

**RELAÇÃO ENTRE MARCADORES GENOTÓXICOS EM USUÁRIOS DE NARGUILÉ**

Bárbara Lidiane Kummer Mallmann

Carina Zuppa

Tiago Mateus Andrade Vidigal

**Resumo**

O objetivo deste trabalho foi utilizar o teste do micronúcleo e o ensaio cometa em amostras de usuários de narguilé para avaliar os efeitos genotóxicos de seu uso. Foram coletadas amostras de sangue e de células epiteliais da mucosa oral de 50 voluntários de ambos os sexos, divididos em grupo controle negativo e grupo teste. Após a coleta das amostras, foram realizados o ensaio cometa e o teste do micronúcleo. A frequência de micronúcleos no grupo teste foi maior e estatisticamente significativa. Os escores do ensaio cometa também foram significativamente mais elevados no grupo teste. Foi possível identificar, por meio dos testes, lesões no DNA em usuários de narguilé, indicando a presença de substâncias genotóxicas. O uso desse tipo de fumaça desencadeia lesões genotóxicas na mucosa oral e no tecido hematopoiético.

Palavras-chave: Ensaio cometa; teste do micronúcleo; lesões no DNA.

**1 INTRODUÇÃO**

Em decorrência das políticas públicas implementadas no Brasil, a prevalência do tabagismo convencional tem diminuído nos últimos anos. Em contrapartida, observa-se o aumento do uso de outras formas de consumo de tabaco, como o narguilé. A fumaça produzida pela queima do carvão utilizado nesse dispositivo contém elevados níveis de compostos tóxicos (LELLELL, FERNANDES, VON DER HAYDE & AZZI, 2016).

O narguilé, também conhecido como narghile, arguile ou shisha, é historicamente utilizado na Ásia e na África e tornou-se popular,

especialmente entre jovens. O equipamento é composto por uma mangueira conectada a um recipiente com água e um forninho superior, no qual o tabaco aromatizado é aquecido por carvão (ELSAIED, DALIBALTA & ABU-FARHA, 2016).

Assim como o cigarro convencional, o narguilé contém substâncias altamente prejudiciais à saúde humana, como nicotina, alcatrão, monóxido de carbono e hidrocarbonetos aromáticos (WHO, 2015). Estudos indicam que seu uso está associado ao desenvolvimento de problemas respiratórios, cardiovasculares e neurológicos (EL-ZATARI, CHAMAM & ZATARI, 2015; ASLAM et al., 2014).

Para avaliar as consequências nocivas do uso do narguilé, podem ser utilizados o teste do micronúcleo associado ao ensaio cometa, amplamente empregados na detecção de danos ao DNA em populações expostas a agentes genotóxicos. O ensaio cometa é uma técnica rápida, sensível e aplicável a diferentes tecidos, capaz de detectar quebras nas fitas de DNA em células individuais (TICE et al., 2000; HARTMANN et al., 2003).

Os micronúcleos são formados por cromossomos inteiros ou fragmentos cromossômicos não incorporados ao núcleo principal durante a divisão celular, sendo indicativos do potencial aneugênico e clastogênico de agentes ambientais (HEDDLE et al., 1991).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo utilizar o teste do micronúcleo e o ensaio cometa como biomarcadores de genotoxicidade associada ao uso do narguilé.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo descritivo, transversal, com o objetivo de realizar uma avaliação clínica, epidemiológica e laboratorial para investigar os efeitos agudos e crônicos do uso de narguilé. Foram avaliados 50 indivíduos de ambos os sexos, maiores de 18 anos, divididos em grupo teste e grupo controle negativo. A seleção dos voluntários foi realizada por conveniência.

O grupo teste foi composto por 25 usuários de narguilé, enquanto o grupo controle negativo foi constituído por 25 indivíduos não usuários. O ensaio cometa e o teste do micronúcleo foram realizados em ambos os grupos com o objetivo de avaliar a genotoxicidade decorrente do uso do narguilé.

Os participantes do grupo teste foram submetidos a uma entrevista por meio de formulário estruturado, contendo questões relacionadas ao tempo e à frequência de uso do narguilé. Foram incluídos indivíduos que relataram utilizar narguilé ao menos uma vez por semana. O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNOESC, sob o parecer nº 66363916.6.0000.5367.

#### Ensaio Cometa

Para a realização do ensaio cometa, foi utilizado o protocolo descrito por Singh, McCoy, Tice e Schneider (1988), com modificações. Lâminas de microscopia limpas foram recobertas com uma fina camada de agarose de ponto de fusão normal (PFN) a 1,5% e deixadas para secagem durante a noite. Sobre essas lâminas foram depositados 5 µL de sangue, misturados a 90 µL de agarose de baixo ponto de fusão (GMP) a 0,75%, mantida a 37 °C. Em seguida, uma lamínula foi colocada sobre cada lâmina.

Após 15 minutos sob refrigeração, as lamínulas foram removidas e as lâminas incubadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10% DMSO, 1% Triton X-100, pH 10) por um período de 2 horas a, no máximo, 24 horas. Posteriormente, as lâminas foram incubadas por 20 minutos em solução desnaturante (30 mM NaOH, 1 mM EDTA), pH > 13, previamente resfriada entre 5 e 8 °C.

A eletroforese foi realizada a 1,19 V/cm e 300 mA por 20 minutos. Após a eletroforese, procedeu-se à neutralização com solução de Tris (392 mM) por 15 minutos. As lâminas foram então fixadas em solução contendo 15%  $\text{CCl}_3\text{COOH}$ , 5%  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 5% glicerol por 10 minutos.

A coloração foi realizada com nitrato de prata, conforme o protocolo descrito por Nadin et al. (2001). Para a coloração, utilizaram-se duas soluções: a primeira contendo carbonato de sódio a 5% e a segunda composta por nitrato de amônio a 0,1%, nitrato de prata a 0,1%, ácido tungstosilícico a 0,25%

e formaldeído a 0,15%, por no mínimo 30 minutos ou até a obtenção da coloração desejada.

Foram analisadas 100 células por lâmina, classificadas em cinco classes de dano previamente estabelecidas: 0, 1, 2, 3 e 4. Após a obtenção das frequências das classes de dano para cada indivíduo, calculou-se a soma dos escores, multiplicando-se o número de células em cada classe pelos valores 0, 1, 2, 3 e 4, correspondentes aos respectivos índices de dano.

#### Teste do Micronúcleo

O teste do micronúcleo foi realizado em células esfoliadas da cavidade oral, conforme os protocolos descritos por Sailaja et al. (2006) e Holland et al. (2008). As amostras coletadas foram armazenadas em solução salina e encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular da UNOESC.

As amostras foram submetidas a três lavagens, sendo a primeira com solução salina e as duas subsequentes com PBS, por centrifugação a 1500 rpm durante 10 minutos. Entre cada lavagem, o sobrenadante foi descartado. Para a confecção das lâminas, 50  $\mu$ L da suspensão celular foram depositados em lâminas previamente aquecidas, realizando-se o esfregaço.

As lâminas foram fixadas em metanol P.A. por 15 minutos e deixadas para secagem em temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período, foram hidratadas por 1 minuto e coradas imediatamente com Giemsa a 10%, em tampão fosfato pH 6,8, por 10 minutos.

Para cada amostra, foram analisadas 1.000 células em microscópio óptico com aumento de 1000X. Os resultados foram expressos como número de micronúcleos por 1.000 células e em porcentagem. Apenas micronúcleos isolados, com coloração semelhante à do núcleo principal e tamanho inferior a um terço deste, foram considerados.

#### Análise Estatística

Os dados foram organizados em banco de dados (Microsoft Excel 2016) e submetidos à análise descritiva, sendo apresentados em frequências para variáveis qualitativas e média  $\pm$  desvio padrão para variáveis quantitativas. A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism 6®. A comparação das médias foi precedida pelo teste de normalidade de

Kolmogorov-Smirnov, com correção de Lilliefors. Como os dados não apresentaram distribuição normal, utilizou-se o teste de Mann-Whitney para dados não paramétricos, considerando-se valores de  $p < 0,05$  como estatisticamente significativos.

#### RESULTADOS

Tanto no grupo controle negativo quanto no grupo teste, a maioria dos cometas observados apresentou classe de dano 0, com médias de 65,95 ( $\pm 17,59$ ) e 45,6 ( $\pm 9,56$ ), respectivamente. As amostras dos grupos controle e teste apresentaram danos de classe 1, com médias de 30,35 ( $\pm 14,20$ ) e 34,8 ( $\pm 7,93$ ).

Lesões de grau 2 estiveram presentes em 85% das amostras do grupo controle e em 100% das amostras do grupo teste, correspondendo a médias de 6,9 ( $\pm 7,27$ ) e 15,1 ( $\pm 5,22$ ), respectivamente. Aproximadamente 25% do grupo controle e 80% do grupo teste apresentaram lesões de grau 3, com médias de 1,3 ( $\pm 2,71$ ) e 4,2 ( $\pm 3,91$ ). Apenas o grupo teste apresentou lesões de grau 4, em cerca de 20% das amostras, com média de 0,7 ( $\pm 1,59$ ).

A partir das classes de dano, foram calculados os escores do ensaio cometa. O grupo controle apresentou escore médio de 49,57 ( $\pm 30,76$ ), enquanto o grupo teste apresentou escore médio de 59,52 ( $\pm 20,44$ ). Os escores do ensaio cometa foram significativamente maiores no grupo teste quando comparados ao grupo controle ( $p = 0,0006$ ).

No teste do micronúcleo, foram analisadas 1.000 células por lâmina. O grupo teste apresentou média de 3,95 ( $\pm 2,13$ ) micronúcleos, enquanto o grupo controle apresentou média de 1,19 ( $\pm 0,6$ ). A frequência de micronúcleos foi significativamente maior no grupo teste ( $p < 0,0001$ ).

#### DISCUSSÃO

Para a avaliação da genotoxicidade decorrente do uso do narguilé, este estudo utilizou o ensaio cometa associado ao teste do micronúcleo. Os resultados demonstraram maiores taxas de genotoxicidade entre os usuários de narguilé em comparação ao grupo controle, em ambos os testes realizados.

O ensaio cometa, também conhecido como eletroforese em gel de célula única, é um método quantitativo capaz de mensurar danos ao material

genético em células eucarióticas, baseando-se no padrão de migração dos fragmentos de DNA em um campo eletroforético (HARTMANN et al., 2003; SINGH et al., 1988). Esses fragmentos resultam de lesões na molécula de DNA induzidas por agentes genotóxicos (BOMBAL, GORDON & BATTY, 2001).

Estudos prévios com usuários de cigarro convencional demonstram resultados semelhantes, com maiores frequências de cometas e micronúcleos em fumantes quando comparados a não fumantes, reforçando o potencial genotóxico da exposição à fumaça do tabaco.

No presente estudo, também foi observada maior frequência de micronúcleos entre os usuários de narguilé. Os micronúcleos são formados por fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros não incorporados ao núcleo durante a divisão celular, sendo considerados importantes indicadores de genotoxicidade (HEDDLE et al., 1991).

A presença de elevadas concentrações de compostos tóxicos na fumaça do narguilé, incluindo nicotina, alcatrão, metais pesados e monóxido de carbono, pode explicar os danos genéticos observados. Além disso, o tempo prolongado das sessões de uso e o grande volume de fumaça inalado aumentam significativamente a exposição aos agentes nocivos.

Assim, os resultados reforçam a evidência de que o uso do narguilé não é uma prática segura e está associado a danos genotóxicos relevantes, além de potenciais prejuízos cardiovasculares, respiratórios e neurológicos descritos na literatura.

### 3 CONCLUSÃO

A frequência de micronúcleos e os escores do ensaio cometa foram significativamente maiores entre jovens usuários de narguilé quando comparados aos não usuários, sugerindo que o uso desse tipo de fumaça desencadeia lesões genotóxicas na mucosa oral e no tecido hematopoiético. A presença de substâncias como tabaco, nicotina e alcatrão, entre outras, bem como a liberação de monóxido de carbono decorrente da queima do carvão, contribuem para o desenvolvimento principalmente de doenças

respiratórias, cardíacas e neurológicas, além de alterações genéticas que favorecem o surgimento de doenças genéticas, como o câncer. Ressalta-se a necessidade de estudos mais abrangentes, com maior número de voluntários e análises das substâncias inaladas durante o uso do narguilé, a fim de identificá-las, bem como da adoção de medidas educativas e preventivas voltadas à redução do consumo dessa prática.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, M. G. Setúbal et al. Micronúcleo: um importante marcador biológico intermediário na prevenção do câncer bucal. *Revista Odonto Ciência*, p. 137–141, s.d.

ASLAM, Hafiz Muhammad; SALEEM, Shafaq; GERMAN, Sidra; QURESHI, Wardah Asif. Harmful effects of shisha: literature review. [S.l.: s.n.], p. 1–9, 2014.

BOMBAIL, Vincent; AW, Dennis; GORDON, Emma; BATTY, Jennifer. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. *Mutation Research*, v. 44, p. 383–392, 2001.

ÇAVAS, Tolga; ERGENE-GÖZÜKARA, Serap. Genotoxicity evaluation of metronidazole using the piscine micronucleus test by acridine orange fluorescent staining. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 19, p. 107–111, 2005.

CHRISTOBHER, S.; PERIYASAMY, M.; MOHAMED, Syed H. E.; BUKHARI, Sadiq A.; KARTHICKKUMAR, A.; BALACHANDAR, V. Cytogenetical analysis in blood lymphocytes of cigarette smokers in Tiruchirappalli district, Tamil Nadu, India. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, v. 18, p. 147–155, 2017.

EKER, Ebru Derici; KOYUNCU, Hayri; DILER, Songul Budak. Determination of genotoxic effects of hookah smoking by micronucleus and chromosome aberration methods. [S.l.: s.n.], p. 4490–4494, 2016.

ELSAYED, Yehya; DALIBALTA, Sarah; ABU-FARHA, Nedal. Chemical analysis and potential health risks of hookah charcoal. *Science of the Total Environment*, v. 569–570, p. 262–268, 2016. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.06.108.

EL-ZAATARI, Ziad M.; CHAMI, Hassan A.; ZAATARI, Ghazi S. Health effects associated with waterpipe smoking. *Tobacco Control*, p. 1–13, 2015.

FROMME, Hermann et al. Indoor air contamination during a waterpipe (narghile) smoking session. *Food and Chemical Toxicology*, v. 47, n. 7, p. 1636–1641, 2009. DOI: 10.1016/j.fct.2009.04.017.

HARTMANN, A. et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. *Mutagenesis*, v. 18, n. 1, p. 45–51, 2003.

HEDDLE, J. A. et al. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 18, p. 277–291, 1991.

HINTZSCHE, Henning et al. Fate of micronuclei and micronucleated cells. *Mutation Research – Reviews in Mutation Research*, v. 771, p. 85–98, 2017. DOI: 10.1016/j.mrrev.2017.02.002.

HOLLAND, Nina 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. *Mutation Research – Reviews in Mutation Research*, v. 659, p. 93–108, 2008.

PEYTON III, Jacob et al. Nicotine, carbon monoxide, and carcinogen exposure after a single use of a water pipe. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, p. 2345–2354, 2011.

Sobre o(s) autor(es)

Bárbara Lidiane Kummer Mallmann, Acadêmica do curso de Farmácia da Unoesc, Campus de São Miguel do Oeste -SC, email: barbaralkm16@gmail.com

Carina Zuppa, Doutorado em Gerontologia Biomédica pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil, Docente da Universidade do Oeste de Santa Catarina, Campus de São Miguel do Oeste, email: carina\_zuppa@unoesc.edu.br

Tiago Mateus Andrade Vidigal, Mestrado em Biotecnologia aplicada à Agricultura pela Universidade Paranaense. Docente da Universidade do Oeste de Santa Catarina, Campus de São Miguel do Oeste, email: tiago.vidigal@unoesc.edu.br