

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

## **AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE DANOS CROMOSSÔMICOS EM CÉLULAS ESFOLIADAS DO LÍQUEN PLANO ORAL, COM O USO DO TESTE DE MICRONÚCLEO**

**Leonardo da Cunha Menezes Souza<sup>1</sup>; José Roberto Cardoso Meireles<sup>2</sup> e Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira<sup>3</sup>**

1. Bolsista PROBIC/UEFS, Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, email: leonmenezes.bio@gmail.com
2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: jrcmeireles@gmail.com
3. Pesquisadora do Laboratório de Genética Toxicológica, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, email: eneida.cerqueira@gmail.com

**PALAVRAS-CHAVE:** líquen plano oral, transformação maligna, danos cromossômicos.

### **INTRODUÇÃO**

O Líquen Plano Oral (LPO) é uma doença inflamatória crônica, de origem auto-imune cujo potencial para progressão à transformação maligna tem registro controverso na literatura (NEVILLE, 1998; GONZALEZ-MOLES *et al.*, 2008). Assim, é importante a identificação de danos genéticos nestas lesões, uma vez que alterações em genes envolvidos com o controle da proliferação e diferenciação celular estão diretamente relacionadas à iniciação do câncer. Entre os diversos marcadores de dano genético, o micronúcleo vem se mostrando eficaz, em diversos trabalhos (CERQUEIRA *et al.*, 1998; CASARTELLI *et al.*, 2000; LEAL-GARZA *et al.*, 2002) como marcador de risco de desenvolvimento de câncer. Micronúcleos são estruturas resultantes de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que não são incluídos no núcleo das células filhas durante a divisão celular. Refletem, portanto, a ocorrência de danos aneugênicos e clastogênicos e, segundo Bonassi *et al.* (2007) são marcadores do risco de câncer. De acordo com Tolbert *et al.* (1991), o compute de alterações nucleares indicativas de apoptose e de necrose, deve ser realizado conjuntamente, pois em níveis excessivos indicam efeitos genotóxicos e efeitos citotóxicos, aumentando dessa forma a sensibilidade do teste. Tendo em vista a controvérsia existente, este estudo objetivou avaliar, com o uso do Teste de Micronúcleo com protocolo diferenciado, a ocorrência de danos cromossômicos e apoptose no epitélio oral de indivíduos com líquen plano.

### **MATERIAL E MÉTODOS**

#### **Grupos Amostrais:**

O presente estudo incluiu dois grupos distintos:

a) Grupo I, constituído por uma amostra de 13 indivíduos com diagnóstico clínico e histopatológico de LPO, encaminhados ao Centro de Referência de Lesões Buciais da Universidade Estadual de Feira de Santana, e à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia;

b) Grupo II, constituído por uma amostra, de 20 indivíduos, sem lesões na mucosa oral, encaminhados à clínica da UEFS para atendimento odontológico de rotina;

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

### **Método:**

O material foi obtido por raspagem gentil da mucosa bucal, da área de lesão (Grupo I) e área de mucosa normal (Grupos I e II). Com o material coletado foi feito esfregaço em lâmina de vidro com uma gota de solução de soro fisiológico (NaCl a 0,09%). O material foi fixado em solução de metanol/ ácido acético (3:1) e processado de acordo com o método de Feulgen & Rossenbeck e contra-corados com fast green a 1% em álcool absoluto por 1 minuto.

### **Análise Citogenética:**

A análise citogenética foi feita sob microscopia óptica e em teste cego com relação aos dados da entrevista. Micronúcleos e alterações indicativas de apoptose foram identificados de acordo com os critérios descritos por Tolbert *et al.* (1991; 1992).

### **Análise Estatística:**

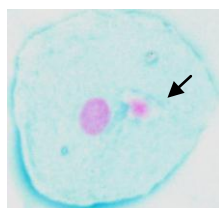
Toda a análise relativa à ocorrência de micronúcleos e alterações indicativas de apoptose foi feita com o uso do Teste Condicional para Comparação de Proporções em Situações de Eventos Raros, que é um teste de significância alternativo ao Teste de Qui-quadrado na linha do Teste Exato de Fisher e adequado à avaliação de eventos citogenéticos quando uma grande amostra de células é necessária para detecção da ocorrência de determinada aberração cromossômica. Em todas as análises o nível de significância foi de 5%.

### **Aspectos Éticos:**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Estadual de Feira de Santana sob protocolo nº 059/2006. A pesquisa, atendendo a Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196/96, foi realizada mediante o consentimento livre e esclarecido dos indivíduos que por si e/ou por seus representantes legais manifestaram sua anuência à participação na pesquisa.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Foi observado nas células obtidas das áreas de lesão dos indivíduos com LPO um número de MN (Fig. 1) significativamente maior do que o observado tanto nas células da mucosa normal desses indivíduos ( $\chi^2 = 7,2045$ ; G.L. = 1;  $p < 0,05$ ) quanto nas dos indivíduos apresentando mucosa oral sem alterações ( $\chi^2 = 4,8289$ ; G.L.= 1;  $p < 0,05$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa quando feita comparação entre a ocorrência de micronúcleos na mucosa normal dos indivíduos com lesão e mucosa bucal dos indivíduos normais ( $\chi^2 = 1,2151$ ; G.L. = 1;  $p > 0,20$ ). Dados apresentados na Tabela 1



Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

Fig. 1 – Célula esfoliada da mucosa oral apresentado um micronúcleo (indicado pela seta)

**Tabela 1.** Dados referentes à ocorrência de micronúcleos entre os Grupos

Grupo	N	MN	#cels	$\chi^2$	Partições do $\chi^2$ ; p; G.L.=1
Caso <sup>M.L.</sup>	13	10	14.139	9,9352 G.L.= 3 p< 0,05	Caso <sup>M.L.</sup> x Caso <sup>M.N.</sup> = 7,2045, p < 0,05
Caso <sup>M.N.</sup>	13	1	13.889		Caso <sup>M.L.</sup> x Controle = 4,8280, p < 0,05
Controle	20	5	22.119		Caso <sup>M.N.</sup> x Controle= 1,2151, p > 0,20

M.L. = Mucosa com Lesão, M.N. = Mucosa Normal, MN= Micronúcleo, #cels= total de células

A análise das alterações indicativas de apoptose, feita do mesmo modo que a análise de MN revelou que a frequência de alterações nucleares indicativas desse processo é significativamente maior nas células obtidas da lesão, tanto quando comparadas à mucosa normal dos indivíduos com LPO ( $\chi^2 = 9,6175$ ; G.L. = 1; p< 0,05), quanto na comparação às células obtidas dos indivíduos controle ( $\chi^2 = 44,9628$ , p<0,001). Ocorrência de apoptose foi também maior na mucosa normal dos indivíduos com lesão quando feita a comparação com os indivíduos controle ( $\chi^2 = 9,9638$ ; G.L. = 1; p< 0,05). Dados apresentados na Tabela 2

**Tabela 2.** Dados referentes à ocorrência de apoptose (Apo) entre os Grupos

Grupo	N	Apo*	#cels	$\chi^2$	Partições do $\chi^2$ ; p; G.L.=1
Caso <sup>M.L.</sup>	13	500	14.139	44,8306 G.L. = 3 p<0,001	Caso <sup>M.L.</sup> x Caso <sup>M.N.</sup> = 9,6175, p < 0,05
Caso <sup>M.N.</sup>	13	399	13.889		Caso <sup>M.L.</sup> x Controle= 44,9628, p < 0,001
Controle	20	515	22.119		Caso <sup>M.N.</sup> x Controle= 9,9638, p < 0,05

M.L. = Mucosa com Lesão, M.N. = Mucosa Normal, #cels= total de células, \* $\Sigma$  cromatina condensada, picnose e cariorréxis

Apesar desta controvérsia, os resultados encontrados no presente estudo apontam para um aumento significativo na frequência de MN, em indivíduos com LPO. Este aumento, também encontrado em outras lesões sabidamente pré-malignas (CERQUEIRA *et al.*, 1998; CASARTELLI *et al.*, 2000; LEAL-GARZA *et al.*, 2002), sugere que o LPO possa estar relacionado a estágios iniciais de carcinogênese, se caracterizando como uma lesão pré-maligna. As alterações indicativas de apoptose revelaram-se significativamente mais frequentes no epitélio oral dos indivíduos com LPO, tanto na área da lesão quanto na mucosa normal dos indivíduos com lesão quando comparadas aos indivíduos sem alterações na mucosa oral. A frequência também foi significativamente maior na área da lesão quando comparada à mucosa normal dos mesmos indivíduos. Segundo Tolbert *et al.*, (1991,1992) a apoptose em excesso reflete genotoxicidade, podendo ser um importante marcador de resposta para eventos iniciais de carcinogênese. Estes achados dão suporte a estudos que reportaram maiores taxas de transformação maligna em indivíduos que apresentavam esta lesão, quando comparados a população geral (RÖDSTRÖM *et al.*, 2003; GANDOLFO *et al.*, 2003).

## CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste estudo, apesar do pequeno número de indivíduos com lesões, revelam uma maior ocorrência de danos cromossômicos nas células obtidas da mucosa afetada dos indivíduos com Líquen Plano Oral, apontando para o potencial dessas lesões em evoluir para a transformação maligna. Evidenciam também o Teste de Micronúcleo com protocolo diferenciado para contagem de fenômenos indicativos de apoptose como efetiva ferramenta para o biomonitoramento de indivíduos portadores dessas lesões. Devido ao pequeno número amostral faz-se necessário a realização de estudos subseqüentes, incluindo um maior número de pacientes, com objetivo de obter resultados mais conclusivos.

## REFERÊNCIAS

- GONZALES-MOLES, M. A.; SCULLY, C.; GIL-MONTOYA, J. A. Oral lichen planus: controversies surrounding malignant transformation. *Oral Diseases*, v. 14, p. 229-243, 2008.
- BONASSI, S. et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, v. 28, p. 625-631, 2007.
- GANDOLFO, S. et al. Risk of oral squamous cell carcinoma in 402 patients with oral lichen planus: a follow-up study in an Italian population. *Oral Oncol.*, v. 40, p. 77-83, 2003.
- RÖDSTRÖM, P. O. et al. Cancer and oral lichen planus in a Swedish population. *Oral Oncol.*, v. 40, p.131-138, 2003.
- CASARTELLI, G. et al. Micronucleus frequencies in exfoliated buccal cells in normal mucosa, precancerous lesions and squamous cell carcinoma, *Anal. Quant. Cytol. Histol.*, v. 22, p. 486-492, 2000.
- RAJENTHERAN, R. et al. Malignant transformation of oral lichen planus. *Eur. J. Surg. Oncol.*, v. 25, p. 520-523, 1999.
- CERQUEIRA, E. M. M. et al. Genetic Damage in Exfoliated Cells of the Uterine Cervix: Association and Interaction Between Cigarette Smoking and Progression to Malignant Transformation? *Acta Cytol.*, v. 42, p. 639-649, 1998.
- NEVILLE, B. W. *Patologia oral & maxilofacial*. Rio de Janeiro: Koogan, 1998. p. 705.
- TOLBERT, P. E.; SHY C. M.; ALLEN, J. W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. *Am J Epidemiol.*, v. 134, p. 840-50, 1991.
- TOLBERT, P. E.; SHY C. M.; ALLEN, J. W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat. Res.*, v. 271, p. 69-77, 1992.