

FREQUÊNCIA DE ALTERAÇÕES NUCLEARES EM PORTADORES DE LESÃO ORAL COM POSSÍVEL POTENCIAL PRÉ-MALIGNO

Leonardo da Cunha Menezes Souza¹ ; José Roberto Cardoso Meireles²

1. Bolsista FAPESB, Graduando do Curso de Licenciatura 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, email: jrcmeireles@gmail.com

PALAVRAS-CHAVES: micronúcleo, lesão oral, apoptose

INTRODUÇÃO

Entre os diversos tipos de lesões orais que ocorre na população humana, o Líquen Plano Oral (LPO) acomete aproximadamente 2% da população adulta em todo o mundo (SUGERMAN *et al.*, 2000). O LPO é uma doença inflamatória crônica, de origem auto-imune cujo potencial para progressão à transformação maligna tem registro controverso na literatura (GANDOLFO *et al.*, 2003; RÖDSTRÖM *et al.*, 2003; SCULLY ; CAROZZO, 2007; BERMEJO-FENOLL *et al.*, 2009). O biomonitoramento de lesões pré-malignas, estratégia efetiva na prevenção do câncer, tem sido realizado com a utilização de diversos marcadores, dentre estes o micronúcleo. Micronúcleos (MN) são estruturas resultantes de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros que não são incluídos no núcleo das células filhas durante a divisão celular (HOLLAND *et al.*, 2008). Refletem, portanto, a ocorrência de danos aneugênicos e clastogênicos e, segundo Bonassi *et al.* (2007), são marcadores de risco de câncer. Tendo em vista que o câncer é resultante de alterações em genes comprometidos com os mecanismos de reparo do DNA e com o controle da proliferação e da diferenciação celular, no presente estudo foram avaliados danos cromossômicos, traduzidos como MN, e alterações nucleares indicativas de apoptose no epitélio oral de indivíduos com LPO, objetivando contribuir para a avaliação dos riscos desta lesão em evoluir para o câncer oral.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo incluiu dois grupos distintos: Grupo I, constituído por uma amostra de 16 indivíduos com diagnóstico clínico e histopatológico de LPO, encaminhados ao Centro de Referência de Lesões Bucais da Universidade Estadual de Feira de Santana, e à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia; Grupo II, constituído por uma amostra de vinte indivíduos, sem lesões na mucosa oral, encaminhados à clínica odontológica da Universidade Estadual de Feira de Santana para atendimento de rotina.

Questionário contendo indagações a respeito de idade, hábitos de higiene bucal, consumo de tabaco, ingestão de bebidas alcoólicas, exposição a agentes genotóxicos conhecidos, uso de medicamentos, uso de próteses e ocorrência de câncer na família foi aplicado a todos os indivíduos, que também foram submetidos a exame clínico oral. As células foram coletadas por raspagem gentil da mucosa bucal, das regiões com lesão (Grupo I) e regiões com aspecto normal (Grupos I e II). Foi feito esfregaço em lâmina de vidro do material obtido, com uma gota de solução de soro fisiológico (NaCl a 0,9%). O material foi fixado em solução de metanol/ácido acético (3:1). Depois de 24h as preparações foram coradas com o reagente de Schiff (método de Feülgen e Rossenbeck) e contra-coradas com fast green a 1% em álcool absoluto por 1 minuto.

A análise das alterações nucleares foi feita em um mínimo de mil células, sob microscopia óptica e em teste cego quanto aos dados do questionário. Para identificação dos micronúcleos e alterações indicativas de apoptose foram adotados os critérios descritos por Tolbert *et al.* (1991; 1992).

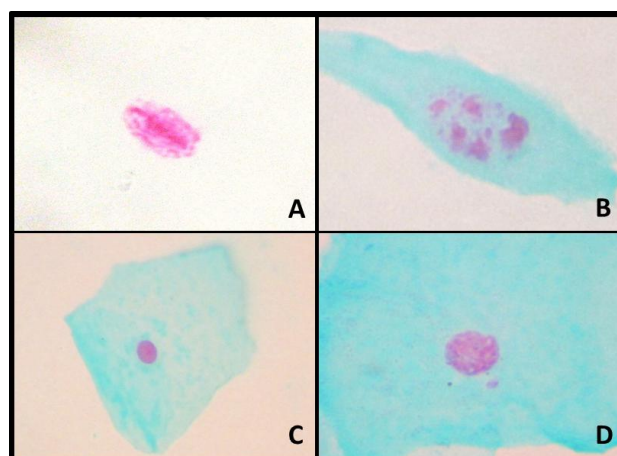


Fig.1 Fotomicrografia de células apresentando cromatina condensada (A) cariorréxis (B), picnose (C) e micronúcleo (D)

Toda a análise relativa à ocorrência de micronúcleos e alterações indicativas de apoptose foi realizada 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. Em todas as análises o nível de significância adotado foi de 5%.

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.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A média de idade do Grupo I foi $49,93 \pm 14,2943$ e a do Grupo II $54,9 \pm 10,2335$ anos. Quanto ao gênero, o Grupo I foi constituído por 12 mulheres e quatro homens e o Grupo II por 14 mulheres e seis homens.

A avaliação da ocorrência de MN entre os grupos mostrou diferenças significantes. As partições de qui-quadrado revelam que nas células obtidas das áreas de lesão dos indivíduos com LPO o número de MN foi significativamente maior do que o observado tanto nas células da mucosa normal desses indivíduos quanto nas dos indivíduos apresentando mucosa oral sem alterações. 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.

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

Grupo	N	MN	#cels	χ^2	Partições do χ^2 ; p; G.L.=1
Caso ^{M.L.}	16	11	17.300	10,1768	Caso ^{M.L.} x Caso ^{M.N.} = 8,1825, p < 0,05
Caso ^{M.N.}	16	1	17.039	G.L.= 2 p < 0,05	Caso ^{M.L.} x Controle = 4,0162, p < 0,05
Controle	20	5	22.119		Caso ^{M.N.} x Controle = 1,7594, 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 também revelou diferença significativa. As partições de qui-quadrado revelam que a frequência de alterações nucleares indicativas desse processo foi significativamente maior nas células obtidas da lesão, tanto quando comparadas à mucosa normal dos indivíduos com LPO quanto na comparação às células obtidas dos indivíduos controle. Ocorrência de apoptose foi também maior na mucosa normal dos indivíduos com lesão quando feita a comparação com os indivíduos controle. Dados apresentados na Tabela 2.

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

Grupo	N	Apo*	#cels	χ^2	Partições do χ^2 ; p; G.L.=1
Caso ^{M.L.}	16	587	17.300	28,5365	Caso ^{M.L.} x Caso ^{M.N.} = 10,8018, p < 0,05
Caso ^{M.N.}	16	472	17.039	p<0,001	Caso ^{M.L.} x Controle = 39,3662, p < 0,001
Controle	20	515	22.119		Caso ^{M.N.} x Controle = 7,4532, p < 0,05

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

A natureza pré-maligna do líquen plano oral é ainda bastante discutida. Resultados de diferentes estudos indicam taxas heterogêneas de transformação maligna, que variam entre 0% a 12,5%, refletindo a discordância entre os autores na determinação do potencial dessa lesão em evoluir para o câncer oral (GONZALES-MOLES *et al.*, 2008).

Os resultados encontrados no presente estudo corroboram dados de outros trabalhos em que também foi avaliada a frequência de MN neste tipo de lesão (Buajeeb *et al.*, 2007; Buajeeb *et al.*, 2008; Sanchez-Siles *et al.*, 2011). Considerando os dados oriundos de estudos em que foi avaliada a associação da maior frequência de micronúcleos nas lesões pré-malignas e malignas do epitélio oral (CERQUEIRA *et al.*, 1998; LEAL-GARZA *et al.*, 2002) os resultados obtidos apontam para a probabilidade de progressão do LPO para o câncer, equiparando-se a outras lesões sabidamente pré-malignas a exemplo da leucoplasia e eritroplasia, que têm sido mostradas em associação com frequências aumentadas de MN (CASARTELLI *et al.*, 2000; HALDER *et al.*, 2004). As alterações indicativas de apoptose também se mostraram mais frequentes na área da lesão, dando suporte aos dados obtidos com MN visto que tais alterações em excesso indicam efeitos genotóxicos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados obtidos neste estudo apontam 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. A realização de estudos subsequentes, incluindo um maior número de pacientes, faz-se necessária, com objetivo de obter resultados mais conclusivos.

REFERÊNCIAS

- BERMEJO-FENOLL, A. *et al.* Premalignant nature of oral lichen planus. A retrospective study of 550 oral lichen planus patients from south-eastern Spain. **Oral Oncol.**, 2009.
- 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.

BUAJEED, W. *et al.* Frequency of micronucleated exfoliated cells in oral lichen planus. **Mutat Res.**, v. 627, p. 191–196, 2007.

BUAJEED, W. *et al.* Reduction of the micronuclei in oral lichen planus supplemented with beta-carotene. **J Oral Sci.**, v. 50, p. 461-467, 2008.

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.

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.

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

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.

HALDER, A. *et al.* Comparative study of exfoliated oral mucosal cell micronuclei frequency in normal, precancerous and malignant epithelium. **Int J Hum Genet.**, v. 4, p. 257-260, 2004.

HOLLAND, N. *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-Reviews in Mutat Res.**, v. 659, p. 93-108, 2008.

RÖDSTRÖM, P. O. *et al.* Cancer and oral lichen planus in a Swedish population.. **Oral Oncol.**, v. 40, p.131-138, 2003.

SANCHEZ-SILES, M. *et al.* A novel application of the buccal micronucleus cytome assay in oral lichen planus: A pilot study. **Arch Oral Biol.**, p. 1-6, 2011.

SCULLY, C.; CAROZZO, M. Oral mucosal disease. **Br J Oral Maxillofac Surg.**, 46: 15–21. 2007

SUGERMAN, P. B. Oral Lichen Planus. **Clin Dermatol.**, v. 18, p. 533–539, 2000.

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.