

AVALIAÇÃO CITOGENÉTICA COM USO DO TESTE DE MICRONÚCLEO DE LÍQUEN PLANO ORAL

Isis Freitas Ribeiro¹; José Roberto Cardoso Meireles²

1- Bolsista FAPESB, Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: isisribeirofsa@gmail.com

2- Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: jrcmeireles@gmail.com

PALAVRAS CHAVE: Líquen plano; Micronúcleo; Citogenética.

INTRODUÇÃO

O líquen plano oral (LPO) é uma inflamação crônica do epitélio escamoso estratificado de etiologia desconhecida, mas provavelmente auto-imune mediada por células T como sugere Scully e Carozzo (2007). Rödströmet *al.* (2003) e Gandolfoet *al.* (2003) sugerem que a inflamação pode ser de natureza pré-maligna, entretanto este é ainda um fator controverso.

Gandolfoet *al.* (2003) avaliaram em um estudo que incluiu 402 indivíduos com LPO a taxa de transformação maligna e identificaram que o risco de desenvolvimento de câncer nesta amostra era significativamente maior quando comparado com risco de desenvolvimento de câncer oral em populações sem lesão na cavidade bucal. Rödströmet *al.* (2003) em uma avaliação de 1028 suecos com LPO também encontraram uma taxa de transformação maligna significativamente maior do que a observada na população geral do país, uma evidência, segundo os autores da maior probabilidade de indivíduos com esta inflamação desenvolverem câncer. Estudos desta natureza são escassos na literatura e a despeito destes resultados Souza *et al.* (2005) pondera que não há dados suficientes acerca de um consenso do potencial maligno destas lesões.

Neste contexto, o teste de micronúcleo tem sido utilizado no biomonitoramento de lesões pré-malignas em diferentes epitélios (CERQUEIRA *et al.*, 1998; CASARTELLI *et al.*, 2000; LEAL-GARZA *et al.*, 2002). Micronúcleos são corpúsculos citoplasmáticos, feulgen positivos e com diâmetro entre 1/3 e 1/6 do núcleo, formados de cromossomos inteiros que não foram incorporados ao núcleo devido a falha no fuso ou fragmento de cromossomo decorrente de sua quebra. Deste modo refletem a ação de agentes clastogênicos e/ou aneugênicos e podem, segundo Bonassi *et al.* (2003), ser considerados marcadores de carcinogênese.

Considerando portanto a falta de consenso da natureza pré-maligna do LPO, a importância da avaliação genotóxica das lesões com potencial para transformação maligna e eficácia do teste de micronúcleo, o objetivo deste estudo foi identificar a ocorrência de micronúcleo em indivíduos com LPO para avaliar os riscos desta lesão evoluir para o câncer.

MATERIAL E MÉTODOS

AMOSTRA

A amostra foi constituída por vinte indivíduos distribuídos em dois grupos:
Grupo I: dez indivíduos com diagnóstico clínico e histopatológico de LPO;
Grupo II: dez indivíduos sem lesão oral.

Objetivando caracterizar esta amostra, todos os indivíduos foram entrevistados com aplicação de um questionário e submetidos a avaliação oral realizada por um cirurgião dentista.

TESTE DE MICRONÚCLEO

Com auxílio de uma escova endocervical células da mucosa oral foram coletadas. Nos indivíduos do Grupo I foram coletadas células evidentemente de mucosa sem lesão e naqueles do Grupo II foram coletadas células da mucosa sem lesão e com lesão.

O material foi coletado e transferido, por esfregaço, para lâmina de microscopia estéril contendo duas gotas de soro fisiológico (NaCl 0,9%). Após secagem à temperatura ambiente as lâminas foram submersas em solução de metanol/ácido acético (3:1) por trinta minutos para fixação do material biológico que após 24h de secagem a temperatura ambiente foi com o reativo de Shift e contra-corado com *fastgreen*.

A análise citogenética em microscopia óptica foi realizada em teste cego com relação aos dados do questionário. Foram analisadas 2.000 células e adotados os critérios de identificação de micronúcleo descritos por Sarto *et al.* (1987) e Tolbert *et al.* (1992).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste condicional para comparação de proporções em situações de eventos raros (BRAGANÇA-PEREIRA, 1991) foi utilizado para análise estatística da ocorrência de micronúcleo entre os grupos.

ASPECTOS ÉTICOS

O projeto tem aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Feira de Santana (protocolo nº 059/2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O potencial pré-maligno do LPO é controverso. Segundo Rajentheran *et al.*, (1999) nos estudos que avaliam a frequência de transformação maligna destas lesões as taxas variam entre 0% a 5,6%. A doença é afeta geralmente indivíduos entre 40 e 70 anos de idade (RANDAZZO *et al.*, 2005; SCULLY e CAROZZO, 2007), estando de acordo com esses dados a média de idade das pessoas que compuseram a amostra deste estudo (tabela I).

Na tabela I pode-se observar que as características dos indivíduos da amostra deste estudo foram similares, uma vez buscou-se parear a amostra para que outros fatores como idade e estilo de vida não interferissem nos resultados referentes a ocorrência de micronúcleo. É importante no entanto ressaltar que a higiene bucal dos indivíduos do grupo I foi em geral inferior, o que pode também ter contribuído para o desenvolvimento do LPO.

Tabela I – Características da amostra

		Grupo	
Características		I	II
Média de idade		52,3±10	50,2±11
Sexo			
	Homem	6	6
	Mulher	4	4
Hábito de fumar			

Não fumantes	8	8
Fumantes	2	2
Hábito de beber		
Consumidores	7	7
Não-Consumidores	3	3
Higiene bucal		
Boa	3	8
Regular	5	12
Péssima	2	0

Nos indivíduos do grupo I as lesões identificadas foram dos tipos reticular, erosivo e em placa na mucosa jugal e língua, resultado com os dados de Scully e Carozzo (2007). Segundo estes autores o LPO pode afetar quaisquer regiões da boca, entretanto é mais comum na língua, gengiva e mucosa labial.

A análise estatística revelou que a ocorrência de micronúcleo observada na mucosa com lesão dos indivíduos do grupo I foi significativamente maior em relação a frequência deste marcador em células da mucosa sem lesão destes próprios indivíduos e daqueles do grupo II. Não foi identificada diferença estatística entre a ocorrência de micronúcleo na mucosa normal dos indivíduos com lesão (grupo I) e mucosa bucal dos indivíduos normais (grupo II). Estes dados referentes à ocorrência de micronúcleo são apresentados na tabela II.

Tabela II – Dados referentes à ocorrência de micronúcleos entre os grupos

Grupo	MN	#cels	χ^2	Partições do χ^2 ; p; G.L.=1
I ^{Mucosa com LPO.}	13	20.000	13,3333	I ^{Mucosa com LPO} x I ^{Mucosasemlesão} ; $\chi^2 = 8,0667$, p < 0,05
I ^{Mucosasemlesão}	2	20.000	G.L.= 2 p < 0,05	I ^{Mucosa com LPO} x II; $\chi^2 = 6,2500$, p < 0,05
II	3	20.000		I ^{Mucosasemlesão} . x II; $\chi^2 = 0,2000$, p > 0,20

Legenda: MN= Micronúcleo, #cels= total de células

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos com objetivo de avaliar a ocorrência de micronúcleo tem sido escassos. Buajeet *et al.* (2007; 2008) avaliaram a frequência deste *endpoint* em 22 indivíduos com diagnóstico clínico e histopatológico de LPO atrófico ou erosivo, e em 22 indivíduos sem lesão oral. Estes autores também identificaram frequência significativamente maior de células micronucleadas nas lesões de líquen plano quando comparadas àquelas obtidas tanto da mucosa normal dos indivíduos sem lesão, quanto das regiões de mucosa normal dos indivíduos com lesão. A maior ocorrência de micronúcleo foi identificada por muitos autores em diversas lesões sabidamente pré-malignas (CERQUEIRA *et al.*, 1998; CASARTELLI *et al.*, 2000; LEAL-GARZA *et al.*, 2002).

Os resultados do presente estudo corroboram aqueles que referiram maiores taxas de transformação maligna em indivíduos com LPO (RÖDSTRÖM *et al.*, 2003; GANDOLFO *et al.*, 2003). Assim, considerando as condições de realização do estudo, os resultados sugerem que o LPO é uma lesão potencialmente pré-maligna.

REFERÊNCIAS

- BONASSI, S., NERI, M., LANDO, C., CEPPI, M., LIN, YP., CHANG, W. P., HOLLAND, N., KIRSCH-VOLDERS, M., E. ZEIGER & M. FENECH. 2003. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. *Mutat. Res.* 543: 155-166.
- BRAGANÇA-PEREIRA, C. A., 1991. Teste estatístico para comparar proporções em problemas de citogenética. In: RABELLO-GAY, M. N., M. A. LA. R. RODRIGUES & R. MONTELEONE NETO. *Mutagênese, carcinogênese e teratogênese: Métodos e critérios de avaliação*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética, pp. 113-121.
- BUAJEEB, W., KRAIVAPHAN, P., C. AMORNCHAT & T. TRIRATANA. 2007. Frequency of micronucleated exfoliated cells in oral lichen planus. *Mutat. Res.* 627: 191-196.
- BUAJEEB, W., KRAIVAPHAN, P., AMORNCHAT, C. & SUTHAMAJARIYA K. Reduction of the micronuclei in oral lichen planus supplemented with beta-carotene. 2008. *J Oral Sci.* 50: 461-467.
- CASARTELLI, G., BONATTI, S., FERRARI, M. De., SCALA, M., MEREU, P., G. MARGARINO & A. ABBONDANDOLLO. 2000. Micronucleus frequencies in exfoliated buccal cells in normal mucosa, precancerous lesions and squamous cell carcinoma, *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 22: 486-492.
- CERQUEIRA, E. M. M., SANTORO, C. L., DONOZO, N. F., FREITAS, B. A., BRAGANÇA-PEREIRA, C. A., R. G. BEVILACQUA & G. M. MACHADO-SANTELLI. 1998. Genetic Damage in Exfoliated Cells of the Uterine Cervix: Association and Interaction Between Cigarette Smoking and Progression to Malignant Transformation? *Acta Cytol.* 42: 639-649.
- GANDOLFO, S., RICHIARDI, L., CARROZZO, M., BROCCOLETTI, R., CARBONE, M., PAGANO, M., VESTITA, C., S. ROSSO & F. MERLETTI. 2003. Risk of oral squamous cell carcinoma in 402 patients with oral lichen planus: a follow-up study in an Italian population. *Oral Oncol.* 40: 77-83.
- LEAL-GARZA, C. H., CERDA-FLORES, R.M., E. LEAL-ELIZONDO & E. I. CORTÉS-GUTIÉRREZ. 2002. Micronuclei in cervical smears and peripheral blood lymphocytes from women with and without cervical uterine cancer. *Mutat. Res.* 515: 57-62.
- RAJENTHERAN, R., MCLEAN, N. R., KELLY, C. G., M. F. REED & A. NOLAN. 1999. Malignant transformation of oral lichen planus. *Eur. J. Surg. Oncol.* 25: 520-523.
- RANDAZZO, A. R., S. A. F. AMORMINO & C. R. MARTINS. 2005. Líquen plano bucal e hepatite C: revisão da literatura. *Rev. de Clín. Pesq. Odontol.* 1: 37-40
- RÖDSTRÖM, PO., MATSSON, J., U. MATTSSON & E. HOLMBERG. Cancer and oral lichen planus in a Swedish population. 2003. *Oral Oncol.* 40: 131-138.
- SARTO, F., FINOTTO, S., GIACOMELLI, L., MAZZOTTI, D., TOMANIN, R. & LEVIS, A. G. 1987. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. *Mutagenesis* 2: 11-17.
- SCULLY, C. & M. CAROZZO. 2007. Oral mucosal disease. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 46: 15-21.
- SOUSA, F. A. C. G., FONTES, P. C., A. BOLANHO & L. E. B. ROSA. 2005. Estudo comparativo entre o líquen plano e o carcinoma epidermóide em mucosa bucal. *Cienc. Odontol. Bras.* 8: 55-60.
- TOLBERT, P. E., C. M SHY & J. W. ALLEN. 1992. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears