

MICRONÚCLEO: UM IMPORTANTE MARCADOR BIOLÓGICO INTERMEDIÁRIO NA PREVENÇÃO DO CÂNCER BUCAL

MICRONUCLEI: AN IMPORTANT INTERMEDIATE BIOMARKER ON ORAL CANCER PREVENTION

Andrade, Miguel Gustavo Setúbal*
Reis, Sílvia Regina de Almeida**
Robinson, Wanyce Miriam***
Borges-Osório, Maria Regina***

RESUMO

A preocupação com a prevenção do câncer da boca e da orofaringe tem motivado diversos estudos epidemiológicos que, apesar de serem úteis em identificar fatores de risco, os indivíduos da amostra já tinham desenvolvido a neoplasia maligna. Outros estudos são conduzidos para investigar a incidência de leucoplasias e segundo tumor primário em indivíduos submetidos a um determinado agente de prevenção. Nesses estudos, entretanto, as alterações celulares são constatadas num momento avançado. Este trabalho se propõe a discutir o papel do micronúcleo, uma alteração cromossômica capaz de refletir a exposição dos indivíduos a carcinógenos, como marcador biológico intermediário na prevenção do câncer bucal e na avaliação de estudos prospectivos.

UNITERMOS: câncer de boca; marcadores biológicos intermediários; micronúcleo.

SUMMARY

The concern with the prevention of mouth and oropharynx cancer has motivated epidemiological studies that, although useful on identify risk factors, the individuals of the sample had already developed the malignant neoplasia. Other studies are lead to verify the incidence of leucoplasias and second primary tumors in individuals submitted to a specific prevention agent. In these studies, however, cellular alterations are evidenced at an advanced stage. This work is proposed to argue the role of micronuclei, a chromosomal alteration able to reflect carcinogen exposition of an individual, as intermediate biomarker in the prevention of oral cancer and in the evaluation of prospective studies.

UNITERMS: mouth cancer; intermediate biomarkers; micronuclei.

INTRODUÇÃO

O carcinoma escamocelular é uma neoplasia epitelial maligna que representa 90% de todos os casos de tumores malignos da cavidade bucal. Sua localização intrabucal mais comum é a língua, em bordos laterais ou superfície ventral, seguida pelo

assoalho da boca. Acredita-se que os carcinomas bucais, na sua maioria são precedidos por lesões clinicamente detectáveis, como ulcerações, leucoplasias e eritroplasias ou a combinação destas condições⁵.

No Brasil, a incidência de carcinomas escamocelulares difere substancialmente nas diferen-

* Mestre em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Doutorado em Imunologia, Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

** Professora Doutora do Departamento de Diagnóstico e Terapêutica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia.

*** Professores Doutores do Programa Pós-Graduação em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

tes regiões, e esse fato se deve possivelmente aos diversos fatores de risco^{18,19}. O fumo⁵ e o uso excessivo de álcool^{20,21}, comuns a inúmeros processos patológicos, têm tido especial interesse na etiopatogenia do câncer de boca e do trato aerodigestivo. O mecanismo que associa esses agentes a um aumento do risco, fundamenta-se em suas composições químicas e na interação com outros fatores. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos presentes no tabaco e produtos resultantes da nitrosação da nicotina atuam como iniciadores e promotores da carcinogênese¹². Por sua vez, a ação carcinogênica do etanol está associada a uma variedade de mecanismos, incluindo deficiências nutricionais, indução de enzimas microsossomais que aumentam a ativação metabólica do tabaco e a sua capacidade de solubilizar e incrementar sua penetração nos tecidos orofaríngeos. Atualmente, muita tem-se enfatizado bastante o papel do acetaldeído, o primeiro metabolito da oxidação do etanol, que promove mutações pontuais em bases de guanina, alterações cromossômicas grosseiras além de inibir a enzima que atua no reparo do DNA²¹.

Estudos epidemiológicos retrospectivos têm demonstrado determinantes adicionais no risco do câncer bucal, como presença de irritações crônicas produzidas por prótese mal adaptada, arestas dentais pontiagudas, uso de anti-sépticos bucais e recentemente o baixo consumo de frutas e verduras ricas em vitaminas A, C e β -caroteno^{6,7,27}. Esses estudos, no entanto, são complexos e demandam amostras grandes para obterem resultados conclusivos²⁸. Uma alternativa menos dispendiosa para avaliar a importância e a eficácia de agentes preventivos é a utilização de marcadores biológicos intermediários que sinalizem um processo de agressão ao organismo. O grau de exposição a carcinógenos pode ser mensurado através da avaliação de alterações histológicas, genéticas, e enzimáticas^{10,14} que acontecem durante as fases da carcinogênese e, portanto, anterior ao aparecimento clínico da neoplasia maligna. Esses marcadores podem servir como sinais para avaliação da eficácia de agentes preventivos ou da diminuição da exposição aos carcinógenos.

Neste trabalho, através de uma revisão da literatura, serão discutidos alguns aspectos relevantes no estudo do câncer bucal, dando ênfase ao micronúcleo como marcador biológico da mucosa bucal frente à ação de carcinógenos associados à ocorrência de carcinomas escamocelulares da boca.

LEUCOPLASIA

A leucoplasia é definida como uma placa branca que não pode ser removida pela raspagem e não pode ser classificada, clinicamente nem microscopicamente, como uma outra entidade patológica. Apresenta-se histologicamente como hiperkeratoses associadas ou não a displasias, possui crescimento lento, é potencialmente reversível e é considerada uma lesão pré-maligna bucal. Estratégias que impliquem em sua reversão poderão identificar agentes úteis na prevenção do câncer da boca e da orofaringe.

A administração de suplementação de vitamina A, β -caroteno ou retinóides tem sido responsável pela remissão de leucoplasias na cavidade bucal^{8,26,25}. STICH et al.²⁶ (1991), comparou a remissão de leucoplasias orais após a administração de 22 μ mol de beta-caroteno ou de 60 mg de vitamina A durante duas semanas, com a associação de 22 μ mol de b-caroteno com 30 mg de vitamina A e verificou um maior índice de remissão das lesões nos indivíduos que receberam apenas a vitamina A. Esses pacientes não tiveram novas leucoplasias e a taxa de recidiva foi bem menor. Esses achados apontam que a vitamina A apresenta superioridade na remissão de leucoplasias, quando comparada com o β -caroteno.

Por ser uma lesão pré-maligna, o aparecimento da leucoplasia pode ser um indício de que a mucosa bucal está sendo agredida por carcinógenos, indicando dessa forma, que no sítio onde elas se formam estão ocorrendo alterações genotóxicas.

Alguns autores relatam que essas lesões possuem um baixo potencial de malignidade⁸, caracterizando-se como fraco preditivo da progressão para um carcinoma¹⁰. Além disso, é relatada a sua baixa especificidade para determinar a exposição a carcinógenos. Apesar da controvérsia encontrada na literatura, a leucoplasia é uma lesão cancerizável e é considerada como um agente na identificação de indivíduos com risco de desenvolver câncer bucal.

SEGUNDO TUMOR PRIMÁRIO

O trato aerodigestivo superior é revestido por uma membrana mucosa com diferentes sítios para cancerização. Esses sítios incluem as diversas partes da cavidade bucal^{18,29}, a orofaringe^{4,7,18} e o esôfago²⁹, sensíveis aos mesmos de fatores de risco, especificamente, o hábito de fumar e o consumo de bebidas alcoólicas. Portanto, pacientes que foram curados de um câncer na cavidade bucal são

indivíduos que apresentam um alto risco para o desenvolvimento de um segundo primário na cavidade bucal ou em outra região de cabeça e pescoço⁴. O desenvolvimento de um segundo tumor primário tem sido utilizado em ensaios populacionais preventivos como modelo para avaliar a eficácia de micronutrientes antioxidantes⁸. Esses estudos baseiam-se no princípio de que os nutrientes ajudariam a reverter a ocorrência de defeitos na mucosa que tornariam os indivíduos sujeitos a um segundo tumor primário. Nesses trabalhos, têm sido usados retinóides sintéticos ou β -caroteno como agentes de prevenção^{9,12}. Os resultados apontam que indivíduos que fizeram uso destes micronutrientes, após a cura do primeiro tumor, apresentavam uma incidência menor do segundo primário. Os carotenóides aumentam a resistência tecidual por promoverem maior migração de macrófagos para regiões sob ação de carcinógenos e maior secreção de fator de necrose tumoral por estas células imunológicas²².

MICRONÚCLEO: MARCADOR BIOLÓGICO INTERMEDIÁRIO

A agressão ao DNA da célula ocorre constantemente por agentes oxidantes. Estes agentes são administrados diretamente como no caso da fumaça do cigarro, que é rica em peróxidos, superóxidos e produtos nitrogenados^{11,17}, ou resultam da metabolização de alimentos¹⁴ e bebidas alcoólicas^{20,21}, cujos metabólitos são nitrosaminas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos³⁰ e acetaldeído²¹. Entretanto, a evolução de uma célula normal para uma célula com alto poder mitótico é um processo longo e conseqüente ao acúmulo de exposições sucessivas. Assim, o defeito genético acumula-se entre as fases de pré-malignidade e malignidade e expressa-se, entre outras formas, pelo aumento do conteúdo nuclear, pela formação de fragmentos de DNA nas células expostas ou pela expressão de proteínas oxidativas¹⁰. Tais transformações indicam que essas células estão em processo de transformação maligna e podem, portanto funcionar como marcadores indicativos do grau de exposição do tecido a carcinógenos.

Na cavidade bucal, a formação de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa tem sido utilizada como marcador biológico intermediário para avaliar o efeito preventivo de protocolos de quimioprevenção ou o grau de comprometimento da mucosa bucal.

O micronúcleo consiste numa porção citoplasmática de cromatina de forma redonda ou ovala-

da que se localiza perto do núcleo (Figura 1). A sua formação resulta de uma lise na molécula de DNA dias ou semanas após a ação de carcinógenos quando as células da camada basal estão em divisão^{23,24}. São constituídos, portanto, de fragmentos de cromátides ou cromossomos acêntricos ou aberrantes² que não foram incluídos no núcleo principal após a conclusão da mitose²³. Portanto, células micronucleadas podem refletir a incidência de eventos genotóxicos sobre a mucosa bucal². A relação entre a formação destas aberrações cromossômicas estruturais e o aparecimento de neoplasias malignas ou mesmo lesões pré-neoplásicas ainda não é bem conhecida²⁴. Sabe-se que, para a formação de alterações genéticas e translocações cromossômicas, seriam necessários anos de lise nas moléculas de DNA associadas a carcinógenos específicos. Entretanto, os eventos que estão relacionados com a formação do micronúcleo, podem ocasionar ativação de proto-oncogenes ou deleção de genes supressores de tumor, culminando com a degeneração maligna.

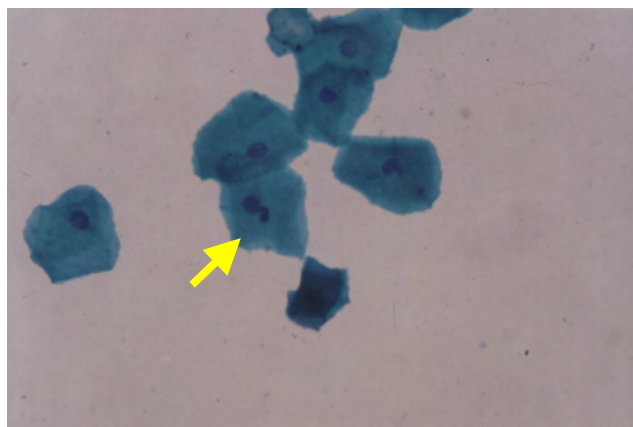


Figura 1 – Células esfoliadas da mucosa da borda lateral da língua exibindo o micronúcleo (seta). Reação de Feulgen. Original, 400 \times .

A capacidade de identificar células com defeito cromossômico confere ao micronúcleo a propriedade de ser utilizado como marcador biológico da exposição a carcinógenos^{9,10,15}. Através de sua expressão, pode-se avaliar o grau de comprometimento da mucosa bucal, como também a eficácia de protocolos de prevenção. A vantagem desse teste é sua capacidade de verificar, *in vivo*, o estado de uma mucosa que é simultaneamente exposta a carcinógenos, co-carcinógenos e antioxidantes – uma condição de difícil reprodução *in vitro*.

Nesse sentido, Reis et al.²⁰ (2002) em um trabalho para avaliar a incidência de células

micronucleadas na mucosa bucal de pacientes dependentes químicos de etanol e sem lesões bucais, encontraram que estes indivíduos apresentavam uma incidência maior desse defeito cromossômico do que indivíduos não expostos. Os autores concluem que o micronúcleo pode contribuir em programas para detecção de grupos de alto risco e prevenção do câncer bucal.

Outra vantagem da utilização deste método como marcador intermediário é a sua habilidade de mensurar de forma acurada e objetiva a frequência de defeitos no DNA. Além do mais, o micronúcleo aparece após o dano, antes mesmo de qualquer alteração pré-maligna clínica ou mesmo histológica^{3,15,27,23}. Da mesma forma, após a remoção do carcinógeno, tem-se observado que a contagem de células com micronúcleos reduz-se rapidamente. Isto sugere que, sem a ação do agente genotóxico, o processo de reparo do DNA se torna eficaz¹. Estas evidências são confirmadas pela redução destes defeitos cromossômicos observada após tratamento de neoplasias malignas orais com radioterapia²⁷, quando comparados à contagem dos mesmos em controles não-irradiados.

Estudos realizados para verificar o comprometimento da mucosa bucal quando exposta a diversas formas de tabaco têm mostrado que o fumo invertido e a ação sinérgica do fumo com o álcool aumenta a expressão de células micronucleadas. Um estudo²³ avaliando o efeito sinérgico do álcool e do tabaco na formação de micronúcleos mostrou que indivíduos que fumavam e bebiam apresentavam significativa elevação na quantidade de micronúcleos em células da mucosa bucal quando comparados a indivíduos que apenas bebiam ou apenas fumavam ou não fumavam e não bebiam. STICH et al.²⁷ (1992), num estudo conduzido na Índia, avaliou, através do teste do micronúcleo, a ocorrência de efeitos genotóxicos associados ao fumo invertido, a uma mistura mascável de tabaco com limão – Khaini – e a um dentifrício contendo tabaco. A quantidade de nitrosaminas oriundas do tabaco na saliva também foram comparadas entre os indivíduos que apresentavam diferentes hábitos. Os resultados mostraram que os usuários do fumo invertido apresentaram a maior frequência de células micronucleadas na mucosa bucal e maior quantidade de nitrosaminas tabaco-específicas na saliva. As frequências mais altas de células com micronúcleos foram encontradas nos sítios nos quais o tabaco estava em íntimo contato com a mucosa bucal nos indivíduos que usavam o Khaini, ou com a brasa do cigarro dos usuários do fumo invertido. Estes achados confirmam o

papel do tabaco na etiologia de lesões malignas orais evidenciando o efeito genotóxico das nitrosaminas. Outros autores têm usado a expressão do micronúcleo como critério para a avaliação de programas de intervenção com o β -caroteno^{1,27,25}, retinóides³ e o selênio^{13,16} em indivíduos com alto risco para o câncer da boca e da orofaringe. Tem-se observado que o uso destes micronutrientes antioxidantes reduz a incidência de células micronucleadas, mostrando a eficácia em reduzir o risco para o desenvolvimento deste tipo de neoplasia maligna.

CONCLUSÕES

Por estas características o teste do micronúcleo traduz-se num importante marcador intermediário para avaliar o grau de exposição da mucosa bucal a carcinógenos. Através de um método não invasivo, simples e de baixo custo, pode-se monitorar o efeito de exposições constantes, programas de intervenção com micronutrientes antioxidantes e, antes de tudo, avaliar, em indivíduos que já tiveram câncer na região de cabeça e pescoço, o comprometimento de outros sítios. Este teste reveste-se, portanto, de grande importância clínica, pois a quantificação de células micronucleadas obtidas a partir de citologia esfoliativa poderá ser um indicativo para a remoção de hábitos e subsidiar terapias antioxidantes em indivíduos expostos aos fatores de risco do câncer de boca, mas que ainda não apresentaram sinais clínicos de alterações celulares.

REFERÊNCIAS

1. Barth TJ, Zöller J, Kübler A, Born IA, Osswald H. Redifferentiation of oral dysplastic mucosa by the application of the antioxidants beta-carotene, tocopherol and vitamin C. *Int J Vitamin Nutr Res.* 1997;67(5):368-76.
2. Beliën JAM, Copper MP, Braakhuis BJM, Snow GB, Baak JPA. Standardization of counting micronuclei: definition of a protocol to measure genotoxic damage in human exfoliated cells. *Carcinogenesis.* 1995;16(10):2395-4000.
3. Benner SE, Pillman SM, Wargovich MJ, Lee JJ, Velasco M, Martin JW, Toth BB, Hong WK. Micronuclei, a biomarker for chemoprevention trials: results of a randomized study in oral premalignancy. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1994; 59(4):457-9.
4. Day GL, Blot WJ, Shore RE, Schoenberg JB, Kohler BA, Greenberg RS, Liff JM, Preston-Martin S, Austin DF, Mc Laughlin JK, Fraumeni Jr JF. Second cancers following oral and pharyngeal cancer: Patients' characteristics and survival patterns. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1994;30(1):381-6.

5. DeMarini DM. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutation Res.* 2004;567(2-3):447-4.
6. Franco EL, Kowalski LP, Oliveira BV, Curado MP, Pereira RN, Silva ME, Fava AS, Torloni H. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. *Int J Cancer.* 1989;43(6):992-1000.
7. Franco EL. Multiple cancers of the upper aerodigestive tract: the challenge of risk factor identification. *Cancer Lett.* 1991;60(1):1-8.
8. Femiano F, Gombos F, Scully C, Battista C, Belnome G, Esposito V. Oral leukoplakia: open trial of topical therapy with calcipotriol compared with tretinoin. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2001;30(5):402-6.
9. Garewal H, Meyskens Jr F, Friedman SRN, Alberts D, Ramsey LBS. Oral cancer prevention: the case for carotenoids and anti-oxidants nutrients. *Prev Med.* 1993;22(5) 701-11.
10. Gerster H. Intermediate cancer bio-markers and their use in beta-carotene studies humans. *Int J Vit Nutr Res.* 1996;66(1):3-18.
11. Handelman GJ, Packer L, Cross CE. Destruction of tocopherols, carotenoids and retinol in human plasma by cigarette smoke. *Am J Clin Nutr.* 1996; 63(4):559-65.
12. Hoffman D, Rivenson A, Chung FL, Wynder EL. Potential inhibitors of tobacco carcinogenesis. *Ann NY Acad Sci.* 1993;686:140-60.
13. Ip CB. The chemoprevention of selenium in carcinogenesis. *Adv Exp Med Biol.* 1986;206:431-47.
14. Jacob RA, Burri BJ. Oxidative damage and defense. *Am J Clin Nutr.* 1996;63(6):985-90.
15. Majer BJ, 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. *Mutat Res.* 2001;489(2-3):147-72.
16. Prasad MPR, Mukunda MA, Krishnaswamy K. Micronuclei and carcinogen DNA adducts as intermediate end points in nutrient intervention trial of precancerous lesions in the oral cavity. *Oral Oncol Eur J Cancer.* 1995;31B(3):155-9.
17. Piyathilake CJ, Macaluso M, Hine RJ, Vinter DW, Richards EW, Krumdieck CL. Cigarette smoking, intracellular vitamin deficiency, and occurrence of micronuclei in epithelial cells of the buccal mucosa. *Cancer Epidemiol Bio Prev.* 1995; 4:751-8.
18. Reis SRA, Lima CR, Marchionni AMT, Setúbal MG. Fatores de risco do câncer da cavidade oral e da orofaringe. I. Fumo, álcool e outros determinantes. *RPG.* 1997;4(2):127-32.
19. Reis SRA, Jesus RP, Marchionni AMT, Setúbal MG, Costa CO, Almeida TA. Fatores de risco do câncer da cavidade oral e da orofaringe. II. Dieta alimentar. *RPG.* 1997;4(3):186-90.
20. Reis SRA, Sadigursky M, Andrade MGS, Soares LP, Espírito-Santo AR, Vilas-Bôas DS. Efeito genotóxico do etanol em células da mucosa bucal. *Pesq Odontol Brás.* 2002;16(3):221-5.
21. Salaspuro MP. Alcohol consumption and cancer of the gastrointestinal tract, *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2004;17(4):679-94.
22. Schwartz J, Suda D, Light G. Beta carotene is associated with the regression of hamster buccal pouch carcinoma and the induction of tumors necrosis factor in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986;136(3):1130-5.
23. Stich HF, Rosin M. Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. *Int J Cancer.* 1983;31(3):305-8.
24. Stich HF, Rosin M, Vallejera MO. Reduction with vitamin A and beta-carotene administration of proportion of micronucleated buccal mucosa cells in Asian betel nut and tobacco chewers. *Lancet.* 1984;1(8388):1204-06.
25. Stich HF, Rosin M, Hornby AP, Mathew B, Sankaranarayanan R, Nair MK. Remission of oral leukoplakias and micronuclei in tobacco/betel quid chewers treated with beta-carotene and with beta-carotene plus vitamin A. *Int J Cancer.* 1988;42(2): 195-9.
26. Stich HF, Mathew B, Sankaranarayanan R, Nair MK. Remission of precancerous lesions in the oral cavity of tobacco chewers and maintenance of the protective effect of b-carotene or vitamin A. *Am J Clin Nutr.* 1991;53(1):298S-304S.
27. Stich HF, Parida BB, Brunnemann KD. Localized formation of micronuclei in the oral mucosa and tobacco-specific nitrosamines in the saliva of "reverse" smokers, Khaini-tobacco chewers and Gudaku users. *Int J Cancer.* 1992;50(2): 172-6.
28. Winn DM. Diet and nutrition in the etiology of oral cancer. *Am J Clin Nutr.* 1995;61(2):437S-445S.
29. Ziegler RG, Morris LE, Blot WJ, Pottorn LM, Hoover R, Fraumeni Jr JF. Esophageal cancer among black man in Washington, DC. II Role of nutrition. *J Natl Cancer Inst.* 1981;67(6):1199-206.
30. Ziegler RG. Alcohol -nutrient interactions in cancer etiology. *Cancer.* 1986;58(8):1942-1948.

Recebido para publicação em: 11/01/2005; aceito em: 25/04/2005.

Endereço para correspondência:

MIGUEL GUSTAVO SETÚBAL ANDRADE
 Rua das Codornas, 211/102, Ed. Jardim do Imbuí - Imbuí
 CEP 41720-020, Salvador, BA, Brasil
 Fones: (71)3362-3977; (71)3341-5159; (71)99787191
 Fax: (71)3341-5159
 E-mail: miguelsetubal@hotmail.com - miguelgustavo@zipmail.com.br