

Ensaio do micronúcleo como indicador de genotoxicidade em indivíduos com albinismo e histórico prévio de câncer de pele

Micronucleus assay as an indicator of genotoxicity in individuals with albinism and prior historic of skin cancer

Rosana Oliveira Rodrigues¹, Lília Maria Azevedo Moreira², Elaine Regina Jesus Silva³, Jamile Patrícia Barbosa Trindade¹, Luciane Melo Rocha⁴, Layla Damasceno do Espírito Santo⁵, Shirlei Cristina Moreira⁶

¹Graduação em Ciências Biológicas - UFBA;

²Doutoramento em Genética – USP;

⁴Graduanda em Farmácia – UFBA;

⁵Mestranda em Genética e Biodiversidade - UFBA;

⁶Médica Dermatologista - Ministério da Saúde.

Resumo

Introdução: A ausência congênita da melanina, um fator de proteção à exposição solar, confere aos indivíduos com albinismo um risco elevado de desenvolver tumores malignos de pele. O teste do micronúcleo destaca-se entre os ensaios biológicos para o monitoramento de indivíduos sob risco carcinogênico. Em células da mucosa oral, uma frequência elevada de micronúcleos é indicativa de altas taxas de mutação e tem sido relacionada ao desenvolvimento de carcinomas neste tecido. **Objetivo:** avaliar a eficácia do ensaio de micronúcleos como bioindicador de genotoxicidade em indivíduos com albinismo e relato pregresso de câncer de pele.

Metodologia: Foram amostrados 6 indivíduos com albinismo oculocutâneo e histórico de câncer de pele, já apresentando cura clínica, comparados a grupos controles constituídos de 10 de indivíduos albinos sem histórico de câncer e oito indivíduos sem distúrbios de pigmentação, nem histórico pregresso de câncer. Em cada indivíduo foram analisadas 1000 células. **Resultado:** Verificou-se um aumento significativo ($P=0.003$) na frequência de micronúcleo em pessoas albinas com história de câncer em relação aos controles.

Conclusão: A realização de testes de micronúcleo em sujeitos em fase de tratamento pode ser uma alternativa para validação do referido teste como indicativos de danos genotóxicos associados ao câncer.

Palavras chave: Albinismo. Micronúcleo. Neoplasias cutâneas.

Abstract

Background: Congenital absence of melanin, a protective factor sun exposure, in individuals with albinism confers a high risk of developing malignant skin tumors. The micronucleus test stands between biological assays for monitoring individuals at risk carcinogen. In cells of the oral mucosa, a high frequency of micronuclei is indicative of high rates of mutation and has been linked to the development of this tissue carcinomas. **Objective:** Evaluate the effectiveness of the micronucleus assay as a biomarker of genotoxicity in individuals with albinism and prior history of skin cancer. **Methodology:** We sampled six individuals with albinism and previous history of skin cancer, already showing clinical cure, compared to control groups of 10 albino individuals with no history of cancer and 8 subjects without pigmentation disorders, or prior history of cancer. In each individual 1000 cells were analyzed. **Results:** There was a significant increase ($P = 0.003$) in the frequency of micronuclei albino people with a history of cancer compared to controls. **Conclusion:** The micronucleus tests in subjects undergoing treatment may be an alternative for validation of this test as indicative of genotoxic damage associated with cancer.

Keywords: Albinism. Micronucleus. Skin neoplasms.

INTRODUÇÃO

O câncer de pele se caracteriza pelo crescimento anormal de células que compõem este estrato celular, com origem associada à radiação ultravioleta decorrente da exposição solar cumulativa que pode ocasionar mutações em protoncogenes e em genes supressores de tu-

mor. As neoplasias cutâneas, entre as quais o carcinoma basocelular (CBC) que é responsável por 75% destas patologias, apresentam um aumento crescente na população geral (CASTRO et al., 1996; MAIA et al., 1995).

Mantese e colaboradores (2006) enfatizam o papel da exposição solar como fator de risco no CBC, que acomete principalmente pacientes do sexo masculino, brancos, com idade acima de 40 anos e com relato de exposição solar repetitiva e consequente efeito cumulativo.

Correspondência / Correspondence: Lília Maria Azevedo Moreira. Universidade Federal da Bahia, Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Geral. Campus Universitário de Ondina, Ondina. 40210-000 - Salvador, BA – Brasil. Telefone: (71) 32836540. Ramal: 33. Fax: (71) 32836538. Email:lazevedo@ufba.br

O risco de desenvolver tumores malignos de pele é maior em pessoas com albinismo por apresentarem ausência congênita da melanina que é um fator de proteção à exposição solar. Na população geral estima-se que 1 em 17000 pessoas tenham alguma forma de albinismo (BASHOUR et al., 2012) e, portanto, uma fragilidade constitucional à ocorrência de câncer.

Entre os ensaios biológicos para o monitoramento de indivíduos sob risco carcinogênico, destaca-se o teste do micronúcleo (MN) que é proposto como um método de avaliação de danos cromossômicos em células expostas a agentes genotóxicos (FENECH; MORLEY, 1985; FENECH et al., 1999; HOLLANDA, 2008), sendo considerado padrão ouro, juntamente com a análise de aberrações cromossômicas e o teste cometa (FLORES; YAMAGUCHI, 2008). Em indivíduos saudáveis, não submetidos à agentes genotóxicos, a proporção de MN, é de 1-3 por 10.000 células nucleadas (CARRARD et al., 2007). Em células da mucosa oral, uma taxa elevada de micronúcleos é indicativa de altas taxas de mutação e tem sido relacionada ao desenvolvimento de carcinomas neste tecido (CARVALHO et al., 2002; ANDRADE et al., 2005; SARAN et al., 2008).

As células da mucosa oral são consideradas sistemas importantes para a avaliação de danos no DNA, por se tratar da primeira barreira contra substâncias tóxicas e mutagênicas. A análise toxicogenética utilizando células epiteliais esfoliadas da mucosa oral confere diversas vantagens, pois, além de ser alvo primário de exposição, a obtenção minimamente invasiva possibilita o monitoramento de populações expostas a agentes genotóxicos e permite fazer associações entre o estilo de vida e os danos encontrados nesse epitélio (HOLLANDA et al, 2008).

As células epiteliais esfoliadas tem sido utilizadas há mais de duas décadas para a avaliação de danos nas cavidades oral e nasal, brônquios, esôfago, cérvix, bexiga e trato urinário (STICH; ROSSIN, 1982), devido à sua eficiência para a detecção de alterações citogenéticas, diagnósticos de condições com potencial de malignização e em pesquisas genômicas que podem preceder, predispor, ou até promover o desenvolvimento tumoral.

Constitui o objetivo deste trabalho, avaliar a eficácia do ensaio de micronúcleos como bioindicador de genotoxicidade em indivíduos com albinismo e histórico pregresso de câncer de pele.

MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de estudo caso-controle, de corte transversal. Foram sujeitos do estudo 6 indivíduos com albinismo oculocutâneo e histórico prévio de câncer de pele, já apresentando cura clínica, integrantes da Associação de Pessoas com Albinismo do Estado da Bahia (APALBA), que é composta por 400

associados. O grupo controle foi constituído de 10 indivíduos albinos sem histórico de câncer (Controle 1) e 8 indivíduos sem distúrbios de pigmentação, nem histórico pregresso de câncer (Controle 2). A inclusão dos indivíduos no estudo foi feita após a assinatura do consentimento informado, de acordo com as normas da resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

A análise de MN foi feita em células de esfregaço de mucosa oral, coletadas por raspagem com espátula de madeira, coradas através da reação Feulgen e contra coloração pelo Fast-Green como previamente descrito por Stich e colaboradores (1982). A leitura das lâminas foi feita ao microscópio ótico com aumento de 400X (Figura 1). Foram contadas 1000 células por indivíduos, com alterações classificadas de acordo com Tolbert e colaboradores (1992).

O experimento foi inteiramente casualizado e os dados foram analisados pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$) – ANOVA, utilizando o programa ASSISTAT Versão 7.6 beta (Silva & Azevedo, 2002). Os dados apresentados nos resultados são expressos como média (\bar{X}) \pm erro padrão (SE).

RESULTADOS

O número de células com MN foi maior entre os indivíduos com albinismo, com ou sem histórico prévio de câncer (Tabela 1). A comparação dos dados mostrou um aumento significativo na frequência de MN em cerca de duas vezes nas pessoas albinas com história de câncer de pele (2.83 ± 0.54) em relação ao controle 1 (1.20 ± 0.33) e cerca de quatro e meio vezes mais em relação ao controle 2 (0.63 ± 0.32), ($P = 0.003$). Não houve diferença significativa entre os dois grupos controles ($P = 0.2354$) (Figura 2).

Figura 1. Célula esfoliada da mucosa oral exibindo micronúcleo (seta). Coloração pelo Feulgen e contra-coloração com Fast-green. 400X.

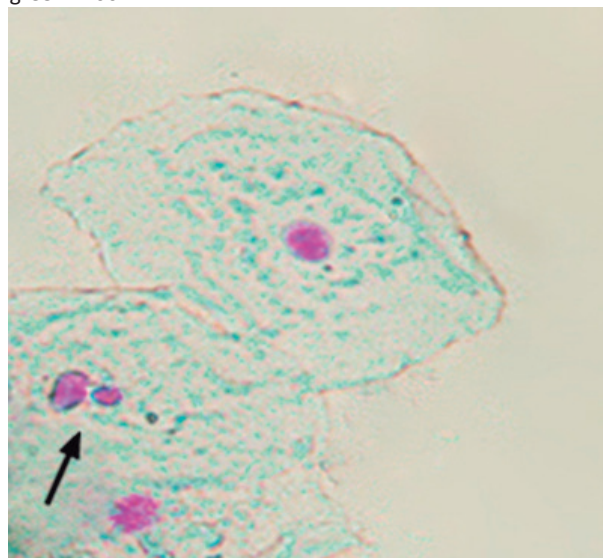


Tabela 1. Frequência de MN em sujeitos e controles do estudo

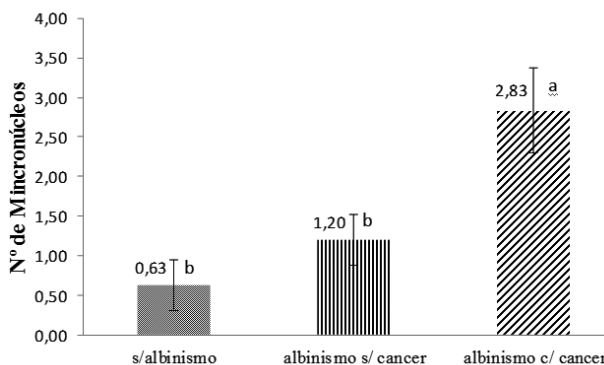
Indivíduos	nº MN/1000 cel.
Sujeitos	
1	2
2	2
3	2
4	5
5	4
6	2
X±SE	2,83 ± 0,54
Controle 1	
1	2
2	2
3	1
4	1
5	0
6	0
7	2
8	1
9	3
10	0
X±SE	1,20 ± 0,33
Controle 2	
1	0
2	2
3	0
4	0
5	1
6	2
7	0
8	0
X±SE	0,63 ± 0,32

DISCUSSÃO

A avaliação dos padrões aneuplóides de DNA pela presença de micronúcleos estão associados à malignidade dos tumores e podem ser encontrados em diferentes graus de displasias incluindo os casos de lesões cutâneas benignas. Melo-Júnior e colaboradores (2009) avaliaram a densidade de micronúcleos em tumores benignos e malignos de pele e concluíram que este tipo de análise poderá ser utilizada no diagnóstico diferencial de neoplasias cutâneas difíceis de serem diagnosticadas apenas pelos métodos convencionais de análise histopatológica.

Considerando a associação entre o aumento da taxa de MN em células bucais esfoliadas de indivíduos com lesões pré-malignas e carcinomas, este achado corrobora a hipótese de que há uma maior sensibilidade à ocorrência de câncer e predisposição a danos genotóxicos em indivíduos com albinismo (BLOCHING et al., 2000; CASARTELLI et al., 2000).

Casartelli e colaboradores (2000) observam, entretanto, que ainda que os resultados permitam atribuir aos MN um valor preditivo no processo de cancerização, a sua avaliação não deve ser utilizada isoladamente, pois as taxas de MN apresentam variações individuais. Embora o aumento de MN não

Figura 2. Comparação entre valores médios de MN em sujeitos e controles do estudo. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (P=0.003).

assegure a ocorrência de transformação maligna, constitui um indicativo de fenômenos degenerativos. De acordo com Garaj-Vrhovac & Zeljezic (2002) após um período de oito meses sem a exposição a produtos, a frequência de aberrações cromossômicas e micronúcleos apresentam decréscimo em relação à exposição recente, o que deve ser também considerado nas análises.

CONCLUSÃO

A aplicação do teste do MN apresenta-se como um possível indicador da ação de agentes genotóxicos que possam estar associados a fenômenos celulares degenerativos. Em indivíduos com albinismo, acometidos por lesões malignas ou câncer, a realização de testes de micronúcleo em sujeitos em fase de tratamento pode ser uma alternativa para validação do referido teste como indicativos de danos genotóxicos associados ao câncer. Acreditamos que este teste possa constituir um biomarcador de baixo custo, na análise do impacto de agentes genotóxicos e também no acompanhamento da remissão de alterações malignas.

AGRADECIMENTOS

Ao programa Permanecer UFBA, pelo apoio ao projeto, e à APALBA, entidade parceira neste estudo; aos biólogos Alexandre Marques e Bernadete Neiva pelo auxílio nas análises estatísticas.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, M.G.S. et al. Micronúcleo: um importante marcador biológico na prevenção do câncer bucal. *Rev. Odonto. Ciênc.*, Porto Alegre, v.20, n.48, p.137-141, 2005.
- BLOCHING, M. Exfoliative cytology of normal buccal mucosa to predict the relative risk of cancer in the upper aerodigestive tract using MN-assay. *Oral Oncol.*, Oxford, v.3, n.36, p. 550-555, 2000.
- CARRARD, V.C. et al. Teste dos micronúcleos- Um biomarcador de dano genotóxico em células descamadas da mucosa bucal. *Rev. Fac. Odontol.* Porto Alegre, v.48, n.1-3, p.77-81, 2007.

- CASARTELLI, G. Micronucleus frequencies in exfoliated buccal cells in normal mucosa, precancerous lesions and squamous cell carcinoma. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, St. Louis, v.22,n.6, p.486-92, 2000.
- CASTRO, L.G.M. et al. Câncer de pele em clínica particular em São Paulo – SP. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v.71, n.6, p.471-476, 1996.
- CARVALHO, M.B. Correlação entre a evolução clínica e a frequência de micronúcleos em células de pacientes portadores de carcinomas orais e da orofaringe. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.48, n.4, p.317-322, 2002.
- FENECH M.; MORLEY A.A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.147,n.1-2 p.29-36, 1985.
- FENECH, M. The Human Micronucleus Project – International collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.428,n.1-2, p.271-83, 1999.
- FLORES, M.; YAMAGUCHI, M.U. Teste do micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v.1, n.3, p.337-340, 2008.
- GARAJ-VRHOVAC, V.; ZELJEZIC, D. Assessment of genome damage in a population of Croatian workers in pesticide production by chromosomal aberration analysis, micronucleus assay and Comet assay. **J Appl Toxicol**, Philadelphia, v.22, n.4, p.249-255, 2002.
- GRONSKOV, K. et al. Oculocutaneous albinism. **Orphanet J. Rare Dis.** v.2, n. 43, p.1-8, 2007.
- HEDDLE, J.A. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity: a report of the US Environmental Protection Agency Genotox Program. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.123,n.1, p.61-118, 1983.
- HOLLANDA, N. 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.**, Amsterdam, v.659, n.1-2, p.93-108, 2008.
- MAIA, M. ; PROENÇA, N.G; MORAES, J.C. Risk factors for basal cell carcinoma: a case control study. **Rev.Saúde Pública**, São Paulo, v.29, n.1, p.27-3, 1995.
- SARAN, R. Risk assessment of oral cancer in patients with pre-cancerous states of the oral cavity using micronucleus test and challenge assay. **Oral Oncol**, Oxford, v.44, n.4, p.354-360, 2008.
- SILVA, FAS; AZEVEDO, CAV. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.4, n.1, p.71-78, 2002.
- STICH HF, STICH W, PARIDA BB. Elevated frequency of micronucleated cells in the buccal mucosa of individuals at high risk for oral cancer: betel quid chewers. **Cancer Lett**, Virgínia, v.17,n.2, p.125-134, 1982.
- TOLBERT, PE; SHY, CM; ALLEN,J.W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears methods development. **Mutat. Res**, Amsterdam, v.271,n.1, p.69-77, 1992.

Submetido em 28.11.2012;

Aceito em 16.07.2013.