

Pesquisa de micronúcleos na mucosa esofágica e sua relação com fatores de risco ao câncer de esôfago

J. DIETZ, A.S. DIEHL, J.C. PROLLA, C.D. FURTADO, A.D. FURTADO

Hospital Nossa Senhora Conceição e Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS

RESUMO - Micronúcleos são fragmentos de DNA não incorporados ao núcleo na divisão celular e que apresentam relação com agentes genotóxicos (mutagênicos ou clastogênicos). Os micronúcleos podem ser detectados nas células esfoliadas dos tecidos.

OBJETIVO. Determinar a frequência de micronúcleos na mucosa esofágica, relacionando com determinados hábitos.

PACIENTES E MÉTODOS. Em pacientes submetidos a endoscopia digestiva alta e sem evidências de anormalidades esofágicas, foram colhidos materiais através de escovado do esôfago médio, para pesquisa de micronúcleos. Após à endoscopia, os pacien-

tes foram questionados sobre seus hábitos.

RESULTADOS. A frequência de micronúcleos não mostrou diferenças significativas ($p > 0,05$) em relação ao sexo, local de residência (rural ou urbana), tipo de atendimento (ambulatorial ou hospitalizado), ingestão de álcool. Nas variáveis fumo e mate houve diferenças significativas entre as categorias expostos e ex-expostos em relação à categoria nunca expostos.

CONCLUSÃO. A frequência de micronúcleos na mucosa esofágica foi maior nos pacientes fumantes e bebedores de mate.

UNITERMOS: Micronúcleos. Esôfago. Fumo. Mate. Álcool.

INTRODUÇÃO

O diagnóstico do câncer de esôfago geralmente é feito quando do aparecimento da disfagia, resultando em detecção nas formas avançadas, onde a sobrevida de cinco anos é inferior a 10%¹. Nos tumores superficiais de esôfago (restritos até a submucosa) e sem metástases, a sobrevida de cinco anos é de 62%². Um número considerável, porém, de câncer superficial de esôfago apresenta metástases, com conseqüente sobrevida de cinco anos em somente 17%². Os micronúcleos surgem de fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros que não são incorporados ao núcleo da célula filha por ocasião da divisão celular³⁻⁷. Evans *et al.* (1959) usou a frequência de micronúcleos para medir o dano citogenético induzido em plantas por irradiações⁸. Högstedt *et al.* (1981) demonstraram *in vivo* a ação citogenética de diversas substâncias químicas no esfregaço de medula óssea por meio do teste de micronúcleos^{9,10}. Na década de 70, o teste de micronúcleos tornou-se viável e confiável pelo estudo de eritrócitos policromáticos da medula óssea em camundongos, passando a ser um dos mais úteis indicadores de dano citogenético na medula óssea^{3,11}. Mais tarde, esse teste passou a ser feito em eritrócitos e linfócitos do sangue periférico e em células esfoliadas, como da mucosa bucal, por exemplo^{4,12-15}. Pesquisadores têm explorado os be-

nefícios do teste de micronúcleos nas populações de células esfoliadas, ou seja, células epiteliais que foram desprendidas da superfície de uma cavidade, como o tracto respiratório, gastrointestinal e genitourinário^{4,15-18}.

Por outro lado, o estado do Rio Grande do Sul (RS) apresenta coeficientes padronizados de mortalidade por câncer de esôfago, 1988-92, de 17.8/100.000 habitantes do sexo masculino e 4.8 no sexo feminino¹⁹. Estes coeficientes são elevados quando comparados com outros estados do Brasil ou com países da América Latina²⁰⁻²³. Fumo, álcool, mate (infusão quente de *Ilex paraguayensis*) têm sido incriminados como fatores de risco ao câncer de esôfago^{24,25}. O câncer de esôfago no RS revelou correlação com fumo, álcool, ingestão de mate, residência em zona rural, baixo nível socioeconômico e predominância em municípios situados ao sul do estado, próximos da Argentina e Uruguai^{26,27}. Esta pesquisa tem como objetivo a determinação de micronúcleos na mucosa esofágica em pacientes sem evidências de lesão no esôfago à endoscopia, relacionando com hábitos como fumo, mate e álcool.

PACIENTES E MÉTODOS

Pacientes atendidos em serviço de gastroenterologia e com solicitação de endoscopia diges-

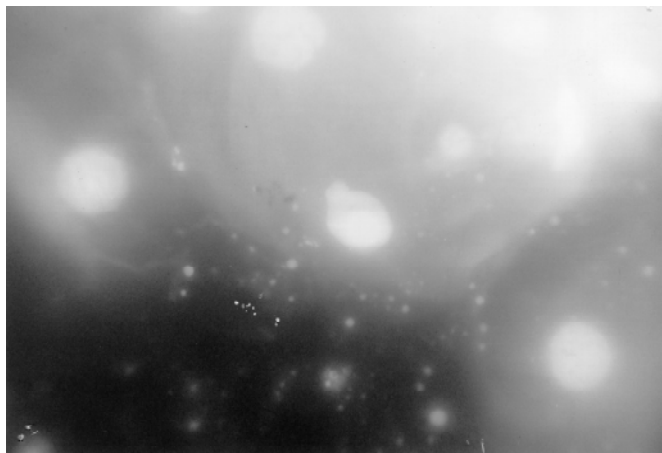


Fig. 1 – Célula da mucosa esofágica corada com acridine orange mostrando formação de micronúcleos

Tabela 1 – Frequência de micronúcleos na mucosa esofágica em relação a sexo, tipo de atendimento e local de residência

	Pacientes	% micronúcleos	Valor p
Masculino	129	0.28	
Feminino	116	0.35	0.13
Ambulatoriais	98	0.28	
Hospitalizados	123	0.35	0.36
Residência em			
Porto Alegre	59	0.28	
Residência áreas urbanas menores	54	0.36	
Porto Alegre			
Áreas rurais	42	0.35	0.12

tiva alta foram convidados a participar da pesquisa através de termo de consentimento, questionário detalhado sobre hábitos, com ênfase em fumo, álcool e mate e colheita de material do esôfago durante a endoscopia. Nos casos de esôfago normal à endoscopia, realizava-se a retirada de material do esôfago médio (aproximadamente 30cm da arcada dentária superior), em toda a circunferência, através de escovadura. O material era colocado em duas lâminas sem fixador e, após, coradas com acridine orange²⁸. As endoscopias e os exames citológicos foram realizadas sempre pela mesma endoscopista e citopatologista, que determinava o número de micronúcleos visualizados em 500 células examinadas. Foram examinados 245 indivíduos, idade média 60,5 anos, 129 do sexo masculino (52,6%) e 116 do sexo feminino (47,3%). Em 85 (34,7%) pacientes não foram encontrados micronúcleos em 500 células examinadas do esfregaço esofágico; em 160 (65,3%) pacientes foram encontrados micronúcleos, ficando a frequência da

Tabela 2 – Frequência de micronúcleos na mucosa esofágica em relação ao consumo de fumo, álcool e mate

	Pacientes	% micronúcleos	Valor p
Fumantes e ex-	139	0.33	
Não-fumantes	106	0.28	0.04
Álcool: bebedores	90	0.29	
e ex-bebedores			
Não-bebedores	155	0.32	0.62
Mate: bebedores	145	0.36	
e ex-bebedores			
Não-bebedores	99	0.25	0.03

população total examinada (n= 245) em 0,31% (Fig. 1). Os resultados da frequência de micronúcleos e variáveis levantadas nos questionários foram analisados por métodos estatísticos para variáveis qualitativas (Mann-Whitney-Wilcoxon; Kruskal Wallis, Qui-quadrado), grau de significância de 5%.

RESULTADOS

A frequência de micronúcleos não mostrou diferenças significativas ($p > 0.05$) entre sexo masculino e feminino, como também quando comparado pacientes ambulatoriais e hospitalizados ou pacientes residentes na cidade de Porto Alegre (1.200.000 hab.) em relação aos residentes em áreas urbanas menores do que Porto Alegre ou áreas rurais (tabela 1).

Nas variáveis fumo, álcool e mate, foram consideradas ex-expostos quando a exposição cessou aproximadamente três meses antes da realização da presente pesquisa. A categoria de fumantes não mostrou diferenças significativas quando comparada com a categoria de ex-fumantes, passando a se constituir uma categoria com frequência de micronúcleos de 0,33%. Na categoria de não-fumantes, a frequência de micronúcleos foi de 0,28%, com diferenças significativas entre não-fumantes quando comparado com fumantes e ex-fumantes (Kruskal Wallis, $p = 0.04$) (tabela 2).

Com referência à ingestão de álcool, a frequência de micronúcleos entre não-bebedores foi de 0,32%; entre bebedores foi de 0,28% e entre ex-bebedores a frequência foi de 0,30%, sem diferenças significativas ($p = 0.62$) (tabela 2).

Com referência ao hábito de ingerir mate, da mesma forma que na variável fumo, não houve diferenças entre os expostos e ex-expostos ao mate (frequência de 0,36%), mas com diferenças significativas entre os expostos e ex-expostos em relação aos não-expostos

Tabela 3 – Frequência de micronúcleos na mucosa esofágica na associação de fumo e mate (*)

	Mate positivo		Mate negativo	
	N	%mn(**)	N	%mn
Fumo positivo	84	1.9	55	1.3
Fumo negativo	61	1.6	44	1.1

(*) p = 0.06
(**) mn = micronúcleos

(frequência de 0,25%, p=0.03) (tabela 2).

Os coeficientes de correlação entre quantidade de cigarros consumidos, quantidade de álcool ou quantidade de mate e micronúcleos não mostrou significancia estatística (p > 0.20; p > 0.10; p > 0.50, respectivamente).

DISCUSSÃO

Micronúcleos consistem em pequenas quantidades de DNA que surgem no citoplasma quando fragmentos de cromossomos ou cromátides ou cromossomos inteiros não são incorporados dentro do núcleo da célula filha durante a mitose, freqüentemente, porque estes fragmentos não possuem um centrômero³⁻⁵. Fragmentos acêntricos não migram e permanecem atrasados na anáfase, enquanto que os elementos cromossômicos com centrômero são orientados em direção aos pólos do fuso^{3,4}. Os fragmentos de DNA deixados para trás são incorporados dentro de núcleos secundários, que por serem muito menores que o núcleo principal da célula são chamados de micronúcleos^{3,4}. O micronúcleo tem entre 1/5 a 1/20 do tamanho do núcleo e geralmente há um micronúcleo por célula^{3,4}. Uma vez que os micronúcleos são decorrentes de cromossomos ou quebra cromossômica que foram perdidos no processo de divisão celular, a frequência de micronúcleos está comprometida em populações de células que não estão em processo de divisão⁵. As células esfoliadas são células epiteliais que foram desprendidas da superfície de uma cavidade, como o trato respiratório, gastrointestinal e genitourinário^{4,16}. As células esfoliadas não se dividem mais, mas refletem anormalidades citogenéticas que ocorreram na população de células na camada basal. Na colheita de células de um tecido que foi exposto a um suposto agente genotóxico (exposição aguda), a colheita deve ocorrer entre 5 a 24 dias após a exposição, uma vez que as células da camada basal tem um tempo de migração de aproximadamente 5 a 7 dias e as células expostas descamam totalmente em cerca de três semanas^{4,16}. Fatores que ocasionam diminuição na

mitose, como irradiação, podem aumentar o tempo de migração das células, e até ocasionar severo dano celular, e, desta forma, influenciar o resultado do teste²⁹. Stich *et al.* (1983) encontraram frequência elevada de micronúcleos na mucosa oral nos indivíduos fumantes e bebedores de álcool¹⁸. Por outro lado, a frequência de micronúcleos diminuiu significativamente entre mascaradores de tabaco após receberem vitamina A e beta-caroteno por nove semanas¹⁵.

A determinação de micronúcleo dá-se através de método rápido e não-invasivo, nos casos de mucosa bucal, escarro, urina, sêmen, colo uterino¹⁶. Em algumas localizações é necessário o uso de equipamentos, como para exame do esôfago, estômago, nasofaringe, cólon¹⁶.

A presença de micronúcleos nas células esfoliadas serve como dosímetro interno, medindo a extensão em que determinado agente ambiental está associado a dano ao DNA dos tecidos e, de certa forma, indicando um potencial ao desenvolvimento de câncer^{4,16}. Aplicação da pesquisa de micronúcleos em estudos populacionais com diferentes exposições genotóxicas pode aumentar o conhecimento do potencial carcinogênico de agentes ambientais em humanos e pode permitir elucidar mecanismos carcinogênicos⁴.

Poucas referencias foram encontradas na literatura com respeito à pesquisa de micronúcleos na mucosa esofágica³⁰.

No presente estudo, a frequência de micronúcleos foi significativamente maior entre fumantes e ex-fumantes, bebedores e ex-bebedores de mate. A frequência de micronúcleos não foi diferente entre bebedores e não-bebedores de álcool. O aumento de micronúcleos entre fumantes pode estar associado com a existência de substâncias carcinogênicas no tabaco^{31,32}; já o mate, sem comprovação até a presente data de presença de carcinógenos, pode estar atuando como fator predisponente devido à temperatura alta em que é ingerido³³⁻³⁵. O álcool, apesar de funcionar como provável fator predisponente ao câncer de esôfago, não se associou ao aumento na frequência de micronúcleos na mucosa esofágica no presente estudo^{18,29,30,36}.

A presença de micronúcleos na mucosa esofágica pode ser o resultado da ação de fatores de risco ao câncer de esôfago, como fumo e mate. Estudos futuros sobre a repercussão e evolução de micronúcleos no esôfago deverão auxiliar a entender o significado de sua presença, definindo, inclusive, a possibilidade de ser uma alteração precursora do câncer do esôfago, o que poderia implicar na sua participação em programas de diagnóstico precoce ao câncer do esôfago.

SUMMARY

Frequency of micronuclei in the esophageal mucosa. Relationship with tobacco, alcohol and maté consumption

Purpose. To demonstrate the frequency of micronucleus in esophageal mucous cells of smokers, consumers of alcoholic beverages and "maté" drinkers.

METHODS. material collected from the middle esophagus in 250 consecutive patients submitted to upper digestive endoscopy was stained with acridine orange and the cytologist determined the number of micronuclei visualized per each 500 cells examined.

RESULTS. the frequency of micronucleated cells did not vary significantly ($p > 0.05$) when the following variables were considered: sex, place of residence (rural or urban), type of care (outpatient or inpatient), ingestion of alcohol. For two variables, smoking and "maté" consumption, there were significant differences in the frequency of micronuclei in the categories exposed and formerly exposed in relation to never exposed.

CONCLUSION. A higher frequency of micronucleus in the esophageal mucous in smoking and "maté" drinkers was evidenced by this study. [Rev Ass Med Bras; 46(3): 207-11]

KEY WORDS: Esophagus. Micronuclei. Smoking. "Maté". Alcohol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Lambert R. Palliation of carcinoma of the esophagus: is there a hope for cure? *The Amer J Gastroenter* 1994; 89 (8):S27-S40.
- Endo M, Takeshita K, Yoshida M. How can we diagnose the early stage of esophageal cancer? Endoscopic diagnosis. *Endoscopy* 1986; 18:11-18.
- Schmid W. The micronuclei test. *Mutation Research* 1975; 31:9-15.
- Vine MF. Micronuclei. In: Hulka BS; Wilcosky TC; Griffith JD (eds). *Biological markers in epidemiology*. Oxford Univ. Press, New York, 1990. Chapter 7: 125-146.
- Heddle JÁ, Hite M, Kirkhart B *et al*. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research* 1983;123:61-118.
- The collaborative study group for the micronucleus test. Strain difference in the micronucleus test. *Mutation Research* 1988; 204:307-16.
- Nordic study group on the health risk of chromosome damage. A nordic data base on somatic chromosome damage in humans. *Mutation Research* 1990; 241:325-337.
- Evans HJ, Neary GJ, Williamson FS. The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma rays on vicia faba roots and the effect of oxygen. *Int. J Radiation Biol* 1959; 1:216-29.
- Högstedt B, Gullberg B, Masrk-Vendel E, Mitelman FG, Skerfving S. Micronuclei and chromosome aberrations in bone marrow cells and lymphocytes of humans exposed mainly to petroleum vapors. *Hereditas* 1981a; 94:179-187.
- Högstedt B, Nilsson PG, Mitelman F. Micronuclei in erythropoietic bone marrow cells: relation to cytogenetic pattern and prognosis in acute nonlymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1981b; 3:185-193.
- Heddle JA. A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutation Research* 1973; 18:1870190.
- Högstedt B, Karlsson A. The size of micronuclei in human lymphocytes varies according to inducing agent used. *Mutation Research* 1985; 156:229-232.
- Schlegel R, MacGregor JT, Everson RB. Assessment of cytogenetic damage by quantification of micronuclei in human peripheral blood erythrocytes. *Cancer Res* 1986; 46:3717-3721.
- Fenech M, Morley AA. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Research* 1986; 161:193-8.
- Stich HF, Stich W, Rosin MP, Vallejera MO. Use of the micronucleus test to monitor the effect of vitamin A, beta-carotene and canthaxanthin on the buccal mucosa of betel nut/tobacco chewers. *Int J Cancer* 1984; 34:745-50.
- Stich HF, San RHC, Rosin MP. Adaptation of the DNA-repair and micronucleus tests to human cell suspensions and exfoliated cells. *Ann NY Acad Sci* 1983; 407:93-105.
- Stich F, Rosin MP. Towards a more comprehensive evaluation of a genotoxic hazard in man. *Mutation Research* 1985; 150:43-50.
- Stich HF; Rosin MP. Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. *Int J Cancer* 1983; 31:305-8.
- Estatísticas de Saúde. *Mortalidade*. Divisão de Informação em Saúde. Secretaria de Saúde e Meio Ambiente do Rio Grande do Sul, 1988 a 1992; vol 14 a 19.
- Estatísticas de Mortalidade - Brasil 1988*. Ministério de Saúde. Fundação Nacional de Saúde, 1993.
- World Health Statistics Annual 1991*. World Health Organization. Genève, 1992.
- Muñoz N. Epidemiological aspects of oesophageal cancer. *Endoscopy* 1993; suppl. 609-612.
- Day NE, Muñoz N, Ghadirian P. *Epidemiology of esophageal cancer: a review*. Epidemiology of cancer of the digestive tract. 1st ed. Netherlands; Martinus Nijhoff Publishers 1982: 21-57.
- De Stefani E, Muñoz N, Estève J, *et al*. Mate drinking, alcohol, tobacco, diet and esophageal cancer in Uruguay. *Cancer Research* 1990; 50:426-31.
- Yu MC, Garabrant DH, Peters JM, Mack TM. Tobacco, alcohol, diet, occupation and carcinoma of the esophagus. *Cancer Research* 1988; 48(13):3843-48.
- Victoria CG, Muñoz N, Day NE *et al*. Hot beverages and oesophageal cancer in Southern Brazil: a case control study. *Int. J. Cancer* 1987; 39:710-16.
- Prolla JC, Dietz J, Costa LA. Diferenças geográficas na mortalidade por câncer de esôfago no rio Grande do Sul. *Rev Ass Med Brasil* 1993; 39 (4):217-20.
- Hayashi M, Sofuni T, Ishidate Jr M. Na application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutation Research* 1983; 120:241-47.
- Sarto F, Finotto S, Giacomelli L, *et al*. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. *Mutagenesis* 1987; 2:11-17.
- Munoz N, Hayashi M, Bang LJ, *et al*. Effect of riboflavin, retinol and zinc on micronuclei of buccal mucosa and of esophagus: a randomized double-blind intervention study in China. *J Natl Cancer Inst* 1987;79:687-691.
- Relevance to human cancer of N-nitroso compounds, tobacco smoke and mycotoxins*. International Agency for Research on

- Cancer. World Health Organization. Ed.: I.K.O'Neil; J. Chen; H. Bartsch. IARC Scientific Publications 105, Lyon, France, 1991, 11-7; 192-6; 482-5.
32. Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Alcohol drinking. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization, Lyon, France, 1988; vol. 44: 71-93; 101-115; 186-95.
33. Kruel CDP, Gurski R, Kruel I, *et al.* *Hot-water effect in the esophageal carcinogenesis experimental model mice.* Abstract Sixth World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus. Milan, Italy, August 23-26, 1995.
34. Kruel CDP, Prolla JC, Zatti H, *et al.* *Mate-herb effect in esophageal carcinogenesis experimental model.* Abstract, Sixth World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus. Milan, Italy, August 23-26, 1995.
35. Yoris N, Ivankovic S, Lehnert T. Effect of thermal injury and oral administration of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine on the development of esophageal tumors in Wistar rats. *Oncology* 1984; 41:36-8.
36. Wynder EL, Bros J. A study of etiological factors in cancers of esophagus. *Cancer* 1961; 14:389-413.