

Utilização do teste com o azul de toluidina como método auxiliar no diagnóstico de lesões orais

Toluidine blue test as an auxiliary method for the diagnosis of oral lesions

Terezinha Lisieux Lopes Calandro

Doutoranda em Patologia Bucodental da UFF

Juliana Tristão Werneck

Simone Sant'Anna Gonçalves

Mestrandas em Patologia Bucodental da UFF

Arley Silva Júnior

Professor Adjunto do Departamento de Patologia da UFF

Eliane Pedra Dias

Professora Titular do Departamento de Patologia da UFF

RESUMO

A avaliação clínica nem sempre é suficiente para garantir o diagnóstico das lesões orais. O objetivo deste artigo é avaliar a validade do teste com o azul de toluidina como método auxiliar no diagnóstico de lesões orais. A amostra constituiu-se de 110 pacientes com lesões orais. Seguindo o protocolo estabelecido para este trabalho, todas as lesões foram submetidas ao teste do azul de toluidina. Um total de 105 lesões foram biopsiadas e a histopatologia considerada padrão-ouro diagnóstico. O teste do azul de toluidina foi positivo em 31 das 110 lesões, com 20 marcações focais e 11 difusas. Concluiu-se que, o teste do azul de toluidina é um recurso útil como método auxiliar no diagnóstico de lesões orais.

Palavras-chave: diagnóstico oral; azul de toluidina; lesão oral.

ABSTRACT

Clinical evaluation is not always sufficient for a conclusive diagnosis. The objective of this study is to evaluate the validity of toluidine blue test for the diagnosis of oral lesions. The sample was comprised of 110 patients with oral lesions. Following the established protocol, the toluidine blue test was applied in all lesions. One hundred and five lesions were biopsied and histopathology considered the gold standard diagnosis. The toluidine blue test was positive in 31 out of the 110 lesions, in 20 focal and 11 diffuse positivity. It was concluded that the toluidine blue test is a useful tool as an auxiliary method for the diagnosis of oral lesions.

Keywords: Oral diagnosis; toluidine blue; oral lesion.

Introdução

O câncer oral tem sido responsável por milhares de óbitos. Almejando o decréscimo desta estatística é de relevante importância a atuação do dentista na realização de exames estomatológicos periódicos (16). Porém, ainda que minuciosa, a avaliação clínica é algumas vezes limitada na definição diagnóstica e comportamento das lesões, levando à necessidade da utilização de exames auxiliares (9), tais como o teste com o azul de toluidina que se trata de um exame de fácil procedimento, rápido, barato, inerte, indolor, sem desconforto ao paciente (5, 8, 14, 19). Entretanto, existe um consenso entre os autores de que o padrão-ouro de diagnóstico é a biópsia (1, 4, 7, 11, 12, 18).

O azul de toluidina é um corante catiônico metacromático do grupo de tiazinas que marca seletivamente grupos ácidos de componentes teciduais (radicais carboxílicos, sulfatos e fosfatos), apresentando afinidade pelo DNA dos núcleos celulares e pelo RNA presente no citoplasma, os quais fixam o corante e coram-se profundamente (5, 10, 16, 19).

A intensidade da coloração pelo azul de toluidina está na dependência do grau de comprometimento da superfície epitelial. Em lesões benignas observamos uma coloração tênue e nas displasias epiteliais e nos carcinomas a coloração é mais evidente devido à forte afinidade do corante por estas áreas (9). O teste com o azul de toluidina é indicado na detecção de displasias epiteliais, carcinomas *in situ* ou precocemente invasivos; na delimitação das margens do epitélio neoplásico; na avaliação e reconhecimento de recidivas tumorais pós-tratamento cirúrgico e/ou radioterápico; na delimitação de áreas de cancerização de campo; no rastreamento de lesões bucais em grupos populacionais expostos aos fatores de risco para o desenvolvimento do câncer bucal; durante o intraoperatório visando o controle marginal de carcinomas, que é um dos aspectos da maior importância e dificuldade na cirurgia do câncer oral, em busca da remoção completa do tumor e no diagnóstico de áreas de proliferação celular e proliferação epitelial (3, 6, 8, 13, 14, 16, 17, 19, 20).

Resultados Falso-Positivos

O corante retém-se mecanicamente no dorso da língua, nas áreas das papilas filiformes, criptas e fissuras linguais, na abertura dos ductos das glândulas salivares menores do palato, nas lesões com irregularidades e fissuras na superfície da mucosa bucal (3, 15, 17, 19), nos tecidos lesionados por bordas cortantes de dentaduras ou outras irritações (2), nos tecidos de granulação, na presença de mucina ou exsudato purulento (16), nas úlceras traumáticas e nos processos inflamatórios crônicos (10, 14, 16).

Resultados Falso-Negativos

O azul de toluidina mostra mudanças apenas da camada epitelial (2, 8). O tecido subjacente invadido não pode ser penetrado pela solução, portanto a extensão da invasão não pode ser corretamente acessada (8). Pode ocorrer nas



displasias severas recobertas por paracetatoses que impedem a penetração do corante e em carcinomas infiltrativos recobertos por mucosa íntegra (16).

Material e Método

A amostra foi constituída por 110 lesões e destas 105 foram submetidas a biópsias (das cinco lesões não submetidas a biópsias, quatro apresentaram redução durante o acompanhamento e um paciente não mais compareceu às consultas).

Após anamnese e exame físico da boca, foi respeitado o seguinte protocolo quanto à aplicação do teste com o azul de toluidina: aplicação com cotonete do ácido acético a 1% na lesão por 1 minuto; aplicação com cotonete do azul de toluidina a 1% na lesão por 1 minuto; aplicação com cotonete do ácido acético para remover o excesso do azul de toluidina; bochecho com água para retirar o restante do excesso (Figura 1).

Foi anotado na ficha de anamnese do paciente o resultado do exame e quando positivo se focal ou difuso (Figura 2). Todos os casos foram documentados com fotografia digital feitas com câmera digital (Sony modelo DSC-H1-China) e com uma videocâmera oral (Active Ware modelo v4-, São Paulo, Brasil). A biópsia foi realizada nos casos com indicação para este procedimento e o exame histopatológico considerado padrão-ouro diagnóstico.

Resultados

Do total de 101 pacientes, 56,1% apresentavam pelo menos uma lesão. Destes 59,4% eram mulheres; 40,6% eram homens; 63,4% eram brancos; 21,8% pardos e 14,8% negros. A idade variou de seis a 88 anos, com média de 48,5 anos e desvio padrão de 17,2 anos. A distribuição dos fatores de risco está representada na Tabela I.

Tabela I. Distribuição (número e percentual) dos pacientes com lesões segundo etilismo e tabagismo

Etilismo	Fumante	Ex-fumante	Não tabagista	Total
Etilista	13 (12,9%)	04 (4,0%)	05 (5,0%)	22 (21,8%)
Ex-etilista	04 (4,0%)	09 (8,9%)	02 (2,0%)	15 (14,9%)
Não etilista	16 (15,8%)	10 (9,9%)	38 (37,6%)	64 (63,4%)
Total	33 (32,7%)	23 (22,8%)	45 (44,6%)	101 (100,0%)

As 110 lesões foram classificadas em oito grupos: a) lesões brancas, 33,6%; b) hiperplasia fibrosa inflamatória, 15,5%; c) carcinoma, 12,7%; d) papiloma, 10,0%; e) granuloma piogênico, 7,3%; f) mucocelo, 6,4%; g) outras (conjunto de lesões de baixa frequência), 10,0%; h) lesões não submetidas a biópsias, 4,5%.

Das 110 lesões, o teste do azul de toluidina foi positivo para 31 lesões (28,2%), 20 com marcações focais e 11 difusas (Tabela II). Houve forte positividade nos granulomas piogênicos, já esperada pela presença de exsudato e grande número de núcleos de leucócitos expostos (Figura 3).

Tabela II. Distribuição da positividade ao teste do azul de toluidina nas lesões clinicamente identificadas

Grupo de lesões (clínica)	Número Total	Percentual Total	Toluidina (Negativo)	Toluidina (Positivo)		
				N (%) total (positivo)	Focal	Difuso
Lesões brancas	37	33,6%	31 (83,8 %)	06 (16,2%)	05	01
Carcinoma	14	12,7%	-	14 (100%)	07	07
Hiperplasia fibrosa inflamatória	17	15,5%	17 (100%)	-		
Granuloma piogênico	08	7,3%	04 (50,0%)	04 (50,0%)	01	03
Mucocelo	07	6,4%	05 (71,4%)	02 (28,6%)	02	
Papiloma	11	10,0%	08 (72,7%)	03(27,3%)	03	
Hiperplasia papilar inflamatória	01	0,9%	01 (100%)	-		
Mácula melanótica	02	1,8%	02 (100%)	-		
Glossite migratória benigna	01	0,9%	01(100%)	-		
Pênfigo vulgar	01	0,9%	-	01 (100%)	01	
Grânulos de Fordyce	01	0,9%	01(100%)	-		
Linfangioma	01	0,9%	01(100%)	-		
Pólipo pulpar	01	0,9%	01(100%)	-		
Aderência	01	0,9%	01(100%)	-		
Cisto gengival do adulto	01	0,9%	01(100%)	-		
Eritema multiforme	01	0,9%	-	01 (100%)	01	
Lesões não submetidas a biópsias	05	4,5%	05 (100%)	-		
TOTAL	110	100%	79 (71,8%)	31 (28,2%)	20	11



Figura 1. Técnica do emprego do teste do azul de toluidina

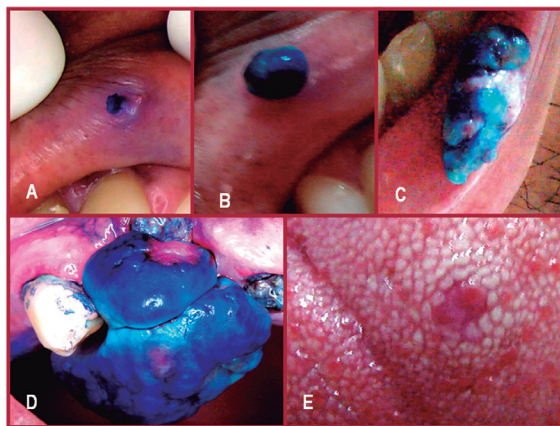


Figura 3. Coloração do azul de toluidina em granulomas piogênicos. 3A. positivo focal; 3B. positivo difuso; 3C. positivo difuso; 3D. positivo difuso; 3E. negativo

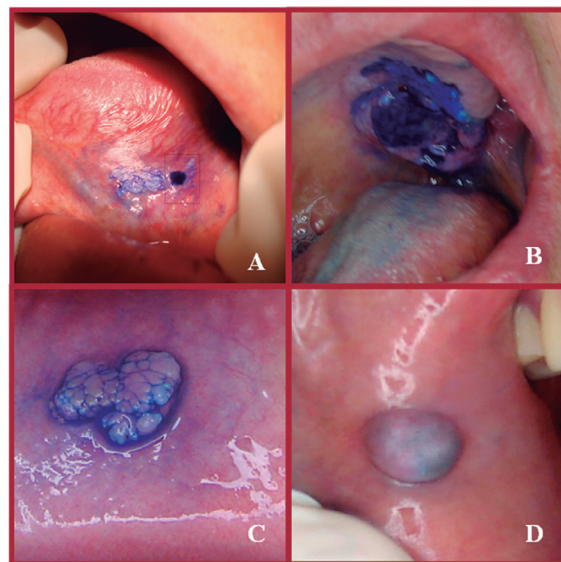


Figura 2. Padrões de resultados do teste com o azul de toluidina. 2A. Positivo focal. Ceratose com displasia epitelial moderada; 2B. Positivo difuso. Adenocarcinoma de células basais; 2C. Negativo com retenção. Papiloma escamoso oral; 2D. Negativo. Hiperplasia fibrosa inflamatória

Das 37 lesões brancas encontradas, seis lesões (16,2%) foram positivas ao teste de azul de toluidina e apresentaram displasias epiteliais de leve a moderada no exame histopatológico e 31 lesões (83,8%) foram negativas ao teste do azul de toluidina, destas 21 (67,7%) não exibiram displasias epiteliais, porém, 10 (32,3%) apresentaram displasias epiteliais de leve a severa no exame histopatológico.

Discussão

O protocolo estabelecido para esta investigação teve como diretriz metodológica a valorização da avaliação da mucosa bucal como o mais importante mecanismo de prevenção e diagnóstico precoce das lesões bucais (5). Entretanto, em alguns casos, a avaliação clínica não apresentou aspectos conclusivos do diagnóstico, o que gerou a necessidade de métodos complementares, como o azul de toluidina. A biópsia foi considerada o padrão ouro diagnóstico nesse trabalho como preconiza a literatura (1, 4, 7, 11, 12, 18).

Devemos atentar aos fatores de risco para malignidade envolvendo os pacientes com lesões. Apenas três pacientes com leucoplasias e dois com carcinomas nunca estiveram expostos aos fatores de risco levantados em nossa amostra, evidenciando a correlação entre estes fatores e o desenvolvimento destas lesões. Os pacientes com outros tipos de lesões não suspeitas de malignidade estavam proporcionalmente bem menos expostos a estes fatores.

Em todas as lesões foi realizado o teste do azul de toluidina, que foi positivo em 31 das 110 lesões estudadas, em 20 as marcações foram focais e em 11 difusas.

Das 37 lesões brancas submetidas a biópsias, seis foram positivas ao teste com o azul de toluidina e todas elas exibiam displasias de leve a moderada no exame histopatológico, resultados estes concordantes com a literatura que indica o azul de toluidina na detecção das displasias epiteliais (3, 6, 8, 13, 14, 16, 17, 19, 20).

Das 31 lesões brancas negativas ao teste do azul de toluidina, 21 não apresentaram displasias epiteliais no exame histopatológico como era esperado, porém, 10 lesões exibiram displasias epiteliais de leve a severa, casos estes em que seria esperada positividade ao teste com o azul de toluidina já que apresentavam displasias epiteliais. Um caso tratava-se de leucoplasia verrucosa proliferativa com displasia epitelial grave e sete casos de ceratoses com displasias epiteliais de leve a moderada, todas estas lesões exibiam na clínica grossas camadas de ceratina. Resultados falso-negativos podem ocorrer nas displasias epiteliais recobertas por paracerases que impedem a penetração do corante (2, 6, 14, 16, 20). Os outros dois casos eram queilites actínicas com displasias leves, cujos resultados negativos ao teste com o azul de toluidina explicam-se pela mucosa do vermelho de lábio possuir um epitélio de transição entre pele e mucosa, portanto, mais ceratinizado e logo, mais difícil de ser penetrado pelo corante.

Das oito lesões com diagnóstico histopatológico de granuloma piogênico observou-se positividade ao azul de toluidina em quatro. Estas lesões eram desprovidas de revestimento epitelial e eram recobertas por exsudato fibrino-leucocitário. Os outros quatro casos foram negativos ao azul de toluidina por tratarem de lesões já em fase de cicatrização e epitelizada (Figura 3). Além

de corar DNA e RNA de lesões epiteliais, áreas de lesões exsudativas também se coram fortemente pelo azul de toluidina. A positividade ocorre em função da presença de necrose liquefativa, em decorrência dos abundantes núcleos dos leucócitos. Tecidos lesionados ou com irritações, aberturas glandulares (2), tecido de granulação, processos e presença de mucina ou exsudato purulento (16), úlceras traumáticas e processos inflamatórios crônicos (10, 14, 16) levam a resultados positivos ou falso-positivos com o teste do azul de toluidina.

Pode ocorrer confusão na interpretação do resultado do exame quando o corante retém-se mecanicamente no dorso da língua, nas áreas das papilas filiformes, criptas e fissuras linguais, na abertura dos ductos das glândulas salivares menores do palato e em lesões com irregularidades e fissuras na superfície da mucosa bucal (3, 15, 17, 19). Estas retenções podem sugerir resultados falso-positivos, situações estas que ocorreram com frequência na amostra desse estudo.

Considerações Finais

O teste com o azul de toluidina é um recurso objetivo que auxilia o exame clínico subjetivo do profissional. É de fácil execução, entretanto, não deve ser o único método auxiliar ao exame clínico utilizado para diagnosticar lesões epiteliais precursoras, em decorrência dos casos falso-negativos. É um indicador de aumento do número de núcleos por área tecidual e pode ser utilizado para identificar áreas de displasias epiteliais, porém, tendo sempre em mente que grandes volumes de conteúdo nuclear de células típicas também poderão revelar positividade. 

Referências Bibliográficas

1. ACHA, A., RUESGA, M. T., RODRIGUEZ, M. J. *et al.* Applications of the oral scraped (exfoliative) cytology in oral cancer and precancer. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.* 2005; 10 (2): 95-102.
2. BODEN, S. E. Early detection of oral cancer by application of four methods. *Federal Dental Services.* 1967; 23 (6): 811-4.
3. CHACRA, J. J., LEHN, C. N., CAMPI, J. P. B. *et al.* Detecção Precoce do Câncer de Cavidade Oral pela Coloração do Azul de Toluidina. *Acta Oncológica Brasileira.* 1994; 14 (1): 31-4.
4. COWPE, J. G., LONGMORE, R. B., GREEN, M. W. Quantitative exfoliative cytology of abnormal oral mucosal smears. *Journal of the Royal Society of Medicine.* 1988; 81: 509-13.
5. EPSTEIN, J. B., ZHANG, L., ROSIN, M. Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. *J. Can. Dent. Assoc.* 2002; 68 (10): 617-21.
6. GANDOLFO, S., BROCCOLETTI, R., PAGANO, M. *et al.* Toluidine Blue uptake in potentially malignant oral lesions in vivo: clinical and histological assessment. *Oral Oncol.* 2006; 42 (1): 89-95.
7. KAUGARS, G. E., SILVERMAN, S. J., RAYA, K. *et al.* The use of exfoliative cytology for the early diagnosis of oral cancer: Is there a role for it in education and private practice? *J. Cancer Education.* 1998; 13: 85-9.
8. KERAWALA, C. J., BEALE, V., REED, M. *et al.* The role of vital tissue staining in the marginal control of oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2000; 29: 32-5.
9. KUJAN, O., GLENNY, A. M., DUXBURY, A. J. *et al.* Screening programmes for the early detection and prevention of oral cancer. *Evid Based Dent.* 2004; 5 (2): 40-1.
10. MARTIN, I. C., KERAWALA, C. J., REED, M. The application of Toluidine Blue as a diagnostic adjunct in the detection of epithelial dysplasia. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 1998; 85: 444-6.
11. MIGLIORATI, C. A., JONES, A. C., BAUGHMAN, P. A. Use of exfoliative cytology in the diagnosis of oral hairy leukoplakia. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 1993; 76 (6): 704-10.
12. MISHRA, M., MOHANTY, J., SENGUPTA, S. *et al.* Epidemiological and clinicopathological study of oral leukoplakia. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 2005; 71 (3): 161-5.
13. NIEBEL, H. H., CHOMET, B. In Vivo Staining Test for Delineation of Oral Intraepithelial Neoplastic Change: Preliminary Report. *Journal of the American Dental Association.* 1964; 68: 801-6.
14. ONOFRE, M. A., SPOSTO, M. R., NAVARRO, C. M. Reability of toluidine blue application in the detection of oral epithelial dysplasia and in situ and invasive squamous cell carcinomas. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 2001; 91 (5): 535-40.
15. RAPOPORT, A., CHACRA, J. J., LEHN, C. N. *et al.* Detecção precoce do câncer de cavidade oral pela coloração com azul de Toluidina. *Rev. do Colégio Brasileiro de Cirurgias.* 1993; 21 (1): 57-60.
16. ROCHA, W. C., LORANDI, C. S., MENDONÇA, E. F. Uso do azul de toluidina como método auxiliar da detecção de displasias epiteliais e carcinomas da mucosa bucal. *Rev. Odonto Ciência.* 1996; 21 (1): 27-49.
17. SHEDD, D. P., HUKILL, P. B., BAHN, S. *et al.* Further appraisal of in vivo staining properties of oral cancer. *Arch. Surg.* 1967; 95: 16-22.
18. SILVA, M. C. A., RADOS, P. V. Citopatologia: um recurso auxiliar na prevenção do câncer bucal em pacientes do sexo masculino. *Rev. Fac. Odontol.* 1997; 38 (2): 3-10.
19. SILVERMAN, S. J., MIGLIORATI, C., BARBOSA, J. Toluidine Blue Staining in the detection of oral precancerous and malignant lesions. *Oral Surgery, Oral Medicine Oral Pathology.* 1984; 4: 379-82.
20. WARNAKULASURIYA, K. A. A. S., JOHNSON, N. W. Sensitive and specificity of OraScan tolluidine blue mouthrinse in the detection of oral cancer and precancer. *J. Oral Pathol. Med.* 1996; 25: 97-103.

Recebido em: 06/10/2010 / Aprovado em: 10/08/2011

Terezinha Lisieux Lopes Calandro

Rua Pereira Nunes, 107/1002 – Ingá

Niterói/RJ, Brasil – CEP: 24210-430

E-mail: terezinha.lisieux@int.gov.br