

BIOMONITORAMENTO CITOGENÉTICO DE LESÕES ORAIS

Bruno Sousa Pereira¹ e José Roberto Cardoso Meireles²

1. Bolsista FAPESB, Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: brunnobala@hotmail.com
2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: jrcmeireles@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: micronúcleo, apoptose, periodontite

INTRODUÇÃO

As práticas de higiene são fundamentais na prevenção das doenças bucais, especialmente a doença periodontal. Em diversos estudos pesquisadores têm demonstrado associação entre higiene bucal e o surgimento de placa bacteriana (PAGE, 1986; SHEIHAM, 1988; LEVINE, 1991).

Embora o desenvolvimento da periodontite esteja relacionado a fatores externos, a exemplo da placa bacteriana, alguns pesquisadores sugerem que fatores genéticos são relevantes para a ocorrência da infecção (HODGE & MICHALOWICZ, 2001; MENG *et al.*, 2007; BAKER & ROOPENIAN, 2002). Marques *et al.*, (2008) consideram que a má higiene bucal e surgimento de sangramentos na gengiva são importantes para o desencadeamento de processos neoplásicos, o que associado a suscetibilidade genética pode ser um fator importante no desenvolvimento de câncer.

Sendo o câncer uma doença genética causada por mutações em genes envolvidos no controle da proliferação e diferenciação celular, a identificação de alterações genéticas se constitui em uma medida importante de prevenção do câncer, uma vez que estas alterações ocorrem antes da manifestação de qualquer sintoma clínico da doença.

Assim, o presente estudo objetivou avaliar a frequência de danos genéticos, traduzidos em micronúcleo, e alterações indicativas de apoptose no epitélio oral de indivíduos com periodontite crônica visando contribuir na elucidação do potencial de malignização destas lesões.

METODOLOGIA

Amostra: o grupo amostral do presente estudo incluiu vinte indivíduos portadores de periodontite crônica segundo critérios da American Academy of Periodontology (AAP, 1999).

Caracterização da Amostra: a amostra foi caracterizada pela aplicação de questionário e o exame odontológico para avaliação da condição oral foi realizada por cirurgião dentista, especialista em periodontia. Dois parâmetros foram avaliados: higiene bucal (satisfatória ou insatisfatória) e presença ou não de lesão. Aqueles indivíduos nos quais foram identificados presença de placa bacteriana, cálculo dental e saburra bucal tiveram a higiene bucal classificada como insatisfatória.

O dentista também avaliou o tipo de lesão e aqueles que não foram classificados como portadores de periodontite crônica moderada, segundo critérios acima relatados, não foram incluídos na amostra.

Obtenção do Material para Estudo Citogenético: o material biológico utilizado no estudo foram células da mucosa oral em áreas sem alterações e com lesão (periodontite crônica) obtidas com auxílio de escova endocervical e cureta, respectivamente.

Preparações para o Estudo do Micronúcleo: o material coletado foi transferido, por esfregaço, para lâmina de microscopia estéril contendo duas gotas de soro fisiológico (NaCl

0,9%). Após secagem à temperatura ambiente as preparações foram submersas por dez minutos em solução de metanol/ácido acético (3:1) para fixação. Vinte e quatro horas depois o material foi corado com o reativo de Shift e contra-corado com fast green a 1%.

Análise Citogenética: toda análise foi realizada em teste cego com relação aos dados do questionário, um total de quatro mil células por indivíduo foi analisado, sendo duas mil da região da lesão e igual número da região sem alteração. Desse modo o indivíduo foi seu “próprio controle”. Seguindo a sugestão de Tolbert *et al.* (1992) e Holland *et al.* (2008), além de micronúcleo, células apresentando alterações nucleares indicativas de apoptose (cariorréxis, picnose, cromatina condensada) foram também incluídas na análise microscópica.

Análise Estatística: a análise estatística referente a ocorrência de micronúcleo e alterações nucleares foi realizada com o uso do teste condicional para comparação de proporções em situações de eventos raros (BRAGANÇA-PEREIRA, 1991).

Aspectos éticos: todo procedimento foi realizado após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Feira de Santana (protocolo 088/2009 – CAAE 0093.0059.000-09).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Características da amostra: a média de idade dos indivíduos que compuseram a amostra foi de $45,4 \pm 10,35$. Nenhum indivíduo informou hábito de fumar e três relataram não ingerir bebida alcoólica. O hábito de consumo de bebida alcoólica socialmente (em média 1,8 l de cerveja por semana) foi informado por 17 participantes. Nenhum participante informou exposição ocupacional a agentes genotóxicos e/ou radiação. A tabela 1 sumariza as características da amostra estudada.

Tabela 1 – Caracterização da Amostra

Características	Resultados
Média de Idade	$45,4 \pm 10,35$
Gênero	
Masculino	11
Feminino	09
Hábito de fumar	
Não fumantes	20
Fumantes	0
Consumo de bebida alcoólica	
Consumidores	17
Não-Consumidores	03

Avaliação odontológica: quanto à condição de higiene oral dos participantes todos apresentaram higiene oral insatisfatória e evidentemente periodontite crônica moderada, uma vez que este foi o critério de inclusão na amostra neste estudo

Análise citogenética: um total de 80.000 células foi analisado: 40.000 da área com lesão (CL) e 40.000 da área sem lesão (SL). A figura 1 apresenta fotomicrografias de células observadas na análise citogenética.

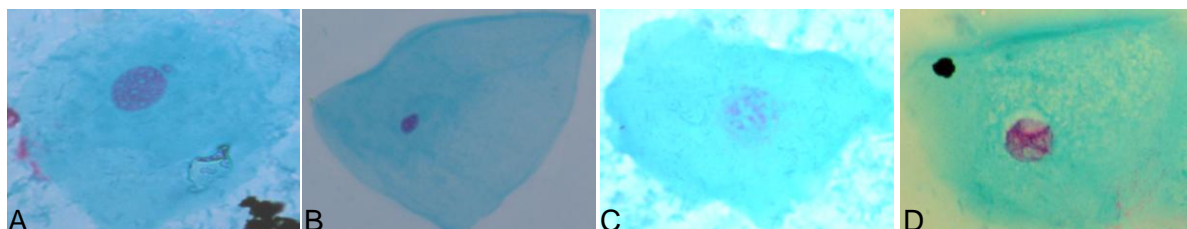


Figura 1 – Fotomicrografia de células esfoliadas da mucosa oral corada pelo método *Felguen/Fast grenn* apresentando micronúcleo (A), picnose (B), cariorréxis (C), cromatina condensada (D). Aumento: 1.000X. Microscópio Zeiss Axioscop.

A análise estatística comparando a frequência dos marcadores biológicos observados nestas duas regiões da mucosa bucal revelou que a frequência de micronúcleo e alterações nucleares indicativas de apoptose foi significativamente maior na área da lesão (tabela 2).

Tabela 2 – Ocorrência de alterações genéticas e nucleares na mucosa oral com lesão e sem lesão de indivíduos portadores de periodontite crônica

Marcador citogenético	Mucosa com lesão		Mucosa sem lesão		Parâmetros estatísticos	
	OBS.	ESP.	OBS.	ESP.	χ^2	P*
MN	30	19	9	19	11,3077	p<0,05
Picnose	107	67	27	67	47,7611	p<0,001
C. condensada	790	455	120	455	493,2967	p<0,001
Cariorréxis	5.430	3.385	1.340	3.385	2.470,9158	p<0,0001

MN = micronúcleo; C. condensada = cromatina condensada; OBS. = observado; ESP. = esperado

Neste estudo a média de idade dos indivíduos da amostra foi de 45,4 anos e nenhum informou hábito de fumar, segundo Magalhães *et al.* (2007), um dos fatores predisponentes para a ocorrência de periodontite. Este resultado ratifica os de Moreira *et al.* (2006) que também não identificaram associação entre hábito de fumar e periodontite. De acordo com Carrard *et al.* (2007) pessoas que ingerem bebidas alcoólicas tem maior probabilidade de desenvolver doenças bucais, inclusive periodontite crônica. Neste estudo todos os participantes eram portadores de periodontite crônica e 30% destes não relataram hábitos etilistas. Desse modo não é possível associar hábitos etilistas e/ou tabagistas e periodontite.

As lesões crônicas são estímulos para resposta inflamatória que resulta na presença de linfócitos que medeiam sinais de apoptose no local do trauma (BASCONES *et al.*, 2008). Desse modo, o processo inflamatório pode atuar como fator mutagênico. O que pode explicar a frequência de MN significativamente maior nas células da área da lesão quando comparada a ocorrência destes marcadores nas células da área sem lesão observada neste estudo.

Segundo ,Birchall *et al.* (1995) os índices de apoptose em mucosa oral normal, com displasia e neoplasia a alteração tecidual está relacionada com a indução da apoptose. Assim, a maior ocorrência de alterações indicativas de apoptose observada neste estudo indica uma “tentativa” do organismo em eliminar células danificadas. Entretanto aponta para o potencial carcinogênico das lesões periodontais, uma vez que o avanço destas lesões, em caso de não tratadas, pode comprometer os mecanismos apoptóticos e permitir a promoção do câncer.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados obtidos nesse estudo pode-se concluir que a periodontite crônica é uma lesão na qual há comprometimento da integridade genética da célula. A maior ocorrência de alterações indicativas de apoptose na área da periodontite crônica aponta para a resposta biológica do organismo ao insulto genotóxico ao qual as células nestas lesões estão submetidas.

REFERÊNCIAS

AAP, AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. Annals of Periodontology. International Workshop for a classification of periodontal diseases and conditions. v. 4, p. 1-6, 1999.

BAKER, P. J.; ROOPENIAN, D. C. Genetic susceptibility to chronic periodontal disease. *Microbes and Infection*. 4(11): 1157-1167, 2002.

BASCONES-ILUNDAIN C, GONZALES-MOLES MA, ESPARZA-GOMEZ G, GIL-MONTOYA JA, BASCONES-MARTINEZ A. Importance of apoptotic mechanisms in inflammatory infiltrate of oral lichen planus lesions. *Anticancer Res*. 2008; 26: 357-362.

BIRCHALL MA, Winterford CM, Allan DJ and Harmon BV (1995) Apoptosis in normal epithelium, premalignant and malignant lesions of the oropharynx and oral cavity: a preliminary study. *Eur J Cancer Oral Oncol* 31B: 380–383.

BRAGANÇA-PEREIRA, C.A. Teste estatístico para comparar proporções em problemas de citogenética. p.113-21, 1991.

CARRAD VC, Filho MS, Rados PV, et al. Quantification of silver staining nucleolar organizer region in epithelial cells of tongue of mice after exposure to, or intake of, alcohol. *Alcohol*. 2007.34:233-8.

HODGE, P. & MICHALOWICZ, B. Genetic predisposition to periodontitis in children and young adults. *Periodontology* 2000. 26(1): 113-134, 2001.

HOLLAND, N.; BOLOGNESI, C.; KIRSCH-VOLDERS, M.; BONASSI, S.; ZEIGER, E.; KNASMUELLER, S.; FENECH, M. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN Project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutation Research.*, 659: 93-108., 2008.

LEVINE, R. The scientific basis of dental health education. 3th. London, Health Education Authority, 1991.

MARQUES, L. A.; ELUF-NETO, J.; FIGUEIREDO, R. A. O.; GÓIS-FILHO, J. F.; KOWALSKI, L.P.; CARVALHO, M.B.; ABRAHÃO, M.; WÜNSCH-FILHO, V. Saúde bucal, práticas de higiene bucal e ocorrência de câncer da cavidade oral. *Rev Saúde Pública*. 42(3): 471-479, 2008.

MAGALHAES MD et al. Exposure measurement in the association between periodontal disease and prematurity/low birth weight. *J Clin Periodontol* 2007; 34:957-96.

MENG, H.; XU, L.; LI, Q.; HAN, J.; ZHAO, Y. Determinants of host susceptibility in aggressive periodontitis. *Periodontology* 2000. 43 (4): 133-159, 2007.

MOREIRA, A. L.; Vianna, M. I.; Cangussu, M. C. T. Condições periodontais associadas aos fatores socioeconômicos na população adulta em Salvador (BA), 2005. *R. Ci. méd. biol.*, Salvador, v. 6, n. 1, p. 39-46: 2006.

SHEIHAM, A. The epidemiology, etiology, and public health aspects of periodontal disease In: Grant, D. A., Stern, I. B.; Listgarten. M. A. Orban. C.V. Mosby, p. 216-51, 1988.

..
.