

BIOMONITORAMENTO CITOGENÉTICO DE LESÕES ORAIS

Dilson Luciano Costa Junior¹; José Roberto Cardoso Meireles².

1. Bolsista PROBIC/UEFS, Graduando em Odontologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: djunior83@hotmail.com
2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: jrcmeireles@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: micronúcleo, periodontite agressiva, apoptose.

INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória dos tecidos periodontais que inclui a gengiva, os ligamentos periodontais, o cimento, o osso alveolar, além dos feixes vasculares e neurais que suprem estes tecidos (LIVINGSTON, PARSELL & POLLACK, 2002). Livingston, Parsell & Pollack (2002) sugerem como fatores de riscos ao desenvolvimento desta doença o uso de cigarro, diabetes, osteoporose, idade avançada, níveis de hormônios estrogênicos e fatores genéticos.

Michaud *et al.* (2008) realizaram estudo incluindo 48.375 homens, destes 5.720 tinham algum tipo de câncer. Estes autores associaram a doença ao histórico tabagista, alimentação e doenças periodontais, além de sugerirem relação entre as doenças periodontais e câncer de pulmão. Hujoel *et al.* (2003) corroboram com estes resultados e salientam que a periodontite também aumenta o risco de desenvolvimento de câncer nos brônquios. Tezal *et al.* (2007) em estudo semelhante sugerem associação entre periodontite crônica e câncer de língua.

O câncer é uma doença genética que tem origem a partir de alterações em genes relacionados com o reparo a danos no DNA durante a replicação, com o controle da proliferação e diferenciação celular. Os tumores surgem a partir de uma única célula que origina uma linhagem celular diferente daquelas do tecido ao qual pertence. Desta forma os fatores que representem riscos de danos ao DNA tornam-se um perigo para a saúde dos indivíduos que estão expostos (GRIFFITHS *et al.*, 2006).

Neste contexto, avaliar os possíveis danos genéticos ocasionados durante o processo inflamatório de periodontite é importante, uma vez que estes dados podem contribuir para a compreensão da possibilidade desta lesão evoluir para neoplasia. Assim o desenvolvimento deste estudo objetivou avaliar, utilizando o Teste de Micronúcleo em células esfoliadas da lesão, possíveis danos genéticos em indivíduos portadores de periodontite agressiva.

METODOLOGIA

O presente estudo incluiu dois indivíduos portadores de periodontite agressiva. Estes indivíduos responderam um questionário contendo indagações a respeito de hábitos de vida e de higiene bucal. Além disso, a avaliação oral para diagnóstico de lesão oral foi realizada com auxílio de um cirurgião dentista.

O material biológico utilizado foi células da mucosa oral em áreas sem alterações e em áreas com lesão periodontal. Este material foi coletado por raspagem gentil da mucosa bucal com uso de escova endocervical e transferido, por esfregaço, para lâmina de microscopia estéril. Após secagem à temperatura ambiente as lâminas foram submersas em solução de metanol/ácido acético (3:1) por 10 min para fixação do material biológico que após 24h de secagem à temperatura ambiental foi hidrolisado em ácido clorídrico (5N) e corado com reativo de Schiff e *fast green*.

A análise citogenética foi realizada em microscopia óptica (200X) em teste cego com relação aos dados do questionário. Os critérios de identificação de micronúcleo adotados foram os descritos por Sarto *et al.* (1987) e Tolbert *et al.* (1992). Células apresentando alterações nucleares degenerativas como cariorréxis, picnose e cromatina condensada também foram incluídas na contagem para inferir acerca da ocorrência de apoptose. A análise estatística foi realizada com uso do teste condicional para comparação de proporções em situações de eventos raros (BRAGANÇA-PEREIRA, 1991).

Todo procedimento metodológico teve início 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

As periodontites agressivas constituem um conjunto de doenças que abrange múltiplas subformas que revelam um fenótipo clínico comum. São consideradas raras já que acometem cerca de 1% da população (TREVILATTO *et al.*, 2002). Em estudos epidemiológicos a respeito da prevalência da periodontite agressiva (PA), Albandar *et al.* (1991) analisando radiografias interproximais relataram uma prevalência de 1,3% de PA em uma população de escolares de 13 anos de idade, de alto nível socioeconômico na cidade de São Paulo. Susin & Albandar (2005) utilizando como critério de diagnóstico a presença de bolsas periodontais ≥ 4 mm em quatro ou mais dentes demonstraram uma prevalência de PA de 2,5% entre indivíduos com 14 a 19 anos de idade em Porto Alegre.

A baixa prevalência da patologia associada com os aspectos clínicos saudáveis da região afetada pode induzir ao subdiagnóstico. Estes fatores têm se caracterizado significativos entraves no que concerne à localização de indivíduos que se encaixem no perfil deste estudo que tem previsão de avaliar ocorrência de danos genéticos em cinquenta indivíduos com PA. Entretanto em quatro meses de coleta apenas dois indivíduos foram diagnosticados com a doença, deste modo os resultados apresentados são referentes a amostras de células esfoliadas da mucosa oral coletadas nestes dois indivíduos.

Os dois indivíduos analisados eram do sexo feminino com idades de 25 e 29 anos. Nenhum dos dois relatou hábito de fumar, ingestão de bebidas alcoólicas, uso de medicamentos, exposição à radiação e ou produtos tóxicos. Ambos, conforme análise clínica e depoimento apresentaram higiene oral adequada e baixa incidência de biofilme bacteriano. Segundo antecedentes médicos, os indivíduos eram saudáveis e a influência de doenças sistêmicas foi descartada. Segundo López *et al.* (1996) e Clerehugh *et al.* (1997) em indivíduos jovens acometidos com doença periodontal a ocorrência de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* pode variar de 40% a 100%. Sugere-se, portanto, que a etiologia da doença nesses indivíduos esteja ligada a este patógeno. Entretanto, deficiências imunológicas e traços de hereditariedade também podem estar associados com a patogênese da doença.

Os resultados referentes à análise microscópica são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Ocorrência de micronúcleo e alterações nucleares indicativas de apoptose em células esfoliadas de mucosa oral hígida e com periodontite agressiva

Biomarcadores	Sítios hígidos		Sítios com lesão	
	Indivíduo 1 ^a	Indivíduo 2 ^b	Indivíduo 1 ^c	Indivíduo ^d
Micronúcleo	1	2	0	0
Cariorréxis	24	5	0	16
Cromatina condensada	2	4	0	0
Picnose	73	18	2	83

^acélulas analisadas: 2.549; ^bcélulas analisadas:2.747; ^ccélulas analisadas: 189; ^dcélulas analisadas:2.932

O número de células na lâmina correspondente ao sítio da periodontite do indivíduo 1 como observado na Tabela 1 foi muito baixo, o que não possibilitou análise estatística. Desse modo, uma análise estatística preliminar foi realizada comparando a ocorrência de micronúcleo e apoptose (Σ cariorréxis + cromatina condensada + picnose) no material coletado do sítio com lesão e sem lesão do indivíduo 2 (Tabela 2).

Tabela 2. Micronúcleo e apoptose em células esfoliadas de mucosa com periodontite agressiva e hígida.

Sítio	Micronúcleo		Apoptose*	
	Observado	Esperado	Observado	Esperado
com lesão	0	1,03	99	65,05
sem lesão	2	0,97	27	60,95
χ^2 (G.L. = 1)	2,13 (p>0,05)		36,62 (p<0,05)	

Legenda* Σ cariorréxis + cromatina condensada + picnose

Em relação à ocorrência de micronúcleo (Figura 1) observou-se que a frequência não diferiu significativamente entre os dois sítios. Por outro lado, na mucosa com lesão a ocorrência de alterações nucleares indicativa de apoptose (Figura 2) foi significativamente maior.

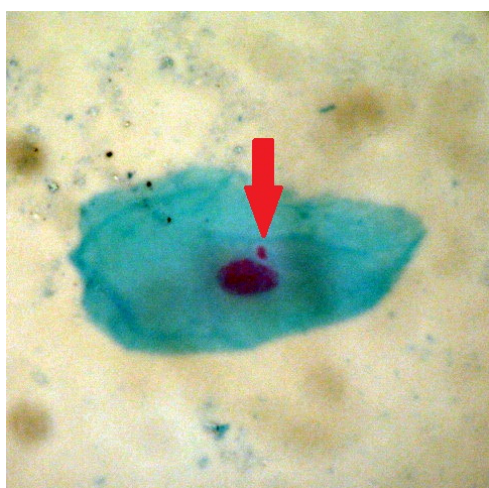


Figura 1. Fotomicrografia de uma célula esfoliada apresentando um micronúcleo (indicado pela seta)

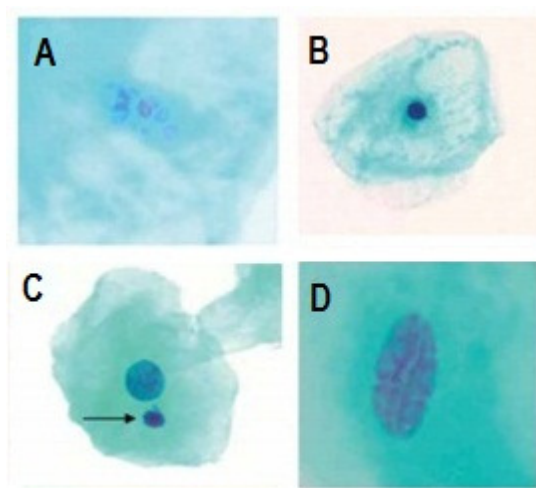


Figura 2. Fotomicrografias de células esfoliadas apresentando cariorréxis(a), picnose(b), micronúcleo(c) e cromatina condensada(d). Fonte: Nature Protocols: 4 (6) 2009.

Os resultados no que se refere a ocorrência de apoptose, embora devam ser vistos com ressalvas, uma vez que o teste de micronúcleo não é um exame individual, sugerem que a lesão que se desenvolve na periodontite agressiva insulta genotoxicamente o tecido. Segundo Birchall *et al.* (1995) a apoptose é um mecanismo de morte celular programado geneticamente que permite a eliminação de células alteradas e participa das vias de controle da quantidade de células decorrente da proliferação excessiva, fatores que podem perturbar a homeostase tecidual e deste modo estarem envolvidos na transformação maligna.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados pode-se concluir que, a periodontite agressiva é uma patologia onde fatores a ela inerentes comprometem a integridade genética da célula que responde através da indução de apoptose.

REFERÊNCIAS

- ALBANDAR, J.M.; BUISCHI, Y.A.; BARBOSA, M.F. 1991. Destructive forms of periodontal disease in adolescents. A 3-year longitudinal study. *J Periodontol.* 62(6):370-6.
- BRAGANÇA-PEREIRA, C.A. 1991. Teste estatístico para comparar proporções em problemas de citogenética. In: M.N. RABELLO-GAY; M.A.L.A.R. RODRIGUES; R. MONTELEONE-NETO (eds), *Mutagênese, carcinogênese e teratogênese: Métodos e critérios de avaliação.* p.113-21. São Paulo: Sociedade Brasileira de genética.
- BIRCHALL, M.A.; WINTERFORD, C.M.; ALLAN, D.J.; HARMON, B.V. 1995. Apoptosis in normal epithelium, premalignant and malignant lesions of the oropharynx and oral cavity: a preliminary study. *Eur J Cancer Oral Oncol.* 31B(6):380-3.
- CLEREHUGH, V.; SEYMOUR, G.J.; BIRD, P.S.; CULLIAN, M.; DRUCKER, D.B.; WORTHINGTON, H.V. 1997. The detection of *A. actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* using an ELISA in an adolescent population with early periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 24(1)57-64.
- GRIFFITHS, A.J.F.; WESSLER, S.R.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.; SUZUK, D.T.; MILLER, J.H. 2006. *Introdução à genética.* Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 743p.
- HUJOEL, P. P.; DRANGSHOLT, M.; SPIEKERMAN, C.; WEISS, N.S. 2003. An Exploration of the Periodontitis - Cancer Association. *Ann Epidemiol.* 13(5)312-16.
- LIVINGSTON, M.; PARSELL, D.; POLLACK, S.2002. Periodontal Disease: Systemic Risk Factors. *J Correct Health Care.* 9(3)247-55.
- LÓPEZ, N.J.; MELLADO, J.C.; LEIJHTON, J.X. 1996. Occurrence of *A. actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in juvenile periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 23(2)101-5.
- MICHAUD, D.S.; LIU, Y.; MEYER, M.; GIOVANNUCCI, E.; JOSHIPURA, K. 2008. Periodontal disease, tooth loss, and cancer risk in male health professionals: a prospective cohort study. *Lancet Oncol.* 9(6)550-8.
- SARTO, F.; FINNOTO, S.; GIACOMELLI, L.; MAZZOTTI, D.; TOMANIN, R.; LEVIS, A. G. 1987. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. *Mutagenesis.* 2(1)11-7.
- SUSIN, C.; VALLE, P.; OPPERMAN, R.V.; HAUGEJORDEN, O.; ALBANDAR, J.M. 2005. Occurrence and risk indicators of increased probing depth in an adult Brazilian population. *J Clin Periodontol.* 32(2):123-9.
- TEZAL, M.; SULLIVAN, M.; REID, M.; MARSHALL, J.R.; HILAND, A.; LOREE, T.; LILLIS, C.; HAUCK, L.; WACTAWSKI, W.J.; SCANNAPIECO, F.A. 2007. Chronic periodontitis and the risk of tongue cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 133(5)450-4.
- TOLBERT, P.E.; SHY, C. M.; ALLEN, J.W. 1992. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res.* 271(1)69-77.
- TREVILATTO, P.C.; TRAMONTINA, V.A.; MACHADO, M.A; GONÇALVES, R.B.; SALLUM, A.W.; LINE, S.R. 2002. Clinical, genetic and microbiological findings in a Brazilian family with aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol.* 29(3)233-9.