

DANOS GENÉTICOS EM CÉLULAS DA MUCOSA ORAL DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE PERIODONTITE AGRESSIVA

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: jremeireles@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: micronúcleo, periodontite agressiva, apoptose.

INTRODUÇÃO

A gengivite e a periodontite são duas categorias de doenças orais mais prevalentes em diversas populações. 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 *et al.*, 2002). Livingston, *et al.* (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.

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 \geq 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.

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. Hujuel *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.

Neste contexto, avaliar os possíveis danos genéticos ocasionados durante o processo inflamatório das periodontites 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, especificamente, de periodontite agressiva.

METODOLOGIA

O presente estudo incluiu 41 indivíduos triados, onde desses, três eram 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 por meio de periograma e exame radiográfico.

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 ambiente 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

Os três indivíduos analisados foram do sexo feminino com idades de 25 e 38 anos. Nenhum relatou hábito de fumar, ingestão de bebidas alcoólicas, uso de medicamentos, exposição à radiação e ou produtos tóxicos. Os relatos e a análise clínica revelaram que todos apresentaram higiene oral adequada e baixa incidência de biofilme bacteriano. Segundo relataram quando questionados acerca de antecedentes médicos, concluiu-se que todos eram indivíduos sem histórico de doenças sistêmicas.

Segundo Boraks (1999), um estímulo patológico pode ocasionar divisão caótica e sem controle das células de um local gerando assim um crescimento tecidual autônomo que foge dos padrões genéticos e fisiológicos. No presente estudo a natureza inflamatória da periodontite agressiva pode ser considerada o tal estímulo patológico ao qual se refere Boraks (1999). Estudos dos diversos aspectos envolvidos no desenvolvimento da periodontite agressiva são escassas devido a sua baixa incidência, em torno de 1% a 2% (ALBANDAR *et al.*, 1991; TREVILATTO *et al.*, 2002; SUSIN & ALBANDAR (2005). Este percentual de incidência pode explicar o baixo número de indivíduos analisados neste estudo, no qual foram avaliados clinicamente 41, mas apenas três, o que representa aproximadamente 7%, foram diagnosticados com a doença. Embora 41 indivíduos seja uma amostra pequena, este resultado merece atenção em estudos futuros, pois uma prevalência de 7% é significativamente maior da relatada em outros estudos. Além disso, estudos acerca da incidência de periodontite agressiva em Feira de Santana não foi localizado na literatura.

Segundo relataram quando questionados acerca de antecedentes médicos, concluiu-se que todos eram 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%. No entanto, já que não foi encontrada associação entre prevalência de placa bacteriana e a doença nestes indivíduos, sugere-se que sua etiologia esteja correlacionada a deficiências imunológicas e/ou herança genética. Necessitando, para diagnóstico conclusivo, exames mais específicos.

Durante a avaliação citogenética foi analisado um total de 14.010 células: 5.979 células de sítios com lesão e 8.031 de sítios hígidos. A análise estatística da ocorrência de micronúcleo e apoptose (Σ cariorréxis + cromatina condensada + picnose) no material coletado dos sítios hígidos e com periodontite (Tabela 1) revelou que nas regiões da mucosa acometidas pela periodontite a ocorrência de apoptose foi significativamente maior, enquanto que a ocorrência de micronúcleo não diferiu entre as duas regiões da mucosa.

Tabela 1. Micronúcleo e apoptose em células esfoliadas de mucosa com periodontite agressiva e hígida

Sítio	Micronúcleo		Apoptose*	
	Observado	Esperado	Observado	Esperado
com lesão	5	3,41	225	180,52
sem lesão	3	4,58	198	242,48
χ^2 (G.L. = 1)	1,28 (p>0,05)		19,11 (p<0,05)	

Σ carioréxis + cromatina condensada + picnose

A frequência de micronúcleo está correlacionada diretamente com a probabilidade da ocorrência de alterações do DNA celular, sendo a alteração cromossômica mais correlacionada com o processo de carcinogênese (ROBERTS, 1997). Embora não indique necessariamente a existência de uma pré-neoplásica (RAMIREZ; SALDANHA, 2002).

A ocorrência de micronúcleo observada neste estudo não foi significativamente diferente em áreas de lesão e áreas não lesionadas. Um fator limitante, no entanto, foi o número reduzido de portadores da doença, um número maior de indivíduos analisados pode aumentar o poder estatístico, uma vez que termos absolutos, a presença deste biomarcador de dano foi maior em áreas de lesão.

O teste do micronúcleo pode ser instrumento de triagem diagnóstica para prevenção e conduta clínicas em indivíduos sob risco carcinogênico tais como os expostos a agentes biotóxicos ambientais. Por ser uma técnica simples, prática, não invasiva e de baixo custo permite, com facilidade, o monitoramento individual de pacientes com carcinomas orais, sua evolução clínica, recidivas, surgimento de novas neoplasias, lesões leucoplásicas bem como alterações tóxicas causadas por biopoluentes mutagênicos, através do controle intra-individual de diferentes tecidos e inter-individual de populações. (RAMIREZ et al., 1999).

A análise de alterações indicativas de apoptose aumenta a sensibilidade do teste de micronúcleo, uma vez que este é um marcador de dano cromossômico relativamente raro. Deste modo número reduzido de células e/ou da amostra pode mascarar a ocorrência de micronúcleo, o que possivelmente pode ter ocorrido neste estudo. Os resultados no que se refere à ocorrência de alterações indicativas de apoptose, sugerem que a lesão que se desenvolve na periodontite agressiva insulta genotoxicamente o tecido e induz uma resposta reparativa do organismo. 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

Por meio dos resultados provenientes da metodologia empregada neste estudo, podemos concluir que as lesões advindas da periodontite agressiva insultam genotoxicamente as células da mucosa oral sendo este insulto revelado pelo aumento da resposta apoptótica e não por danos cromossômicos.

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.
- BORAKS, S. Diagnóstico Bucal. 2. Ed. São Paulo: Artes Médicas, 1999.

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.

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.

RAMIREZ, A; SALDANHA, P. H. Micronucleous investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. *Genet. Mol Res*. v. 1, n. 3, p. 246-260, 2002.

RAMIREZ, A et al. Clinical implication of micronuclei frequency as a biomonitor for alcoholic patients with oral carcinomas. In: VARMA, A.K. *Oral Oncology*. Delhi, Índia. MacMillan, 1999. p. 199-204.

ROBERTS, O. M. Comparative cytology of the oral cavities of snuff users. *Acta Cytol*, v. 41, n. 4 p. 1008-1014, 1997.

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.; OPPERMANN, 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.