

OCORRÊNCIA DE DANOS CROMOSSÔMICOS E APOPTOSE NA DOENÇA PERIODONTAL

Marcela Beatriz Aguiar Moreira¹; Isaac Suzart Gomes Filho², Paulo de Tarso Jambeiro Brandão³, Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira⁴

1. Bolsista FAPESB/UEFS, Graduanda em Odontologia, Universidade Estadual de Feira de Santana. e-mail: marcelabeatriz01@gmail.com
2. Orientador, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana. e-mail: isuzart@gmail.com.
3. Participante do projeto “Alterações citogenéticas na doença periodontal”, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana. e-mail: paulojambeiro@gmail.com.
4. Participante do projeto, Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Feira de Santana. e-mail:eneida@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: Doença Periodontal; Danos Citogenéticos; Mucosa Ceratinizada.

INTRODUÇÃO

A Doença Periodontal é um processo inflamatório e infeccioso, promovida pelo acúmulo de biofilme nas superfícies dentárias. Quando ocorre o envolvimento dos tecidos gengivais, caracteriza-se como gengivite, e ao atingir os tecidos de sustentação dentária, refere-se a periodontite. A alta ocorrência dessa doença pode estar associada a fatores socioeconômicos como renda, dificuldade de acesso a serviços de atenção odontológica, resposta imunológica do indivíduo, microbiota específica, idade, hábitos deletérios como tabagismo, alcoolismo, higiene bucal deficiente, fatores genéticos e fatores psicossociais (CARRANZA, 2007; OLIVEIRA, 2004).

Para a detecção dessa doença, assim como o reconhecimento de seu tipo e de sua gravidade, é essencial à realização de um minucioso exame clínico periodontal. Tais dados permitem um acurado diagnóstico e o desenvolvimento de um plano adequado de tratamento. Quando a terapia periodontal não é realizada de maneira eficaz, pode ocorrer a colonização bacteriana no epitélio gengival, que induz resposta tecidual ao processo inflamatório o qual se faz acompanhar por aumento na atividade mitótica, propiciando oportunidade para a ocorrência de danos ao material genético que, por sua vez, podem se somar a outros danos futuros e favorecer o processo neoplásico, a apoptose (ACHA et al., 2005; LINDHE, 2005).

Por eliminar células apresentando alterações em genes comprometidos com o reparo do DNA e/ou com o controle da proliferação e diferenciação celular (proto-oncogenes e supressores de tumor), a apoptose se constitui em um mecanismo de proteção contra o câncer, doença que resulta de mutações gênicas e/ou cromossômicas envolvendo os referidos genes. Nos tecidos em constante renovação, a apoptose garante a homeostase tecidual, sua ocorrência em frequências aumentadas, contudo, é indicativa de efeitos genotóxicos que estão relacionados à iniciação do processo de transformação maligna (TOLBERT et al. 1992).

Considerando a elevada ocorrência da Doença Periodontal e das lesões no material genético induzidas pela resposta inflamatória que, uma vez não eliminadas por apoptose, podem contribuir para o desenvolvimento do câncer, o objetivo do presente estudo foi avaliar a ocorrência de alterações citológicas, indicativas de danos cromossômicos e apoptose em indivíduos com Doença Periodontal.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo de caso-controle foi desenvolvido em indivíduos adultos, de ambos os sexos, atendidos nos ambulatórios de odontologia da UEFS em Feira de Santana, Bahia. A amostra de 72 indivíduos foi composta pelos Grupos Caso - Grupo I (n=21): indivíduos com Gengivite; Grupo II: indivíduos com Periodontite (n=24); e Grupo Controle - Grupo III (n=27): indivíduos sem doença periodontal. Todos foram esclarecidos a respeito da pesquisa, aqueles que concordaram em participar do estudo assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UEFS (Protocolo 121/2009).

Os dados gerais foram obtidos por meio de entrevista aos participantes, através de questionário estruturado abordando: Identificação e dados sócio-demográficos; situação geral da saúde; hábitos de vida; aspectos relacionados com a saúde bucal; história de exposição a agentes genotóxicos. Não foram incluídos no estudo os indivíduos que referiram história de exposição recente a agentes comprovadamente genotóxicos como radiação ionizante e consumo atual de tabaco.

Após entrevista, foi realizado exame clínico bucal para determinação do diagnóstico periodontal utilizando os seguintes descritores clínicos: índice de sangramento gengival, profundidade de sondagem, nível de inserção clínica, recessão e hiperplasia. A condição bucal do indivíduo foi avaliada por um único dentista clínico, treinado previamente por periodontista experiente.

Foram considerados com periodontite os indivíduos que apresentaram quatro ou mais dentes com um ou mais sítios com profundidade de sondagem ≥ 4 mm, com perda de inserção clínica ≥ 3 mm, no mesmo sítio, e presença de sangramento ao estímulo. De acordo com a presença de gengivite, os participantes foram identificados quando apresentaram pelo menos 25% dos sítios sangrantes após sondagem periodontal sem, contudo, apresentarem os critérios acima descritos para periodontite (GOMES FILHO et al, 2007).

Para estudo citogenético, células foram coletadas por raspagem gentil da mucosa ceratinizada, utilizando escova do tipo *cytobrush*. Nos indivíduos dos Grupos I e II, foram coletadas células das áreas com lesão, com o rigor de selecionar o sítio na pior condição periodontal, porém com o cuidado de observar se a área estava afastada de restos radiculares e/ou próteses dentárias removíveis. Para o grupo controle, a coleta de células foi feita nos sítios de menor profundidade de sondagem seguindo os mesmos cuidados referidos anteriormente.

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 em solução de metanol/ácido acético (3:1) para fixação, 24 horas depois o material foi corado com o reativo de *Shift* e contra-coradas com *fast Green* (1% em etanol). Toda análise foi realizada em teste cego em relação aos dados do questionário e ao diagnóstico, por um único examinador experiente. Um mínimo de 2.000 células por indivíduo foi analisado.

Os critérios de identificação de micronúcleo adotados foram aqueles descritos por Tolbert, Shy e Allen (1992) como estruturas com distribuição cromatínica e coloração igual (ou mais clara) que a do núcleo, visualizadas no mesmo plano deste, com limites definidos e semelhantes aos nucleares, medindo de 1/5 a 1/3 do tamanho do núcleo. Somente células com citoplasma íntegro foram computadas. Células apresentando fenômenos nucleares degenerativos como cariólise, cariorréxis, picnose e cromatina condensada também foram incluídas no computo, assim como aquelas que apresentaram *broken-eggs*.

A análise de dados compreendeu estudo da distribuição percentual de todas as co-variáveis de interesse no estudo. Foram aplicados, com nível de significância de 5%, os testes estatísticos Qui-quadrado, para avaliação de diferenças estatísticas entre as frequências das

co-variáveis supracitadas para os Grupos I e II em referência ao controle. A análise relativa à ocorrência de micronúcleos e de alterações indicativas de apoptose entre os grupos foi realizada com o uso do teste condicional para comparação de proporções em situações de eventos raros, que é um teste de significância adequado à avaliação de eventos citogenéticos quando uma grande amostra de células é necessária para detecção da ocorrência de uma determinada aberração cromossômica. Foi testada a hipótese de trabalho em que o número de micronúcleos, aumentado nos Grupos I e II, é maior que aquele observado no grupo controle.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amostra foi formada por 72 indivíduos (19 homens e 53 mulheres), com média de idade \pm erro padrão de $41 \pm 8,48$ anos. De acordo com o critério de diagnóstico periodontal empregado, 24 indivíduos apresentavam periodontite, 21 foram identificados como tendo gengivite, e 27 não apresentaram alterações no periodonto.

Quando avaliadas as características gerais dos indivíduos de acordo com o diagnóstico da condição periodontal, observou-se que os grupos controle e gengivite, e os grupos controle e periodontite mostraram-se homogêneos para a grande maioria das características, exceto para renda familiar ($p = 0,02$) e densidade familiar ($p = 0,02$).

Os participantes do grupo controle apresentaram maior frequência de renda familiar menor ou igual a um salário mínimo (55,56% x 23,81%) do que aqueles do grupo gengivite. Por outro lado, quanto a densidade domiciliar, os participantes do grupo gengivite apresentaram maior frequência de mais de quatro pessoas por domicílio do que aqueles do grupo controle (38,10% x 11,11%).

Quanto às características comportamentais relacionadas à saúde bucal (Tabela 1), os grupos controle, gengivite e periodontite foram homogêneos para a maioria dos aspectos analisados, exceto para uso de fio dental ($p = 0,03$). A frequência de não uso de fio dental nos participantes dos grupos gengivite (47,62%) e periodontite (45,83%) foi mais que o dobro daquela observada no grupo controle (18,52%).

Tabela 1. Características comportamentais relacionadas à saúde bucal dos grupos controle, gengivite e periodontite (n=72). Feira de Santana, Bahia, Brasil, 2013.

Características	Controle (27) n(%)	Gengivite (21) n(%)	P*	Periodontite (24) n(%)	P*
Frequência de escovação dental ao dia					
≤ Uma vez	0 (0,00%)	1 (4,76%)		1 (4,17%)	
Duas ou mais	27 (100,00%)	20 (95,24%)	0.25	23 (95,83%)	0.28
Uso de fio dental					
Não	5 (18,52%)	10 (47,62%)		11 (45,83%)	
Sim	22 (81,48%)	11 (52,38%)	0.03	13 (54,17%)	0.03
Faz uso de enxaguatório bucal					
Não	21 (77,78%)	15 (71,43%)		20 (83,33%)	
Sim	6 (22,22%)	6 (28,57%)	0.61	4 (16,67%)	0.61
Visita periódica ao dentista					
Não	18 (66,67%)	13 (61,90%)		13 (54,17%)	
Sim	9 (33,33%)	8 (38,10%)	0.73	11 (45,83%)	0.36

* P = valor de p. Significância estatística: $p \leq 0,05$;

Por apresentarem as preparações citológicas número insuficiente de células, foram excluídos da análise citológica treze indivíduos: três do Grupo controle, três do Grupo I e sete do Grupo II. A análise citológica incluiu, portanto, vinte e um indivíduos do Grupo controle; dezoito indivíduos com gengivite e dezessete com periodontite.

A Tabela 2 apresenta a distribuição da ocorrência de micronúcleos entre os grupos controle, gengivite e periodontite. Não foi observada diferença estatisticamente significativa

entre os grupos ($p > 0,10$).

Tabela 2. Dados referentes à ocorrência de micronúcleos (MN) entre os Controles, Grupo I (gingivite) e Grupo II (periodontite) (n=59). Feira de Santana, Bahia, Brasil, 2013.

Grupo	MN Observados	MN Esperados	# Células	χ^2
Controle (n=24) *	10	11,41	50112	
Grupo I (n=18) *	14	10,06	37600	2,43
Grupo II (n=17) **	9	9,52	35589	G.L.=2 P<0,10 ***

* Três informações perdidas;

** Sete informações perdidas;

***P = valor de p. Significância estatística: $\leq 0,05$.

A avaliação estatística da ocorrência de apoptose (Tabela 3), inferida pelo somatório de cariórrexis, cromatina condensada e picnose, revelou diferença significativa entre os grupos: $\chi^2 = 14,1763$; G.L.=2; $p < 0,005$. As partições de Qui-quadrado mostram que sua ocorrência é significativamente maior entre os indivíduos com periodontite quando comparados tanto aos indivíduos controle quanto aos indivíduos apresentando gengivite (Grupo II): $\chi^2 = 13,86$; $p < 0,005$ e $\chi^2 = 5,45$; $p < 0,02$, respectivamente, (G.L.= 1). Diferença estatisticamente significativa, contudo, não foi detectada quando comparados indivíduos controle e indivíduos com gengivite: $\chi^2 = 1,58$; G.L.= 1; $p > 0,1$.

Tabela 3. Dados referentes à apoptose (AP) entre os Controles, Grupo I (gingivite) e Grupo II (periodontite) (n=59).

Grupo	AP	# Cél	χ^2	Partições do χ^2 ; p; G.L.=1
Controle (n=24)	1798	50112	6,84	Grupo I x Controle = 0,04; $p > 0,9$
Grupo I (n=18)	1359	37600	G.L.=2	Grupo I x Grupo II = 4,36; $p < 0,05$
Grupo II (n=17)	1393	35589	$p < 0,05$	Grupo II x Controle = 5,94; $p < 0,025$

AP= Apoptose

Cél= Total de Células

Importante ressaltar que os pacientes com doença periodontal estão ainda em tratamento, e a análise após terapia encontra-se em andamento.

CONCLUSÃO

Os achados obtidos demonstram que o processo inflamatório gerado pela gengivite e periodontite não está relacionado a uma maior ocorrência de danos cromossômicos, no entanto nos indivíduos com periodontite, a maior ocorrência de apoptose é indicativa dos efeitos genotóxicos da infecção periodontal.

REFERÊNCIAS

- ACHA, A. *et al.* 2005. Applications of the oral scraped (exfoliative) cytology in oral cancer and recancer. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, Valencia, 10: 95-102.
- CARRANZA, A. F. 2007. *Periodontia Clínica*/ (editores) Michael G. Newman, Henry H. Takei e Perry R. Klokkevold. Elsevier. Rio de Janeiro.
- GOMES-FILHO, I.S. *et al.* 2007. The association between postmenopausal osteoporosis and periodontal disease. *Journal of Periodontology*, 78:1731-1740.
- LINDHE, J. 2005 *Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral*. Guanabara Koogan.
- OLIVEIRA, L.C.B.S.; FISCHER, R.G. 2004. A doença periodontal como fator de risco para pneumonia nosocomial. *Revista Periodontia*, São Paulo, Brasil, 14(3): 25-39.
- TOLBERT, P. E., SHY, C. M., ALLEN, J. W. 1992. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutation Research*, 271:69-77.