

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

MARCELA CHIRIANO

**BIOMONITORAMENTO CITOGENÉTICO EM
PACIENTES PERIODONTAIS PORTADORES DE
*DIABETES MELLITUS DO TIPO 2***

BAURU
2010

MARCELA CHIRIANO

**BIOMONITORAMENTO CITOGENÉTICO EM
PACIENTES PERIODONTAIS PORTADORES DE
*DIABETES MELLITUS DO TIPO 2***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do título de Cirurgião-dentista, sob a orientação da Profa. Dra. Patrícia Pinto Saraiva.

BAURU
2010

C5416b

Chiriano, Marcela

Biomonitoramente citogenético em pacientes periodontais portadores de diabetes mellitus tipo 2 / Marcela Chiriano -- 2010.

30f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Pinto Saraiva.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Odontologia) - Universidade Sagrado Coração - Bauru - SP.

1. Doença periodontal. 2. Diabetes mellitus. 3. DNA. 4. Micronúcleo. 5. Teste do cometa. I. Saraiva, Patrícia Pinto. II. Título.

DEDICATÓRIA

Em memória dos meus avós António Peraçoli, Dezolina Negrelli Peraçoli, Paschoali Chiriano e Elvira Abruci Chiriano, que partiram antes do meu cursar na universidade, mas que sempre estarão vivos em meu coração... Minha eterna saudade.

Aos meus pais, Nivaldo Donizete Chiriano e Bernadete Peraçoli Chiriano, pelo exemplo que os tornam formidáveis, por todo amor, carinho e compreensão, pelo orgulho que sinto de ser sua única filha, pela oportunidade e confiança que depositaram em mim, meu interminável reconhecimento e gratidão.

Ao meu namorado e companheiro Gustavo Biazotto, por todo incentivo, carinho e compreensão, por todos os momentos difíceis que superamos juntos, com todo meu amor, lhe dedico cada segundo de minha vida a você.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS, que em toda sua infinita grandeza e generosidade me deu meios de se tornar apta a conduzir e concluir este curso.

A Dra. Patrícia Pinto Saraiva, pelo apoio, amizade e segurança que me proporcionava nas clínicas nas quais me orientava, pela ajuda na elaboração e apresentação do meu primeiro simpósio realizado em nossa universidade, por aceitar ser minha orientadora na realização do trabalho de conclusão de curso depositando assim credibilidade e total confiança para que pudéssemos realizar este trabalho com sucesso.

Ao Dr. José Fernando Lopes, pela oportunidade concedida na realização do estágio no “Hospital de Anomalias Crânios-Faciais, Centrinho FOB/USP”, pelo apoio e colaboração na apresentação do meu segundo simpósio na universidade, pelo incentivo e segurança proporcionado nas clínicas para a concretização dos casos relacionados a próteses, por nossa amizade e pelo nosso eterno Timão!

Ao Dr. Aparício Dekon, com seu talento formidável na arte de ensinar, pela educação e amor com que trata seus alunos e pacientes, a todo aprendizado concedido, a nossa infinita amizade.

A Dr. Mariza, com sua calma e delicadeza ao repassar o conhecimento, pelo apoio dado no momento mais difícil da fase universitário, quando contrai o vírus da gripe H1N1, por aceitar fazer parte da banca na apresentação do meu TCC e pela amizade construída nesses quatro anos de convivência.

A Dr. Maria Izabel, pela amizade, pelos inúmeros puxões de orelha que se esbanjavam nas clínicas em relação as: tomadas radiográficas, revelações de radiografias e preenchimento adequados dos prontuários; pelo aprendizado proporcionado e por aceitar ser banca da do meu TCC.

A Dr. Claudia, como coordenadora de nosso curso nos manteve atualizados das informações do mundo odontológico, sempre a disposição para conversar, entender e ajudar a resolver assuntos que nos assombravam, pela demonstração de carinho com seus alunos e pelo orgulho que nos passa em ser coordenadora do nosso curso.

As funcionárias da universidade: Célia, Cida(s), Dirce e Rosa, por agüentarem todos os alunos as chamando de uma só vez, por dividirem todo o sentimento gerado em relação às matérias, provas, clínicas, etc., pela linda amizade que se construiu ano após anos.

A em especial, funcionária da universidade Solange, por me agüentar revirando os prontuários que ela os organiza com todo cuidado para realização do projeto de pesquisa

coordenado pela professora Dra. Patrícia P. Saraiva, por todas as vezes que corri para que não passasse um novo paciente de endodontia, pela amizade e pelas risadas inconfundíveis que nos proporciona.

A todos os meus colegas da XXVII turma de Odontologia da “Universidade Sagrado Coração”, por todos os momentos, por todas as brigas, por todos os sentimentos, sentirei eternas saudades.

MUITO OBRIGADA!!!

*“Sábio é o ser humano que tem coragem de ir
diante do espelho da sua alma para reconhecer
seus erros e fracassos e utilizá-los para plantar
as mais belas sementes no terreno de sua
inteligência”*

Augusto Cury

RESUMO

A doença periodontal e o diabetes *mellitus* apresentam uma associação bidirecional, na qual o diabetes favorece o desenvolvimento da doença periodontal e esta, quando não tratada, piora o controle metabólico do diabetes. A doença periodontal e o diabetes *mellitus* levam a mudanças significantes nos níveis plasmáticos de citocinas, hormônios e espécies reativas de oxigênio (radicais livres). O excesso de produção de espécies reativas de oxigênio causa aumento do estresse oxidativo na mucosa bucal, sendo que este estresse pode contribuir a danos em lipídeos, proteínas e DNA, sendo que estes danos podem ser responsáveis por transformações malignas das células envolvidas. Várias técnicas para identificação de danos genéticos são aplicadas atualmente, de forma rápida e com baixo custo, permitindo screening populacionais. Entre os instrumentos de avaliação do material genético estão o teste do micronúcleo e o teste do Cometa. Neste trabalho realizamos um levantamento bibliográfico para verificarmos a associação das doenças periodontal e diabetes, e de que forma estes testes podem ser aplicados para a detecção precoce de alterações genéticas.

Palavras-chave: Doença Periodontal. Diabetes *mellitus*. DNA. Micronúcleo. Teste do Cometa.

ABSTRACT

Periodontal disease and diabetes *mellitus* have a bidirectional association, in which diabetes promotes the development of periodontal disease and that, if untreated, worsening the metabolic control of diabetes. Periodontal disease and diabetes *mellitus* leads to significant changes in plasma levels of cytokines, hormones and reactive oxygen species (free radicals). The overproduction of reactive oxygen species cause increased oxidative stress in the oral mucosa, and this stress can contribute to damage lipids, proteins and DNA, and this damage may be responsible for malignant transformation of cells involved. Several techniques for identification of genetic damage are currently applied, quickly and inexpensively, allowing screening population. Among the tools for assessment of genetic material are the micronucleus test and comet assay. In this work, we performed a literature review to verify the association between periodontal diseases and diabetes, and how these tests can be applied for early detection of genetic alterations.

Keywords: Periodontal Disease. Diabetes *mellitus*. DNA. Micronucleus. Test of the Comet.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formação de uma ponte citoplasmática e de um micronúcleo.....	18
Figura 2 - Fragmento Cromossômico	19
Figura 3 - Visualização do Micronúcleo	19
Figura 4 - Aparência celular de um cometa	21
Figura 5 - Características dos cometas.....	22

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	12
3	MATERIAL E MÉTODOS	13
4	REVISÃO DA LITERATURA	14
4.1	DOENÇA PERIODONTAL.....	14
4.2	DIABETES <i>MELLITUS</i>	14
4.3	DOENÇA PERIODONTAL E DIABETES <i>MELLITUS</i>	15
4.4	ALTERAÇÕES GENÉTICAS	17
4.5	TESTE DO MICRONÚCLEO	17
4.5.1	Análise de Micronúcleos em Linfócitos	20
4.5.2	Análise de Micronúcleos em Células Epiteliais	20
4.6	TESTE DO COMETA	20
5	DISCUSSÃO	23
6	CONCLUSÃO	25
	REFERÊNCIAS	26

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal é um processo inflamatório bacteriano que atinge os tecidos de sustentação do dente, resultado do acúmulo de biofilme na superfície externa do dente, culminando com a destruição dos componentes do periodonto, ou seja, cemento, ligamento periodontal e osso alveolar.

Pacientes portadores de doença periodontal são expostos presença crônica de microrganismos periodontais provocando alterações nos níveis plasmáticos de citocinas e hormônios, e espécies reativas de oxigênio, os chamados radicais livres.

Alterações plasmáticas de vários marcadores inflamatórios também são encontradas em pacientes diabéticos, influenciando na porcentagem de gordura corpórea, sensibilidade à insulina e glicose plasmática. *Diabetes mellitus* (DM) é uma doença crônica caracterizada por deficiência parcial ou total na produção de insulina ou por resistência à sua ação.

A interação entre doença periodontal e diabetes mostram uma ação bidirecional, sendo que uma influencia a outra, estabelecendo uma relação patofisiológica por meio da indução de uma resposta inflamatória que produz vários mediadores químicos presentes na inflamação.

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) causa aumento do estresse oxidativo no tecido gengival, sendo que este estresse pode contribuir a um dano adicional de lipídeos, proteínas e moléculas de DNA. Quando os índices de danos ao DNA provocados pelo estresse oxidativo associam-se a diminuição na efetividade do reparo do DNA, podem provocar um aumento no risco de câncer em pacientes diabéticos do tipo 2. Isto confirma que o dano e o reparo ao DNA são fundamentais no processo de transformação maligna.

Testes citogenéticos, de mutagênese ou biologia molecular oferecem informações importantes para avaliação dos efeitos deletérios que os processos inflamatórios causam, identificando indivíduos com maior risco para o desenvolvimento de determinadas doenças em um curto intervalo de tempo a baixos custos.

Várias metodologias para detecção e, por conseguinte, mensuração do risco pelo qual populações humanas estão expostas continua sendo propostas e avaliadas. Dentre os ensaios disponíveis atualmente para esta finalidade, destaca-se o teste do micronúcleo, que detecta quebras cromossômicas causadas por agentes que provocam quebras cromossômicas e/ou indução de aneuploidia, e o teste do Cometa, que avalia a integridade do material cromossômico.

Por estes motivos, propusemos verificar a patofisiologia das doenças periodontais e diabetes *mellitus* e sua associação, e as possíveis metodologias existentes para avaliar os danos citogenéticos provocados por estas alterações.

2 OBJETIVOS

Verificar, na literatura, os processos de associação entre doença periodontal e diabetes *mellitus*, e possíveis danos no DNA e morte celular, indicativos da fase de iniciação tumoral, promovidos pela exposição freqüente a mediadores químicos inflamatórios, por meio dos testes do cometa e micronúcleo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo descritivo com análise dos processos de etiopatogenia da doença periodontal e diabetes *mellitus* e sua interrelação, e de possíveis conseqüências sobre células da mucosa bucal. Foram incluídos artigos no período de 1975 a 2010.

Foram utilizadas três bases de dados para a revisão bibliográfica: LILACS (Literatura Latino-americana e do Caribe em Ciências da Saúde), consultada por meio do site da Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), da Biblioteca Regional de Medicina (BIREME), MEDILINE (Literatura Internacional em Ciências da Saúde), acessada por meio do PUBMED, SCIELO e SCIENCE DIRECT consultado por meio do Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

Os descritores utilizados para a busca de artigos foram: doença periodontal, diabetes *mellitus*, dano ao DNA, micronúcleo, teste do cometa, periodontal disease, DNA damage, micronucleus, comet assay.

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 DOENÇA PERIODONTAL

A doença periodontal é o processo inflamatório que ocorre na gengiva em resposta a antígenos bacterianos da placa dentária que se acumulam ao longo da margem gengival. A placa é um biofilme constituído por bactérias, proteínas salivares e células epiteliais descamadas (HERRING & SHAH, 2006).

No diagnóstico da extensão da doença periodontal, a profundidade de sondagem é um bom indicador do avanço da doença. Em um periodonto saudável não há perda de inserção epitelial ou formação de bolsa, e a profundidade periodontal é menor que 2 mm (ANGELI et al., 2003). Bolsas periodontais podem se estender de 4 a 12 mm. Clinicamente, pacientes com bolsa periodontal de 4 mm ou mais são diagnosticados como periodontite. Pacientes com bolsas periodontais com 6 mm ou mais são diagnosticados como periodontite avançada ou severa (HUJOEL et al., 2002; ELTER et al., 2004).

Em pacientes com doença periodontal, a exposição crônica, a níveis sistêmicos, a microrganismos periodontais pode existir, levando a mudanças significantes nos níveis plasmáticos de citocinas e hormônios. Recentemente, Blucher et al., investigaram de que forma as concentrações plasmáticas de marcadores inflamatórios estão associados com medidas de obesidade, sensibilidade à insulina e hiperglicemia. Descobriram significantes correlações entre concentrações plasmáticas de vários marcadores inflamatórios examinados e porcentagem de gordura corpórea, sensibilidade à insulina e glicose plasmática.

4.2 DIABETES *MELLITUS*

Diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica caracterizada por deficiência parcial ou total na produção de insulina ou por resistência à sua ação. Isso leva à anormalidade nos metabolismos glicídico, protéico e lipídico, que resultam em hiperglicemia, a qual induz múltiplas anormalidades sistêmicas. Afeta mais que 16 milhões de pessoas nos Estados Unidos (SKYLER & ODDO, 2002). Estima-se que, em 2010, aproximadamente 221 milhões de pessoas no mundo serão portadoras de DM (AMOS et al., 1997).

4.3 DOENÇA PERIODONTAL E DIABETES *MELLITUS*

A doença periodontal, mais especificamente a periodontite, é uma das várias complicações resultantes do diabetes tipo 1 ou tipo 2. Vários estudos encontraram uma alta prevalência de doença periodontal entre pacientes diabéticos que em controles saudáveis (Fuster et al., 1992), portanto, existe uma relação estabelecida entre doença periodontal e diabetes. Estudos recentes mostram evidências indicativas de uma interrelação adversa bidirecional entre diabetes tipo 1 e tipo 2 e doenças periodontais. A relação mais direta é que a doença periodontal pode levar ao diabetes tipo 2; todavia, a visão alternativa é que o desenvolvimento da doença periodontal é resultante de complicações tanto do tipo 1 como do tipo 2 de diabetes (TENG et al., 2002).

Essas doenças apresentam uma associação bidirecional na qual o diabetes favorece o desenvolvimento da doença periodontal e esta, quando não tratada, piora o controle metabólico do diabetes (3).

Estudos sugerem que a presença de infecção periodontal pode estar ligada ao controle do diabetes. Resultados do estudo de Grossi et al., indicaram que o controle efetivo da infecção periodontal em pacientes diabéticos podem reduzir os níveis de produtos da glicação avançada no soro (AGEs). AGEs são conhecidos por causar hiperglicemia, que é uma complicação do diabetes, portanto, os níveis de controle glicêmico parece ser o fator chave. Alguns pesquisadores observaram correlações positivas similares de pobre controle glicêmico em pacientes com alta perda de inserção dental (CHRISTGAU et al., 1998; OFFENBACHER & SALVI, 1999). A prevenção e controle da doença periodontal pode ser considerada como uma parte integral do controle da diabetes.

Uma vez que a microbiota periodontal em pacientes com DM é similar à de não-diabéticos (bactérias gram-negativas anaeróbicas como *Actinobacillus*, *Bacteróides* e *Porphyromonas*) (HERRING & SHAH, 2006), outros fatores, tais como hiperglicemia e anormalidades da resposta imune do hospedeiro frente às infecções bucais, parecem ser os responsáveis pela maior prevalência desta complicação em diabéticos (VERNILLO, 2003).

Todavia, a relação patofisiológica entre diabetes e doença periodontal ocorre por meio da habilidade de ambas as condições induzirem uma resposta inflamatória, levando à produção de vários mediadores químicos presentes na inflamação (KIM & AMAR, 2006).

Dados emergentes indicam que fatores genéticos podem estar associados com a etiopatogênese da periodontite agressiva. A troca de cromátides irmãs é um método sensível que pode refletir uma instabilidade do DNA ou uma deficiência do reparo de DNA. Emingil

et al. 2002, investigaram a frequência de troca de cromátides irmãs de pacientes com diferentes formas de doença periodontal e determinar como este marcador citogenético em pacientes com periodontite agressiva pode ser diferente quando comparados com pacientes com periodontite crônica e pacientes controle. Os dados mostraram que os danos citogenéticos no tipo agressivo de doença periodontal não é maior que na periodontite crônica e controles. Embora a ausência de danos citogenéticos aberrantes tenha sido observada em diferentes formas de periodontites comparadas ao controle, não descarta a importância de outros fatores genéticos na patogênese da doença periodontal (EMINGIL, 2002).

O excesso de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) causa aumento do estresse oxidativo no tecido gengival, sendo que este estresse pode contribuir a um dano adicional de lipídeos, proteínas e moléculas de DNA. Mutações no DNA mitocondrial (mtDNA) são consideradas biomarcadores do dano oxidativo. A produção em excesso de ROS por leucócitos polimorfonucleares ativados na inflamação crônica pode levar ao dano oxidativo prematuro do mtDNA. Canakçi et al., 2006, encontrou a ocorrência de deleções no mtDNA em pacientes com periodontite.

Diabetes *mellitus* do tipo 2 está associada com elevado nível de estresse oxidativo, que é um dos mais importantes fatores responsáveis pelo desenvolvimento de complicações crônicas da doença. Portanto, ele mostra que pacientes diabéticos têm elevado índice de danos ao DNA provocados pelo stress oxidativo, e diminuição na efetividade do reparo do DNA. Estas mudanças estão associadas com o risco aumentado de câncer em pacientes diabéticos do tipo 2, confirmando que o dano e o reparo ao DNA possuem um papel importante na transformação maligna (SLIWINSKA et al., 2008).

Danos ao DNA podem estar associados com a diabetes mellitus do tipo 2 e suas complicações são originadas a partir do estresse oxidativo. Estudos (BLASIAK et al., 2004) mostram que o diabetes do tipo 2 não somente está relacionado ao dano oxidativo ao DNA, mas também com o aumento da suscetibilidade a agentes mutagênicos e diminuída eficácia de reparo do DNA. Estes dados podem contribuir para um *link* entre diabetes e câncer e medidas do dano e reparo do DNA, mensurados pelo ensaio do cometa, podem ser marcadores do risco de câncer em pacientes diabéticos.

Isso é respaldado na noção de que os chamados agentes mutagênicos são indutores de alterações na seqüência das bases do DNA, podendo acelerar ou aumentar o aparecimento de mutações que estão associadas às neoplasias. Nesse sentido, os mecanismos envolvendo lesões genéticas, mutagênese e carcinogênese parecem estar intimamente relacionados (RIBEIRO et al., 2004).

4.4 ALTERAÇÕES GENÉTICAS

Há alguns anos, a literatura tem demonstrado que mutações em alguns genes considerados críticos, especialmente relacionados à proliferação celular e apoptose, são importantes para o desenvolvimento das neoplasias (RIBEIRO et al., 2005; 2007).

Os sistemas biológicos apresentam uma rede complexa de respostas ao ataque de agentes deletérios, que varia desde um estresse genérico a alterações bastante específicas, intimamente associadas a mecanismos de toxicidade, degeneração e morte celular. Até recentemente, a visão dessa complexidade era obscurecida pela simplicidade das ferramentas disponíveis para a avaliação desses efeitos, pela heterogeneidade da casuística e, por conseguinte, o estabelecimento de grupos-controle confiáveis. Atualmente, com a evolução de áreas como a citogenética, mutagênese, biologia molecular, ou mesmo da bioinformática, tornou-se possível obter informações fundamentais para o entendimento dos mecanismos envolvidos nas doenças e, assim, desenvolver novos instrumentos para avaliar e prognosticar tais efeitos, identificar novos biomarcadores de exposição, e identificar indivíduos com maior risco para o desenvolvimento de determinadas doenças em um curto intervalo de tempo a baixos custos (PEDERZOLLI, 2008).

Os cânceres de cabeça e pescoço representam 10% dos tumores malignos, sendo que aproximadamente 40% deles localizam-se na cavidade bucal (Macfarlane et al., 1987). No Brasil, este tipo de câncer apresenta uma das incidências mais altas do mundo, estando entre os nove tipos mais freqüentes, sendo a região Sudeste a mais atingida (INCA, 2008). No estado de São Paulo o câncer da cavidade oral esteve em 5º lugar na incidência entre homens, e o 7º entre as mulheres (INCA, 2008). As neoplasias orais apresentam alta taxa de mortalidade, devido entre outros fatores, ao diagnóstico tardio e conseqüentes tratamentos agressivos.

4.5 TESTE DO MICRONÚCLEO

Frente a estes dados, há uma crescente busca por metodologias para detecção e, por conseguinte, mensuração do risco pelo qual populações humanas estão expostas. Dentre os ensaios disponíveis atualmente para esta finalidade, destaca-se o teste do micronúcleo. Este teste tem demonstrado ser um método efetivo e válido para detecção de quebras cromossômicas causadas por agentes clastogênicos e/ou aneugênicos (ÇELIK et al., 2003;

MINICUCCI et al., 2005; CELIK & KANIK 2006; CAVALLO et al., 2007; SPEIT et al., 2007).

Historicamente os micronúcleos foram descritos a mais de um século, chamados por Howell de “fragmentos de material genético” ou por Jolly “corpúsculos de Howell-Jolly” nomenclatura utilizada no início do século passado. Dentre os Hematologistas o termo “corpúsculo de Howell-Jolly” ficou conhecido para designar eventos de aparecimentos de micronúcleo (KIRSCH-VOLDERS et al., 2003) (Figura 1).



Figura 1 - Formação de uma ponte citoplasmática e de um micronúcleo a partir de um fragmento cromossômico acêntrico

Fonte: <http://www.icb.ufmg.br/biq/prodap/2003/micronucleos/sobremn.html>.

A primeira tentativa de utilizar os micronúcleos como indicadores de danos citogenéticos foi realizada por Evans et al. (1959 apud EVANS, 1997), para medir o dano induzido em raiz de cebola por neutrófilos e raios-gamas, utilizando a frequência de micronúcleos. Trabalhos realizados por Boller e Schmid (1970) para a utilização do teste de micronúcleo como meio de monitorar a ação de agentes com potencial genotóxico, se tornou um marco decisivo para que sugerissem o termo “teste de micronúcleo” pela primeira vez, e por Heddle (1977 apud EVANS, 1997) em trabalhos utilizando eritrócitos de ratos, nos quais quantificavam o DNA de micronúcleos e verificavam que esta quantidade correspondia a de cromossomos ou fragmentos de cromossomos acêntricos. (KIRSCH-VOLVERES et al., 2003)

Aplicado como teste *screening* de populações humanas expostas a agentes potencialmente mutagênicos e/ou carcinogênicos, os testes de micronúcleos tem sido considerado um teste rápido e econômico (HEDDLE et al., 1991, FENECH, 2006). De acordo com Ramirez e Saldanha (2002, p 140) o micronúcleo é um núcleo adicional na qual é separado do núcleo principal de uma célula durante a divisão celular por meio de cromossomos ou fragmentos de cromossomos, que em relação aos demais, se atrasam. Resulta de alterações estruturais cromossômicas espontâneas ou experimentais induzidas, ou

ainda, de falhas no fuso celular, sendo, no entanto, excluído do novo núcleo formado na telófase (Figura 2).



Figura 2 – Fragmento cromossômico observado em uma anáfase

Fonte: GARCIA et al., 2006.

O micronúcleo apresenta entre 1/5 a 1/20 do tamanho do núcleo e geralmente há um micronúcleo por célula (SCHMID, 1975) (Figura 3). Os grupos celulares devem ser analisados no momento em que estiverem no processo de divisão exposto ao agente agressor, ficando sua análise comprometida em populações de células que não estão no processo de divisão celular (HEDDLE et al., 1983).

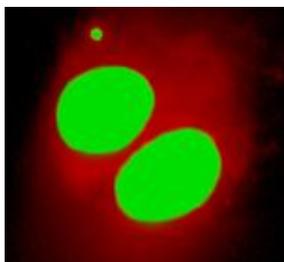


Figura 3 – Visualização de micronúcleo após coloração, mostrando o tamanho do micronúcleo. Linus Pauling Institute Micronutrient Research for Optimum Health.

Fonte: <http://lpi.oregonstate.edu/CCP/micronucleus.html>.

Aliado a sua facilidade de execução e baixo custo, quando comparado a outros testes designados para o mesmo propósito, o teste do micronúcleo em células esfoliadas tem sido amplamente utilizado em estudos de biomonitoramento humano (KNUDSEN and HANSEN, 2007).

As duas principais técnicas desenvolvidas para o teste de micronúcleo são realizadas em linfócitos sanguíneos e/ ou em células epiteliais descamadas.

4.5.1 Análise de Micronúcleos em Linfócitos

Krepinsky e Heddle (1983 apud EVANS, 1997) demonstraram que o teste de micronúcleo poderia ser efetivamente usado se não houvesse a fragilidade dos linfócitos durante a manipulação, e as respostas variadas destes aos estímulos mitogênicos; foram realizadas novas alterações nos protocolos desses testes.

Desde a descoberta da Citocalacina B, droga inibidora da cariocinese, para marcar a divisão celular, ficando as células com o número de núcleos correspondentes ao número de divisões celulares, o teste de micronúcleo em linfócitos vem auxiliando em estudos da genética taxológica no biomonitoramento de populações humanas expostas a agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos de atuação sistêmica (ANWAR, 1992, SAVOLDI-BARBOSA; SAKAMOTO-HOJO; TAKAHASHI, 1999).

4.5.2 Análise de Micronúcleos em Células Epiteliais

As células esfoliadas, pela facilidade com que se procede a coleta, possuem um grande potencial como ferramenta de biomonitoramento de populações expostas a agentes genotóxicos; mucosa epitelial da boca, nariz e bexiga são alguns exemplos de regiões que podem fornecer material por meio de técnica simples e não invasivas (FENECH et al., 1999)

A coleta é um procedimento rápido e simples, friccionando-se contra a região de coleta, com o auxílio de uma pequena escova de cerdas macias, o material é coletado. Na cavidade bucal podemos utilizar a coleta de células da mucosa ou borda lateral de língua, pois estes tecidos epiteliais estão em constante processo de divisão celular com renovação do tecido pela descamação das células superficiais (VINE, 1990).

A coleta das células para análise do micronúcleo deve ocorrer entre 5 a 24 dias após a exposição do tecido a agentes genotóxicos (exposição aguda), uma vez que a migração das células da camada basal ocorrem aproximadamente dentre 5 e 7 dias e as células expostas descamam totalmente em cerca de três semanas (VINE, 1990).

4.6 TESTE DO COMETA

Além do teste do micronúcleo, a técnica que utiliza células individualizadas em gel (teste do cometa), permite que a integridade do material genético também seja avaliada, em todas as etapas da carcinogênese, especialmente nas fases mais incipientes do processo.

Rydberg & Johanson (1978) utilizando técnicas bioquímicas foram os pioneiros na quantificação de danos no DNA em células individualizadas. Mais tarde, Ostling & Johanson (1984) introduziram modificações na metodologia, em que células individualizadas, embebidas em agarose eram colocadas sobre uma lâmina de microscópio, lisadas por detergentes e altas concentrações de sais, e expostas à eletroforese sob condições neutras. As células com frequência aumentada de quebras de cadeia dupla de DNA apresentavam maior migração da molécula em direção ao ânodo, permitindo a visualização de uma “cauda” ao exame microscópico, após coloração com um agente intercalante fluorescente (brometo de etídio). Devido a essa aparência, a imagem resultante foi denominada de “cometa”, o que levou Olive (1989) a sugerir o nome de “comet assay” (teste do cometa) para identificar o teste, também conhecido por ‘single cell gel electrophoresis assay’. A interpretação dos resultados é feita a partir dos cometas, sendo dividido em duas partes: cabeça e cauda (Figura 4).

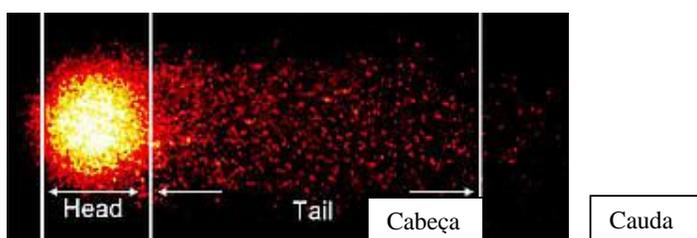


Figura 4 – Aparência celular de cometa, indicando a região da cabeça e cauda.

Fonte: <http://www.toxikologie.uni-wuerzburg.de>.

Células com pouco dano no DNA apresentam pouca ou nenhuma cauda e possuem aparência similar a nucleóides, enquanto as células com o DNA danificado apresentam caudas mais evidentes e longas (Figura 5). O tamanho, a intensidade da fluorescência, o aspecto, a forma, bem como outras características dos cometas são mensuradas visualmente por meio de ‘scores’ ou mesmo por programas específicos de análise de imagem (TICE et al., 2000).

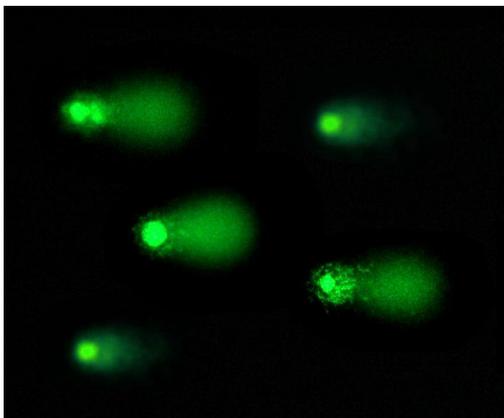


Figura 5 – Características dos cometas, mostrando diferentes tamanhos e intensidades das caudas.

Fonte: <http://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/STA-350%2520Fig%25202.jpg&imgrefurl>.

O teste do Cometa, não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação (ALBERTINI et al., 2000). O teste cometa tem sido frequentemente utilizado nos estudos em linfócitos humanos, biomarcador de exposição na avaliação de populações de risco e nos casos de reparo de DNA e apoptose (KOPJAR et al., 2002, MOLLER, 2006, TRZECIAK et al., 2008).

O teste do Cometa é uma técnica que detecta danos recentes ainda passíveis de reparo do DNA, já os testes de micronúcleo detectam danos consolidados, por isso, para estudos de biomonitoramento que permite o surgimento de características de exposição diferentes em uma mesma população, se torna importante o uso de ambas as técnicas citogenéticas (MALUF, 2004).

Além das vantagens citadas e do baixo custo, o teste do cometa difere de outros ensaios que detectam danos no DNA (MONTEITH & VANSTONE, 1995), por requerer células viáveis, mas não em divisão, sendo, portanto, aplicável a qualquer tipo de tecido dos quais células vivas possam ser obtidas. Em virtude do teste do cometa possibilitar o acesso a quebras do DNA de uma única célula, poucos milhares de células (de 1 a 10.000 células) são necessárias para análise.

5 DISCUSSÃO

Dados indicam que fatores genéticos estão associados com a etiopatogênese da doença periodontal agressiva, tendo como conseqüência a instabilidade ou falta de regeneração do DNA, provocado pela liberação de radicais livres derivados do processo inflamatório que envolve a doença. Os radicais livres provenientes do aumento do estresse oxidativo no tecido gengival, podem contribuir a um dano adicional de lipídeos, proteínas e moléculas de DNA. A presença de mutações no DNA é considerada biomarcador do dano oxidativo, sendo que a produção em excesso de ROS, por leucócitos polimorfonucleares ativados na inflamação crônica, pode levar ao dano oxidativo prematuro (EMINGIL et al., 2002).

Diabetes *mellitus* do tipo 2 também está associado com elevados níveis de estresse oxidativo, que é um dos importantes fatores responsáveis pelo desenvolvimento de complicações crônicas da doença. Estas alterações mostram que pacientes diabéticos possuem altos níveis de danos oxidativos ao DNA e diminuição na efetividade de reparo ao DNA (SLIWINSKA et al., 2008).

As duas doenças analisadas neste trabalho, doença periodontal e diabetes *mellitus* estão comprovadamente relacionadas, de ação bidirecional. A produção de mediadores químicos inflamatórios é comum às duas doenças, causando um excesso destes produtos. Em grandes quantidades, estas substâncias podem agir sobre as células da mucosa bucal, provocando alterações nucleares e genéticas.

O acúmulo de alterações provocadas no material genético pode dar início a processos de carcinogênese. Por este motivo o monitoramento de pacientes com estas características deve ser realizado constantemente, evitando, desta forma, que o câncer bucal possa se instalar e se desenvolver.

Dois testes citogenéticos são utilizados atualmente com muita freqüência para a detecção precoce destas alterações: Micronúcleo e Cometa.

O teste do micronúcleo tem sido aplicado em testes de genotoxicidade de produtos químicos, pois os micronúcleos são facilmente visualizados nos eritrócitos e são fortes indicativos para mensuração de aberrações cromossômicas (CAMPANA ET AL., 2003). O teste do micronúcleo, ao lado da análise de aberrações cromossômicas e do teste do Cometa, é considerado padrão ouro nos métodos citogenéticos. Sua simplicidade o torna bastante atrativo, uma vez que um grande número de células pode ser analisado. Atua como marcador biológico de danos genéticos e pode ser utilizado como indicador de mutagenicidade e como

um instrumento de monitoração, considerando-se que retornam aos níveis basais quando o organismo permanece durante certo tempo sem contato com o agente indutor (Flores & Yamaguchi, 2008).

O teste do Cometa é o método de escolha para medir danos ao DNA, de vários tipos, em células humanas, tais como linfócitos, expostas a diferentes agentes genotóxicos, incluindo radiação, produtos químicos e estresse oxidativo. Em termos de simplicidade, custo, pequena quantidade de material necessário, sensibilidade e confiabilidade, o teste do cometa tem poucos concorrentes sérios. Quando padronizados e validados, o teste do cometa pode fornecer informações valiosas nas áreas de identificação de perigos e avaliação de risco para doenças relacionadas com estresse oxidativo (por exemplo, diabetes e doenças cardiovasculares), nutrição e acompanhamento da eficácia do tratamento médico (DUSINSKA & COLLINS, 2008).

Portanto, fica claro a importância do potencial mutagênico dos agentes químicos inflamatórios aos quais a mucosa bucal fica exposta na presença da associação entre as duas doenças analisadas neste trabalho. Embora um único evento mutagênico não necessariamente leva ao desenvolvimento do câncer, a detecção de um indício de atividade mutagênica é um importante indício para a avaliação do risco à doença.

Os testes aqui abordados são de simples execução, baixo custo, capaz de fazer a identificação de risco em grandes populações, tornando-se importantes ferramentas neste exercício.

6 CONCLUSÃO

Concluimos através das análises bibliográficas que:

- A associação entre Doença Periodontal e Diabetes *Mellitus* irá produzir grande quantidade de radicais livres.
- Nesta situação, radicais livres são capazes de provocar alterações no material genético das células da mucosa bucal.
- Os testes do micronúcleo e cometa são capazes de detectar alterações precoces no material genético.

REFERÊNCIAS

AMOS, A.F.; MACCARTY, D.J.; ZIMMET, P. The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections 2010. **Diabet Med**, v.14, p.S1-S5, 1997.

ANGELI, F.; VERDECCHIA, P.; PELLEGRINO, C.; PELLEGRINO, R.G.; PELLEGRINO, G.; PROSCIUTTI, L.; GIANNONI, C.; CIANETTI, S.; BENTIVOGLIO, M. Association between periodontal disease and left ventricle mass in essential hypertension. **Hypertension**, v.41, p.488–492, 2003.

BLASIAK, J.; ARABSKI, M.; KRUPA, R.; WOZNIAK, K.; ZADROZNY, M.; KASZNICKI, J.; ZURAWSKA, M.; DRZEWOSKI, J. DNA damage and repair in type 2 diabetes mellitus. **Mutat Res**, v.554, p.297-304, 2004.

BLUHER, M.; FASSHAUER, M.; TONJES, A.; KRATZSCH, J.; SCHON, M.R.; PASCHKE, R. Association of interleukin-6, C-reactive protein, interleukin-10 and adiponectin plasma concentrations with measures of obesity, insulin sensitivity and glucose metabolism. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v.113, p.534–537, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância – **Conprev. Atlas de mortalidade por câncer no Brasil 1979-1999**. - Rio de Janeiro: INCA, 2002.

CAMPANA, M. A. et al. Micronuclei induction in *Rana Catesbeiana* tadpoles by the Pyrethroid insecticide lambda-Cyhalothrin. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n.1, p. 99-103, 2003.

CANAKCI, C.F.; TATAR, A.; CANAKCI, V.; CICEK, Y.; OZTAS, S.; ORBAK, R. New evidence of premature oxidative DNA damage: mitochondrial DNA deletion in gingival tissue of patients with periodontitis. **J Periodontol**, v. 77, p.1894-1900, 2006.

CAVALLO, D.; URSINI, C.L.; OMODEO-SALE, E.; IAVICOLI, S. Micronucleus induction and FISH analysis in buccal cells and lymphocytes of nurses administering antineoplastic drugs. **Mutat Res**, v. 628, p.11-18, 2007.

CELIK, A. et al. Cytogenetic biomonitoring in petrol station attendants: micronucleus test in exfoliated buccal cells. **Mutagenesis**, v.18, p.417-421, 2003.

CELIK, A.; KANIK, A. Genotoxicity of occupational exposure to wood dust: Micronucleus frequency and nuclear changes in exfoliated buccal mucosa cells. **Environ Mol Mutagen.**, v.47, p.693-698, 2006.

CHRISTGAU, M.; PALITZSCH, K.D.; SCHMALZ, G.; KREINER, U.; FRENZEL, S. Healing response to nonsurgical periodontal therapy in patients with diabetes mellitus: clinical, microbiological, and immunologic results. **J Clin Periodontol**, v.25, p.112–124, 1998.

ELTER, J.R.; CHAMPAGNE, C.M.E.; OFFENBACHER, S.; BECK, J.D. Relationship of periodontal disease and tooth loss to prevalence of coronary heart disease. **J Periodontol**, v.75, p.782–790, 2004.

EMINGIL, G.; SAPMAZ, G.; BIÇAKÇI, N.; OZKINA, Y.F. Sister chromatid Exchange (SCE) analysis in periodontitis. **J Clin Periodontol**, v.29, p.811-815, 2002.

FENECH, M. et al. The human micronucleus project - an international collaborative study on the use of micronucleus technique for measuring DNA damages in humans. **Mutat. Res.**, v.428, p.271-283, 1999.

FLORES, M.; YAMAGUCHI, M.U. Teste do micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v.1, p.337-340, 2008.

FUSTER, V.; BADIMON, L.; BADIMON, J.J., et al. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. **N Engl J Med**, v.326, p.242–250, 1992.

GARCÍA, F.P.; VARGAS, M.A.L.; MARZO, M.A.M.; ESTEBAN, E.B.; OYARZÚN, J.C.G. Danos tóxicos em tecidos vegetais, produzidos por águas contaminadas com arsênio em Zimapan, Hidalgo, México. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.26, 2006.

GROSSI, S.G.; ZAMBON, J.J.; HO, A.W.; KOCH, G.; DUNFORD, R.G.; MACHTEL E.E.; et al. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. **J Periodontol**, v.65, p.260–267, 1994.

HERRING, M.E.; SHAH, S.K. Periodontal disease and control of diabetes mellitus. **J Am Osteopath Assoc**, v.106, p.416-421, 2006.

HUJOEL, P.P.; DRANGSHOLT, M.T.; SPIEKERMAN, C.; DEROUEN, T.A. Periodontitis-systemic disease associations in the presence of smoking: causal or coincidental? **J Periodontol**, v.30, p.51–60, 2000.

Instituto Nacional do Câncer – INCa – Ministério da Saúde. Câncer de Boca. Disponível em http://www.inca.gov.br/Estimativa/2008/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=1, acesso em 22 abr 2009.

KERN, Ricardo. Avaliação de Micronúcleos em células epiteliais bucais de estudantes de odontologia. **Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, curso de Mestrado em Odontologia – área de concentração em Clínica Integrada**, 2006.

KHIMABUKUR, Fernanda. Avaliação *in vitro* da Cisplatina, em Linfócitos de Pacientes com Melanoma Cutâneo, por meio de Testes Citogenéticos. **Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, 2010.

KIM, J.; AMAR, S. Periodontal disease and systemic conditions: a bidirectional relationship. **Odontology**. v.94, p.10–21, 2006.

KNUDSEN, L.E.; HANSEN, A.M. Biomarkers of intermediate endpoints in environmental and occupational health. **Int J Hyg Environ Health**., v.210, p.461-470, 2007.

MACFARLANE, G.J.; BOYLE, P.; SCULLY, C. Oral cancer in Scotland: changing incidence and mortality. **BMJ**., v.305, p.1121-1123, 1992.

MINICUCCI, E. et al. Cytogenetic damage in circulating lymphocytes and buccal mucosa cells of head-and-neck cancer patients undergoing radiotherapy. **J. Radiat. Res.**, v.46, p.135-142, 2005.

MONTEITH, D.K.; VANSTONE, J. Comparison of the microgel electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of DNA damage. **Mutat Res.**, v.345, p.97-103, 1995.

NORPPA, H. FALCK, G. What do human micronuclei contain? **Mutagenesis**, v.18, p.221-233, 2003.

OFFENBACHER, S.; SALVI, G.E. Induction of prostaglandin release from macrophages by bacterial endotoxin. **Clin Infect Dis**, v.28, p.505–513, 1999.

OLIVE, P.L. Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. **Radiat Res.**, v.117, p.79-92, 1989.

OSTLING, O., JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.123, p.291-298, 1984.

RIBEIRO, D.A.; FAVERO, D.M.; SILVA, R.N.; RIBEIRO, B.; ALENCAR, M.E. Genomic instability in non-neoplastic oral mucosa cells can predict risk during 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. **Oral Oncol**, v.40, p.910-915, 2004.

RIBEIRO, D.A.; KITAKAWA, D.; DOMINGUES, M.A.; CABRAL, L.A.; MARQUES, M.E.; SALVADORI, D.M. Survivin and inducible nitric oxide synthase production during 4NQO-induced rat tongue carcinogenesis: a possible relationship. **Exp Mol Pathol.**, v.83, p.131-137, 2007.

RIBEIRO, D.A.; SALVADORI, D.M.; MARQUES, M.E. Abnormal expression of bcl-2 and bax in rat tongue mucosa during the development of squamous cell carcinoma induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. **Int J Exp Pathol.**, v.86, p.375-381, 2005.

RYDBERG, B.; JOHANSON, K.J. Radiation-induced DNA strand breaks and their rejoining in crypt and villous cells of the small intestine of the mouse. **Radiat Res.**, v.64, p.281-292, 1975.

SIBIO, Maria Tereza. Influência do Hormônio Tireoidiano e da Restrição Alimentar sobre dano de DNA em Animais Obesos. **Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista**, 2010.

SKYLER, J.; ODDO, C. Diabetes trends in the USA. **Diabetes Metab Res Rev**, v.18, p.S21–S26, 2002.

SLIWINSKA, A.; BLASIAK, J.; KASZNICKI, J.; DRZEWOSKI, J. In vitro effect of gliclazide on DNA damage and repair in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM). **Chem Biol Interact**, v.173, p.159-165, 2008.

SPEIT, G.; SCHMID, O.; FROHLER-KELLER, M.; LANG, I.; TRIEBIG, G. Assessment of local genotoxic effects of formaldehyde in humans measured by the micronucleus test with exfoliated buccal mucosa cells. **Mutat Res.**, v.627, p.129-135, 2007.

TENG, Y.T.; TAYLOR, G.W.; SCANNAPIECO, F.; KINANE, D.F.; CURTIS, M.; BECK, J.D.; KOGON, S. Periodontal health and systemic disorders. **J Can Dent Assoc**, v.68, p.188–192, 2002.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ Mol Mutag.**, v.35, p.206-221, 2000.

VERNILLO, A.T. Dental considerations for the treatment of patients with diabetes mellitus. **JADA**, v.134, p.24S-33S, 2003.