



Revista
Saúde Integrada
ISSN 2447-7079

AValiação de Micronúcleo Após a Aplicação de Agentes Desensibilizantes: Um Ensaio Clínico Randomizado

Camila Rafaela Mousquer

Professora do curso de Odontologia da Faculdade CNEC Santo Ângelo. Mestre em Clínica Odontológica pela Universidade de Passo Fundo. Pós graduada em docência para o Ensino Superior CNEC/IESA. E-mail: crmousquer@gmail.com

Fabício Batistin Zanatta

Professor Adjunto do curso de Odontologia da Universidade federal de Santa Maria e do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas; Doutor em Odontologia pela Universidade Luterana do Brasil.

Gilberto Heinzmann

Professor do curso de Odontologia Faculdade CNEC Santo Ângelo. Especialista em Cirurgia e Traumatologia Bucamaxilofacial.

Silene Barbieri

Professora do curso de Odontologia Faculdade CNEC Santo Ângelo. Mestre em Odontologia pela Universidade Federal de Pelotas; Residência em Atenção à Saúde Oncológica pela Universidade Federal de Pelotas; Pós graduanda em docência para o Ensino Superior Faculdade CNEC Santo Ângelo. E-mail: lenebarbieri86@gmail.com

Simone Barbieri Tomé

Professora do curso de Odontologia Faculdade CNEC Santo Ângelo. Mestre Endodontia – São Leopoldo Mandic. E-mail: 1432.simonetome@cnecc.br

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar as células gengivais de pacientes com hipersensibilidade dentinária (HD), através de teste de micronúcleo, após a aplicação de agentes dessensibilizante em pacientes selecionados nos laboratórios de práticas clínicas do curso de Odontologia do Centro Universitário Franciscano (UNIFRA), Santa Maria, RS. Participaram do estudo quatorze pacientes, de ambos os sexos, classificados em dois grupos, teste (6) e controle (8). A avaliação foi feita através do biomonitoramento da superfície exposta ao agente. Para este fim, adotou-se o teste de micronúcleo, que evidenciou a presença ou não de carcinógenos, refletindo na incidência de eventos genotóxicos sobre a mucosa bucal. A coleta de material foi feita através da citologia esfoliativa na região onde os pacientes apresentaram HD aos estímulos térmicos, táctil e/ou osmóticos. As lâminas foram coradas pela coloração de Giemsa que serviram para a avaliação da frequência de micronúcleo e das alterações metanucleares. Os resultados demonstram pouca variação entre os espécimes estudados em relação ao número de micronúcleos, que variou de zero a dez micronúcleos por amostra estudada, sem diferenças importantes entre os grupos. Portanto, a utilização do gel teste parece não aumentar a incidência de eventos genotóxicos. Entretanto, um número maior de observações deve ser avaliado para confirmar estes achados.

Palavras-chave: Hipersensibilidade dentinária, Micronúcleo, Eventos Genotóxicos, Alterações Metanucleares, Citologia Esfoliativa.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate gingival cells from patients with dentine hypersensitivity (DH) through the micronucleus assay, following the application of desensitizing agents in selected patients in the laboratories of clinical practice of the dental clinic of the Center Franciscan University (UNIFRA) Santa Maria, RS. The study included fourteen patients of both sexes, divided into two groups, test (6) and control (8). The evaluation was performed using the biomonitoring of surface exposed to

p. 58-68

the agent. To this end, we adopted the micronucleus test, which revealed the presence of carcinogens, increasing the incidence of genotoxic on the oral mucosa. The material collection was done by exfoliative cytology in the region where the HD patients to thermal stimuli, tactile and / or osmotic. The slides were stained with Giemsa which served for evaluation of micronucleus frequency and change metanucleated. The results show little variation among the specimens studied in relation to the number of micronuclei, which ranged from zero to ten micronuclei per sample, without significant differences between groups. Therefore, using the gel test does not appear to increase the incidence of genotoxic events. However, a greater number of observations must be evaluated to confirm these findings.

Key-words: Dentin Hypersensitivity, Micronuclei, Events Genotoxic, Changes Metanucleated, Exfoliative Cytology.

INTRODUÇÃO

A hipersensibilidade dentinária (HD) é caracterizada por uma sensação dolorosa aguda, bem localizada e transitória, em resposta a estímulos tácteis, térmicos, evaporativos e/ou osmóticos, os quais normalmente não causariam resposta em um dente saudável (Addy et al. 2007, Porto et al. 2009, Furlan et al. 2007). O mecanismo biológico explicativo da HD hipotetiza que os estímulos atuam sobre os túbulos dentinários abertos, promovendo uma movimentação hidrodinâmica. Por sua vez, esta movimentação dos fluidos estimula as terminações nervosas pulpares causando a sensação dolorosa. (Mesquita et al. 2009, Vale et al.1997, Astrom e Brannstron et al. 1992, Porto et al. 2009)

A HD afeta de 8-57% da população adulta e é associada com a dentina exposta ao ambiente oral (Porto et al. 2009, Addy et al. 1992, Markowitz et al. 2007). Essa condição atinge pessoas de diversas faixas etárias, apresentando uma maior prevalência em mulheres do que homens (Fisher et al. 1991). Quanto aos dentes mais afetados destacam-se caninos e pré-molares de ambos os arcos. Esta condição tem um impacto na qualidade de vida, podendo desencadear alterações emocionais e mudanças de comportamento. (Porto et al. 2009). Além disso, os componentes erosivos da dieta e presença de placa bacteriana da dentina são fatores coadjuvantes a etiologia da HD (Maia de Oliveira et al. 2003, Porto et al 2009, Gillan et al. 2006, Fischer et al. 1991).

O manejo clínico da HD busca atuar na diminuição dos sintomas e na prevenção destes. Assim, aconselhamentos dietéticos e outros hábitos nocivos e instruções de higiene fazem parte do tratamento da HD. (PORTO et al. 2009, GILLAM et al. 2006). Há uma vasta possibilidades terapêuticas para o tratamento da HD, tais como vernizes, revestimentos, materiais restauradores, adesivos dentinários, dentifrícios e enxaguatórios bucais que são utilizados para reduzir a HD (Kazemi et al. 1999, Gillam et al. 2006). Entretanto, ainda não existe um agente padrão-ouro para o tratamento da HD (Porto et al. 2009, Kimura et al. 2000, Pereira et al. 1995). Grossman, 1935 recomendou que o agente dessensibilizante devesse ser de fácil aplicação, indolor, ter ação rápida e efeito prolongado e não promover alteração de cor no dente e não produzir efeitos adversos importantes.

Uma das formas de avaliar os efeitos adversos de um agente químico odontológico pode ser o teste de micronúcleo (Giovanini et al. 2009). O micronúcleo consiste numa porção citoplasmática de cromatina de forma redonda ou ovalada que se localiza perto do núcleo. Os micronúcleos são formados durante a

telófase da mitose ou meiose, quando o envelope nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos das células filhas. São resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal. Assim sendo, o micronúcleo representa perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural (fragmento) ou dano no aparelho mitótico (Corrard et al., 2006). A sua formação resulta de uma lise na molécula de DNA dias ou semanas após a ação de carcinógenos quando as células da camada basal estão em divisão. São constituídos, portanto, de fragmentos de cromátides ou cromossomos acêntricos ou aberrantes que não foram incluídos no núcleo principal após a conclusão da mitose. Portanto, células micronucleadas podem refletir a incidência de eventos genotóxicos sobre a mucosa bucal (Andrade et al., 2005).

Neste sentido, o micronúcleo parece ser um teste de fácil execução e de forte especificidade como marcador biológico preditivo para lesões cancerizáveis. Por esta razão, tem sido utilizado em Odontologia para avaliar efeitos adversos de diversas substâncias químicas (Bohrer et al. 2005, Giovanini et al. 2009). Portanto, o presente estudo objetiva testar a hipótese nula de que não há diferença no número de micronúcleos nas células do tecido gengival após o tratamento de HD entre um gel dessensibilizante contendo fluoreto de sódio 5%, Oxalato de potássio 5% e Cloreto de estrôncio 10% e um gel placebo, ambos de uso tópico e caseiro, no tratamento de hipersensibilidade dentinária.

MATERIAS E MÉTODOS

O presente estudo foi um Ensaio Clínico Randomizado, Duplo Cego, com indivíduos diagnosticados como portadores de hipersensibilidade dentinária. Os pacientes foram recrutados das clínicas do Curso de Odontologia do Centro Universitário Franciscano e do curso de especialização em Periodontia da Universidade de Uningá – Santa Maria. Os dados foram coletados no período de Abril a Agosto de 2010. O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UNIFRA (CEP/UNIFRA) sob o protocolo 311.2009.2.

Anteriormente aos exames clínicos, os participantes elegíveis responderam a um questionário semi-estruturado onde se investigou a história médica do paciente, histórico odontológico e características como: tratamentos prévios de HD, tratamentos periodontais aos quais foram submetidos, hábitos de higiene, ingestão de sacarose e substâncias ácidas.

Critérios de elegibilidade

Foram considerados pacientes elegíveis aqueles que apresentaram no mínimo um dente, com recessão gengival e HD após pelo menos um dos estímulos térmico, táctil e/ou osmótico (água), testados através da utilização de jato de ar, sonda exploradora e jato d'água da seringa tríplice, respectivamente.

Foram considerados não elegíveis pacientes que faziam uso crônico de antiinflamatório e analgésico; utilizavam algum produto de uso profissional para HD; apresentavam alergia a algum componente que está sendo utilizado no trabalho; Grávidas ou lactantes; Condições sistêmicas que causassem ou predisões o desenvolvimento da HD (exemplo: reflúxo esofágico). Ainda, indivíduos cujo dente com HD apresentasse cavidades de cárie, fraturas, ausência de sensibilidade pulpar ou com alguma sintomatologia pulpar testada através dos testes de sensibilidade pulpar a

frio, defeito congênito de esmalte ou de dentina; restauração extensa realizada nos últimos três meses e dentes pilares de próteses fixas ou removíveis foram considerados não elegíveis. (Ritter et al., 2006).

Critérios de exclusão

Foram considerados critérios de exclusão após o início do estudo pacientes que não retornassem aos atendimentos para realização dos testes de sensibilidade no período estipulado de avaliação; que não fizessem uso adequado do produto, o qual era avaliado pelas marcações da seringa; que desistissem de participar da pesquisa, por algum motivo, após alguns dias de uso do produto; que não suspendessem o uso de dentifrícios dessensibilizantes, no mínimo, uma semana antes do início da participação do trabalho.

Procedimentos experimentais

Após a seleção dos dentes que foram incluídos neste estudo, realizou-se o Índice de Sangramento Gengival, Índice de Placa Visível, com o auxílio de uma sonda milimetrada (Marca, cidade de fabricação, estado, país) foram avaliados a Profundidade de Sondagem (distância da margem gengival a porção mais apical sondável), o Nível de Inserção gengival (distância da junção amelo-dentinária até a porção mais apical sondável) e o Sangramento a Sondagem. Ainda foi realizada a tomada de medida da região de recessão gengival em altura, largura e profundidade (no caso da presença de lesões cervicais não cariosas). A mensuração da HD foi realizada na face vestibular dos elementos selecionados.

Mensuração da hipersensibilidade dentinária

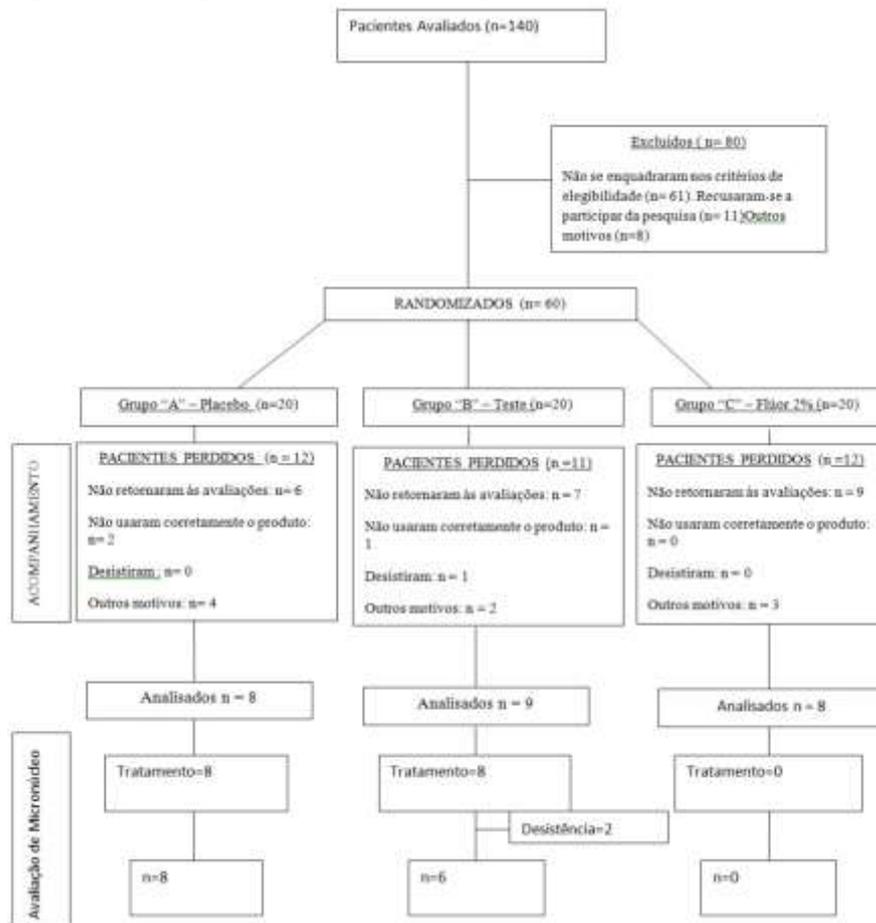
A HD foi mensurada através de uma escala analógica visual (EAV) e uma escala verbal (sem dor, dor leve, dor moderada, dor forte e dor muito forte) imediatamente a aplicação do jato de ar, do teste táctil e do jato d'água. Após a realização dos testes, os pacientes que participaram da pesquisa foram distribuídos em três grupos através de uma randomização sob forma de sorteio realizado pelo operador do estudo.

Um Grupo recebeu uma seringa contendo o placebo, identificada com a letra "A" e o outro grupo recebeu a seringa contendo a substância em forma de gel (Fluoreto de sódio 5%, Oxalato de potássio 5%, Cloreto de estrôncio 10%) etiquetada com a letra "B". Após a randomização, foi realizada uma deplacagem supragengival e os pacientes receberam as substâncias acondicionadas em seringas com marcação de 10 g. A seringa encontrava-se envolta por um saco de papel branco, para evitar qualquer tipo de associação por parte do examinador e do paciente, pois as substâncias apresentavam discretas diferenças em sua coloração e não foi possível tornar idênticas pela farmácia responsável pela manipulação dos produtos. A orientação para a utilização das substâncias testadas foi a de realizar escovação 1 vez ao dia com o produto recebido, por pelo menos 1 minuto e na quantidade de 0,25 g (0,5 ml) do produto conforme a demarcação na seringa. Ainda, foi demonstrada pelo examinador, a quantidade a ser utilizada com uma seringa vazia (mantendo o cegamento), e entregue juntamente com o produto um lembrete com a forma de uso.

Os participantes da pesquisa, também, foram instruídos a retornarem para as avaliações de 7, 15 e 30 dias trazendo suas escovas multicerdas, para que antes dos

testes de mensuração da HD fosse realizada uma deplacagem dos sítios a serem avaliados. A adesão ao tratamento foi realizada com o controle da utilização da substância pela extremidade interna do embolo da seringa. Os Indivíduos que suspenderam o uso por qualquer motivo, não retornaram após sete dias ou fizeram a utilização inadequada da substância fornecida, foram descartados da amostra.

Figura 1. Fluxograma do desenho experimental.



Coleta das Células Gengivais

Foram coletados, no baseline, células gengivais de quatorze sítios por meio de citologia esfoliativa (CE). Previamente a CE, os indivíduos realizaram um bochecho com água por 30 segundos para remoção de qualquer material solto que pudesse comprometer a análise. Para a realização da citologia esfoliativa foi realizada raspagem com swab, na região de gengiva livre vestibular do elemento dentário que apresentou HD aos estímulos. Após duas semanas do término dos produtos, foram realizadas novas coletas de células gengivais nos mesmos locais inicialmente coletados. As amostras foram coletas no período de abril/agosto de 2010 e analisadas de agosto/outubro de 2010.

Após a coleta do material, o mesmo foi imerso em um tubo Falcon de 15ml contendo 5 ml de salina resfriada. Após, o tubo Falcon era transportado imediatamente ao laboratório em uma caixa refrigerada. No laboratório as amostras foram centrifugadas à 3000RPM por 10 minutos, após desprezar o sobrenadante e ressuspender o restante em 2ml de solução fixadora metanol – ácido acético (3:1). Após este procedimento, as amostras foram centrifugadas mais uma vez à 3000RPM por 1 min. Então foi desprezado um pouco do sobrenadante, homogeneizado o restante e espalhado sobre

as lâminas, previamente identificadas e deixou-se secar a temperatura ambiente. Para finalizar o procedimento as células foram coradas com Giemsa mais água destilada, na proporção de 1 gota de corante para 1ml de água. Depois de feito este procedimento de coloração, esperou-se secar o corante e observou-se em microscopia de 40X.

Para uma melhor identificação das alterações nucleares foi seguido o protocolo de Bohrer et al.2005. Os critérios utilizados para caracterizar a formação de micronúcleos (MNs) foram os seguintes: estrutura e intensidade de coloração da cromatina similar ou mais fraca que o núcleo principal; bordas nítidas, sugerindo a presença de membrana; estruturas arredondadas e incluídas no mesmo citoplasma do núcleo principal e não ultrapassar 1/5 do maior diâmetro do núcleo principal (Corrard et al., 2007; Giovanini et al., 2009). Ainda, foram também identificadas células binucleadas (BNs, células contendo dois núcleos) Para a avaliação de células com Mns ou BNs foram analisadas uma média de 500 células por lâmina. A avaliação das lâminas foi realizada por uma examinadora experiente em diagnóstico genético-laboratorial e ocorreu de forma cega para os grupos experimentais.

ANÁLISE DOS RESULTADOS

Foi realizada uma análise descritiva dos dados de acordo com cada grupo experimental.

RESULTADOS

A tabela 1 traz uma descrição de variáveis demográficas e de hábitos que podem influenciar os resultados. A maioria dos participantes foi do sexo feminino. Quanto a hábitos presentes em indivíduos pertencentes aos dois grupos o uso de antisséptico foi mais freqüente no grupo controle do que no grupo teste.

Tabela 1. Descrição das variáveis demográficas e hábitos nos grupos experimentais no baseline.

	Grupo teste	Grupo controle
Idade		
Média (± dp)	49.6 (9.9)	38.3 (8.9)
Sexo n (%)		
Feminino	4 (66.7)	6(75)
Masculino	2 (33.3)	2(25)
Fumo n (%)		
Sim	1 (16.7)	1 (12.5)
Não	5 (83.3)	7 (87.5)
Álcool n (%)		
Sim	1 (16.7)	0 (0)
Não	5 (83.3)	8 (100)
Anti-séptico n (%)		
Sim	2 (33.3)	5 (62.5)
Não	4 (66.7)	3 (37.5)

As figuras 2 e 3 trazem a descrição através de um gráfico Box Plot (mínimo, máximo, mediana, percentis 25 , 75 e média) do número de células com MNs e BNs entre os tratamentos teste e controle nos dois momentos experimentais. Quanto à análise dos Mns a média no baseline foi de 1 e 2.6 células, para os grupos placebo e teste, respectivamente. Na segunda coleta do material, foram 2.6 e 2.5 para o grupo placebo e teste, respectivamente. Já a análise das células binucleadas no baseline demonstrou um número médio de 0.5 e 1 para os grupos placebo e teste, respectivamente. No segundo momento experimental estes números foram para 2.37 e 2.3 para os grupos placebo e teste, respectivamente. Apesar de não existirem diferenças importantes no número de MNs e BNs entre os dois tratamentos, o tratamento placebo parece ter provocado mais aumento de Mns e Bns do que o tratamento teste.

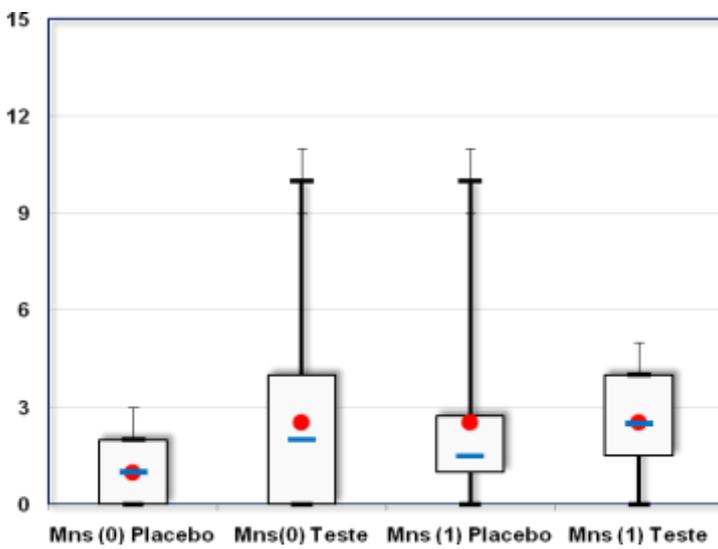


Figura 2. Descrição do número de micronúcleos de acordo com os diferentes grupos e tempos experimentais.

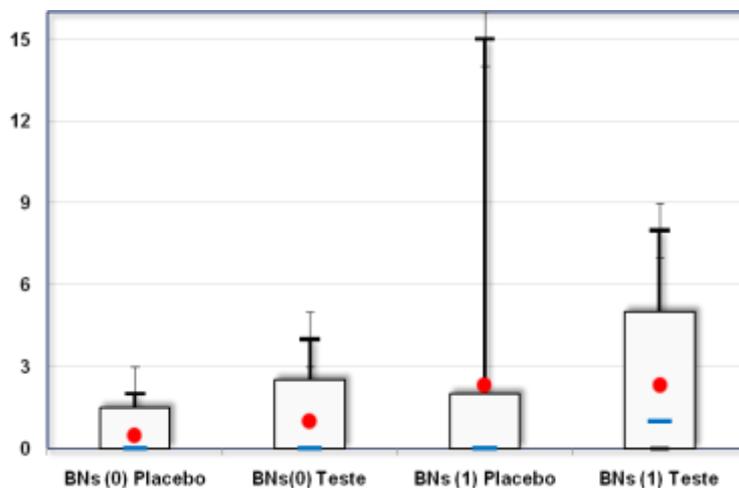


Figura 3. Descrição do número de células binucleadas de acordo com os diferentes grupos e tempos experimentais.

DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo foi analisar a formação de células com Mns e Bns após o uso de um agente dessensibilizante contendo fluoreto de sódio 5%, Oxalato de potássio 5% e Cloreto de estrôncio 10%. Considerando estes desfechos nossos resultados demonstraram que o uso de gel teste não pareceu resultar em aumento do número de Mns e Bns.

A verificação de efeitos adversos de um produto para uso bucal pode ser realizada de várias formas. A razão pela qual foi utilizado MNs para avaliar possíveis efeitos adversos foi de que o Mn contém material genético que foi perdido do genoma durante a mitose, como resultado de eventos clastogênicos, e ocorrem antes de qualquer mudança histopatológica pré-neoplásica tornar-se evidente (Giovanini et al., 2009). Giovanini et al.2009 avaliaram a presença de micronúcleos (MN) em amostras celulares coletadas de lesões bucais leucoplásicas constatando que há maior incidência de micronúcleos em esfregaços celulares de regiões bucais que apresentam forte potencial carcinogênico, mas ainda sem lesão prodrômica evidente. Os Mns podem ser considerados como marcadores biológicos por poderem refletir doses de exposição à carcinógenos e sua interação com macromoléculas, como por exemplo, o DNA. Como as interações do DNA com substâncias químicas são reconhecidamente os primeiros passos na iniciação do câncer, maior ênfase deve ser dispensada aos métodos que detectam a atividade genotóxica em humanos (Corrard et al., 2007, Andrade et al., 2005). Já a inclusão da avaliação de células binucleadas foi realizada porque o aparecimento de BNs provavelmente não esteja relacionado a alterações do DNA, mas parece estar envolvido com atraso da divisão celular. (Corrard et al., 2007).

Um dos achados intrigantes do presente estudo foi o de que foi encontrado um maior aumento de MNs e Bns após o gel placebo quando comparado ao teste quando comparados as médias nos dois tempos experimentais. Este achado pode ser explicado por observações individuais que tenham sido muito discrepantes aumentando a média do grupo. Outra hipótese seja a de que o número de usuários de antisséptico foi maior no grupo placebo comparado ao grupo teste. Não foi avaliado exatamente a concentração de álcool nos antissépticos utilizados mas a maioria das formulações encontradas comercialmente têm alguma concentração de álcool. Bohrer et al.2005 avaliaram a formação de MNs na mucosa bucal de fumantes e usuários de álcool encontrando uma tendência no aumento de MNs. .

A randomização dos usuários dos géis utilizados, o uso de gel placebo como controle, a coleta de células gengivais por apenas uma pesquisadora, a calibragem prévia da avaliadora das lâminas e a avaliação das mesmas de forma cega compõe um conjunto de aspectos metodológicos que aumentam a validade interna dos resultados. Entretanto, o reduzido número de participantes não permitiu realizar uma exploração analítica dos dados e tampouco detectar diferenças importantes entre os géis teste e placebo. Portanto, o presente estudo comporta-se muito mais como um estudo piloto.

Considerando a avaliação de micronúcleo após a utilização de agentes dessensibilizantes, de acordo com o nosso conhecimento, parece ser um estudo

pioneiro. Portanto, não temos estudos avaliando formação de MNs após uso de dessensibilizantes para compararmos com nossos achados. Considerando as limitações do presente estudo, o uso do gel teste parece não estar associado a um aumento significativo no número de Mns e Bns. Entretanto, um maior número amostral deve ser testado para que se confirme ou refute estes achados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Addy M, West NX, Barlow A, Smith S. Dentine hypersensitivity: is there both stimulus and placebo responses in clinical trials. *Int J Dent Hygiene*. v.5; p.53-59; 2007.
- Andrade MGS, et al. Micronúcleo: Um importante marcador biológico intermediário na prevenção do câncer bucal. *Revista Odontologia – Fac. Odontologia/PUCRS*. v.20; p.137-141; 2005.
- Brännström M, Aström A. The hydrodynamics of the dentine; its possible relationship to dentinal pain. *Int.dent.J*. v.22; p.219-227; 1972.
- Bohrer PL, Filho MS, Paiva RL, da Silva IL, Rados PV. Assessment of micronucleus frequency in normal oral mucosa of patients exposed to carcinogens. *Acta Cytol*. v.49; p.265-272; 2005.
- Corrard VC, Costa CH, Ferreira LA, Lauxen IS, Rados PV. Teste dos Micronúcleos – Um Biomarcador de Dano Genotóxico em Células Descamadas da Mucosa Bucal. R. Fac. *Odontol. Porto Alegre*. v.48; p.77-81; 2007.
- Fischer C, et al. Clinical evaluation of pulp and dentine sensitivity after supragingival and subgingival scaling. *Endod Dent Traumatol*. v.7; p.259-265; 1991.
- Furlan LM, et al. Incidência de recessão gengival e hipersensibilidade dentinária na clínica de graduação da FOP-UNICAMP. *Periodontia*. v.17; p.53-61; 2007.
- Giovanini AF, Vieira DC, Franco LB, Zielak JC, Pizzatto E, Gonzaga CC. Análise de micronúcleo em citologia esfoliativa de lesões leucoplásicas em boca. *POS – Perspect. Oral Sci*. v.1; p.19-23; 2009.
- Grossman LI. A systematic method for the treatment of hypersensitive dentin. *J. Am. Dent. Assoc*. v.22; p.592-602; 1935.
- Kazemi RB, Sen BH, Spangberg LSW. Permeability changes of dentine treated with titanium tetrafluoride. *J Dent*. v.27; p.531-538; 1999.
- Kimura Y, et al. Treatment of dentine hypersensitivity by lasers: a review. *Journal of Clinical Periodontology*. v.27; p.715-721; 2000.
- Markowitz k, Pashley DH. Personal reflections on a sensitive subject. *J Dent Res*. v.86; p.292-295; 2007.
- Mesquita CR. et al. Hiperestesia dentinária: Opções de tratamento. *Revista dentística on line*. v.18; p.29-34; 2009.
- Porto ICCM, Andrade AKM, Montes MAJR. Diagnosis and treatment of dentinal hypersensitivity. *Jornal of Oral Science*. v.51; p.323-332; 2009.
- Pereira JC. Hiperestesia dentinária-aspectos clínicos e formas de tratamento. *Maxi-Odonto*. v.1; p.1-24; 1995.
- Vale IS, et al. Hipersensibilidade dentinária: Diagnóstico e tratamento. *Rev Odontol Univ São Paulo*. v.11; p.207-213; 1997.