

Avaliação da genotoxicidade em Cirurgiões-Dentistas da cidade de Pelotas-RS através do teste de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa bucal

GENOTOXICITY EVALUATION IN DENTISTS OF PELOTAS CITY - RS THROUGH MICRONUCLEUS TEST IN BUCAL EXFOLIATED MUCOSAL CELLS

Daniela Martino ROTH

Farmacêutica - Bioquímica - UCPel - Mestranda em Biotecnologia, UFRGS

Gustavo ZEHLINSKI

Bacharel em Informática - UFPel

Maria da Graça MARTINO-ROTH

Bióloga - Doutora em Ciências - Escola de Medicina - UCPel

Milhões de trabalhadores em vários setores ocupacionais correm o risco potencial de estarem expostos a substâncias perigosas. Há alguns anos tem sido debatido o amálgama dentário e seu efeito potencial par a saúde. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do mercúrio do amálgama nos cirurgiões-dentistas expostos a essa substância, por pelo menos cinco anos. Muitas substâncias são genotóxicas e podem causar alterações genéticas nas células somáticas de trabalhadores expostos. Neste estudo, foi utilizado o teste de micronúcleos (MN) em células esfoliadas, por ser um teste de baixo custo, não invasivo, no qual a formação de MN é um biomarcador para detectar efeitos endógenos do estilo de vida, exposições ocupacionais e ambientais a genotóxicos, como também, a proteção de vários compostos em estudos de intervenção. A frequência de células com micronúcleos em cirurgiões-dentistas com hábito alcoólico ($4,43\text{CMN} \pm 4,16$) foi significativamente mais baixa ($P < 0,001$) do que a dos dentistas sem hábito alcoólico ($14,50\text{CMN} \pm 16,72$). Os fumantes expostos apresentaram frequência de células com micronúcleos ($4,50\text{CMN} \pm 2,12$) significativamente mais baixa ($P < 0,001$) do que a dos não fumantes ($10,62\text{CMN} \pm 14,06$). A idade e o tempo de trabalho não influenciaram na frequência de células com micronúcleos nestes profissionais.

UNITERMOS: Mercúrio; Micronúcleos; Cirurgiões-dentistas; Genotoxicidade ocupacional.

INTRODUÇÃO

Milhões de trabalhadores em vários setores ocupacionais correm o risco potencial de estarem expostos a substâncias perigosas. Essas substâncias, incluindo poeira, fibras, e compostos químicos orgânicos e inorgânicos, são usadas como matéria

bruta, intermediária ou como produto final no processo industrial. Elas podem existir na forma de gases, vapores, fumaça, misturas ou partículas. A inalação é a rota primária de exposição, porém, esta pode ocorrer, ainda, através de absorção pela pele ou ingestão. Muitos trabalhadores estão expostos a um complexo de misturas químicas ou misturas de

agentes químicos e físicos. Muitas doenças em trabalhadores podem ser atribuídas a exposição a agentes químicos ou físicos⁷.

Muitas das substâncias a que os trabalhadores estão expostos são atualmente reconhecidas como genotóxicas e tem o potencial de causar alterações genéticas em tecidos alvo de trabalhadores expostos. Tais alterações, se ocorrerem em proto-oncogenes ou genes supressores de tumores, que estão envolvidos no controle do crescimento ou diferenciação celular, podem levar ao desenvolvimento do câncer em órgãos alvo⁷.

Há alguns anos tem sido debatido o amálgama dentário e seu efeito potencial na saúde. O mercúrio é um de seus constituintes que oferece perigo e por esse motivo vem recebendo atenção especial⁶. O mercúrio é uma substância extremamente tóxica quando ocorre exposição de modo crônico e prolongado. Sua absorção e acúmulo no organismo ocorre lentamente e pode continuar durante muito tempo, levando potencialmente ao desenvolvimento de sérias conseqüências para saúde³.

Os cirurgiões dentistas são profissionais que estão constantemente em contato com vapores deste metal, devido a confecção do amálgama. Para este fim, o mercúrio é usado sob forma elementar ou metálico e é altamente tóxico. É um metal líquido que tem a propriedade de se volatilizar à temperatura ambiente, o que facilita a contaminação do ar. Essa volatilização pode aumentar até oito vezes quando a temperatura se eleva de 20°C à 50°C¹³.

Durante a operatória restauradora de dentes, desde a formação do amálgama, até a escultura da restauração na cavidade bucal, há a possibilidade de absorção do mercúrio pela pele, inalação ou ingestão do metal¹.

A avaliação do dano que pode ocorrer no DNA a nível cromossômico é parte importante da genética toxicológica, visto que as alterações cromossômicas são um evento importante no processo de carcinogênese. E embora nosso conhecimento da estrutura dos cromossomos seja, ainda, incompleto, várias evidências sugerem que as alterações cromossômicas sejam conseqüências e manifestações diretas de dano a nível de DNA. Como por exemplo, quebras cromossômicas podem resultar de falha no reparo da quebra na dupla cadeia do DNA⁴.

Uma maneira de se estudar os efeitos em uma população exposta, é conduzir estudos de monitoramento, utilizando parâmetros biológicos pertinentes, tais como, ensaios citogenéticos, que

podem identificar alterações nos cromossomos resultantes da exposição a agentes genotóxicos². O ensaio de micronúcleos tem emergido como um método preferencial para medir o dano cromossômico, pois pode detectar tanto perda como quebra cromossômica, visto que são biomarcadores que se manifestam a curto prazo após exposição e sua freqüência se encontra elevada em tecidos expostos antes que qualquer sinal clínico seja evidente. É largamente utilizado por serem marcadores simples que podem ser examinados em preparações citológicas de rotina, utilizando-se como material para análise quaisquer células humanas esfoliadas¹⁴.

Os micronúcleos são corpúsculos contendo DNA que surgem durante mitoses da camada basal do epitélio como partícula extracromossômica, quando fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros são perdidos ou não são incluídos nos núcleos das células filhas e ficam localizados no citoplasma da célula sem qualquer conexão estrutural com núcleo principal⁸. Assim, uma freqüência elevada de micronúcleos em células esfoliadas revela a ação genotóxica e pode ser usada para identificar grupos de populações de alto risco para desenvolver câncer⁹.

Os micronúcleos formados espontaneamente são eventos raros que podem variar, em pessoas saudáveis, de 0,3 a 0,5%. Por essa razão, devem ser analisadas, pelo menos, 1000 células por indivíduo para se obter resultados satisfatórios¹⁴.

Por estarem expostos a vapores de mercúrio durante a confecção do amálgama, os cirurgiões - dentistas foram investigados para avaliar a freqüência de células com micronúcleos; intervir, quando for o caso, para reforçar a necessidade de equipamentos de proteção, diminuindo o nível de exposição, bem como procurar conscientizar a classe odontológica quanto a importância da higiene do mercúrio.

MATERIAL E MÉTODOS

Este é um estudo preliminar que avaliou uma amostra 14 cirurgiões - dentistas com mais de cinco anos de trabalho, no qual manipulam amálgama e 12 trabalhadores não expostos, como grupo controle. Todos profissionais eram saudáveis e responderam a um questionário referente a história pessoal, ocupacional, fumo, saúde e dieta.

O estudo foi realizado em células esfoliadas do tecido epitelial da mucosa bucal, obtidas através de

raspagem com espátula de madeira. As coletas foram realizadas, sempre pela manhã. Fez-se dois esfregaços por amostra, em lâmina previamente limpa, fixados em metanol e corados pelo método Schiff-Fast-Green. Foram analisadas 2000 células por indivíduo, em microscópio óptico, utilizando-se aumento de 1000 vezes. A análise estatística foi realizada através do Programa SPSS, para determinar a média de CMN no grupo de expostos e de controles, bem como verificar se havia diferença entre elas, determinar o desvio padrão, a variância e investigar como as variáveis como idade, tempo de trabalho, uso de fumo e bebidas alcoólicas influenciaram na frequência de CMN. Foi utilizado o Teste t, bicaudal, de Student e o teste do χ^2 .

RESULTADOS

As principais características que apontam o perfil dos indivíduos expostos e dos controles, que

participaram deste estudo preliminar, estão contidos na Tabela 1. Os indivíduos avaliados foram identificados quanto à idade, tempo de trabalho, etnia, hábito de fumar e hábito alcoólico.

Os dados foram analisados pelo teste do χ^2 , com $P < 0,001$. A diferença entre o número médio de células com micronúcleos (CMN) dos cirurgiões - dentistas (9,80CMN \pm 13,20) e dos controles (3,25CMN \pm 3,28) analisado através do teste t de Student, bicaudal, foi altamente significativa ($P < 0,001$). A frequência de células com micronúcleos em cirurgiões-dentistas com hábito alcoólico (4,43CMN \pm 4,16) foi significativamente mais baixa ($P < 0,001$) do que a dos cirurgiões-dentistas sem hábito alcoólico (14,50CMN \pm 16,72). Os expostos fumantes apresentaram frequência de células com micronúcleos (4,50CMN \pm 2,12) significativamente mais baixa ($P < 0,001$) do que os não fumantes (10,62CMN \pm 14,06). A idade e o tempo de trabalho não influenciaram na frequência de células com micronúcleos nestes profissionais.

TABELA 1 – Caracterização da amostra de indivíduos expostos (Cirurgiões-dentistas) e não expostos ao mercúrio, que foram avaliados pelo teste de micronúcleos.

Características	Dentistas n=14	Controles n=12
Idade média	40,4 anos	39,6 anos
Varição	26 - 57	23 - 60
Caucasóides	13 (92,9%)	11 (91,7%)
Negróides	01 (7,1%)	01 (8,3%)
Fumantes	02 (14,2%)	01 (8,3%)
Não-fumantes	12 (85,7%)	11 (91,6%)
C/háb. alcoólico	07 (50,0%)	06 (50,0%)
S/háb. alcoólico	07 (50,0%)	06 (50,0%)
Tempo médio de trabalho	15,6 anos	13,9 anos
Varição	2 - 32	1 - 34

DISCUSSÃO

Há algum tempo, se conhece bem o efeito teratogênico, principalmente sobre o cérebro, do mercúrio. Crianças, cujas mães entraram em contato com o mercúrio durante a gravidez, podem nascer com graus variáveis de atraso no desenvolvimento neuro-psico-motor, bem como microcefalia, surdez e cegueira¹¹. Tenório; Bley Sobrinho¹² (1987) recomendaram às cirurgiãs-dentistas em idade fértil, proteger-se dos efeitos nocivos desse material,

salientando que o mercúrio pode causar também, intoxicação crônica em cirurgiões-dentistas e em seu pessoal auxiliar, quando facilita-se a sua volatilização.

Os resultados deste estudo preliminar evidenciam que, além de perigoso, o mercúrio pode ser genotóxico, visto que o número médio de células com micronúcleos encontrado nos cirurgiões-dentistas (9,8CMN \pm 13,20) é, pelo menos, três vezes o número médio encontrado nos indivíduos não expostos ao mercúrio do amálgama (3,25CMN \pm 3,28). Esse aumento significativo de células com micronúcleos nos cirurgiões-dentistas deve resultar

de alterações no seu material genético, desde que os micronúcleos são uma consequência dessas alterações.

Galic et al.⁵ (2001) realizaram estudos com ratos nos quais foi colocado quatro restaurações com amálgama nos dentes, por dois meses, e verificaram que houve um aumento significativo de concentração de mercúrio na urina desses animais em relação ao controle.

Estudos em humanos foram realizados por Tezel et al.¹³ (2001), nos quais foi medida a concentração de mercúrio no sangue venoso de alunos e professores da clínica de odontologia, onde usavam amálgama para fazer restaurações dentárias nos pacientes. As avaliações do nível de mercúrio no sangue foram realizadas no início e no fim do ano letivo, sendo detectado um aumento significativo ($p < 0,001$) da concentração de mercúrio no plasma de todos os indivíduos expostos.

Na Figura 1 pode-se observar a percentagem dos indivíduos expostos e não expostos com relação a frequência de CMN e verificar que existe uma diferença nessa distribuição. Nos controles há uma concentração maior na faixa de poucas células com micronúcleos, enquanto nos expostos a situação é inversa. Outro fator importante de ser salientado é a grande variação encontrada nos dados dos indivíduos expostos, o mesmo não se verificando no grupo controle, cujos dados individuais apresentam maior homogeneidade. A variação encontrada dentro do grupo exposto quanto a frequência de CMN, caracterizada pelo alto valor do desvio padrão (13,20), deve ser devida à resposta diferenciada de cada indivíduo a um determinado agente genotóxico. Essa resposta diferenciada pode ser determinada por diferentes fatores relacionados à constituição

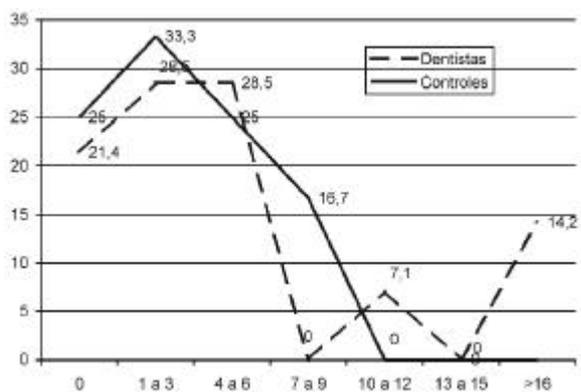


FIGURA 1 - Percentagem dos indivíduos expostos ao mercúrio (Cirurgiões-dentistas) e controles com relação ao número de células com micronúcleos encontrado (em 2000 células)

genética e hábitos de vida, como uso de bebida alcoólica, fumo, alimentação, bem como aos cuidados de proteção durante a exposição.

Shamy et al.¹⁰ (1995) avaliaram trabalhadores de indústrias expostos ao vapor de mercúrio. Utilizaram, para biomonitorizar, os testes de micronúcleos (MN), de trocas entre cromátides irmãs (SCE) e de Hipoxantina-guanina-fosforibosil transferase (HGPRT) em linfócitos humanos. Foram examinados 30 trabalhadores do sexo masculino e comparados com 30 indivíduos controle. O grupo exposto ao vapor de mercúrio apresentou alta frequência de alterações em todos os testes realizados: 32 células com MN e o grupo controle 1,7CMN. No teste de SCE, o resultado foi de 7,3 nos expostos e de 0,2 nos controles, e no teste de HGPRT, os expostos apresentaram 0,94, sendo o grupo controle com 0,001. Esses resultados também demonstram que a exposição ao vapor de mercúrio pode alterar o material genético dos indivíduos e devido a esse fato os autores recomendam que mais estudos sejam realizados em trabalhadores expostos ao vapor de mercúrio.

Devido a ampla discussão que há na bibliografia sobre o efeito sinérgico do uso do fumo e hábito alcoólico, em determinadas situações de genotoxicidade ocupacional, foi analisada, também, a possível relação, nos indivíduos expostos, entre o uso de fumo e o hábito alcoólico com a frequência de células com micronúcleos. Verificou-se, entretanto, que, nos indivíduos fumantes, bem como nos indivíduos com hábito alcoólico, houve uma diminuição no número médio de células com MN. Apesar de que, os fumantes expostos encontrados nesta avaliação são somente dois, o que é um número muito pequeno e que não reflete o número de cirurgiões-dentistas fumantes. Entretanto, os dados indicam que nos indivíduos que não fumam e não bebem bebidas alcoólicas, o dano genotóxico foi maior do que naqueles que tem os dois hábitos.

Esses resultados são difíceis de serem explicados, tendo em vista inúmeros estudos que concluíram que o uso de fumo e de álcool determinam um aumento de células com MN. Ou, ainda, que o fumo e o álcool são, por si só, substâncias genotóxicas. Entretanto, existem outros estudos que não chegaram à mesma conclusão, demonstrando que esse aspecto é ainda muito controverso. Deve-se considerar, também, que nesses estudos prévios, a genotoxicidade avaliada não foi com relação à exposição ao vapor de mercúrio, o que ocorre com cirurgiões-dentistas estudados neste trabalho.

Pode-se concluir, com base nos dados apresentados neste estudo, que estes resultados evidenciam que os cirurgiões-dentistas, os quais estão expostos ao vapor de mercúrio durante a preparação de restaurações dentárias com amálgama, apresentam um aumento de células com micronúcleos (3 vezes maior) em relação ao grupo controle. Portanto, essa substância altera o seu material genético, sendo então, genotóxica, o que

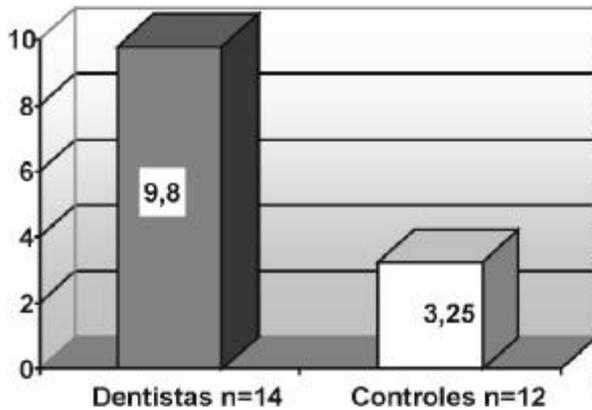


FIGURA 2 - Número médio de células com micronúcleos encontrado (em 2000 células) nos indivíduos expostos ao mercúrio (Cirurgiões-dentistas) e controles ($P<0,001$)

indica a possibilidade de problemas maiores para sua saúde. Este fato impõe a necessidade da realização de maiores estudos e de alertá-los no sentido de diminuir a exposição a esse agente genotóxico e reforçar a necessidade do uso de equipamento de proteção e atentar para a higiene mercurial ¹²: - frascos de mercúrio devem ser inquebráveis, bem vedados e mantidos em lugares frescos (evita evaporação); - derramamento acidental - deve-se

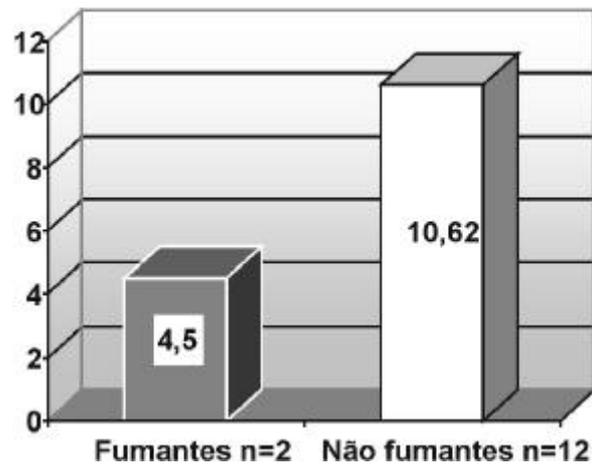


FIGURA 3 - Número médio de células com micronúcleos encontrado (em 2000 células) nos indivíduos expostos ao mercúrio (Cirurgiões-dentistas) fumantes e não fumantes ($P<0,001$)

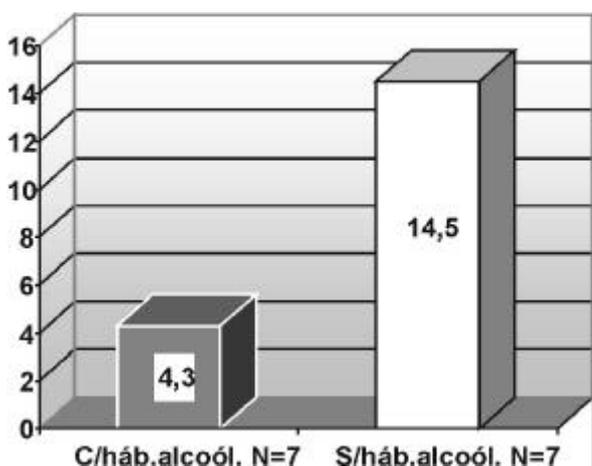


FIGURA 4 - Número médio de células com micronúcleos encontrado (em 2000 células) nos indivíduos expostos ao mercúrio (Cirurgiões-dentistas) com hábito alcoólico e sem hábito alcoólico ($P<0,001$)

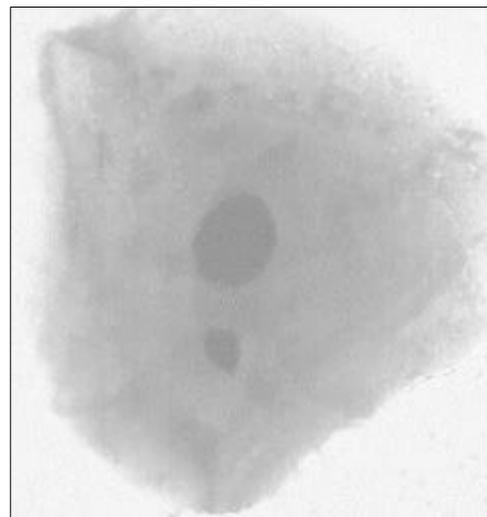


FIGURA 5 - Fotografia de uma célula esfoliada da mucosa bucal, contendo um micronúcleo

fazer limpeza imediata com luvas, não usar aspirador de pó, pois espalha o metal; - lavar imediatamente quando entrar em contato com a pele; - usar máscara (reduz inalação do vapor de mercúrio); - restos de mercúrio e amálgama devem ser armazenados em recipientes fechados contendo água ou solução fixadora; - usar amalgamadores com redoma de proteção; - jatos de água e sugadores de alto volume devem ser usados na remoção de restos de amálgama e acabamento de restaurações novas; o exaustor para esse sistema deve ficar fora da sala de operação; - instrumental usado na manipulação do mercúrio deve ser bem lavado antes de ir para estufa. Deve-se, ainda, submeter-se a dosagens de mercúrio, na urina ou no sangue, em intervalos regulares, preferencialmente de seis em seis meses.

ABSTRACT

Millions of workers in various occupational settings have the potential to be exposed to hazardous substances. For many years, there has been a debate concerning dental amalgam and potential health effects. The aim of this study is to evaluate the effects of mercury from amalgam in dentists exposed to this substance over a five years period. Many substances are genotoxic and may cause genetic alterations in the somatic cells of exposed workers. In this study, we used the micronucleus assay (MN) with exfoliated cells, because is a cost-effective, non-invasive method, in which the formation of MN is an endpoint to detect endogenous, lifestyle, occupational and environmental exposures to genotoxics as well as chemoprotection of various compounds in intervention studies. The results showed significant increase of cells with micronucleus in dentists (9,80CMN \pm 13,20) compared with controls (3,25CMN \pm 3,28). The frequency of cells with micronucleus in dentists with alcoholic habit (4,43CMN \pm 4,16) were significantly lower (P <0,001) than the dentists without alcoholic habit (14,50CMN \pm 16,72). The exposed smokers presented frequency of cells with micronucleus (4,50CMN \pm 2,12) significantly lower (P <0,001) than the non smokers (10,62CMN \pm 14,06). The age and the time of work didn't influence in the frequency of cells with micronucleus in these professionals.

UNITERMS: Mercury; Micronucleus; Dentists; Occupational genotoxicity

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aragão BN, Gagliardi RM, Luna H. Efeito mitogênico e clastogênico do mercúrio utilizado em restaurações dentárias nos macrófagos peritonias de camundongos Swiss. Anais do 42º Congresso Nacional de Genética - SBG; 1996 set.13-16; Caxambú (MG). Minas Gerais: SBG; 1996. p.95, resumo A.16.
2. Au WW, Walker DM, Ward JB, Whorton E, Legator M, Singh V. Factors contributing to chromosome damage in lymphocytes of cigarette smokers. Mutation Research 1991; 260:137-44.
3. Chern Lin JH, Chen KI, Ju CP. Particle size effect on structure and properties of dispersed Pd-containing dental amalgam. Biomaterials 2002; 23:597-608.
4. Fenesh M. The in vitro micronucleus technique. Mutation Research 2000; 455:81-95.
5. Galic N, Prpic-Mehic G, Prester LJ, Krnic Z, Blanus M, Erceg D. Elimination of mercury from amalgam in rats. Journal Trace Elements Medical Biology 2001; 15; 1:1-4.
6. Høl PJ, Vamnes JS, Gjerdet NR, Eide R, Isrenn R. Dental amalgam and selenium in blood. Environmental Research Section A 2001; 87:141-6.
7. Keshava N, Ong T. Occupational exposure to genotoxic agents. Mutation Research 1999; 437:175-94.
8. Major B, Laky B, Kraemer S, Kassie F. Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. Mutation Research 2001; 489:147-72.
9. Rabello Gay MN, Rodrigues MAR, Monteiro Neto R. Mutagênese, carcinogênese e teratogênese: métodos e critérios de avaliação. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Genética; 1991.
10. Shamy MY, ElGazzar RM, Tabona, Christie NT, ElSaidi KF. Somatic cell mutation in workers occupationally exposed to mercury vapor. Environmental Pathology, Toxicology and Oncology 1995 14:165-71.
11. Smith DW. Síndromes de malformações congênitas. São Paulo: Editora Manole Ltda.; 1985.
12. Tenório MCM B, Bley Sobrinho J. Mercúrio - efeitos fetotóxicos. Dentística - Fase II 1987 jan/jul; 2(1):1-4.
13. Tezel H, Eras OS, Erakın C, Kayali A. Blood mercury levels of dental students and dentists at a dental school. Brazilian Dent J 2001 Oct; 27(191) (8):449-52.
14. Tierko Holand N, Jacob RA, Shang N, Babaran A, Smith MT. Micronuclei in lymphocytes and exfoliated buccal cells of postmenopausal women with dietary changes in folate. Mutation Research 1998; 417:101-14.

Endereço para correspondência:
Maria da Graça Martino-Roth
E-mail: gmartino@zaz.com.br