

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EVELYN LOUISE ANTONIO

**GENOTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE DOS RAIOS X NO EPITÉLIO DA
MUCOSA ORAL DE CRIANÇAS SUBMETIDAS À RADIOGRAFIA PANORÂMICA**

**CURITIBA
2010**

EVELYN LOUISE ANTONIO

**GENOTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE DOS RAIOS X NO EPITÉLIO DA
MUCOSA ORAL DE CRIANÇAS SUBMETIDAS À RADIOGRAFIA PANORÂMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de concentração Saúde Bucal durante a Infância e Adolescência, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ângela Fernandes

Co-orientador: Prof. Dr. Antonio Adilson
Soares de Lima

**CURITIBA
2010**

Antonio, Evelyn Louise

Genotoxicidade e citotoxicidade dos raios X no epitélio da mucosa oral de crianças submetidas à radiografia panorâmica / Evelyn Louise Antonio – Curitiba, 2010.

60 f.: il.; 31 cm.

Orientadora: Professora Dra. Ângela Fernandes

Co-orientador: Professor Dr. Antonio Adilson Soares de Lima

Dissertação (Mestrado) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração: Saúde Bucal durante a Infância e Adolescência.

Inclui bibliografia.

Anormalidades induzidas por radiação. 2. Radiografia panorâmica. 3. Genotoxicidade. 4. Testes de mutagenicidade. 5. Mucosa bucal. 6. Epitélio I. Fernandes, Ângela. II. Lima, Antonio Adilson Soares de. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título

CDD 617.6

TERMO DE APROVAÇÃO


EVELYN LOUISE ANTONIO

GENOTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE DOS RAIOS X NO EPITÉLIO DA MUCOSA ORAL DE CRIANÇAS SUBMETIDAS À RADIOGRAFIA PANORÂMICA

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós Graduação em Odontologia, área de concentração Saúde Bucal durante a Infância e Adolescência, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Orientadora Prof^ª. Dr^ª. Ângela Fernandes
Departamento de Estomatologia, UFPR



Co-orientador Prof. Dr. Antonio Adilson Soares de Lima
Departamento de Estomatologia, UFPR



Professora Doutora Liliâne Janete Grandó
Departamento de Patologia, UFSC



Professora Doutora Maria Ângela Naval Machado
Departamento de Estomatologia, UFPR

Curitiba, 30 de dezembro de 2010.

Aos meus pais Maria Inêz e José Luiz.

À minha outra mãe Francisca.

À amiga Maria Tereza.

Pelo apoio irrestrito.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos às crianças que participaram desta pesquisa e seus pais. Aos professores e alunos da disciplina de Odontopediatria da UFPR.

Ao corpo docente do Programa de Pós Graduação em Odontologia da UFPR, em especial a minha orientadora Professora Doutora Ângela Fernandes, pela persistência e compromisso demonstrados na orientação deste trabalho.

À Professora Doutora Maria Suely Soares Leonart, pelo acolhimento e pelo conhecimento transmitido. Ao professor Antonio Adilson Soares de Lima pela disponibilidade durante a calibração e leitura das lâminas. Ao professor Doutor Aguinaldo José do Nascimento pelo apoio e grande auxílio na estatística e tradução.

Às técnicas do curso de farmácia da UFPR: Mônica e Irene pelo carinho e paciência; à Mestre em Biologia Celular Mônica Akemi, e a todas as pessoas que contribuíram para o desenvolvimento da parte laboratorial da pesquisa.

Aos técnicos em Radiologia José Antonio Bertoldi e Hilda Aparecida dos Santos. Aos Professores Doutores Jayme Bordini Júnior e Maria Ângela Naval Machado por cederem o laboratório de Patologia.

À Mestre Ana Paula Camargo Martins da PUC/PR, pelo socorro nos momentos críticos, ensinando os “segredos” para a coloração das lâminas.

À Yara Age Koss, por flexibilizar meu horário de trabalho permitindo assim, que eu pudesse cursar o mestrado, pelo apoio e pelo carinho que sempre demonstrou. À equipe de saúde bucal da Unidade de Saúde Santa Amélia, pela torcida, principalmente à Maria Noeli Fernandes.

Agradeço também à minha família pela compreensão e apoio. Em especial à Mayra Fernanda Polakoski.

Agradeço principalmente a Deus pela presença constante e pela força nos momentos difíceis.

A persistência é uma idéia firme e constante de algo que se pretende fazer, mesmo na presença de dificuldades. A satisfação reside no esforço, não no resultado obtido. O esforço total é a plena vitória.

Gandhi

RESUMO

O objetivo deste estudo foi analisar a genotoxicidade e a citotoxicidade produzidas por raios X no epitélio da mucosa oral de crianças durante a obtenção da radiografia panorâmica. A amostra foi constituída por 30 crianças saudáveis, sendo 19 do sexo feminino e 11 do masculino, com faixa etária de quatro a dez anos (média de sete anos de idade). As células epiteliais da mucosa oral foram coletadas por meio de citologia esfoliativa em base líquida imediatamente antes e após sete dias da obtenção da radiografia panorâmica. Os esfregaços foram processados e corados utilizando a técnica de *Feulgen Rossenbeck* modificada. Foram analisadas e quantificadas projeções nucleares dos tipos *buds* e *broken eggs*, alterações genotóxicas na forma de micronúcleos e alterações citotóxicas dos tipos picnose, cariólise e cariorréxe. A frequência de picnose, *buds* e *broken eggs* foi significativamente maior após a exposição aos raios X ($p < 0.05$), porém não houve diferença estatisticamente significativa em relação às demais alterações estudadas ($p > 0.05$) e ao sexo. A exposição aos raios X emitidos durante a obtenção da radiografia panorâmica pode induzir morte celular no epitélio da mucosa oral de crianças, porém não se encontrou indícios significativos de efeitos genotóxicos.

Palavras-chave: Anormalidades Induzidas por Radiação. Radiografia Panorâmica. Genotoxicidade. Testes de Mutagenicidade. Mucosa Bucal. Epitélio.

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze the genotoxicity and cytotoxicity produced by X-rays on oral mucosa epithelium in infants during exposure of panoramic radiography. Sample consisted of 30 healthy children, being 19 girls and 11 boys, with age ranging from 4 to 10 years (average around 7 years old). Oral mucosa cells were collected by liquid-based cytology technique immediately before and seven days after radiography exposure. The smears were processed and stained using modified Feulgen Rossenbeck technique. It was analyzed projections as nuclear buds and broken eggs types, genotoxic alterations as micronuclei, and cytotoxic alterations as pyknosis, karyorrhexis, and karyolysis. It was observed that frequency of pyknosis, buds, and broken eggs were significantly higher after X-rays exposure ($p < 0.05$), but no difference statistically significant was observed regarding other changes ($p > 0.05$), as well for sexes. Exposure to X-rays during panoramic radiography can induce cellular death in oral mucosa epithelium of children, but no evidence of genotoxic effects was observed.

Key words: Abnormalities, Radiation-Induced. Radiography, Panoramic. Genotoxicity. Mutagenicity Tests. Mouth Mucosa. Epithelium.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - REALIZAÇÃO DA COLETA DE CÉLULAS, CURITIBA, 2010.....	15
FIGURA 2 - PREPARO DA SOLUÇÃO DE ARMAZENAMENTO DAS CÉLULAS EPITELIAIS COLETADAS, CURITIBA, 2010.....	15
FIGURA 3 - CEGAMENTO DOS FRASCOS, CURITIBA, 2010	16
FIGURA 4 - PROCESSAMENTO LABORATORIAL, CURITIBA, 2010.....	17
FIGURA 5 - COLORAÇÃO DE <i>FEUGEN ROSSENBECK</i> MODIFICADA, CURITIBA, 2010.....	17
FIGURA 6 - CÉLULA MICRONUCLEADA, CURITIBA, 2010.....	19
FIGURA 7 - CÉLULA NORMAL E ALTERAÇÕES NUCLEARES, CURITIBA, 2010.....	19

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	OBJETIVOS.....	12
3	METODOLOGIA.....	13
3.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	13
3.2	APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA.....	13
3.3	SELEÇÃO DA AMOSTRA.....	13
3.4	PROCEDIMENTOS.....	14
3.4.1	Coleta de material.....	14
3.4.2	Cegamento da amostra.....	15
3.4.3	Processamento laboratorial.....	16
3.4.4	Análise das lâminas.....	18
3.4.5	Análise estatística.....	20
4	CAPÍTULO.....	21
4.1	ARTIGO 1 EM PORTUGUÊS.....	21
4.2	ARTIGO 1 EM INGLÊS.....	28
4.3	ARTIGO 2 EM PORTUGUÊS.....	37
5	CONCLUSÃO.....	50
	REFERÊNCIAS DA DISSERTAÇÃO.....	51
	APÊNDICES.....	53
	ANEXOS.....	55

1 INTRODUÇÃO

A radiografia panorâmica fornece a imagem de todo o complexo bucomaxilofacial num único filme (CAPELLI *et al.*, 1991) e tem sido amplamente utilizada em Odontologia. Além de permitir a diminuição da exposição aos raios X, quando comparada com um levantamento periapical, a radiografia panorâmica é de fácil execução, sendo bem aceita por crianças e adolescentes, o que justifica sua indicação na Odontopediatria (OLIVEIRA, CORREIA & BARATA, 2006).

Os exames radiográficos proporcionam grande benefício ao exercício da Odontologia, porém o seu uso deve estar indicado mediante justificativa clínica, pois mesmo uma baixa dose de radiação, como a recebida pelo paciente durante a obtenção da panorâmica, é capaz de provocar efeitos biológicos deletérios e cumulativos nos tecidos humanos (PAGNONCELLI & OLIVEIRA, 1999).

A exposição precoce e sucessiva à radiação X pode aumentar a possibilidade de alterações celulares num indivíduo, causando maior risco para o desenvolvimento de câncer. Alterações genéticas como formações de micronúcleos e aberrações nucleares são efeitos biológicos iniciais da carcinogênese (POPOVA *et al.*, 2007). O conhecimento dos fatores que causam essas alterações e dos efeitos dos agentes carcinogênicos favorece a prevenção ao câncer.

A discussão sobre doses de radiação recebidas pelo paciente e seus riscos biológicos envolvendo radiografias panorâmicas é extensa (PAGNONCELLI & OLIVEIRA, 1999). Uma maneira de estudar os efeitos da irradiação em uma população exposta é conduzir pesquisas utilizando parâmetros biológicos com manifestações em curto prazo e identificar os danos resultantes da exposição aos raios X. As informações obtidas podem ser usadas como um aviso do risco potencial, em longo prazo, de problemas de saúde, principalmente em crianças.

O estudo da frequência de micronúcleos tem sido utilizado para verificar efeitos genotóxicos em tecidos humanos, assim como o grau de exposição e a extensão do dano que um agente ambiental provocou no DNA. Funciona como um biomarcador, o qual indica a suscetibilidade do paciente ao desenvolvimento do câncer. Os micronúcleos são fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros que foram perdidos durante a mitose celular devido a um evento clastogênico (que provoca quebra cromossômica) ou aneugênico (que interfere no fuso mitótico). Os

raios X são agentes clastogênicos e induzem a formação de micronúcleos, além de outras alterações nucleares (RIBEIRO *et al.*, 2008).

O epitélio da mucosa oral foi o tecido eleito para análise dos efeitos da radiação X, pois as células esfoliadas são facilmente coletadas por meio da citologia esfoliativa. Segundo Sarto *et al.* (1987) os efeitos das radiações podem ser estudados por meio da citologia esfoliativa em base líquida, por ser de simples execução, baixo custo e não invasiva, além de otimizar a análise microscópica das lâminas com maior número de células epiteliais individuais descamadas. Para a análise do efeito dos raios X sobre tecidos epiteliais está indicado o uso do teste de micronúcleos aliado à contagem de alterações nucleares degenerativas (TOLBERT *et al.*, 1992). Esta associação aumenta a especificidade do biomonitoramento de populações expostas a agentes genotóxicos, entre os quais os raios X (FREITAS *et al.*, 2005).

A exposição aos raios X produz citotoxicidade e genotoxicidade nas células epiteliais da mucosa oral (CERQUEIRA *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2008). Estudos sobre os efeitos genotóxicos induzidos por raios X são importantes para identificar o grau de risco ao câncer que um indivíduo apresenta.

Este estudo pretende contribuir para o aumento do conhecimento da ação dos raios X sobre tecidos humanos, por meio da análise da genotoxicidade e citotoxicidade dos raios X sobre o epitélio da mucosa oral de crianças submetidas à radiografia panorâmica.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral:

- Analisar a genotoxicidade e citotoxicidade dos raios X no epitélio da mucosa oral de crianças submetidas à radiografia panorâmica.

Objetivos específicos:

- Realizar uma análise quantitativa dos efeitos dos raios X nas células do epitélio da mucosa oral de crianças submetidas à radiografia panorâmica por meio da mensuração dos micronúcleos, cariorréxe, cariólise, picnose, *buds* e *broken eggs* formados.

3 METODOLOGIA

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Foi realizado um estudo transversal, prospectivo e quantitativo (ANTUNES & PERES, 2006).

3.2 APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná (UFPR) em 26/08/2009 sob o registro CEP/SD 761.096.09.07 (ANEXO A).

3.3 SELEÇÃO DA AMOSTRA

A amostra constituiu-se de 30 crianças, de ambos os sexos, com idades entre quatro a 10 anos, que estavam em tratamento na clínica de Odontopediatria do curso de Odontologia da UFPR durante o primeiro semestre de 2010 e que necessitavam de radiografia panorâmica.

A criança e seus responsáveis foram convidados a participar do estudo e receberam informações sobre o mesmo. Aqueles que concordaram com a participação assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A). Após assinatura do TCLE, foi aplicado um questionário para seleção da amostra (APÊNDICE B).

Os critérios de inclusão da amostra foram:

- Crianças saudáveis de ambos os sexos, com idades entre quatro a 10 anos e sem alterações de mucosa oral.

Os critérios de exclusão da amostra foram:

- Crianças com doenças sistêmicas ou lesões na mucosa oral, com idade inferior a quatro anos e superior a 10 anos, que tivessem sido submetidas a exame radiográfico em região de cabeça 21 dias antes do início do estudo ou que tivessem feito uso contínuo de enxaguatório oral contendo álcool no último mês.

3.4 PROCEDIMENTOS

3.4.1 Coleta de material

Antes da realização do exame radiográfico, os participantes realizaram um enxágue bucal com água corrente. Foi realizada a coleta de células epiteliais da mucosa oral pela técnica da citologia esfoliativa em base líquida (FIGURA 1) e, em seguida, a radiografia panorâmica. O aparelho utilizado para obtenção da radiografia foi da marca Siemens modelo Orthophos Plus/CD (Alemanha) aplicando-se regime de 60 Kv, 16 mA, 14,1 segundos.

A coleta das células foi feita em duas etapas: imediatamente antes e sete dias após a obtenção da radiografia panorâmica. O período de sete dias foi escolhido, por encontrar-se dentro do ciclo de *turnover* celular, que ocorre em até 21 dias. A coleta aconteceu sempre da seguinte forma: a bochecha foi afastada delicadamente com espátula de madeira descartável¹. Com uma escova cervical² foi realizado um esfregaço suave no fundo de vestibulo do lado direito, próximo ao ducto excretor da glândula parótida, aplicando-se cinco movimentos giratórios no sentido horário. Após, mergulhava-se a escova em um frasco contendo 1 mL de metanol³ e ácido acético⁴ na proporção de 3:1 (solução fixadora) (FIGURA 2). Os frascos foram conservados em geladeira à temperatura de 8°C por 14 dias, até o momento do processamento.

¹ Estilo®, Brasil

² Vagispec®, Adlin, Brasil ou Cervical Brusck®, Kolplast, Brasil

³ Álcool metílico PA 100%, marca Nuclear®

⁴ Ácido acético glacial PA 100%, marca Synth®

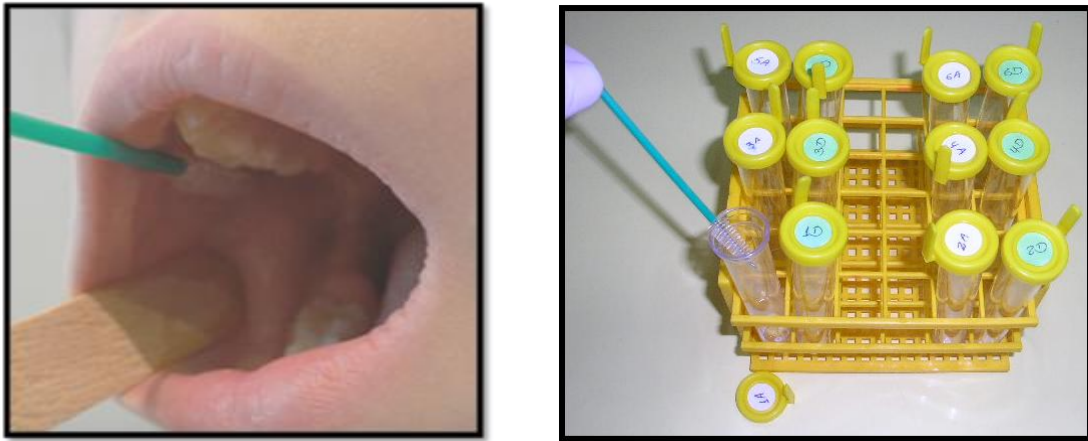


FIGURA 1. REALIZAÇÃO DA COLETA DE CÉLULAS, CURITIBA, 2010



FIGURA 2. PREPARO DA SOLUÇÃO DE ARMAZENAMENTO DAS CÉLULAS EPITELIAIS COLETADAS, CURITIBA, 2010

3.4.2 Cegamento da amostra

A identificação dos frascos (FIGURA 3) e das lâminas foi coberta e codificada para evitar viés

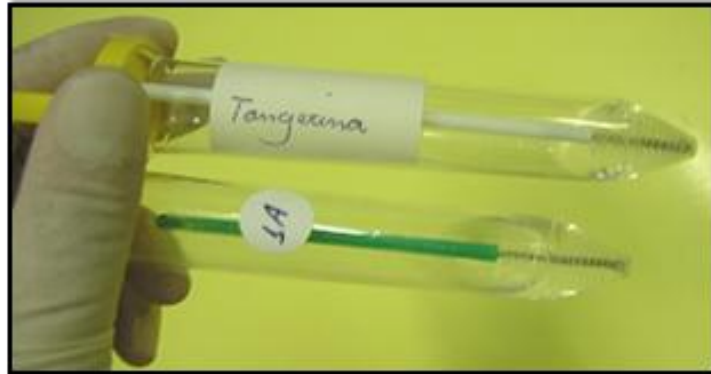


FIGURA 3. CEGAMENTO DOS FRASCOS, CURITIBA, 2010

3.4.3 Processamento laboratorial

O processamento laboratorial foi realizado no Laboratório de Citologia Clínica do Curso de Farmácia da UFPR. Os procedimentos realizados para coleta celular e processamento das lâminas foram testados e padronizados por meio da realização de um estudo piloto.

Os frascos foram homogeneizados em um aparelho agitador de tubos tipo *vórtex*⁵ à velocidade quatro, por 20 segundos. Em seguida, foram centrifugados⁶ a temperatura ambiente, por cinco minutos a 800 rpm, 130 de gravidade (FIGURA 4).

As células foram dispostas cuidadosamente sobre as lâminas de vidro com o auxílio de uma pipeta de 1000 μ L. As lâminas foram deixadas secar por 24hs e após secas foram coradas pela técnica *Feulgen-Rossenbeck* modificada (FEULGEN & ROSSEMBECK, 1924) (FIGURA 5) seguindo os seguintes passos:

- 1) foram mergulhadas em uma solução de ácido clorídrico⁷ 5M por 30 minutos em temperatura ambiente;
- 2) enxaguadas com água destilada por 10-15 minutos;
- 3) mergulhadas no corante de *Schiff* por 1 hora e 30 minutos;
- 4) enxaguadas com água corrente por cinco minutos;

⁵ Phoenix®, Brasil

⁶ Centrífuga 4K15, Sigma®

⁷ HCl PA, marca Reagen®

- 5) contra coradas com *Fast Green*⁸ 1% por um minuto;
- 6) enxaguadas em água corrente para remover possíveis excessos de contra-corante e passaram por uma bateria de um minuto cada em álcool 95%, 100%, 100%, e três baterias de um minuto cada em xilol⁹;
- 7) montagem das lâminas com a colocação das lamínulas e vitral.



FIGURA 4. PROCESSAMENTO LABORATORIAL, CURITIBA, 2010

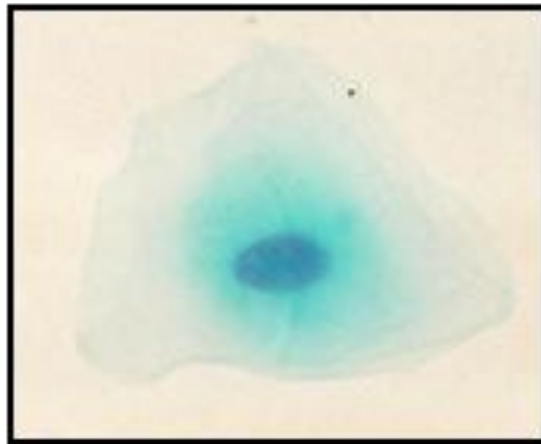


FIGURA 5. COLORAÇÃO DE *FEUGEN ROSSENBECK* MODIFICADA, CURITIBA, 2010

⁸ FCF, CI 42053, marca Vetec®

⁹ Xilol PA 100%, marca Qeel®

3.4.4 Análise das lâminas

A leitura cega das lâminas foi realizada por um examinador, após calibração por um patologista oral experiente. A calibração foi feita por meio da análise conjunta de cinco lâminas, totalizando aproximadamente 6000 células.

Para a análise das lâminas foi utilizado um microscópio de luz trinocular, modelo Olympus CH30, adaptado com ocular WH 10X-H/22¹⁰ e objetivas PLAN 100X/0,25¹¹. A análise manual das lâminas foi realizada com objetiva de 40X, da esquerda para a direita e de cima para baixo. A seguir, passou-se para a objetiva de imersão para análise dos micronúcleos, picnose, cariólise, cariorréxe, *buds* e *broken eggs* (TAKAHASHI, 1982).

A pesquisa dos micronúcleos e demais alterações nucleares foi realizada em 1000 núcleos celulares para cada esfregaço citológico (HOLLAND *et al.*, 2008), sendo verificadas mais 1000 células quando a frequência de micronúcleos foi maior que 2‰.

Os micronúcleos foram identificados seguindo os critérios de Sarto *et al.* (1987). Consistem em pequenas massas nucleares delimitadas por membrana, separadas do núcleo principal. Quando comparado ao núcleo principal, o micronúcleo deve apresentar:

- formato arredondado, com diâmetro menor que 1/5 a 1/3 do núcleo principal;
- situar-se dentro do citoplasma no mesmo plano focal;
- ter estrutura de cromatina similar;
- intensidade de cor e textura semelhante ou mais fraca;
- ser *Feulgen* positivo e não refratário;
- a borda deve estar evidente, sugerindo membrana nuclear, sem sobreposições.

A contagem dos micronúcleos seguiu os critérios descritos por Sarto *et al.* (1987) para mensuração dos danos ao DNA/genotoxicidade (FIGURA 6).

¹⁰ Olympus®, Japão

¹¹ Olympus®, Japão

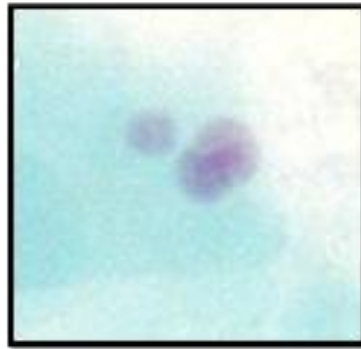


FIGURA 6. CÉLULA MICRONUCLEADA, CURITIBA, 2010

Para análise das alterações citotóxicas: picnose, cariorréxe, cariólise e dos *buds* e *broken eggs* foram utilizados os critérios descritos por Tolbert *et al.* (1992) (FIGURA 7). Estes consistem em parâmetros para inclusão das células analisadas durante a leitura microscópica:

- citoplasma intacto e células planas sobre a lâmina;
- pouca ou nenhuma sobreposição das células subjacentes;
- pouco ou nenhum debris;
- núcleo normal e intacto, perímetro nuclear liso e distinto.

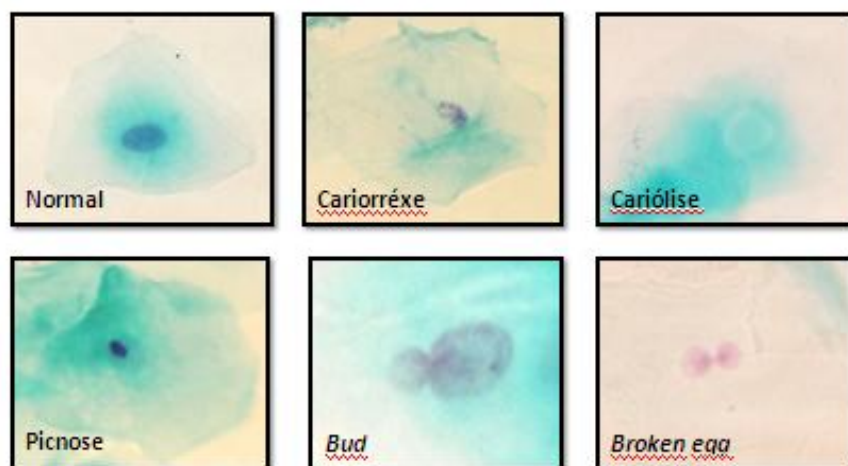


FIGURA 7. CÉLULA NORMAL E ALTERAÇÕES NUCLEARES, CURITIBA, 2010

Para identificação das estruturas nucleares analisadas foram utilizados os seguintes critérios morfológicos:

- Picnose: o núcleo é visualizado como um ponto pequeno, escuro e denso, o qual não apresenta estrutura de cromatina perceptível.
- Cariorréxe: condensação da cromatina em várias partículas, apresentando fragmentação do núcleo em pequenos corpos arredondados ou ovalados dentro do citoplasma intacto. Estas partículas são de número variável, surgindo como pontos negros ou formações alongadas, inteiramente separadas umas das outras ou ligadas por uma tênue linha de cromatina.
- Cariólise: dissolução do núcleo caracterizada pela sua ausência. Esta alteração nuclear, quando vista ao microscópio, demonstra uma coloração pálida e fraca.
- *Buds*: células contendo uma pequena quantidade de material genético aderida ao núcleo principal, como um prolongamento nuclear.
- *Broken eggs*: células nas quais uma pequena quantidade de material genético liga-se ao núcleo principal por meio de um filamento *Feulgen* positivo.

3.4.5 Análise estatística

Os dados foram tabulados em planilha *Excel* (Microsoft) e analisados pelo teste de Wilcoxon pareado ($p < 0,05$) com o uso do programa *Statística 8.0* (StatSoft).

4 CAPÍTULO

4.1 ARTIGO 1 EM PORTUGUÊS

Introdução

A radiação ionizante pode induzir citotoxicidade¹⁻⁹, genotoxicidade⁴ e carcinogênese^{10,11} em tecidos humanos. Baixas doses de radiação, como a emitida durante a obtenção da radiografia panorâmica¹² são capazes de provocar efeitos biológicos deletérios e cumulativos em organismos vivos. Embora as radiografias panorâmicas sejam amplamente utilizadas na Odontologia, seu uso deve ser indicado quando necessário^{13,14}, pois os raios X têm um efeito deletério sobre as células epiteliais. Além disso, as crianças são mais suscetíveis aos efeitos danosos dos raios X quando comparadas aos adultos¹⁴⁻¹⁶.

As alterações genéticas como formações de micronúcleos e aberrações nucleares são efeitos biológicos iniciais da carcinogênese². O conhecimento dos fatores que causam estas alterações e dos efeitos dos agentes carcinogênicos favorece a prevenção ao câncer. Portanto, os estudos sobre os efeitos genotóxicos induzidos por raios X no epitélio da mucosa oral são importantes para identificar o risco de desenvolvimento do câncer de boca e atuar na sua prevenção¹⁷.

Os micronúcleos são fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros que foram perdidos durante a mitose celular devido a um evento clastogênico (que provoca quebra cromossômica) ou aneugênico (que interfere no fuso mitótico)¹⁸. Os raios X são agentes clastogênicos e induzem a formação de micronúcleos, além de outras alterações nucleares. A frequência de micronúcleos é utilizada como um parâmetro para verificar o grau de exposição e a extensão de dano provocada por um agente ambiental ao DNA, funcionando como um biomarcador, que indica a suscetibilidade do indivíduo ao desenvolvimento do câncer¹⁹. Todavia, o teste de micronúcleos tem sua especificidade aumentada ao serem registradas alterações celulares degenerativas indicativas de morte celular^{1,4} como picnose, cariorréxe e cariólise; assim como as projeções nucleares *buds* e *broken eggs*.

O objetivo deste estudo foi verificar se os raios X emitidos durante obtenção da radiografia panorâmica na podem induzir aumento frequência de micronúcleos, picnose, cariorréxe, cariólise, *buds* e *broken eggs* no epitélio da mucosa oral de crianças.

Métodos

Amostra e considerações éticas

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná (UFPR) sob número 761.096.09.07. Foram obtidas células da mucosa oral de 30 crianças saudáveis (11 meninos e 19 meninas), com idades entre quatro a 10 anos (média de sete anos de idade), encaminhadas pela clínica de Odontopediatria da UFPR para realização da radiografia panorâmica. Os responsáveis legais das crianças autorizaram o estudo por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido. Estes responderam a um questionário com dados sobre o sexo, idade e histórico de exposição prévia à radiação X, uso de enxaguatório bucal contendo álcool ou medicação, e doenças sistêmicas ou alterações que comprometessem a mucosa oral. Foram excluídas da amostra crianças submetidas aos agentes genotóxicos anteriormente citados. As radiografias panorâmicas foram realizadas no Serviço de Radiologia Odontológica da UFPR em aparelho radiológico extrabucal (Siemens Orthophos CD, Bensheim, Germany), com regime de 60 Kv, 16mA e 14.1s.

Coleta das células e preparo das lâminas

A coleta das células epiteliais maduras da mucosa oral das crianças foi realizada imediatamente antes da obtenção da radiografia panorâmica e sete dias após a realização da mesma. As células foram coletadas por meio de uma leve raspagem na mucosa jugal do lado direito, com movimento de rotação utilizando uma escova citológica cilíndrica (Koplast, Jaraguá do Sul, Brazil), após o enxágue da boca com água corrente. As células foram armazenadas em um tubo Falcon contendo 1 mL de metanol/ácido acético na proporção de 3:1, centrifugadas a 130 x

g durante 5 minutos, fixadas e depositadas em lâminas limpas. Após secas, as lâminas foram coradas pelo método de *Feulgen Rossenbeck* modificado²⁰.

Análise citológica

As lâminas, após cegamento de suas identificações, foram analisadas manualmente em microscópio de luz com magnitude de 400x, e as alterações encontradas foram confirmadas em 1000x. Os micronúcleos foram analisados conforme os critérios estabelecidos por Sarto *et al.*²¹ como um parâmetro de genotoxicidade. Para a análise das alterações *broken eggs*, *buds*, picnose, cariorréxe e cariólise foram utilizados os critérios descritos por Tolbert *et al.*¹⁷. Para cada lâmina foram analisadas 1000 células viáveis por um único observador previamente calibrado.

Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste pareado de Wilcoxon. Foi considerado significativo um valor de $p < 0.05$.

Resultados

A frequência de células que apresentaram micronúcleos e demais alterações antes e sete dias após a obtenção da radiografia panorâmica está ilustrada na Tabela 1. A frequência de *broken eggs*, *buds* e picnose foi significativamente maior após a exposição aos raios X (teste pareado de Wilcoxon, $p < 0.05$) (Figura 1). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes quanto ao sexo ($p > 0.05$). Apesar da frequência de micronúcleos, cariólise e cariorréxe não ter apresentado resultado estatisticamente significativo, foi observado um leve aumento da mesma após a exposição aos raios X.

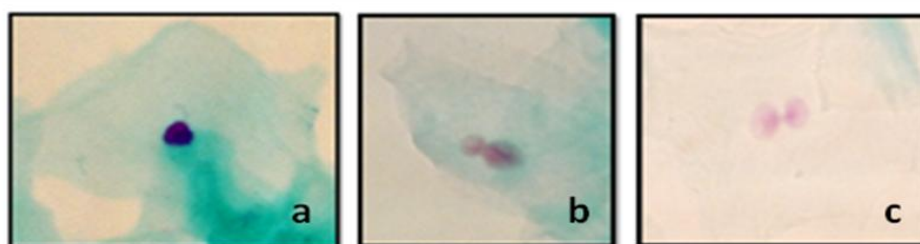
Tabela 1. Frequencia de alterações nucleares em crianças expostas a radiografia panorâmica.

Exposição radiográfica	Normal	Micro-nucleus	Cariólise	Cariorréxe	Picnose*	Buds*	Broken eggs*	Total
Antes	52057	63	2093	286	273	179	49	55000
Após	64029	78	2358	326	413	263	109	67576

* - Diferenças estatisticamente significantes (Teste Pareado de Wilcoxon, $p < 0,05$).

Dados expressos em ‰

Figura 1. Alterações que apresentaram aumento estatisticamente significativo.



Teste pareado de Wilcoxon, $p < 0,05$; a - picnose, b – bud, e c – broken egg; Feulgen Rossenbeck modificado, 1000x.

Discussão

No geral, as crianças são mais suscetíveis a agentes tóxicos que os adultos²² e, portanto a radiação ionizante pode ser um agente mutagênico com ações cumulativas²³. Considerando que um indivíduo pode ser submetido a repetidas radiografias ao longo da vida, o efeito de sucessivas exposições aos raios X e às repetições deve ser considerado, pois pode ocorrer aumento da frequência de alterações nucleares após estes eventos³. Embora a dose de radiação recebida durante a obtenção da radiografia panorâmica seja baixa¹⁵, deve-se considerar que crianças são mais radiosensíveis que adultos²⁴. Desta forma, o efeito cumulativo de pequenas doses sobre tecidos sensíveis poderia desencadear efeitos citotóxicos, resultando em injúria celular crônica, proliferação celular compensatória, desenvolvimento de tumores e carcinogênese².

Entretanto, Ribeiro *et al.*⁶ demonstraram que houve aumento de alterações citotóxicas similares em crianças e adultos submetidos à radiografia panorâmica. Concluíram que as crianças não se mostraram mais suscetíveis a agentes induzidos por raios X quando comparadas aos adultos. Neste estudo, o tamanho da amostra e os tipos de alterações nucleares analisadas foram ampliados em relação aos estudos de Ribeiro *et al.*⁶ e Angelieri *et al.*², tendo-se observado efeitos de citotoxicidade após a exposição aos raios X e também aumento significativo de outras alterações nucleares degenerativas: *buds* e *broken eggs*, diferentemente daqueles autores. Desta forma, é necessária a realização de mais estudos sobre os efeitos dos raios X em crianças, observando suas implicações a curto e longo prazo, uma vez que o risco de danos frente a baixas doses de radiação nessa população não está totalmente esclarecido.

Segundo Silva *et al.*³ os hormônios femininos provocam alterações em células epiteliais da mucosa oral de mulheres. Porém, neste estudo não foi observada diferença quanto ao sexo, provavelmente porque a faixa etária selecionada não se encontrava na puberdade.

Vários autores demonstraram que a exposição a baixas doses de radiação, como a emitida durante a obtenção da radiografia panorâmica, causam citotoxicidade em tecidos da mucosa oral¹⁻⁹, mas não causam aumento na frequência de micronúcleos^{1-9,19}. Estes dados são semelhantes aos observados neste estudo.

Entretanto, Cerqueira *et al.*⁴ encontraram alta frequência de micronúcleos em células do epitélio gengival após exposição à radiação, associando este achado ao fato de as células da gengiva serem diretamente atingidas pelos raios X durante a obtenção da radiografia panorâmica. Todavia, o epitélio da mucosa bucal também é atingido diretamente pelos raios X, mas não foi observado aumento significativo na frequência de micronúcleos após a exposição à radiação X neste e em outros estudos semelhantes. Talvez as mucosas mastigatória, de revestimento e especializada reajam de forma diferente à ação dos raios X^{4,7}, sendo necessário estudos que viabilizem essa comparação.

A formação de micronúcleos é dose dependente e varia conforme o tipo de radiação utilizada e a radiosensibilidade do tecido envolvido. Entretanto, baixas doses de radiação X são capazes de induzir quebra de DNA, mas não resultam necessariamente em micronúcleos²⁵. Neste estudo, a quantidade de micronúcleos e

demais alterações observadas foram maiores após a exposição aos raios X, quando comparadas com células epiteliais antes da exposição. Porém, não foram estatisticamente significantes. É possível que o fato de eventos citotóxicos diminuírem a viabilidade celular, ocasionado morte por apoptose, esteja relacionado com a baixa frequência de células micronucleadas encontradas^{1,2}.

Este estudo demonstrou aumento estatisticamente significativo na frequência de *buds*, *broken eggs* e picnose em células epiteliais da mucosa oral de crianças submetidas à radiografia panorâmica, resultado semelhante ao de Silva *et al.*³. O significado dos *buds* e *broken eggs* ainda é obscuro²⁶, podendo estar relacionado com o processo normal de divisão celular^{1,4}, com DNA amplificado eliminado do núcleo durante a fase S do ciclo celular²⁷ ou como estruturas precursoras do estágio de micronúcleos^{28,29}. Sendo que esta hipótese implicaria em genotoxicidade dos raios X sobre a mucosa oral de crianças. Por enquanto, somente é possível afirmar que a radiação X causa instabilidade genética. As alterações picnóticas são achados frequentes em células escamosas superficiais; indicam degeneração celular por intenso amadurecimento ou envelhecimento precoce ligado a um forte processo inflamatório e causam a morte das células afetadas.

A morte celular por apoptose pode ocorrer devido à grande quantidade de lesões causadas ao DNA da célula, tornando-a funcionalmente inviável ao organismo. A ocorrência sucessiva destes eventos pode retardar a renovação do epitélio de revestimento da boca. Caso a capacidade de regeneração do organismo seja suplantada, fenômenos degenerativos podem ocasionar alterações no epitélio aumentando a predisposição à transformação maligna³⁰. Desta forma, convém analisar a toxicidade da radiação X por meio de estudos longitudinais para determinar se os danos gerados são pontuais e transitórios, ou incorporados e mantidos ao longo das divisões celulares³¹.

A radiografia panorâmica é considerada o exame de eleição para avaliação inicial de crianças acima de cinco anos de idade, pois permite uma observação ampla do complexo bucomaxilofacial e expõe a criança a uma menor dose de radiação X quando comparada com um levantamento radiográfico intrabucal. Todavia, deve ser indicada sempre que necessário, utilizando-se técnica radiográfica apurada e seguindo critérios de radioproteção vigentes a fim de se evitar repetições desnecessárias³.

Conclusão

Os resultados obtidos sugerem que os raios X emitidos durante a obtenção da radiografia panorâmica podem induzir alterações nas células do epitélio da mucosa oral de crianças.

4.2 ARTIGO 1 EM INGLÊS

Introduction

Ionizing radiation can induce cytotoxicity¹⁻⁹, genotoxicity⁴, and carcinogenesis in human tissue¹⁰⁻¹¹. Low doses of radiation, such as the amount emitted during exposure to panoramic radiography¹², are able to cause cumulative and deleterious biological effects. Although panoramic radiographs are greatly used in Dentistry their use must be only indicated when strictly necessary^{13,14}, since X-rays have a deleterious effect on epithelial cells. Besides, children are more susceptible than adults to harmful effects of X-rays¹⁴⁻¹⁶.

The genetic changes such as formations of micronuclei and nuclear aberrations are initial biological effects of carcinogenesis². Knowledge of the factors that cause these changes and the effect of the carcinogenic agents help in cancer prevention. Therefore, studies on genotoxic effects induced by X-rays on the oral mucosa epithelium are important to identify the mouth cancer development risk and to act in its prevention¹⁷.

Micronuclei are whole or fragments of chromosomes lost during cell mitosis cell due to clastogenic (that cause fractures) or aneugenic (that interfere in the mitotic fuse)¹⁸. X-rays are clastogenic agents and induce micronuclei formation, besides other nuclear changes. The micronuclei frequency is used as a parameter to verify the degree of exposure and the extent of an environmental agent causing DNA damage, being a biomarker that indicates the patient's susceptibility to cancer development¹⁹. However, micronucleus test has its specificity increased when degenerative cellular changes, indicatives of cellular death, are registred^{1,4}, such as pycnosis, karyorrhexis, karyolysis; as well as nuclear projections buds and broken eggs.

The aim of this work was to verify whether the X-radiation, during panoramic radiography exposure, would induce an increase on micronuclei, pycnosis, karyorrhexis, karyolysis, buds, and broken eggs frequency in the oral mucosa epithelium of children.

Methods

Subjects and ethical considerations

Approval was given by the Ethical Committee for Research of Universidade Federal do Paraná (UFPR). Cells from oral mucosa were obtained from 30 healthy children (11 boys and 19 girls), aged from 4 to 10 years (average around 7 years old) who had undergone panoramic dental radiography as outpatients at the Odontopediatric Clinics of UFPR, after informed consent signed by legal guardians. They answered a questionnaire before the X-ray examination. The main features computed were age, sex and history of prior exposure to X-radiation, use of buccal mouthwash containing alcohol or medication, and systemic diseases or changes that compromise the oral mucosa.

The exclusion criteria were children subjected to the genotoxic agents above mentioned. Radiographs were taken according to the routine procedures of the Radiology Service at UFPR, at 60Kv 16mA, 14.1s (Siemens Orthophos, Bensheim, Germany).

Collection of cells and slide preparation

Exfoliated oral mucosa cells were collected immediately before X-ray exposure and 7 days after. The material was obtained by smooth scraping from both sides of the cheeks, with cervical brush (Koplast, Jaraguá do Sul, Brazil) under rotational movements, after rinsing the mouth with tap water. Cells were transferred to a Falcon tube containing 1 mL of 3:1 methanol/acetic acid, centrifuged at 130 x g during 5 min, fixed and dropped onto pre-cleaned slides. The air dried slides were stained using modified Feulgen Rossenbeck technique²⁰.

Cytological analysis

The blinded smears were analyzed under a light microscope at 400x magnification and the abnormalities were confirmed by 1000x oil immersion microscopy. Micronuclei were scored according to the criteria described by Sarto *et al.*²¹ as parameter of genotoxicity, and broken eggs, buds, pyknosis, karyorrhexis,

and karyolysis according to Tolbert *et al.*¹⁷. A minimal of 1000 cells was analyzed for each slide by a single observer, previously calibrated by an experienced pathologist.

Statistical analysis

Data were submitted to statistical analyses of Wilcoxon matched pairs test. Significance was set at $p < 0.05$.

Results

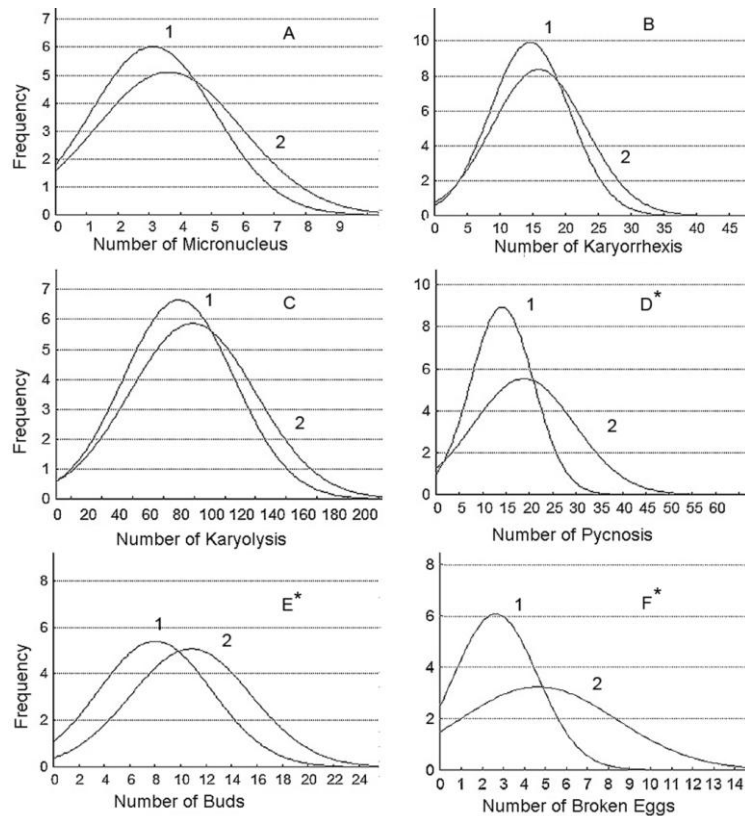
Frequencies of micronucleated cells and other nuclear alterations before and 7 days after X-ray exposure is illustrated in Table 1. Frequency of broken eggs, buds and pyknosis was statistically significant higher after radiation exposure (Wilcoxon Matched Pairs Test, $p < 0.05$). Although no difference with statistical significance for micronucleus, karyolysis, and karyorrhexis were observed after X-ray exposure, increase on frequencies on these nuclear alterations did occur. This can be clearly observed in Figure 1, under normal frequency distribution curves. No difference was observed for sexes ($p > 0.05$).

Table 1. Frequency of nuclear alteration of children exposed to panoramic radiography.

X-ray exposure	Normal	Micro-nucleus	Karyolysis	Karyorrhexis	Pyknosis*	Buds*	Broken eggs*	Totals
Before	52057	63	2093	286	273	179	49	55000
After	64029	78	2358	326	413	263	109	67576

* - Differences statistically significant (Wilcoxon Matched Pairs Test, $p < 0,05$).
Data are expressed as ‰

Figure 1. Normal frequency distribution curves of the number of the micronuclei and other cytotoxic nuclear alteration.



Curves fit expected normal frequency distribution.

A – micronucleus; B – karyorrhexis; C - karyolysis; D – pyknosis; E – buds; F- broken eggs; 1 - before X-Ray; 2 – after X-Ray. Data for 30 patient children.

*- Difference statistically significant (Wilcoxon Matched Pairs Test, $p < 0,05$).

Discussion

Actually, children are more susceptible to toxic agents than adults²², and ionizing radiation can be mutagenic with cumulative actions²³. Whereas an individual may be subjected to repeated X-rays, the effect of its successive exhibitions should be considered, since frequent nuclear changes after these events may occur³. Although the radiation dose received under panoramic radiography is low¹⁵, children are more radiosensitive than adults²⁴. This way, the cumulative effect of small doses over sensitive tissues could trigger cytotoxic effects, resulting in chronic cell injury, compensatory cell proliferation, tumor development, and carcinogenesis².

However, studies of Ribeiro *et al.*⁶ showed similar cytotoxic increase in adults and children subjected to panoramic radiography, concluding that children are not more susceptible than adults to nuclear alteration induced by X-rays.

In this work, sample size and nuclear assays was higher than Ribeiro *et al.*⁶ and Angelieri *et al.*², and we observed cytotoxicity effects following exposure to X-rays and also significant increase in other nuclear degenerative changes: buds and broken eggs, unlike those authors. Thus, more studies on effects of X-rays in children are necessary, noting its implications in the short and long term, since the risk of damage against the low doses of radiation in this population is not fully clarified.

According to Silva *et al.*³, female hormones cause changes in epithelial cells of the oral mucosa of women. However, in this work difference related to sex was not observed, probably because the sex age selected was not at puberty.

Currently, many authors have demonstrated that low doses of radiation exposure from panoramic radiography cause cytotoxicity in tissues of oral mucosa¹⁻⁹, but no increase in frequency of micronuclei^{1-9,19}. This work presented similar results.

However, Cerqueira *et al.*⁴ found high frequency of micronuclei in gingival epithelial cells after exposure to radiation, associating this finding to the fact that those cells are directly affected by X-rays during the taking of panoramic radiography. Epithelium of the buccal mucosa is also hit directly by X-rays, but it was not observed significant increase in frequency of micronuclei after X-radiation exposure in this work and other similar studies. Masticatory, specialized and coating mucous could react differently to the action of X-rays^{4,7}, still being necessary further studies make this comparison possible.

Micronuclei formation is dose-dependent and varies according to type of radiation used and radiosensitivity of the tissue. However, low doses of X-radiation are able to induce DNA damage, which does not necessarily result in micronuclei²⁵. In this work the amount of micronuclei and other changes observed were higher after X-rays exposure, but not statistically significant (Figure 1). It is possible that the cytotoxic events that decreased cellular viability, causing death by apoptosis, are related to the occurrence of low frequency of micronucleated cells^{1,2}.

This work showed statistically significant increase in the frequency of buds, broken eggs and pyknosis in children subjected to panoramic radiography, similar to Silva *et al.*³. Meaning of buds and broken eggs is still obscure¹⁶, and it could be

related to normal process of cellular division^{1,4}, with DNA amplified and eliminated from nuclei during S phase of cellular cycle²⁷, or with micronuclei precursor structures^{28,29}. This hypothesis would entail genotoxicity of X-rays on the oral mucosa of children. So far, it is only possible to say that X-ray cause genetic instability. Pycnosis changes are normally found in squamous cellular surface; it may indicate cellular degeneration by intense ripeness or premature aging linked to a strong cellular inflammatory process, causing death of the affected cells.

Cellular death by apoptosis could occur due to the large amount of injuries caused by the cell's DNA, making it not fully functional to organism. The successive occurrence of these events may delay the renewal of the mouth epithelial tissue. If repair capacity of the organism is overcome, degenerative phenomena can cause epithelial alterations, increasing the predisposition to malignant transformation³⁰. Thus, it is important to examine the toxicity of X-radiation throughout longitudinal studies to verify if generated damages are punctual and transient or incorporated and maintained along the cellular divisions³¹.

The panoramic radiography is considered examination of choice for initial assessment of children above the age of 5, because it allows extensive observation of the bucomaxilofacial complex and exposes the child to a lower dose of X-radiation, compared to an intraoral radiographic survey. However, it should be indicated whenever necessary, using accurate radiographic technique following actual radioprotection criteria in order to avoid unnecessary repetitions³.

Conclusions

The results of the present work suggest that exposure to X-rays during panoramic radiography could induces cellular death in oral mucosa cells in children.

Referências do artigo 1

1. Cerqueira EMM, Gomes-Filho IS, Trindade S, Lopes MA, Passos JS, Machado-Santelli GM. Genetic damage in exfoliated cells from oral mucosa of individuals exposed to X-rays during panoramic dental radiographies. *Mutat Res* 2004;562:111–7.
2. Angelieri F, Oliveira GR, Sannomiya EK, Ribeiro DA. DNA damage and cellular death in oral mucosa cells of children who have undergone panoramic dental radiography. *Pediatr Radiol* 2007;37:561–5.
3. Silva AE, Rados PV, Lauxen IS, Gedoz L, Villarinho EA, Fontanella V. Nuclear changes in tongue epithelial cells following panoramic radiography. *Mutat Res* 2007;632:121–5.
4. Cerqueira EMM, Meireles JCR, Lopes MA, Junqueira VC, Gomes-Filho IS, Trindade S, Machado-Santelli GM. Genotoxic effects of X-rays on keratinized mucosa cells during panoramic dental radiography. *Dentomaxillofac Radiol* 2008;37:398–403.
5. Ribeiro DA, Angelieri F. Cytogenetic biomonitoring of oral mucosa cells from adults exposed to dental X-rays. *Radiat Med*, 2008;26:325–30.
6. Ribeiro DA, Oliveira G, Castro GM, Angelieri F. Cytogenetic biomonitoring in patients exposed to dental X-rays: comparison between adults and children. *Dentomaxillofac Radiol*, 2008;37:404-7.
7. Angelieri F, Moleirinho TCG, Carlin V, Oshima CTF, Ribeiro DA. Biomonitoring of oral epithelial cells in smokers and non-smokers submitted to panoramic X-ray: comparison between buccal mucosa and lateral border of the tongue. *Clin Oral Investig* [In Press].
8. Ribeiro DA, Sannomiya EK, Pozzi R, Miranda SR, Angelieri F. Cellular death but not genetic damage in oral mucosa cells after exposure to digital lateral radiography. *Clin Oral Investig* [In Press].
9. Angelieri F, Carlin V, Saez DM, Pozzi R, Ribeiro DA. Mutagenicity and cytotoxicity assessment in patients undergoing orthodontic radiographs. *Dentomaxillofac Radiol* 2010;39:437-40.
10. Ron E. Cancer risks from medical radiation. *Health Phys* 2003;85:47-59.
11. Memon A, Godward S, Williams D, Siddique I, Al-Saleh K. Dental x-rays and the risk of thyroid cancer: a case-control study. *Acta Oncol* 2010;49:447-53.
12. Jones P, Reychler H, Engels H, Wambersie A. Radiologic exposure of the dental patient: comparison of the doses delivered by different techniques. *Rev Belge Med Dent* 2007;62:4-24.

13. Abbott P. Are dental radiographs safe? *Aust Dent J* 2000;45:208-13.
14. Oliveira MMN, Correia MF, Barata JS. Aspectos relacionados ao emprego da radiografia panorâmica em pacientes infantis. *R Fac Odontol Porto Alegre* 2006;47:15-9.
15. Myers DR, Shoaf HK, Wege WR, Carlton WH, Gilbert MA. Radiation exposure during panoramic radiography in children. *Oral Surgery Oral Med Oral Pathol* 1978;46:588-93.
16. Kleinerman RA. Cancer risks following diagnostic and therapeutic radiation exposure in children. *Pediatr Radiol* 2006;36:121-5.
17. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res* 1992;271:69-77.
18. Belien JAM, Copper MP, Braakhuis BJM, Snow GB, Baak JPA. Standardization of counting micronuclei: definition of a protocol to measure genotoxic damage in human exfoliated cells. *Carcinogenesis* 1995;16:2395-400.
19. Popova L, Kishkilova D, Hadjidekova VB, Hristova RP, Atanasova P, Hadjidekova VV, Ziya D, Hadjidekov VG. Micronucleous test in buccal epithelium cells from patients subjected to panoramic radiography. *Dentomaxillofac Radiol* 2007;36:168-71.
20. Feulgen R, Rossenbeck H. Mikroskopisch chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der thymonucleinsäure und die darauf bestehende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparate. *Z Physiol Chem* 1924;135:203-48.
21. Sarto F, Finotto S, Giacomelli L. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. *Mutagenesis* 1987;2:11-7.
22. Neri M, Fucic A, Knudsen LE, Lando C, Merlo F, Bonassi S. Micronuclei frequency in children exposed to environmental mutagens: a review. *Mutat Res* 2003;544:243-54.
23. Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, Fenech M. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res* 2008;659:93-108.
24. Gil C, Varoli FP, Buscatti MY, Costa C, Oliveira JX. Evaluation of patients submitted to dental radiographs, considering gender and age range concerning radiological protection. *Rev Inst Ciên Saúde* 2005;23:269-74.
25. He JL, Chen WL, Jin LF, Jin HY. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the comet assay for the detection of genotoxic effects of X-ray radiation. *Mutat Res* 2000;469:223-31.

26. Nersesyan AK. Nuclear buds in exfoliated human cells. *Mutat Res* 2005;588:64–8.
27. Shimizu N, Itoh N, Utiyama H, Wahl GM. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *J Cell Biol* 1998;140:1307-20.
28. Serrano-Garcia L, Montero-Montoya R. Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. *Environ Mol Mutagen* 2001;38:38–45.
29. Ramirez A, Saldanha PH. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. *Genet Mol Res* 2002;1:246–60.
30. Carrard 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* 2007;48:77-81.
31. Shuas S, Ganapathy KS, Gayatri Devi M, Ramesh C. Application of the micronucleous test to exfoliated epithelial cells from the oral cavity of beedi smokers, a high risk group for oral cancer. *Mutat Res* 2004;561:15-21.

4.3 ARTIGO 2 EM PORTUGUÊS

Introdução

A radiografia panorâmica tem sido amplamente utilizada como exame de rotina para diagnóstico inicial em Odontologia [1,2], proporcionando grandes benefícios para o planejamento odontológico. Todavia, estudos recentes demonstraram que a exposição aos raios X durante a tomada radiográfica panorâmica produziu citotoxicidade e genotoxicidade em tecidos orais humanos. Desta forma, recomenda-se a indicação daquele exame apenas quando há uma justificativa clínica, uma vez que mesmo baixas doses de radiação (como a quantidade emitida durante a exposição à radiografia panorâmica), ainda assim, são capazes de provocar efeitos biológicos deletérios e cumulativos [3-10].

As alterações genéticas como formações de micronúcleos e as degenerações nucleares são efeitos biológicos associados à iniciação da carcinogênese [11,12]. O conhecimento dos fatores causais e dos efeitos destas alterações favorece a prevenção ao câncer [7,8,13]. Portanto, estudos sobre os efeitos genotóxicos e citotóxicos induzidos pela radiação X são importantes para identificar o grau de risco ao câncer que o paciente apresenta quando exposto, objetivando minimizá-lo [4].

Os micronúcleos são fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros que foram perdidos durante a mitose celular devido a um evento clastogênico ou aneugênico [14,15]. A radiação X é um agente clastogênico, que pode induzir a formação de micronúcleos e outras alterações nucleares [16]. A frequência de micronúcleos é utilizada como um parâmetro para verificar o grau de exposição e a extensão do dano causado por um agente ao DNA. Funciona como um biomarcador, indicativo da suscetibilidade de um indivíduo ao aparecimento do câncer [14,17-22]. A associação do teste de micronúcleos com o registro de outras alterações nucleares indicativas de morte celular aumenta a sensibilidade da detecção de danos celulares [12,16].

Assim, o objetivo deste estudo foi verificar se a exposição à radiação X emitida durante a tomada radiográfica panorâmica induz ao aumento na frequência de micronúcleos e outras alterações nucleares, contribuindo ao conhecimento existente acerca dos efeitos induzidos por raios X sobre tecidos orais humanos.

Material e métodos

A busca dos artigos foi realizada nas bases de dados eletrônicas da Biblioteca Virtual de Saúde e *PubMed* entre abril de 2009 a julho de 2010. Os estudos a serem selecionados deveriam ter como objetivo principal a avaliação dos efeitos genotóxicos e/ou citotóxicos dos raios X sobre células orais em humanos submetidos à radiografia panorâmica. As palavras-chave utilizadas foram *panoramic radiography* em combinação com: *genotoxicity* (6 artigos BVS e 3 *PubMed*), com DNA (5 artigos BVS e 13 *PubMed*) e com *micronucleus test* (6 artigos *PubMed*). A busca limitou-se a artigos publicados a partir de 2003.

Os critérios de inclusão foram estabelecidos previamente para esse estudo de revisão. Os critérios de inclusão definidos para a seleção dos artigos foram: a) pacientes submetidos à radiografia panorâmica por indicação de um profissional; b) radiografia panorâmica como variável independente; c) pesquisa realizada com seres humanos; d) artigos publicados em qualquer idioma, a partir do ano de 2003; e) controle dos fatores de confusão e vieses. Os critérios de exclusão tiveram como objetivo limitar que fatores externos pudessem interferir nos efeitos da radiação X, emitidos durante a tomada radiográfica panorâmica, sobre os tecidos orais. Os critérios de exclusão para esta revisão foram: a) presença de outra intervenção além da radiografia panorâmica; b) estudos de caso, *in vitro* ou realizados com animais; c) avaliação de células não provenientes da mucosa oral.

Os artigos selecionados foram avaliados quanto à qualidade por um avaliador. Foi verificado se a metodologia empregada em cada estudo adequava-se aos parâmetros descritos no projeto HUMN, diminuindo as fontes de variabilidade que poderiam comprometer os resultados apresentados [16]. Foram considerados 7 itens (listados na Tabela 1) e julgados como: (A) adequado, (M) moderada adequação, (B) baixa adequação ou (N) ausência da informação. A avaliação final dos estudos classificou-os como fraco, moderado ou forte evidência científica, conforme os critérios de apreciação crítica. Após seleção dos artigos, foram extraídas e resumidas as informações disponíveis nos mesmos (Tabela 2).

Resultados

A pesquisa inicial nas bases de dados eletrônicas identificou 33 referências. Retirando-se as duplicatas chegou-se a um total de 16 publicações, sendo seis excluídas por não pesquisar genotoxicidade ou citotoxicidade associada à radiação X emitida durante a exposição à radiografia panorâmica e uma por avaliar linfócitos. Os nove artigos restantes foram inclusos nesta revisão por cumprirem os critérios de inclusão e exclusão descritos nos materiais e métodos (Tabelas 1 e 2). Os resultados destes estudos estão descritos na Tabela 3.

Os estudos apresentados relataram necessidade de mais pesquisas quanto aos efeitos genotóxicos e citotóxicos provocados pelos raios X emitidos durante a tomada de radiografias panorâmicas [3-10]. Além disso, os autores [3-10] recomendaram a indicação criteriosa das radiografias panorâmicas, pois como este exame não está isento de riscos ele deve ser utilizado apenas quando necessário.

Discussão

Desenho metodológico dos estudos

Uma maneira de estudar os efeitos da irradiação em uma população exposta é conduzir pesquisas utilizando parâmetros biológicos pertinentes com manifestações em curto prazo e identificar os danos resultantes da exposição aos raios X. As informações obtidas podem ser usadas como um aviso do risco potencial do desenvolvimento, em longo prazo, de problemas de saúde como o câncer [23].

Nesta revisão, os estudos analisados buscaram avaliar dano genotóxico ou citotóxico em tecidos orais humanos após a exposição de pacientes à radiação X emitida durante a tomada da radiografia panorâmica, sendo o indivíduo seu próprio controle (desenho cruzado). Apesar desse desenho metodológico não ser considerado padrão ouro em qualidade de evidência, tem sido bastante utilizado em pesquisas envolvendo efeitos da radiação. Isto se deve principalmente às questões éticas que permeiam a exposição de indivíduos saudáveis ao risco.

Aspectos metodológicos dos estudos

O aumento na frequência micronúcleos em células orais tem sido associado a diversos fatores como: exposição à radiação [16,24]; presença de lesões na mucosa oral [16,17]; tabagismo [16,19], ingestão freqüente de álcool [16,19,25,26], dieta [16], uso contínuo de enxaguatório oral [19,27], sexo [5] e idade [11,28], entretanto, o efeito destes parâmetros na ocorrência de micronúcleos ainda é inconclusivo. Os artigos avaliados buscaram evitar que estes possíveis fatores de confusão interferissem no desfecho estudado por meio do controle ou exclusão destas variáveis da amostra, ou, analisando o peso das mesmas junto à variável independente radiografia panorâmica.

Os tecidos orais estão na rota direta do feixe de raios X emitido durante a tomada da radiografia panorâmica. A radiação pode afetar as células progenitoras da camada basal do epitélio oral; porém, ao utilizar a citologia esfoliativa para verificar os efeitos provocados, a coleta deve se dar entre uma a três semanas após o *turnover* celular, quando a célula descama [15,16]. Desta forma, houve adequação dos estudos revisados quanto ao período de coleta celular após a exposição à radiação X emitida durante a obtenção da radiografia panorâmica.

É possível realizar a citologia esfoliativa na mucosa oral utilizando *cytobrusch*, escovas dentais, espátulas de metal, plástico ou madeira [15,18]. Cuidados adicionais devem ser tomados ao se utilizar espátulas de madeira. Estas devem estar umedecidas em solução tampão antes da coleta celular, evitando ressecamento e alteração da amostra [16]. As pesquisas que utilizaram espátula de madeira não relataram este cuidado adicional [4,7-10], o que pode ter acarretado um aumento no número de células observadas com alterações citotóxicas. Além disso, o vigor empregado durante a raspagem é de difícil padronização, podendo ser uma fonte de variabilidade entre os diferentes estudos [15,16,22], pois danos celulares podem ser provocados mais facilmente durante esfregaços vigorosos quando comparados aos leves [16].

A ausência de cuidados durante o preparo e coloração das lâminas também interfere nos resultados. As células ficam mais agrupadas e sobrepostas quando são depositas sobre a lâmina por meio do esfregaço, dificultando a leitura e a eleição de áreas de avaliação segundo os critérios descritos por Tolbert *et al* [12]. Este método foi utilizado por Cerqueira *et al.* [3,6]. A confecção das lâminas utilizando citologia

em meio líquido e centrifugação é adequada [16,29]. A centrifugação auxilia na remoção de sujidades e microorganismos que podem gerar artefatos [18]; e a citologia em meio líquido permite que as células fiquem mais esparsas sobre a lâmina, facilitando a leitura; e em conformidade com os critérios de contagem já citados [12].

Ainda não existe um protocolo validado quanto ao preparo, fixação e coloração de células da mucosa oral visando análise de micronúcleos e outras alterações nucleares sob microscopia de luz ou fluorescência. Entretanto, a fixação com metanol e ácido acético (3:1) [18] e a coloração de *Feulgen* são bastante apropriadas para este tipo de estudo [15,16,18]. A vantagem da coloração de *Feulgen Fast Green* é a especificidade para corar DNA [30-33]; o núcleo adquire uma tonalidade rósea e o citoplasma verde claro permitindo boa visualização devido ao contraste tanto em microscopia de luz quanto fluorescência. O método de *Giemsa* utilizado pelo estudo de Popova *et al.* [11] implica em risco elevado de falso-positivo, pois grânulos ceratohialínicos, alterações metanucleares e bactérias podem ser erroneamente interpretadas como micronúcleos [15,16].

Os critérios utilizados na avaliação dos desfechos investigados (micronúcleos e alterações nucleares citotóxicas) têm validade e confiabilidade descritos na literatura. Estes foram reportados por Belien [17], Sarto [34] e Tolbert [12]. Com exceção de Popova *et al.* [11], os demais autores utilizaram os critérios de Tolbert e/ou Sarto nas mensurações realizadas. Porém, os artigos avaliados deixaram de relatar o nível de confiabilidade intra e/ou interexaminador. Não se deve assumir que, pelo fato de somente um examinador experiente realizar todas as mensurações, a confiabilidade será adequada, garantindo a força de evidência. Outros dois pontos controversos foram: a possibilidade de erro de leitura durante a análise microscópica, pois alguns estudos não relataram cegamento [4,7-10]; e o uso de magnitudes menores para contagem do número de alterações nucleares, uma vez que a recomendação é a de que este tipo de avaliação seja feita com objetivas de alta magnitude (400x e 1000x) [18].

Para se obter um resultado estatisticamente significativo, deve-se observar um número mínimo de 1000 células orais por indivíduo, entretanto esta quantidade aumenta para 2000 ou 3000 células quando a frequência de micronúcleos encontrada for maior que 5 ocorrências por amostra [12]. Desta forma, o número de

indivíduos analisados em cada estudo, que variou de 17 a 42 participantes antes e após a exposição, pode ser considerado satisfatório para os fins pesquisados.

A análise estatística utilizada nos artigos avaliados foi correta: Teste de Wilcoxon para variáveis numéricas sem distribuição normal com dados pareados, e Mann-Whitney ou X^2 quando foram analisados dados não pareados.

A inexistência de um protocolo de pesquisa validado definindo quais alterações nucleares devem ser verificadas concomitantes ao teste de micronúcleos [19,22] tornou-se evidente pela falta de homogeneidade dos desfechos avaliados nesta revisão, conforme observado na Tabela 3. Mesmo considerando que a maioria das pesquisas foi conduzida por um único grupo de pesquisadores, é necessário que haja uma padronização na forma de apresentação dos dados, possibilitando comparações futuras. A quantificação dos micronúcleos pode ser descrita por meio da frequência de células micronucleadas; pela média de alterações por célula; ou pelo número total de micronúcleos / número de células avaliadas do indivíduo. Considera-se esta última forma de apresentação de resultados como sendo a mais indicada para avaliações decorrentes de genotoxicidade [15]. Outro aspecto a ser considerado é a importância da apresentação de cada alteração nuclear citotóxica separadamente, tornando bastante claro o efeito da radiação X sobre a mucosa oral. Isto não ocorreu nos estudos conduzidos pelo grupo de Ribeiro e Angelieri [4,7-10].

Em pesquisas utilizando linfócitos, as causas de variações na frequência de micronúcleos já estão estabelecidas, sendo: 65,3% devido à dose de exposição ao agente genotóxico; 26,3% covariância; 4,5% laboratório; 3,1% não explicado; e 0,5% método de coloração [16]. Para células orais, a identificação e distribuição dos fatores das variações que poderiam alterar a frequência de micronúcleos entre diferentes pesquisas permanecem obscuros, devido à variabilidade de métodos quanto à coleta celular, preparo das lâminas, métodos de coloração, itens ainda desconhecidos, e principalmente, pela ausência de um protocolo de pesquisa validado [16,22]. O projeto HUMN tem avançado no sentido de responder estas questões, buscando homogeneizar o método de pesquisa para aplicação do teste de micronúcleos em células da mucosa oral [16].

Desta forma, o nível de evidência resultante da análise crítica dos artigos desta revisão suporta a afirmação de que a radiação X emitida durante a tomada da radiografia panorâmica pode induzir citotoxicidade, mas não genotoxicidade. Isso se

deve ao fato de os artigos analisados apresentarem boa classificação quanto aos critérios descritos no projeto HUMN. Por fim, os efeitos deletérios dos raios X emitidos durante a exposição à radiografia panorâmica sustentam a indicação deste exame apenas quando necessário.

Conclusão

O nível de evidência apresentado pelos artigos analisados foi suficiente para suportar que a radiação X emitida durante a obtenção da radiografia panorâmica é capaz de induzir efeito citotóxico em células da mucosa oral, mas não genotoxicidade.

Tabela 1 - Resultado da análise da qualidade de evidência dos artigos.

Itens Avaliados	Autor (Ano)	Cerqueira et al. (2004)	Angelieri et al. (2007)	Popova et al. (2007)	Silva et al. (2007)	Ribeiro et al. (2008)	Cerqueira et al. (2008)	Ribeiro e Angelieri (2008)	Angelieri et al. (2009)	Ribeiro et al. (2010)
Tipo de estudo		M	M	M	M	M	M	M	A	M
Controle de viés		A	A	A	A	A	A	A	A	A
Consentimento		A	A	A	A	A	M	A	A	A
Descrição e adequação da metodologia		A	A	M	A	A	A	A	A	A
Método de coleta e tratamento dos dados		M	A	M	A	A	A	A	A	A
Cegamento		A	N	N	A	N	A	N	N	N
Análise estatística		A	A	A	A	A	A	A	A	A
Classificação final evidência científica		Moderado	Forte	Fraco	Forte	Forte	Forte	Forte	Forte	Forte

A = alta adequação, M = moderada adequação, B = baixa adequação, N = ausência da informação

Tabela 2 - Resumo comparativo dos artigos que preencheram os critérios de relevância científica.

Autor Itens	Cerqueira et al. (2004)	Angelieri et al. (2007)	Popova et al. (2007)	Silva et al. (2007)	Ribeiro et al. (2008)	Cerqueira et al. (2008)	Ribeiro e Angelieri (2008)	Angelieri et al. (2009)	Ribeiro et al. (2010)
Amostra	31	17	32	42	17	40	39	15 fumantes 17 não	30
Faixa etária	24 ± 1.023	7.7±1.5	24 a 73	18 a 40	39.6±5.4 e 7.7±1.5	26±9.18	39.6±13	37.7±6.5 e 39.6±5.4	20-23
Coleta celular	Esfregaço com escova cervical	Citologia em meio líquido com espátula de madeira	Citologia em meio líquido com escova dental	N Escova cervical	Citologia em meio líquido com espátula de madeira	Esfregaço com escova cervical	Citologia em meio líquido com espátula de madeira	Citologia em meio líquido com espátula de madeira	Citologia em meio líquido com espátula de madeira
Coloração	Feulgen Rossembeck	FFG	Giemsa 10%	Feulgen	FFG	Feulgen Rossembeck	FFG	FFG	FFG
Nº células avaliadas	1000	2000	2000	2000	2000	1000	2000	2000	2000
Local da coleta	Mucosa jugal	Mucosa jugal	Mucosa jugal	Borda lateral da língua	Mucosa jugal	Gengiva maxilar	Mucosa jugal	Muc jugal e borda lateral da língua	Mucosa jugal
Momento da coleta	Antes e 10 dias após	Antes e 10 dias após	Antes e 10±2 dias após	Antes e 10 dias após	Antes e 10 dias após	Antes e 10 dias após	Antes e 10 dias após	Antes e 10 dias após	Antes e 10 dias após
Aumento	N	400x	100x	400x e 1000x	400x	200x e 1000x	400x	1000x	400x
Crítérios para avaliação celular	Tolbert	Sarto e Tolbert	Descreve critérios utilizados	Sarto e Tolbert	Sarto e Tolbert	Tolbert	Sarto e Tolbert	Sarto e Tolbert	Sarto e Tolbert
Desfechos avaliados	MN, buds, broken eggs, cromatina condensada, cariorréxe, cariólise e picnose	MN, cariorréxe, cariólise e picnose	MN	MN, buds, broken eggs, cariorréxe e células binucleadas	MN, cariorréxe, cariólise e picnose	MN, broken eggs, cromatina condensada, cariorréxe, cariólise e picnose	MN, cariorréxe, cariólise e picnose	MN, cariorréxe, cariólise e picnose	MN, cariorréxe, cariólise e picnose

MN = micronúcleo, FFG = Feulgen Fast Green

Tabela 3 – Resultados e conclusões dos artigos revisados segundo autor.

Autor (Ano)	Resultados alterados após a exposição *	Conclusões do estudo
Cerqueira et al. (2004)	Cromatina condensada e cariorréxe aumentados ($p < 0.0001$).	Os raios X emitidos durante a tomada radiográfica panorâmica induzem efeitos citotóxicos por incremento na apoptose.
Angelieri et al. (2007)	Cariorréxe, picnose e cariólise aumentados ($p < 0.05$).	Radiação X emitida durante a tomada radiográfica panorâmica pode induzir morte celular.
Popova et al. (2007)	Não houve alteração significativa na frequência de micronúcleos ($t = 1.19$ e $p > 0.05$).	Exposição aos raios X durante a tomada radiográfica panorâmica não induz a formação de micronúcleos.
Silva et al. (2007)	Alto número de <i>broken eggs, buds</i> , cariorréxe e células binucleadas ($p = 0.01$) com uma exposição. Nº de cariorréxes e células binucleadas maior no grupo exposto a uma segunda radiografia panorâmica ($p = 0.01$).	Os raios X emitidos durante a tomada radiográfica panorâmica aumentam o número de alterações nucleares (exceto MN), efeito intensificado quando há repetição do exame.
Ribeiro et al. (2008)	Aumento na frequência de cariólise, picnose e cariorréxe ($p < 0.05$) em crianças e adultos.	Os raios X podem induzir efeitos citotóxicos na mucosa oral. Crianças não são mais suscetíveis aos efeitos nocivos dos raios X quando comparadas aos adultos.
Cerqueira et al. (2008)	Frequência de micronúcleos ($p < 0.05$), cariorréxe e cromatina condensada ($p < 0.001$) mais alta após a exposição.	Os raios X promovem genotoxicidade e incremento da apoptose no epitélio gengival.
Ribeiro e Angelieri (2008)	Aumento na frequência de cariorréxe, picnose e cariólise ($p < 0.05$).	Radiação X emitida durante a tomada radiográfica panorâmica é capaz de induzir citotoxicidade.
Angelieri et al. (2009)	Aumento na frequência de cariorréxe, cariólise e picnose ($p < 0.05$) em fumantes e não fumantes, tanto em borda lateral de língua como em células da bochecha.	Raios X promovem citotoxicidade. Os efeitos mais pronunciados ocorreram na borda lateral da língua de fumantes.
Ribeiro et al. (2010)	Frequência de cariorréxe, cariólise e picnose aumentadas ($p < 0.05$).	Radiação X emitida durante a exposição à radiografia panorâmica digital é capaz de promover citotoxicidade.

* Com exceção dos resultados apresentados por Cerqueira et al. (2008), os demais artigos não encontraram diferença significativa na frequência de micronúcleos antes e após radiografia panorâmica.

Referências do artigo 2

- [1] R. Boeddinghaus, A. Whyte, Current concepts in maxillofacial imaging, *Eur J Radiol*, 66 (2008) 396–418.
- [2] Y. Martinez-Beneyto, M. Alcaráz-Baños, L. Pérez Lajarín, V.E. Rushton, Clinical justification of dental radiology in adult patients: A review of the literature, *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 12 (2007) E244-51.
- [3] E.M.M. Cerqueira, I.S. Gomes-Filho, S. Trindade, M.A. Lopes, J.S. Passos, G.M. Machado-Santelli, Genetic damage in exfoliated cells from oral mucosa of individuals exposed to X-rays during panoramic dental radiographies, *Mutat Res*, 562 (2004) 111–7.
- [4] F. Angelieri, G.R. Oliveira, E.K. Sannomiya, D.A. Ribeiro, DNA damage and cellular death in oral mucosa cells of children who have undergone panoramic dental radiography, *Pediatr Radiol*, 37 (2007) 561–5.
- [5] A.E. Silva, P.V. Rados, I.S. Lauxen, L. Gedoz, E.A. Villarinho, V. Fonatnella, Nuclear changes in tongue epithelial cells following panoramic radiography, *Mutat Res*, 632 (2007) 121–5.
- [6] E.M.M. Cerqueira, J.C.R. Meireles, M.A. Lopes, V.C. Junqueira, I.S. Gomes-Filho, S. Trindade, G.M. Machado-Santelli, Genotoxic effects of X-rays on keratinized mucosa cells during panoramic dental radiography, *Dentomaxillofac Radiol*, 37 (2008) 398–403.
- [7] D.A. Ribeiro, F. Angelieri, Cytogenetic biomonitoring of oral mucosa cells from adults exposed to dental X-rays, *Radiat Med*, 26 (2008) 325–30.
- [8] D.A. Ribeiro, G. Oliveira, G.M. Castro, F. Angelieri, Cytogenetic biomonitoring in patients exposed to dental X-rays: comparison between adults and children, *Dentomaxillofac Radiol*, 37 (2008) 404-7.
- [9] F. Angelieri, T.C.G. Moleirinho, V. Carlin, C.T.F. Oshima, D.A. Ribeiro, Biomonitoring of oral epithelial cells in smokers and non-smokers submitted to panoramic X-ray: comparison between buccal mucosa and lateral border of the tongue, *Clin Oral Investig*, [In Press].
- [10] D.A. Ribeiro, E.K. Sannomiya, R. Pozzi, S.R. Miranda, F. Angelieri, Cellular death but not genetic damage in oral mucosa cells after exposure to digital lateral radiography, *Clin Oral Investig*, [In Press].
- [11] L. Popova, D. Kishkilova, V.B. Hadjidekova, R.P. Hristova, P. Atanasova, V.V. Hadjidekova, D. Ziya, V.G. Hadjidekov, Micronucleous test in buccal epithelium cells from patients subjected to panoramic radiography, *Dentomaxillofac Radiol*, 36 (2007) 168–71.

- [12] P.E. Tolbert, C.M. Shy, J.W. Allen, Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development, *Mutat Res*, 271 (1992) 69-77.
- [13] J.C.R. Meireles, M.A. Lopes, N.N. Alves, E.M.M. Cerqueira, Apoptose em células esfoliadas da mucosa bucal de indivíduos ocupacionalmente expostos a agentes mutagênicos e carcinogênicos. *Rev Bras Canc*, 52 (2006) 337-43.
- [14] M.G.S. Andrade, S.R.A. Reis, W.M. Robinson, M.R. Borges-Osório, Micronúcleo: um importante marcador biológico Intermediário na prevenção do câncer bucal. *Rev Odonto Ciência*, 20 (2005) 137-41.
- [15] V.C. Carrard, C.H. Costa, L.A. Ferreira, I.S. Lauxen, P.V. Rados, Teste dos Micronúcleos – Um Biomarcador de Dano Genotóxico em Células Descamadas da Mucosa Bucal, *Rev Fac Odontol Porto Alegre*, 48 (2007) 77-81.
- [16] N. Holland, C. Bolognesi, M. Kirsch-Volders, S. Bonassi, E. Zeiger, S. Knasmueller, M. Fenech, The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps, *Mutat Res*, 659 (2008) 93-108.
- [17] J.A.M. Belien, M.P. Copper, B.J.M. Braakhuis, G.B. Snow, J.P.A. Baak, Standardization of counting micronuclei: definition of a protocol to measure genotoxic damage in human exfoliated cells, *Carcinogenesis*, 16 (1995) 2395-400.
- [18] B.J. Majer, B. Laky, S. Knasmueller, F. Kassie, 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, *Mutat Res*, 489 (2001) 147–72.
- [19] V.S. Freitas, M.A. Lopes, J.C.R. Meireles, L. Reis, E.M.M. Cerqueira, Efeitos genotóxicos de fatores considerados de risco para o câncer bucal, *Rev Baiana Saúde Pub*, 29 (2005) 189-199.
- [20] A. Halder, T. Chakraborty, K. Mandal, P.K. Gure, S. Das, R. Raychowdhury, A.K. Ghosh, M. De, Comparative Study of Exfoliated Oral Mucosal Cell Micronuclei Frequency in Normal, Precancerous and Malignant Epithelium, *Int J Hum Genet*, 4 (2004) 257-60.
- [21] R. Mehrotra, A. Gupta, M. Singh, R. Ibrahim, Application of cytology and molecular biology in diagnosing premalignant or malignant oral lesions, *Mol Cancer*, 23 (2006) 5-11.
- [22] S. Bonassi, B. Biasotti, M. Kirsch-Volders, S. Knasmueller, E. Zeiger, S. Burgaz, C. Bolognesi, N. Holland, P. Thomas, M. Fenech, State of the art survey of the buccal micronucleus assay—a first stage in the HUMNXL project initiative, *Mutagenesis*, 24 (2009) 295–302.
- [23] W.W. Au, D.M. Walker, J.B. Ward, Factors contributing to chromosome damage in lymphocytes of cigarette smokers, *Mutat Res*, 260 (1991) 137-44.

- [24] J.L. He, W.L. Chen, L.F. Jin, H.Y. Jin, Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the comet assay for the detection of genotoxic effects of X-ray radiation, *Mutat Res*, 469 (2000) 223–31.
- [25] S.R.A. Reis, M. Sadigursky, M.G.S. Andrade, L.P. Soares, A.R. Espírito Santo, Efeito genotóxico do etanol em células da mucosa bucal, *Pesq Odontol Bras*, 16 (2002) 221-5.
- [26] S.R.A. Reis, A.R. Espírito Santo, M.G.S. Andrade, M. Sadigursky, Cytologic alterations in the oral mucosa after chronic exposure to ethanol, *Braz Oral Res*, 20 (2006) 97-102.
- [27] E.O. Erdemir, A. Şengün, M. Ülker, Cytotoxicity of Mouthrinses on Epithelial Cells by Micronucleus Test, *Eur J Dent*, 2 (2007) 80-85.
- [28] M. Neri, A. Fucic, L.E. Knudsen, C. Lando, F. Merlo, S. Bonassi, Micronuclei frequency in children exposed to environmental mutagens: a review, *Mutat Res*, 544 (2003) 243–54.
- [29] E.P. Dias, A. Milagres, J.B. Santos, C.P. Valladares, A.C.B. Souza, R.S. Pinheiro, Estudo comparativo de raspados orais submetidos à técnica de citologia em meio líquido e citopatologia convencional, *J Bras Patol Med Lab*, 44 (2008) 25-9.
- [30] H.S. Di Stefano, A cytochemical study of the Feulgen nucleal reaction, *Proc Natl Acad Sci USA*, 34 (1948) 75-80.
- [31] H. Ris, A.E. Mirsky, Quantitative cytochemical determination of desoxyribonucleic acid with the Feulgen nucleal reaction, *J Gen Physiol*, 33 (1949) 125-46.
- [32] R. Souto, F.R. Borges, D.M.C. Cunha, C.A.S.T. Vilanova-Costa, A.D. Cruz, O teste de micronúcleo como ferramenta qualitativa de dano genético: aspectos citotécnicos, *Estudos*, 35 (2008) 171-8.
- [33] A. Nersesyan, M. Kundi, K. Atefie, R. Schlte-Hermann, S. Knasmueller, Effect of staining procedures on the results of micronucleus assays with exfoliated oral mucosa cells, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15 (2006) 1835–40.
- [34] F. Sarto, S. Finotto, L. Giacomelli, D. Mazzotti, R. Tomanin, A.G. Levis, The micronucleous assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa, *Mutagenesis*, 2 (1987) 11-17.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos sugerem que os raios X emitidos durante a obtenção da radiografia panorâmica podem induzir alterações nas células do epitélio da mucosa oral de crianças.

REFERÊNCIAS DA DISSERTAÇÃO

ANTUNES, J.L.F.; PERES, M.A. **Epidemiologia da saúde bucal**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

CAPELLI, J. et al. Avaliação de interesse clínico entre a radiografia panorâmica e o conjunto periapical aplicado à clínica odontológica. **Rev Inst Ciênc Saúde**, v. 9, n. 2, p. 59-68, jul./dez. 1991.

CERQUEIRA, E.M.M. et al. Genotoxic effects of X-rays on keratinized mucosa cells during panoramic dental radiography. **Dentomaxillofac Radiol**, v.37, p. 398–403, 2008.

DIAS, E.P. et al. Estudo comparativo de raspados orais submetidos à técnica de citologia em meio líquido e citopatologia convencional. **J Bras Patol Med Lab**, v. 44, n. 1, p. 25-9, fev. 2008.

FEULGEN, R.; ROSSENBECK, H. Mikroskopisch chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der thymonucleinsäure und die darauf bestehende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparate. **Z Physiol Chem**, v. 135, p. 203–48, 1924.

FREITA, V.S. et al. Efeitos genotóxicos de fatores considerados de risco para o câncer bucal. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v.29 n.2, p.189-19, jul./dez. 2005.

HOLLAND, N. et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. **Mutat Res**, v. 659, p. 93-108, 2008.

OLIVEIRA, M.M.N; CORREIA, M.F.; BARATA, J.S. Aspectos relacionados ao emprego da radiografia panorâmica em pacientes infantis. **R Fac Odontol Porto Alegre**, v. 7, n. 1, p. 15-9, abr. 2006.

PAGNONCELLI, S.D.; OLIVEIRA, F.A.M. A utilização da radiografia panorâmica como uma opção de diagnóstico radiográfico inicial em Odontopediatria. **J Bras Odontopediatria & Odontologia do Bebê**, v. 2, n. 7, p. 186-99, maio/jun. 1999.

POPOVA, L. et al. Micronucleous test in buccal epithelium cells from patients subjected to panoramic radiography. **Dentomaxillofac Radiol**, v. 36, p. 168–71, 2007.

RIBEIRO, D.A.; ANGELIERI, F. Cytogenetic biomonitoring of oral mucosa cells from adults exposed to dental X-rays. **Radiat Med**, v. 26, p. 325–330, 2008.

RIBEIRO, D.A. et al. Cytogenetic biomonitoring in patients exposed to dental X-rays: comparison between adults and children. **Dentomaxillofac Radiol**, v. 37, p. 404-7, 2008.

SARTO, F.; FINOTTO, S.; GIACOMELLI, L. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. **Mutagenesis**, v. 2, p. 11–17, 1987.

TAKAHASHI, M. **Atlas colorido de Citologia do Câncer**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1982.

TOLBERT, P.E.; SHY, C.M.; ALLEN, J.W. Micronuclei and other anomalies in buccal smears: methods development. **Mutat Res**, v. 271, p. 69-77, 1992.

APÊNDICES

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, responsável pelo menor _____ que foi convidado para participar da pesquisa intitulada: "Genotoxicidade e citotoxicidade dos raios X no epitélio da mucosa oral de crianças submetidas à radiografia panorâmica" autorizo a sua participação.

A cirurgiã-dentista Evelyn Louise Antonio, aluna do mestrado em Saúde Bucal durante a infância e adolescência da UFPR explicou-me que as pesquisas permitem avanços importantes em todas as áreas e que a participação do meu filho(a) neste estudo é muito importante.

Sei que o objetivo desta pesquisa é descobrir se os raios X utilizados para uma radiografia panorâmica são capazes de causar mudanças importantes na gengiva da criança.

Fui avisado que se meu filho(a) participar da pesquisa será feito um exame chamado citologia esfoliativa antes da radiografia panorâmica e 07 dias depois.

Meu filho fará um bochecho com água e em seguida será passada suavemente uma escova macia por cinco vezes na bochecha dele(a). Sei também que este exame com a escova não oferece riscos.

Como meu filho está sendo atendido na Odontopediatria, o acompanhamento do tratamento dele será feito pelos professores daquela clínica. Os resultados deste estudo servirão para propor novas formas de diagnóstico e/ou critérios para solicitar radiografias panorâmicas em crianças.

A cirurgiã-dentista Evelyn Louise Antonio será responsável pelo exame do meu filho(a) nesta pesquisa e estará disponível para esclarecer qualquer dúvida que possa surgir sobre a pesquisa seja por telefone: 8835-1511; e-mail: louise_evelyn@yahoo.com.br ou, no Serviço de Radiologia Odontológica da UFPR (Rua Prefeito Lothário Meissner, nº 632, Jardim Botânico) às segundas e terças-feiras das 13:30h às 16h30.

Sei também que se eu não quiser autorizar o meu filho a participar da pesquisa, essa decisão não vai afetar o atendimento ou o tratamento odontológico dele.

Fui informado que todos os dados pessoais do meu filho serão mantidos em segredo.

(Assinatura do responsável legal)

Curitiba, _____ de _____ de 2010.

Evelyn Louise Antonio
Pesquisadora Responsável

Profª. Drª. Ângela Fernandes – Orientadora

APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO DE SELEÇÃO DA AMOSTRA

Questionário para seleção da amostra

Data de nascimento (2000 a 2006): / /

Idade: 4 5 6 7 8 9 10

Sexo: F M

Criança apresenta alterações em mucosa oral?	S	N
Portadora de doença sistêmica ou de alterações que poderiam comprometer a mucosa oral?	S	N
Realizou exame radiográfico em região de cabeça a menos de 21 dias?	S	N
Faz uso diário ou contínuo de enxaguatório oral contendo álcool no último mês?	S	N
Está fazendo uso de alguma medicação?	S	N
Qual medicação?		
Incluído	Excluído	

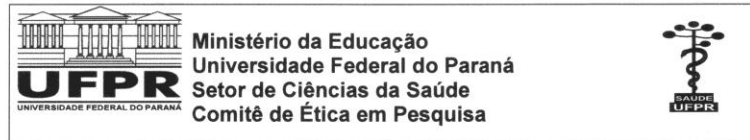
Data da coleta celular: / /

2010.

Assinatura do responsável: _____

ANEXOS

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA UFPR



Curitiba, 26 de agosto de 2009.

Ilmo (a) Sr. (a)
Evelyn Louise Antonio

Nesta

Prezado(a) Pesquisador(a),

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado “**Genotoxicidade dos raios X sobre a mucosa oral de crianças submetidas à radiografia panorâmica**” está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução CNS 196/96, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em reunião realizada no dia 05 agosto de 2009 e apresentou pendência(s). Pendência(s) apresentada(s), documento(s) analisado(s) e projeto aprovado em 26 de agosto de 2009.

Registro **CEP/SD**: 761.096.09.07 **CAAE**: 0038.0.091.084-09

Conforme a Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do relatório final ou parcial: 26/02/2010.

Atenciosamente

Prof. Dr. Lillian Maria Labronici
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde

Prof. Dra. Lillian Maria Labronici
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa - SD/UFPR

Rua Padre Camargo, 280 – Alto da Glória – Curitiba-PR – CEP 80060-240
Fone: (41)3360-7259 – e-mail: cometica.saude@ufpr.br

ANEXO B - INSTRUÇÕES PEDIATRIC DENTISTRY

Pediatric Dentistry • Journal of Dentistry for Children
Instructions to Contributors

Introduction

Pediatric Dentistry [or Journal of Dentistry for Children], a journal of the American Academy of Pediatric Dentistry (AAPD), is published bimonthly [or 3 times per year] to promote practice, education, and research specifically related to the specialty of pediatric dentistry. Manuscripts are accepted for consideration if neither the article, nor any part of its essential substance, tables, or figures has been or will be published in another journal or is simultaneously submitted to another journal. Published papers do not necessarily represent the views of the editor, the AAPD Communications Department, or the American Academy of Pediatric Dentistry.

Types of articles

The journal publishes full-length scientific articles not exceeding 8 printed pages (20 double-spaced 8 1/2x11-in document pages; font no smaller than 11-point Times New Roman or Arial); and clinical articles and case reports not exceeding 4 printed pages (10 double-spaced 8 1/2x11-in document pages). Authors are encouraged to review these Instructions carefully prior to submitting their manuscripts.

Submission of manuscripts

Submission of manuscripts to *Pediatric Dentistry [Journal of Dentistry for Children]* occurs online through the Scholar One Manuscript Central Web site at <http://mc.manuscriptcentral.com/pediadent>, [<http://mc.manuscriptcentral.com/jdentchild>]. No hard copy submissions will be accepted. Submitting authors must set up an online account and provide all information requested during the online submission process, including: corresponding author's contact information; names, titles (such as "associate professor," "chairman,"), academic degrees (such as "DMD," "MS," "PhD,"), and affiliations of all authors; short (running) title; and 3 to 5 keywords. Honorary designations should not be included (eg, "FRCS," "FICD," "Diplomate, ABPD," etc). Authors should ensure that the keywords appear in the U.S. National Library of Medicine Medical Subject Headings, or "MeSH" (found at "<http://www.nlm.nih.gov/mesh/>"). This information should also appear on the first page of the UNBLINDED version of the manuscript but should be removed from BLINDED version along with any references to names, authors, or institutions. Both an UNBLINDED and BLINDED version of the manuscript must be uploaded. Tables should appear at the end of the main document, while photos, photomicrographs and graphs should be submitted as separate files (.jpg or .tif format). Prior to submission, the corresponding author must guarantee that the article has not been published, and is not being considered for publication elsewhere. Submission of multi-authored manuscripts implies participation of each of the authors in the preparation of the paper. Only individuals who have made a significant contribution to the study or manuscript should be listed as authors. The efforts of others should be noted in the *Acknowledgments* section at the end of the manuscript. The corresponding author should submit the following statement: "All authors have made substantive contribution to this study and/or manuscript, and all have reviewed the final paper prior to its submission." Authors (including authors of letters to the editor) are responsible for disclosing all financial and personal relationships that might bias their work. If such conflicts exist, the authors must provide additional detail in the appropriate text box during online submission. Funding sources for the work being submitted must be disclosed in the *Acknowledgments* section of the manuscript.

Manuscript organization

Scientific articles should be organized under the following headings: *Abstract, Introduction, Methods, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgments, and References*. Titles of all papers should not exceed 15 words. The *Introduction* section should include only pertinent references. When included for a study, the *Methods* section should be sufficiently detailed to replicate the study. The *Results* section should include only results and not discussion of the data. The *Discussion* section should discuss the results, but not repeat them. The *Conclusions* section should consist of succinct, numbered statements that are supported by the results of the study. They should not repeat the *Results* section. Clinical articles and case reports should include: brief unstructured *Abstract*, brief *Introduction, Description of Case or Clinical Technique, Discussion* (if any), *Acknowledgments* (if

any), and *References* (if any). Literature reviews should include a brief unstructured *Abstract*, *Introduction*, the *Review of the Literature* with appropriate subheadings, *Discussion*, *Conclusions*, *Acknowledgments*, and *References*.

Abstracts

All submissions must include an abstract. Abstracts should be brief providing the reader with a concise but complete summary of the paper. Generalizations such as “methods were described” should not be used. Scientific articles should have a structured abstract of approximately 200 words with the following sections: *Purpose*, *Methods*, *Results*, and *Conclusions*. Clinical articles, case reports, and literature reviews should have an unstructured abstract consisting of not more than 150 words.

Editorial style

Papers will be published in English, using American spelling. Manuscripts must be submitted with proper English grammar, syntax, and spelling. Authors should express their own findings in the past tense and use the present tense where reference is made to existing knowledge, or where the author is stating what is known or concluded. Footnotes should be avoided and their content incorporated into the text. Numbers should be represented as digits; only numbers beginning a sentence should be spelled out. The editors reserve the right to revise the wording of papers in the interest of the journal’s standards of clarity and conciseness.

Units of measure: Authors should express all quantitative values in the International System of Units (SI units) unless reporting English units from a cited reference. Figures and tables should use SI units, with any necessary conversion factors given in legends or footnotes. All numbers should be expressed as digits, and percent values should be expressed as whole numbers. Laboratory data values should be rounded to the number of digits that reflects the precision of the results and the sensitivity of the measurement procedure.

Statistical tests: The results of all statistical comparisons should be reported to include the statistical test value and the associated *P* value and confidence interval, if appropriate. If $P > .01$, the actual value for *P* should be expressed to 2 digits, whether or not *P* is significant, unless rounding a significant *P* value expressed to 3 digits would make it nonsignificant (eg, $P = .049$, not $P = .05$). If $P < .01$, it should be expressed to 3 digits (eg, $P = .003$, not $P < .05$). Actual *P* values should be expressed unless $P < .001$, in which case they should be so designated. Nonsignificant values should not be expressed as “NS.” For confidence intervals, the number of digits should equal the number of digits in the point estimate. For example, for an odds ratio of 3.56, the 95% confidence interval should be reported as “1.23, 5.67,” not as “1.234, 5.678.”

Tooth names: The complete names of individual teeth should be given in full in the text of articles using the following convention: [primary/permanent] [maxillary/mandibular] [right/left] [central/lateral or first/second/third] [tooth type]. Examples: “primary maxillary right first molar,” “permanent mandibular first molars,” but “mandibular right second premolar.” In tables these names may be abbreviated by the Universal system (A-T for primary teeth, 1-32 for permanent teeth).

Commercially-produced Materials: Any mention of commercially produced materials, instruments, devices, software, etc, must be followed by the name of the manufacturer and the manufacturer’s location in parentheses. Example: “... in an Excel spreadsheet (Microsoft, Inc, Redmond, Wash).”

Abbreviations: Abbreviations should be used to make manuscripts more concise. The first time an abbreviation appears, it should be placed in parentheses following the full spelling of the term (eg, “...permanent first molars (PFMs)...”). In manuscripts using more than three abbreviations, authors should use bold typeface for the first appearance of each abbreviation.

Permissions

For materials taken from other sources, a written statement from the authors and publisher giving permission to *Pediatric Dentistry* for reproduction must be provided. Waivers and statements of informed consent must accompany the manuscript when it is submitted for review. Waivers should accompany any photograph showing a human subject unless the subject’s features are blocked enough to prevent identification.

Human and Animal Subjects

Manuscripts of research involving human or animal subjects must state in the Methods section that the study was approved by an Institutional Review Board (IRB) or other institutional research ethics committee using language similar to “...this institutionally approved study...” IRB approval for human subjects must also be obtained if the study involved the use of tissues from humans (eg, extracted teeth), or work produced by humans (eg, systematic analyses and meta-analyses). When human

subjects have been used, the text should indicate that informed consent was obtained from all participating adult subjects, and parents or legal guardians of minors or incapacitated adults. If required by the authors' institution, informed assent must be obtained from participating children at or above the age specified by the institution. The cover letter for the manuscript must contain a statement similar to the following: "The procedures, possible discomforts or risks, as well as possible benefits were explained fully to the human subjects involved, and their informed consent was obtained prior to the investigation."

Figures

Graphics/photos should be provided at a minimum resolution of 600 dpi as a .tif or .jpg file. Photomicrographs must include a scale labeled with a convenient unit of length (eg, 50 μ m). Figures should be numbered in Arabic numerals in the order of the first citation in the text. Legends for each figure must be printed on a separate page. Include a key for symbols or letters used in the figures. Figures should be saved as a separate file. Figure legends should be understandable without reference to the text. A key for any symbols or letters used in the figure should be included. Abbreviations should be explained in a footnote to the figure. If illustrations, tables, or other excerpts are included from copyrighted works the author is responsible for obtaining written permission from the copyright holder prior to submitting the final version of the paper. Full credit must be given to such sources with a superscript reference citation in the figure legend. Reference citations in figure legends or captions should follow numerically the reference number in the text immediately preceding mention of the figure. Figures take up additional page space and should be limited to those that add value to the text.

Tables

Tables should be double-spaced, appear on separate pages, and should be titled and numbered in Arabic numerals in the order of the first citation in the text. Short headings should appear at the top of each column. Explanatory matter should be placed in captions, not in the title. For footnotes, use the following symbols in this sequence: *, †, ‡, §. Tables should be understandable without alluding to the text. Due to space limitations, only tables adding value to the text should be included.

Acknowledgments

Funding and other sources of support must be disclosed in the *Acknowledgments* section. Personal acknowledgments should be limited to appropriate professionals who have contributed intellectually to the paper but whose contribution does not justify authorship.

References

References should be relevant to the material presented and identified by superscript Arabic numerals in the text. A list of all references should appear at the end of the paper in numeric order as they are cited in the text. Journal abbreviations are those used by Index Medicus. Reference style is that used by the Journal of the American Dental Association (http://www.ada.org/prof/resources/pubs/jada/authors/auth_general.asp#style). The following are sample references:

Journal: Bogert TR, García-Godoy F. Effect of prophylaxis agents on the shear bond strength of a fissure sealant. *Pediatr Dent* 1992;14:50-1. For journals, list all authors when there are 6 or fewer; when there are 7 or more, list the first 3, then "et al." Page numbers should be elided where possible. For example: 12-8, 347-51, 191-5.

Book: Bixler D. Genetic aspects of dental anomalies. In: McDonald RE, Avery DR, eds. *Dentistry for the Child and Adolescent*. 5th ed. Philadelphia: CV Mosby Co;1987:90-116.

Article, report, or monograph issued by a committee, institution, society, or government agency: *Medicine for the public: Women's health research*. Bethesda, Md.: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health; 2001. DHHS publication 02-4971.

World Wide Web: Centers for Disease Control and Prevention. Water Fluoridation. Available at: "<http://www.cdc.gov/oralhealth/waterfluoridation/index.htm>". Accessed June 18, 2006. Authors citing material from the World Wide Web should use WebCite (www.webcitation.org), a free service for authors who wish to archive their Web references to ensure that cited Web material will remain available to readers in the future. Web citations archived on WebCite will not disappear in the future. Authors should provide direct references to original sources whenever possible. Avoid using abstracts as references. Avoid references to papers accepted but not yet published, if possible. If such a citation is necessary, these papers should be cited as being "in press," and verification that they have been accepted for publication must be provided. Where possible, references of easily accessible material

are preferable to dissertations, theses, and other unpublished documents. Authors should avoid citing “personal communication” unless it provides essential information not available from a public source. In those cases, the name of the individual providing the information and the date of communication should be provided in parentheses in the text and not as a numbered reference. Authors should obtain written permission and confirmation of accuracy from the source of a personal communication; this permission should be submitted as a supplementary document at the time of manuscript submission. Authors should verify the accuracy of all references and are responsible for ensuring that no cited reference contains material that was retracted or found to be in error subsequent to its publication.

Copyright

All authors must agree to the terms of copyright transfer as indicated during the online manuscript submission process. The American Academy of Pediatric Dentistry owns copyright of any contribution. The AAPD and its licensees have the right to use, reproduce, transmit, derivate, publish, and distribute the contribution, in the journal or otherwise, in any form or medium. Authors will not use or authorize the use of the contribution without the AAPD’s written consent, except as may be allowed by US fair use Law.

ANEXO C - INSTRUÇÕES MUTATION RESEARCH REVIEWS

Article structure

http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/506097/authorinstructions

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. **The abstract should be no more than 300 words of size.**

Keywords

Immediately after the abstract, please provide 3-6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature

Authors are requested to adopt the nomenclature system for human gene mutations recommended by the HUGO MDI Nomenclature Working Group. Guidelines for this system can be found at <http://journals.wiley.com/1059-7794/nomenclature.html>.