

GENOTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE DOS RAIOS X EM CRIANÇAS SUBMETIDAS À RADIOGRAFIA PANORÂMICA

Genotoxicity and cytotoxicity of X-rays in children exposed to panoramic radiography

Evelyn Louise Antonio^{a,*}, Aguinaldo José do Nascimento^b, Antonio Adilson Soares de Lima^b, Maria Suely Soares Leonart^b, Ângela Fernandes^b

RESUMO

Objetivo: Analisar a genotoxicidade e a citotoxicidade produzidas por raios X no epitélio da mucosa oral de crianças durante a obtenção da radiografia panorâmica.

Métodos: A amostra foi constituída por 30 crianças saudáveis, sendo 19 do sexo feminino e 11 do masculino, com faixa etária de 4 a 10 anos (média de 7 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 *bud e broken egg*, alterações genotóxicas na forma de micronúcleo e alterações citotóxicas dos tipos picnose, cariólise e cariorrexe.

Resultados: A frequência de picnose, *bud e broken egg* foi significativamente maior após a exposição aos raios X ($p < 0,05$), porém não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao sexo, bem como nas demais alterações estudadas.

Conclusões: A exposição aos raios X emitidos durante a obtenção da radiografia panorâmica pode induzir à morte celular no epitélio da mucosa oral de crianças. Não foi encontrado indício significativo de efeito genotóxico.

Palavras-chave: Anormalidades induzidas por radiação; Genotoxicidade; Crianças.

ABSTRACT

Objective: To assess the genotoxicity and cytotoxicity produced by X-rays in the epithelium of the oral mucosa of infants exposed to panoramic radiography.

Methods: The sample consisted of 30 healthy children, 19 females and 11 males, ranging in age from 4 to 10 years (average of 7 years of age). Oral mucosa cells were collected by liquid-based cytology immediately before and after seven days following the exposure to panoramic radiography. Smears were processed and stained using the modified Feulgen Rossenbeck technique. Bud and broken egg nuclear projections, changes in the form of micronuclei, and genotoxic and cytotoxic changes of pyknosis, karyorrhexis and karyolysis were analyzed and quantified.

Results: The frequency of pyknosis, buds and broken eggs was significantly higher after exposure to X-rays ($p < 0.05$), but there was no statistically significant difference regarding gender, as well as in the other changes studied.

Conclusions: Exposure to X-rays emitted during submission to panoramic radiography may induce cell death in the epithelium of children's oral mucosa. No evidence was found for a significant genotoxic effect.

Keywords: Radiation induced abnormalities; Genotoxicity; Children.

*Autor correspondente. E-mail: eantonio@sms.curitiba.pr.gov.br (E.L. Antonio).

^aPrefeitura Municipal de Curitiba, Curitiba, PR, Brasil.

^bUniversidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brasil.

Recebido em 6 de agosto de 2016; aprovado em 1 de dezembro de 2016; disponível on-line em 07 de julho de 2017.

INTRODUÇÃO

A radiação ionizante pode induzir citotoxicidade,¹⁻⁹ genotoxicidade⁴ e carcinogênese^{10,11} em tecidos humanos. Baixas doses de radiação, como a emitida durante a obtenção da radiografia panorâmica,¹² são capazes de provocar efeitos biológicos deletérios e cumulativos em organismos vivos. Dessa forma, o uso de métodos diagnósticos que utilizem radiação ionizante devem ter indicação clínica bem fundamentada,^{13,14} pois os raios X têm efeito deletério sobre as células epiteliais. Além disso, alguns estudos relatam que as crianças podem ser mais suscetíveis aos efeitos danosos dos raios X, quando comparadas aos adultos.¹⁴⁻¹⁶

As alterações genéticas como formações de micronúcleos e aberrações nucleares são efeitos biológicos iniciais da carcinogênese.² Portanto, estudos sobre os efeitos genotóxicos induzidos por raios X no epitélio são importantes para identificar o risco de desenvolvimento do câncer e atuar na sua prevenção,¹⁷ uma vez que o biomonitoramento dos pacientes por meio de citologia esfoliativa permite verificar e acompanhar a presença de atípias celulares antes da ocorrência de manifestações clínicas neoplásicas.

Os micronúcleos são fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros que foram perdidos durante a mitose celular em razão de um evento clastogênico — que provoca quebra cromossômica — ou aneugênico — que interfere no fuso mitótico.¹⁸ Os raios X são agentes clastogênicos e induzem à 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 de câncer.¹⁹ Entretanto, o teste de micronúcleos tem sua especificidade aumentada ao registrar alterações celulares degenerativas indicativas de morte celular^{1,4} como picnose, cariorrexe e cariólise, e as projeções nucleares *bud* e *broken egg*.

O objetivo deste estudo foi verificar se os raios X emitidos durante a obtenção da radiografia panorâmica podem induzir aumento da frequência de micronúcleo, picnose, cariorrexe, cariólise, *bud* e *broken egg* no epitélio da mucosa oral de crianças.

MÉTODO

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 4 e 10 anos — média de 7 anos de idade —, encaminhadas pela clínica de Odontopediatria da UFPR para realização da radiografia panorâmica. Os responsáveis legais pelas crianças autorizaram o estudo por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE).

Os responsáveis preencheram um questionário com os seguintes dados sobre a criança: idade, sexo, histórico de exposição prévia à radiação X, uso de enxaguatório bucal contendo álcool, uso de medicações, presença de doenças sistêmicas ou de alterações que comprometessem a mucosa oral. Foram incluídas na amostra crianças autorizadas a participar do estudo pelos responsáveis legais, que tivessem até dez anos de idade, de ambos os sexos. Foram excluídas da amostra crianças com mais de 10 anos de idade — por motivos hormonais — e/ou que apresentassem uma das seguintes condições observadas há menos de 28 dias: submissão à radiação ionizante; uso de enxaguatório bucal contendo álcool; presença de alterações na mucosa; uso de medicação ou manifestação de doença capaz de interferir no núcleo celular. A exposição prévia a esses fatores genotóxicos implicaria em aumento da frequência de alterações nucleares durante o *turnover* celular, que ocorre a cada 7 até 28 dias. As radiografias panorâmicas foram realizadas no Serviço de Radiologia Odontológica da UFPR em aparelho radiológico extrabucal da marca *Siemens*, modelo Orthophos CD, com regime de 60 Kv, 16 mA e 14,1 s.

A coleta das células epiteliais maduras da mucosa oral das crianças foi realizada imediatamente antes da obtenção da radiografia panorâmica e sete dias¹⁷ após a sua realização. Procedeu-se a uma leve raspagem na mucosa jugal do lado direito, com movimento de cinco rotações em sentido horário e suave pressão manual, utilizando-se escova citológica cilíndrica (Cervical Brush[®], Kolplast, São Paulo, Brasil), 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* modificado.²⁰ A confecção das lâminas foi realizada de forma padronizada^{9,18} por um único técnico em um único dia.

As lâminas, após cegamento de suas identificações, foram analisadas 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 parâmetro de genotoxicidade. Para a análise das alterações *broken egg*, *bud*, picnose, cariorrexe e cariólise foram utilizados os critérios descritos por Tolbert et al.¹⁷ Para cada lâmina foram analisadas mil células viáveis¹⁸ por um único observador experiente. As alterações celulares analisadas estão ilustradas na Figura 1.

Para a comparação das médias, utilizou-se o teste *t* de Student para amostras pareadas. A significância estatística foi estabelecida para $p < 0,05$.

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 egg* ($p=0,005$), *bud* ($p=0,006$) e picnose ($p=0,039$) foi significativamente maior após a exposição aos raios X. Não foram observadas diferenças significantes quanto ao sexo dos participantes.

DISCUSSÃO

No geral, crianças são mais suscetíveis a agentes tóxicos do que os adultos,²² portanto, a radiação ionizante pode ser um agente mutagênico com ações cumulativas.²³ 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 esses eventos.³ Embora a dose de radiação recebida durante a obtenção da radiografia panorâmica seja baixa,¹⁵ deve-se considerar que crianças são mais radiosensíveis do que adultos.²⁴ Dessa forma, o efeito cumulativo de pequenas doses sobre tecidos sensíveis poderia desencadear efeitos citotóxicos, resultando em agressão celular crônica, proliferação celular compensatória, desenvolvimento de tumores e carcinogênese.²

Apesar das considerações supramencionadas, Ribeiro et al.⁶ demonstraram haver aumento de alterações citotóxicas similares

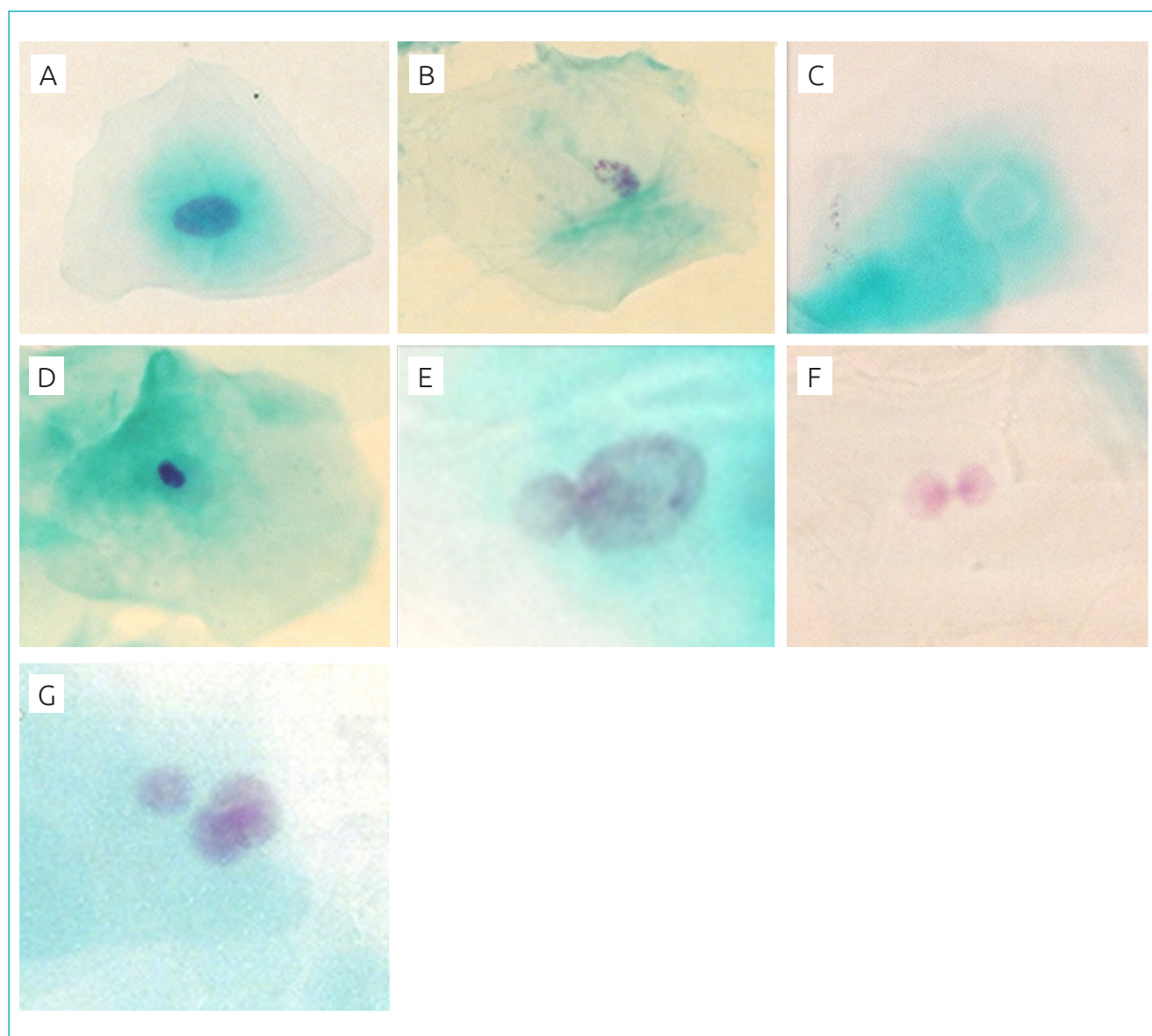


Figura 1 Alterações nucleares analisadas: (A) núcleo normal; (B) cariorrexe; (C) cariólise; (D) picnose; (E) *bud*; (F) *broken egg*; (G) micronúcleo.

em crianças e adultos submetidos à radiografia panorâmica. Os autores 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 observando-se efeitos de citotoxicidade após a exposição aos raios X e também aumento significativo de outras alterações nucleares degenerativas: *bud* e *broken egg*, diferentemente do encontrado por esses autores. Dessa forma, é necessária a realização de mais estudos sobre os efeitos dos raios X em crianças, observando suas implicações em 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 oral,¹⁻⁹ mas não causam aumento na frequência de micronúcleos.^{1-9,19} Esses dados são semelhantes aos observados neste estudo. Todavia, Cerqueira et al.⁴ encontraram alta frequência de micronúcleos em células do epitélio gengival após exposição à radiação, associando esse achado ao fato das células da gengiva serem diretamente atingidas pelos raios X durante a obtenção da radiografia panorâmica. Entretanto, 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 necessários 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. Contudo, baixas doses de radiação X são

capazes de induzir quebra de DNA, mas não resultam necessariamente em micronúcleos.²⁵ Neste estudo, a quantidade de micronúcleos e as 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 os eventos citotóxicos diminuírem a viabilidade celular, ocasionando sua morte por apoptose, esteja relacionado à baixa frequência de células micronucleadas encontradas.^{1,2}

Este estudo demonstrou aumento significativo na frequência de *bud*, *broken egg* 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 obscuro,²⁶ podendo estar relacionado ao 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} A última 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 e indicam degeneração celular por intenso amadurecimento ou envelhecimento precoce ligado a um forte processo inflamatório, causando a morte das células afetadas.

A morte celular por apoptose pode ocorrer em razão da grande quantidade de lesões causadas ao DNA da célula, tornando-a funcionalmente inviável ao organismo. A ocorrência sucessiva desses 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 maligna.³⁰ Dessa 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 celulares.³¹

Apresenta-se como limitação deste estudo o fato da análise microscópica das alterações nucleares ter sido efetuada por um único observador experiente. Considera-se que, apesar da

Tabela 1 Frequência de alterações nucleares em crianças expostas à radiografia panorâmica.

| Exposição a raio X | Parâmetros | Normal | Micronúcleo | Cariólise | Cariorrexe | Picnose* | <i>Bud</i> * | <i>Broken egg</i> * | Total |
|--------------------|---------------|--------|-------------|-----------|------------|----------|--------------|---------------------|--------|
| Antes | Média | 1735,2 | 2,1 | 69,8 | 9,5 | 9,1 | 6,0 | 1,6 | 1833,3 |
| | Desvio padrão | 718,0 | 2,0 | 36,0 | 6,0 | 6,7 | 4,4 | 2,0 | 744,1 |
| Depois | Média | 2134,3 | 2,6 | 78,6 | 10,9 | 13,8 | 8,8 | 3,6 | 2251,3 |
| | Desvio padrão | 1129,2 | 2,3 | 40,8 | 7,2 | 10,8 | 4,7 | 3,7 | 1175,9 |

*Diferenças estatisticamente significativas – teste *t* de Student para amostras pareadas, $p < 0,05$. Dados expressos em %.

aplicação da calibração intraexaminador e da criteriosa análise das lâminas, é recomendável a comparação dos dados interexaminadores, conforme preconizado no protocolo descrito por Thomas et al.²³

A radiografia panorâmica é considerada o exame de eleição para avaliação inicial de crianças acima de cinco anos de idade em odontologia, pois permite uma observação ampla do complexo bucomaxilofacial e expõe a criança a uma menor dose de radiação X, comparada a um levantamento radiográfico intra-bucal.¹⁴ Todavia, deve ser indicada apenas quando necessária, utilizando-se técnica radiográfica apurada e seguindo os critérios de radioproteção vigentes, a fim de se evitar repetições desnecessárias.^{3,14} Essas recomendações podem ser extrapoladas a

todos os exames que utilizem radiação ionizante como método diagnóstico complementar. Os resultados obtidos sugerem que os raios X emitidos durante a obtenção da radiografia panorâmica induzem a alterações nas células do epitélio da mucosa oral de crianças. Portanto, ao indicar esse exame de imagem, o profissional deve levar em consideração o risco de promover alterações cromossômicas no epitélio a cada exposição.

Financiamento

O estudo não recebeu financiamento.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

1. Cerqueira EM, 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 EM, Meireles JR, Lopes MA, Junqueira VC, Gomes-Filho IS, Trindade S, et al. 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 TC, Carlin V, Oshima CT, 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.* 2010;14:669-74.
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.* 2011;15:357-60.
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 MM, 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 JA, Copper MP, Braakhuis BJ, Snow GB, Baak JP. 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, et al. 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 Nukleinsäure 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, Mazzotti D, Tomanin R, Levis AG. 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. Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, Fenech M. Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*. 2009;4:825-37.
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 Cien Saude*. 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. Nersesyanyan 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.