



Avaliação da lesão genética induzida por exposição a radiação ionizante utilizando o ensaio do micronúcleo em células da mucosa jugal

Daniel Filipe Geraldo Esteves

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em

Tecnologias Biomédicas

Orientador: Doutora Octávia Gabriela da Silva Viegas Nené Monteiro Gil

Orientador externo: Mestre Ana Paula Rei Madeira Ribeiro

Júri

Presidente: Professora Doutora Patrícia Margarida Piedade Figueiredo

Orientador: Doutora Octávia Gabriela da Silva Viegas Nené Monteiro Gil

Vogal: Professor Doutor Nuno Filipe da Rocha Guerreiro de Oliveira

Novembro de 2016

Agradecimentos

Concluindo a realização deste estudo no âmbito do mestrado em Tecnologias Biomédicas do Instituto Superior Técnico quero agradecer a todas as pessoas que me apoiaram na realização da dissertação, terminando assim uma grande etapa da minha vida.

Inicialmente quero agradecer às minhas orientadoras, Mestre Ana Paula Madeira Ribeiro e Doutora Octávia Monteiro Gil que me deram toda a orientação e disponibilidade para conseguir ultrapassar todos os obstáculos ao longo deste trabalho, assim como um grande apoio a nível profissional e pessoal, sem os quais este trabalho não teria sido realizado, um muito obrigado por tudo. Também quero agradecer ao Doutor Pedro Vaz, coordenador do Grupo de Protecção e Segurança Radiológica do IST/CTN, pelo apoio à concretização desta dissertação.

Ao Dr. Rui Sequeira Aguiar da Clínica Dentopraxis que foi um grande apoio na fase inicial do estudo, dada a sua orientação e aconselhamento na recolha de amostras, um muito obrigado.

Ao Dr. Francisco Proença e à Enfermeira Manuela Rodrigues que foram imprescindíveis para a realização do estudo no Centro Hospitalar de Lisboa Central, EPE - Hospital São José em Lisboa, serviço de Estomatologia. Também não posso deixar de agradecer a toda a equipa do serviço de Estomatologia que me orientaram e apoiaram na seleção de dadores para a recolha das amostras. Quero agradecer à Dra. Ana Rita Simão, Dr. Fernando Fernandes, Dr. Manuel Ribeiro, Dr. António Lourenço, Dra. Ludmila Kalachinskova, Dr. Luís Fonseca, Dr. Nuno Leão Mendes e à Dra. Patrícia Caxeirinho. Obrigado pelo vosso apoio.

Um agradecimento especial a todos os dadores que se disponibilizaram a participar no estudo e que tornaram possível a sua realização, muito obrigado.

No Grupo de Protecção e Segurança Radiológica do IST/CTN não posso deixar de agradecer o grande apoio por parte da Mestre Ana Catarina Antunes e da Dra. Vanda Martins que me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho. Assim como ao Yuri, Salvatore, Mariana, Ana, Sílvia, que me integraram desde o início do estudo no seu ambiente, a todos vós um muito obrigado.

Aos meus Pais, Isabel e Delfim, que sem eles nunca teria chegado onde cheguei, pelo apoio incondicional que sempre me deram, carinho, força e dedicação. Obrigado por tudo, pelos momentos menos bons que tive de ultrapassar e que me ajudaram a crescer, assim como pelos momentos de alegria que sempre partilhamos. Nunca poderia deixar de agradecer também ao meu irmão Duarte e à minha avó Antónia, pelos momentos alegres que sempre trouxeram descontração e pelo apoio nas alturas mais difíceis do percurso.

Por fim, quero agradecer a todos os meus Amigos que sempre me apoiaram nos bons e nos maus momentos ao longo do meu percurso académico.

Resumo

O ortopantomógrafo é utilizado essencialmente na deteção e avaliação de patologias estomatológicas, sendo a ortopantomografia um exame radiológico frequente. Este tipo de exames envolve uma exposição do paciente a baixas doses de radiação ionizante. A avaliação da formação de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa jugal é um procedimento não-invasivo que pode dar uma ideia das lesões genéticas induzidas pela radiação ionizante. Os micronúcleos são biomarcadores de lesão genotóxica e de instabilidade cromossómica. De modo atingir esse objetivo, implementámos e validámos a técnica para avaliar a formação dos micronúcleos nas células esfoliadas da mucosa jugal em laboratório.

No estudo realizado avaliou-se a frequência de micronúcleos em células da mucosa jugal de 60 indivíduos. Destes, 20 indivíduos serviram como grupo de controlo, 20 foram submetidos a uma ortopantomografia no Centro Hospitalar de Lisboa Central, EPE - Hospital de São José, em Lisboa, e por fim, 20 indivíduos tinham hábitos tabágicos como rotina diária.

No grupo exposto a radiação ionizante proveniente do exame de ortopantomografia foram observadas diferenças estatisticamente significativas na frequência de micronúcleos ($p=0,028$) quando se comparam as amostras obtidas antes ($0,004 \pm 0,003$) e 10 dias após ($0,005 \pm 0,002$) a realização do exame, indicando que o exame induz lesão cromossómica. No grupo de fumadores foi verificado um aumento da frequência de micronúcleos ($0,005 \pm 0,004$) em comparação com o grupo de controlo ($0,002 \pm 0,001$), apresentando uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,001$).

O ensaio do micronúcleo em células da mucosa jugal foi implementado no nosso laboratório com sucesso, permitindo a avaliação da lesão induzida pela exposição a radiação ionizante nos exames de ortopantomografia.

PALAVRAS-CHAVE: Radiação ionizante, Ortopantomografia, Células da mucosa jugal, Técnica do micronúcleo, Doses baixas.

Abstract

Orthopantomography, using low doses of ionizing radiation, is a frequently employed radiological examination being essential for the detection and evaluation of oral pathologies. The evaluation of micronuclei formation in the oral mucosa exfoliated cells is a non-invasive procedure that can give an idea of the damage caused by ionizing radiation, since they are biomarkers of genotoxic events and chromosomal instability. To achieve this goal, we have implemented and validated the technique to evaluate micronuclei formation in oral mucosa exfoliated cells in laboratory.

This study focused on the analysis of the micronuclei frequency in oral mucosa cells of 60 individuals, in which 20 individuals are controls, 20 were submitted to orthopantomography exam at the Centro Hospitalar de Lisboa Central - Hospital de São José in Lisbon and 20 individuals are smokers.

Statistically significant differences were observed ($p=0.028$) between micronuclei yields obtained before (0.004 ± 0.003) and 10 days after (0.005 ± 0.002) the orthopantomography, indicating that the exposure to ionizing radiation due to the exam induce chromosomal damage. In smoking group there was an increase in micronuclei frequency (0.005 ± 0.004) compared with the control group (0.002 ± 0.001), being this difference statistically significant ($p=0.001$).

The micronuclei assay was successfully implemented in our laboratory for oral mucosa cells, allowing the assessment of the damage induced by exposure to ionizing radiation in orthopantomographies.

KEYWORDS: Ionizing radiation, Orthopantomography, Buccal mucosa cells, Micronuclei assay, Low doses.

Índice

CAPÍTULO 1	1
Introdução	1
1.1 Radiação ionizante	1
1.1.1 Tipos de radiação ionizante.....	2
1.2 Ortopantomografia.....	3
1.2.1 Ortopantomógrafo.....	4
1.2.1.1 Características do ortopantomógrafo	5
1.2.2 Doses de radiação ionizante utilizadas nos exames de ortopantomografia	6
1.2.3 Efeitos biológicos da radiação ionizante	6
1.2.4 Proteção radiológica	7
1.2.5 Limites de dose.....	7
1.2.6 Dosimetria.....	8
1.3 Interação da radiação com o sistema biológico	9
1.4 Mucosa jugal.....	10
1.4.1 Constituição da mucosa jugal.....	11
1.4.2 Tipos de célula existentes na mucosa jugal	12
1.5 Avaliação da lesão genética.....	15
1.5.1 Micronúcleos.....	15
1.6 Objetivos do estudo.....	17
CAPÍTULO 2	19
Materiais e Métodos	19
2.1 Amostra	19
2.1.1 Considerações éticas	20
2.2 Otimização do protocolo para a técnica dos micronúcleos em células da mucosa jugal	21
2.3 Colheita de células na mucosa jugal	23
2.4 Técnica dos micronúcleos	23
2.5 Critérios de leitura	24
2.6 Análise estatística.....	24

CAPÍTULO 3	25
Resultados	25
3.1 Grupo controlo	26
3.1.1 Comparação entre dadores do grupo controlo	27
3.2 Grupo exposto à radiação ionizante	28
3.2.1 Comparação entre dadores do grupo exposto à radiação ionizante	31
3.3 Grupo de fumadores	34
3.3.1 Comparação entre dadores do grupo de fumadores	34
3.4 Células binucleadas	36
CAPÍTULO 4	39
Discussão dos resultados	39
4.1 Células mononucleadas	39
4.1.1 Grupo controlo	39
4.1.2 Grupo exposto à radiação ionizante	40
4.1.3 Grupo de fumadores	42
4.2 Células binucleadas	43
CAPÍTULO 5	45
Conclusões e Trabalhos Futuros	45
CAPÍTULO 6	47
6.1 Bibliografia	47
6.1.1 Referências eletrónicas	54

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Intervalo de fatores técnicos e estimativa da dose efetiva associada, indicados no programa standard do Ortopantomógrafo - Orthopantomograph® OP 200	6
Tabela 2 - Limite de doses para exposição ocupacional e membros do público	8
Tabela 3 - Fator de ponderação para os diferentes tipos de radiação	9
Tabela 4 - Fator de ponderação para os diferentes tipos de tecidos	9
Tabela 5 - Caracterização da amostra do estudo.	19
Tabela 6 - Número de cigarros consumidos por dia pelos dados do grupo de fumadores.	20
Tabela 7 - Caracterização e distribuição dos micronúcleos no grupo controlo.	26
Tabela 8 - Distribuição do número de micronúcleos entre o género masculino e feminino do grupo controlo.	27
Tabela 9 - Comparação e distribuição do número de micronúcleos entre as faixas etárias do grupo controlo.	27
Tabela 10 - Caracterização e distribuição dos micronúcleos no grupo exposto à radiação ionizante, antes e após a realização do mesmo.	29
Tabela 11 - Comparação entre os dados do género feminino e masculino antes e depois do exame de ortopantomografia tendo em conta a distribuição do número de micronúcleos.	31
Tabela 12 - Comparação do número de micronúcleos entre grupos etários antes e depois da realização do exame.	32
Tabela 13 - Caracterização e distribuição dos micronúcleos no grupo de fumadores.	34
Tabela 14 - Distribuição do número de micronúcleos entre o género masculino e feminino do grupo de fumadores.	35
Tabela 15 - Distribuição do número de micronúcleos nas faixas etárias do grupo de fumadores.	35
Tabela 16 - Número de células binucleadas no grupo de controlo.	36
Tabela 17 - Número de células binucleadas antes e após do exame de ortopantomografia no grupo exposto.	37
Tabela 18 - Número de células binucleadas no grupo de fumadores.	38
Tabela 19 - Valor médio de micronúcleos, de diferentes grupos controlo de estudos em células da mucosa jugal.	39
Tabela 20 - Fatores técnicos associados aos exames de ortopantomografia em diferentes estudos.	40

Lista de Figuras

Figura 1 - Efeito da radiação ionizante.....	1
Figura 2 - Capacidade de penetração de diferentes tipos de radiação ionizante	2
Figura 3 - Ortopantomógrafo	3
Figura 4 - Ilustração de uma ortopantomografia	4
Figura 5 - Ilustração do funcionamento de um ortopantomógrafo. a) Início do ciclo do exame; b) Ciclo do exame incompleto; c) Ciclo do exame completo.....	4
Figura 6 - Movimento da ampola e do recetor em torno do paciente e criação da imagem panorâmica	5
Figura 7 - Modos de ação da radiação ionizante	10
Figura 8 - Ilustração da cavidade oral	11
Figura 9 - Estrutura da mucosa jugal	11
Figura 10 - Esquema da secção transversal da mucosa jugal	12
Figura 11 - Ilustração dos diferentes tipos de células que fazem parte da constituição da mucosa jugal, visualizadas no estudo de Thomas <i>et al.</i> , (2009). a) Célula basal; b) Célula diferenciada; c) Célula diferenciada precoce c/ 1 MN (seta); d) Célula diferenciada tardia c/ 1 MN (seta); e) Célula diferenciada c/ 1 NBUD (seta); f) Célula binucleada; g) Célula de cromatina condensada; h) Célula cariorrética; i) Célula picnótica; j) Célula cariolítica.....	14
Figura 12 - Sequência da origem dos vários tipos de células que constituem a mucosa jugal.....	14
Figura 13 - Esquema da formação dos micronúcleos (setas vermelhas).....	16
Figura 14 - Imagens de micronúcleos (setas) visualizados neste trabalho: a) Célula mononucleada com 1 micronúcleo; b) Célula mononucleada com 2 micronúcleos; c) Célula mononucleada com 3 micronúcleos.	25
Figura 15 - Imagens de uma célula binucleada (a) e de uma célula mononucleada (b), contabilizadas neste trabalho.....	25
Figura 16 - Imagens de células mononucleadas e binucleadas sem e com contaminação a) e b) respetivamente. Na imagem a) observa-se um micronúcleo (seta).	26
Figura 17 - Frequência de micronúcleos nos grupos etários do grupo de controlo.....	28
Figura 18 - Distribuição da frequência de micronúcleos no grupo exposto à radiação ionizante.....	30
Figura 19 - Frequência de micronúcleos antes e após o exame de ortopantomografia	30
Figura 20 - Comparação da frequência de micronúcleos nos dados do género feminino e masculino, antes e depois do exame.	32
Figura 21 - Comparação entre os grupos etários, antes e após o exame de ortopantomografia.	33

Lista de Abreviaturas e Acrónimos

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

ALARA – As Low As Reasonably Achievable

BN – Células Binucleadas

CB – Célula Basal

CD – Célula Diferenciada

CE – Célula Estaminal

D – Dose absorvida

E – Dose efetiva

F – Feminino

g – Aceleração gravítica

GC – Grupo de controlo

GE – Grupo exposto à radiação ionizante

GF – Grupo de fumadores

H_T – Dose equivalente

ICRP – International Commission on Radiological Protection

IST/CTN – Instituto Superior Técnico / Campus Tecnológico e Nuclear

M – Masculino

min – minutos

MN – Micronúcleo

mono – Células mononucleadas

M_T – Massa do tecido ou órgão

NBUD – Nuclear Buds

PBS – Phosphate Buffered Saline

RI – Radiação Ionizante

rpm – Rotações por minuto

Sv – Sievert

UNSCEAR – United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation

W_R – Fator de ponderação da radiação

W_T – Fator de ponderação do tecido

ϵ_T – Energia transmitida

CAPÍTULO 1

Introdução

A radiação ionizante (RI) está presente no nosso cotidiano como uma ferramenta fundamental na realização de exames de diagnóstico e em terapia. Atualmente, a utilização da RI é cada vez mais frequente em diversas atividades, aumentando assim a exposição da população em geral. A sua utilização em diversas aplicações médicas, oferece uma inestimável resposta no desenvolvimento de métodos de diagnóstico cada vez mais precisos, perante a grande diversidade de patologias existentes. As radiografias realizadas na cavidade oral são consideradas um instrumento valioso de auxílio aos profissionais de saúde, para a realização do diagnóstico. Considerando este tipo de exames como o primeiro patamar de recurso no diagnóstico estomatológico e maxilofacial, a análise deste tipo de exames irá determinar o melhor caminho a seguir durante a fase de tratamento do paciente.

A descoberta da RI e dos materiais radioativos levou a um avanço no diagnóstico médico e no tratamento de várias patologias. Assim, torna-se necessário analisar os benefícios e os riscos dos procedimentos radiológicos, tendo em conta o ganho que daí pode advir para os pacientes (IAEA, 2004).

1.1 Radiação ionizante

As radiações podem ser classificadas de acordo com os efeitos produzidos na matéria. Por definição, a RI possui a capacidade de remover elétrons de uma molécula (Jin *et al.*, 2010) ou de um átomo, libertando partículas eletricamente carregadas (Figura 1), que têm a capacidade de induzir efeitos biológicos (IAEA, 2010). A grande maioria das lesões provenientes da RI em sistemas biológicos, são causadas pela passagem dos elétrons através das moléculas dos tecidos biológicos, dando origem ao processo de ionização (Joiner e Kogel, 2009). Contudo, existem grandes evidências de que os raios-X podem induzir alterações genéticas e causar lesões no ácido desoxirribonucleico (ADN) (Angelieri *et al.*, 2007; Ribeiro, 2012).

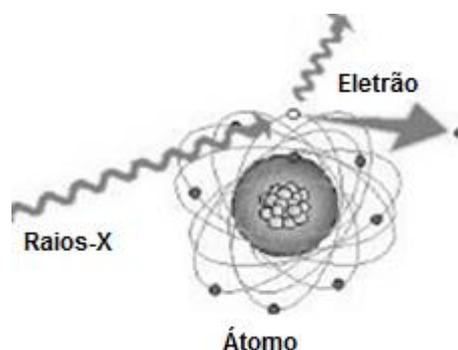


Figura 1 - Efeito da radiação ionizante (Adaptado de URL 1, 2016).

1.1.1 Tipos de radiação ionizante

Existem vários tipos de RI, partículas alfa, partículas beta, raios gama, raios-X (URL 2, 2003) e os neutrões (Antunes, 2012) (Figura 2), com diferentes capacidades de penetração.

As partículas alfa são partículas emitidas durante a desintegração nuclear de determinados radionuclídeos, constituídas por dois neutrões e dois prótons, sendo idênticas ao núcleo de um átomo de hélio. Este tipo de partículas perde rapidamente a sua energia sendo facilmente absorvidas por uma folha de papel (IAEA, 2010).

Partículas beta, são partículas que podem ter carga positiva ou negativa, emitida na desintegração nuclear de alguns radionuclídeos (IAEA, 2011). Possuem maior penetração que as partículas alfa, mas o seu alcance em tecidos biológicos é bastante limitado. Podem ser absorvidas pelo plástico, vidro ou metal. No tecido biológico, normalmente, não penetram para além da camada superior da pele podendo contudo causar queimaduras na mesma (IAEA, 2004, 2010).

A radiação gama, são fótons de elevada energia (IAEA, 2004) e não possuem massa nem carga. Esta radiação é emitida por núcleos instáveis, havendo libertação de radiação beta (URL 2, 2003). Os raios gama são mais penetrantes do que as partículas carregadas (IAEA, 2011), conseguem atravessar materiais muito densos como o chumbo, apresentando um elevado risco de exposição para o corpo humano (URL 2, 2003).

Os raios-X, são considerados fótons de alta energia assim como a radiação gama. São produzidos artificialmente por um feixe de eletrões, têm capacidade de penetrar em materiais densos e em tecidos biológicos (IAEA, 2004).

Por fim, os neutrões são considerados partículas sem carga elétrica, com massa semelhante à do próton (IAEA, 2004). Estas partículas são mais penetrantes que as partículas carregadas, e são considerados como RI indireta, pois não podem participar nas interações eletrostáticas devido à ausência de carga (IAEA, 2010), havendo a emissão de partículas beta e radiação gama quando interagem com a matéria (Antunes, 2012).

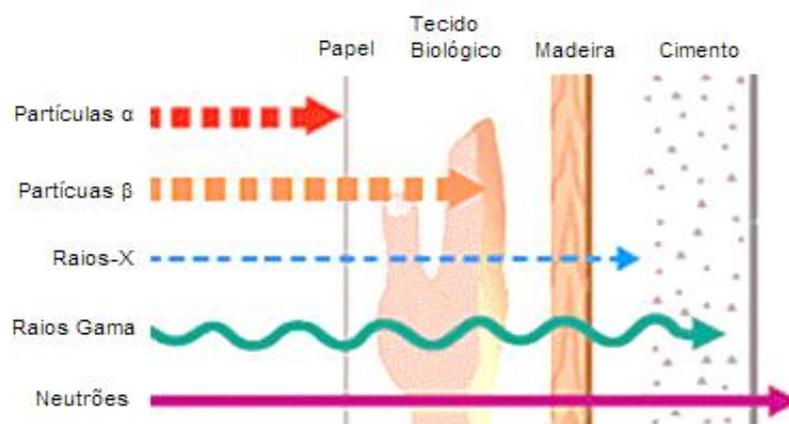


Figura 2 - Capacidade de penetração de diferentes tipos de radiação ionizante (URL 3, 2014).

1.2 Ortopantomografia

A ortopantomografia é um exame complementar de diagnóstico realizado no ortopantomógrafo (Figura 3), um equipamento específico em radiologia convencional, caracterizado por uma técnica de imagem capaz de reproduzir uma estrutura anatômica curva, numa imagem plana e bidimensional. Também conhecida como imagem panorâmica, a ortopantomografia é um dos exames complementares de diagnóstico mais realizados (Toossi *et al.*, 2012). Segundo Rushton e Horner (1996), a imagem dentária representa uma grande inovação no campo da radiologia odontológica, atuando na patologia traumática e na lesão aguda ou crónica da cavidade oral. A ortopantomografia (Figura 4), segundo White e Pharoah (2014), permite uma avaliação da estrutura dentária, maxilares, sistema mastigatório, das articulações temporo mandibulares e dos seios maxilares. Estando envolvida em várias especialidades médico-cirúrgicas, tais como a estomatologia, maxilofacial e ortodontia.



Figura 3 - Ortopantomógrafo (Adaptado de User Manual & Technical Specifications (2006)).

As principais vantagens deste exame são:

- Visualização plana e ampla das estruturas ósseas, dentárias e da cavidade oral;
- Aplicável mesmo em doentes com limitações de funcionalidade da cavidade oral;
- Utilização de doses baixas de RI;
- Pouco tempo de exposição;
- Planeamento de tratamento e controlo.



Figura 4 - Ilustração de uma ortopantomografia (White e Pharoah, 2014).

Por outro lado este tipo de exame também apresenta algumas desvantagens:

- Não é útil para detetar pequenas lesões de cáries ou doenças periapicais;
- Superfícies próximas dos pré-molares podem ficar sobrepostas;
- A imagem não exhibe um detalhe anatómico preciso;
- Presença de estruturas sobrepostas podem esconder algumas lesões, no caso da coluna cervical (White e Pharoah, 2014).

1.2.1 Ortopantomógrafo

A imagem do exame de ortopantomografia é obtida através do movimento recíproco da ampola de raios-X e do recetor de imagem, em torno de um ponto ou plano central, numa trajetória circular (Figura 5) (White e Pharoah, 2014).

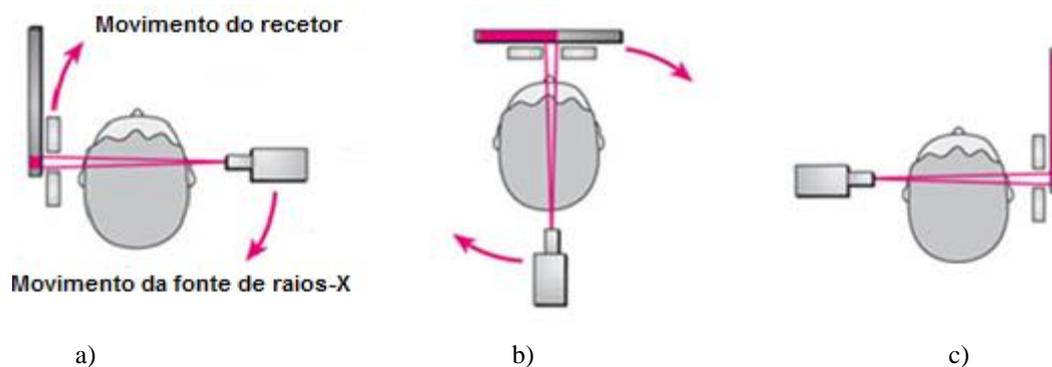


Figura 5 - Ilustração do funcionamento de um ortopantomógrafo. a) Início do ciclo do exame; b) Ciclo do exame incompleto; c) Ciclo do exame completo (Adaptado de Whaites e Drage, 2013).

Durante o movimento da ampola de raios-X, existe a emissão de um feixe estreito de radiação ao longo de um plano vertical. O eixo de rotação está localizado no interior da cavidade oral do paciente. Uma série de imagens são captadas pelo recetor que se movimenta de forma coordenada com a ampola de raios-X. As diversas projeções geradas dão origem à imagem plana da superfície curva da cavidade oral (Figura 6) (Oliveira, 2004).

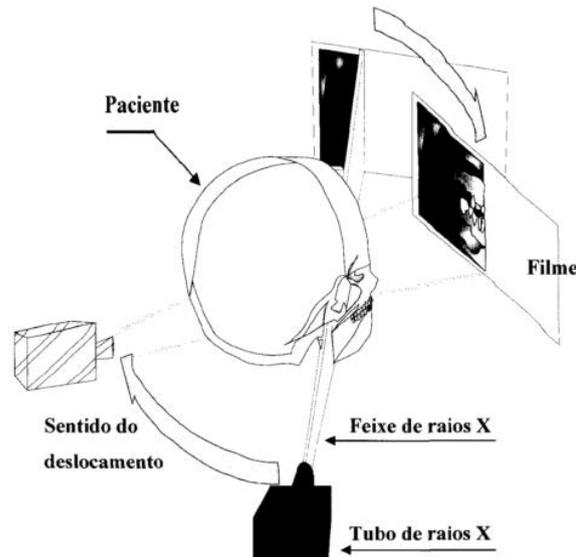


Figura 6 - Movimento da ampola e do recetor em torno do paciente e criação da imagem panorâmica (Oliveira, 2004).

1.2.1.1 Características do ortopantomógrafo

O ortopantomógrafo baseia-se no princípio da tomografia linear (deslocação do conjunto ampola e recetor em sentidos opostos, com o eixo do movimento num plano constante) e adapta esta técnica a um movimento coordenado da ampola e do recetor no sentido horário proporcionando um aumento da nitidez na imagem, segundo o plano selecionado, com a eliminação das estruturas que estão em planos abaixo ou acima do plano de estudo. A grande amplitude do movimento à volta do paciente permite um ângulo suficientemente abrangente que aborda a espessura da estrutura anatómica que está a ser avaliada. Desta forma a desfocagem dos planos adjacentes ao plano de interesse aumenta e a nitidez da imagem panorâmica também. O desenvolvimento da radiografia panorâmica baseia-se ainda na técnica de *slot* que consiste na regulação simultânea, do diafragma primário e secundário que delimita o feixe de raios-X à saída da ampola, diminuindo assim a radiação difusa, a exposição do paciente e aumenta o contraste da imagem.

A especificidade dos equipamentos para estudos ortopantomográficos permite uma qualidade de imagem com elevada importância para a exatidão do diagnóstico, ao mesmo tempo que proporciona uma baixa dose de exposição no paciente (Pasler e Visser, 2001).

1.2.2 Doses de radiação ionizante utilizadas nos exames de ortopantomografia

Os valores de dose de RI em radiografias dentárias são considerados baixos, na gama de 1,9 - 36 μSv . Segundo o relatório UNSCEAR (2012), são consideradas doses baixas de RI as que possuem valor igual ou inferior a 100 mSv, como os aplicados nos exames de ortopantomografia.

Neste tipo de exames a dose estimada para cada paciente depende da estrutura facial do indivíduo. Os equipamentos de ortopantomografia possuem tabelas específicas com valores de dose efetiva, resultantes dos fatores técnicos (kV e mA) adequados ao morfotipo de cada paciente (Tabela 1).

Tabela 1 - Intervalo de fatores técnicos e estimativa da dose efetiva associada, indicados no programa standard do Ortopantomógrafo - Orthopantomograph ® OP 200 (Adaptado de User Manual & Technical Specifications, 2006).

kV	mA	μSv	kV	mA	μSv
57	2	1,9	73	8	15,5
63	5	5,7	73	13	23,8
63	10	10,9	73	16	31,7
63	13	12,8	77	5	12,1
66	5	7,2	77	8	18,7
66	13	16,8	77	13	27,1
66	16	21	77	16	35,4
70	5	8,6	81	8	21,1
70	13	20,4	81	13	31,3
70	16	26,5	85	13	36

1.2.3 Efeitos biológicos da radiação ionizante

A exposição do Homem à RI pode provocar efeitos deletérios na saúde. Esses efeitos podem ser agrupados em duas categorias: os efeitos estocásticos e os determinísticos. Os efeitos estocásticos podem conduzir ao aparecimento de doenças hereditárias provocadas por lesões genéticas associadas a exposições crônicas a baixas doses de radiação, considerados como efeitos tardios da RI. Estes efeitos podem provocar mutações genéticas causando replicação de células mutadas, leucemia, tumor da tireoide, tumor da glândula salivar e outros tipos de cancro. Por outro lado, os efeitos determinísticos podem conduzir à morte ou à perda de funções de um órgão ou tecido biológico. Estes efeitos incluem lesões letais no ADN ou a diminuição da função de um tecido ou órgão, como por exemplo, o aparecimento de cataratas e a diminuição do desenvolvimento fetal (Antunes, 2012; White e Pharoah, 2014).

1.2.4 Proteção radiológica

Os profissionais de saúde que realizam exames de ortopantomografia têm em atenção a qualidade da imagem do exame obtido, com o objetivo de facilitar o diagnóstico. Contudo, são sempre ponderados e equacionados os valores de dose utilizados, de modo a reduzir ao mínimo os níveis de exposição do paciente e do profissional que realiza o procedimento. A International Commission on Radiological Protection (ICRP 103, 2007) distingue três categorias de exposição:

- Exposição ocupacional - Trabalhadores expostos a RI no seu local de trabalho;
- Exposição de pacientes - Exposição a RI para fins de diagnóstico, intervenção ou procedimentos terapêuticos;
- Exposição do público - Abrange todas as exposições a RI que não pertençam à exposição ocupacional e de pacientes.

Todos os benefícios e riscos da exposição de um paciente devem ser avaliados, tendo em atenção os efeitos cumulativos da exposição à RI. Neste contexto a proteção radiológica possui como objetivo principal a proteção do Homem face às radiações ionizantes, baseando-se em três princípios fundamentais: o princípio da justificação, princípio da otimização e o princípio da limitação de dose (ICRP 103, 2007):

- Princípio da justificação - nenhuma prática que envolva exposição a RI deve ser adotada se dessa prática não resultar um claro benefício para o Homem ou sociedade envolvente.
- Princípio da otimização - todas as exposições a RI e o número de indivíduos expostos devem ser mantidos a um nível tão baixo quanto possível (A.L.A.R.A – *As Low As Reasonably Achievable*), tendo em conta os diversos fatores de natureza económica e social.
- Princípio da limitação de dose - a exposição de indivíduos deve estar sujeita a limites de dose de modo a assegurar que nenhum indivíduo seja exposto a níveis de RI considerados inaceitáveis.

Todos profissionais de saúde que trabalham com equipamentos de RI devem considerar todas as medidas de segurança e proteção radiológica, desde a distância à fonte de RI, tempo de exposição e a utilização barreiras como blindagem.

1.2.5 Limites de dose

Com o objetivo de prevenir o aparecimento de efeitos determinísticos e limitar a ocorrência de efeitos estocásticos a um nível aceitável, a ICRP 103 (2007) delineou diretrizes para os valores de dose de RI recebidos através da exposição ocupacional e de membros do público (Tabela 2).

Tabela 2 - Limite de doses para exposição ocupacional e membros do público (Adaptado de ICRP 103, 2007).

Tipo de Limite	Ocupacional	Público
Dose Efetiva	20 mSv/ano	1 mSv/ano
Dose equivalente anual		
Cristalino	150 mSv	15 mSv
Pele	500 mSv	50 mSv
Extremidades (mãos e pés)	500 mSv	-

No caso da exposição ocupacional (limite de dose efetiva para profissionais expostos a RI) a recomendação é de que os 20 mSv/ano sejam uma média de 5 anos, ou seja, em 5 anos não devem ser excedidos os 100 mSv. Contudo, num só ano não devem ser excedidos os 50 mSv. Embora estes valores sejam considerados como aceitáveis, todos os esforços devem ser realizados para otimizar as práticas decorrentes da exposição a RI e garantir que estas doses de exposição sejam tão baixas quanto possível (White e Pharoah, 2014).

1.2.6 Dosimetria

As grandezas dosimétricas são utilizadas para quantificar e descrever a quantidade de energia depositada por um feixe de radiação num determinado meio. A RI pode ser medida em termos de dose absorvida ou dose de exposição. A dose absorvida (D) (Equação 1) é representada pelo valor esperado (d_ϵ) de energia transmitida por qualquer tipo de RI por unidade de massa (d_m), sendo expressa em Gray (Gy) (IAEA, 2014; Antunes, 2012).

$$D = \frac{d_\epsilon}{d_m} \quad \text{(Equação 1)}$$

A proteção radiológica utiliza a dose equivalente para comparar eficiência biológica relativa (RBE) dos diferentes tipos de radiação no tecido. A dose equivalente (H_T) (Equação 2) é a dose média absorvida num determinado órgão ou tecido, ponderada pelo tipo de radiação que nele incide, onde w_R é o fator de ponderação da radiação (Tabela 3), sendo expressa em Sv (IAEA, 2010).

$$H_T = w_R D \quad \text{(Equação 2)}$$

Tabela 3 - Fator de ponderação para os diferentes tipos de radiação (Adaptado de ICRP 103, 2007).

Tipo de Radiação	Fator de Ponderação (w_R)
Fotões	1
Elétrões	1
Protões	2
Partículas α , fragmentos de fissão e iões pesados	20
Neutrões	2,5 - 20 (dependendo da energia dos neutrões)

A dose efetiva (E) (Equação 3) é caracterizada pela multiplicação da dose equivalente (H_T) pelo fator de ponderação do tecido (w_T) (Tabela 4), sendo expressa em Sv (IAEA, 2010).

$$E = \sum w_T H_T \quad \text{(Equação 3)}$$

Tabela 4 - Fator de ponderação para os diferentes tipos de tecidos (Adaptado de ICRP 103, 2007).

Tecido	Fator de Ponderação (w_T)
Medula óssea, Cólon, Pulmão, Estômago, Mama	0,12
Gónadas	0,08
Bexiga, Fígado, Esófago, Tiroide	0,04
Pele, Cérebro, Glândulas salivares	0,01

1.3 Interação da radiação com o sistema biológico

Os raios-X interagem quer de forma direta quer indireta com a molécula de ADN (Figura 7), sendo responsáveis pela lesão do ADN e de proteínas nas células (Spotheim-Maurizot e Davidková, 2011). O efeito direto da radiação é caracterizado pela transferência de energia de um fóton ou de um eletrão para as macromoléculas biológicas ionizando-as (White e Pharoah, 2014). A interação inicial entre a RI e o tecido biológico ocorre ao nível dos eletrões (White e Pharoah, 2014), e leva à perda de energia da radiação e à produção de átomos excitados e moléculas ionizadas, que se podem converter em radicais livres (IAEA, 2010). Uma ou mais ligações químicas podem ser quebradas, dando origem a átomos ou moléculas com eletrões desemparelhados que possuem um curto período de vida (IAEA, 2010). O efeito indireto é caracterizado pela interação do fóton com as moléculas de água produzindo radicais livres por um processo denominado radiólise da água (White e Pharoah, 2014). A absorção de energia da radiação depende da quantidade do material biológico existente à passagem da RI. Como a água é a molécula predominante num organismo vivo, 80% da massa de uma célula viva, grande parte da energia da RI irá ser absorvida pelas moléculas de água (IAEA, 2010).

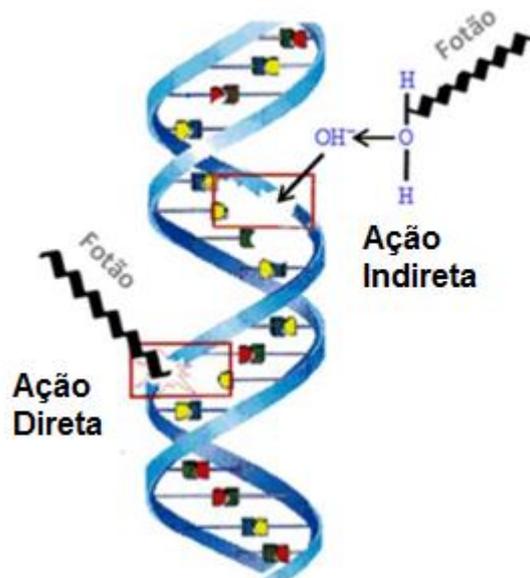


Figura 7 - Modos de ação da radiação ionizante (Adaptado de Antunes, 2012).

Na perspectiva de White e Pharoah (2014) as lesões no ADN são a primeira causa de morte celular induzida pela exposição à RI. A radiação produz diferentes tipos de alterações no ADN, como por exemplo:

- Quebra de uma ou das duas cadeias da molécula de ADN;
- Alterações ou perda de uma base, na estrutura da molécula de ADN;
- Quebra das pontes de hidrogénio;
- Aparecimento de ligações cruzadas (intracatenárias ou intercatenária) na cadeia de ADN ou proteínas.

1.4 Mucosa jugal

A cavidade oral (Figura 8) reflete a saúde de um indivíduo. Algumas patologias podem advir de alterações da mucosa jugal, como deficiência de vitaminas, efeitos nocivos induzidos pelo tabaco ou até mesmo efeitos do consumo de álcool (Squier e Kremer, 2001). Estas manifestações podem ser observadas em tecidos que possuem uma rápida proliferação, aumentando assim o risco de infeção na cavidade oral (Squier e Kremer, 2001), visto a mucosa jugal estar exposta diariamente a vários agentes tóxicos.

A mucosa jugal possui 500 µm de espessura (Markiewicz *et al.*, 2007), é constituída por tecido conjuntivo, caracterizado pela sua elasticidade e flexibilidade (Squier e Kremer, 2001).

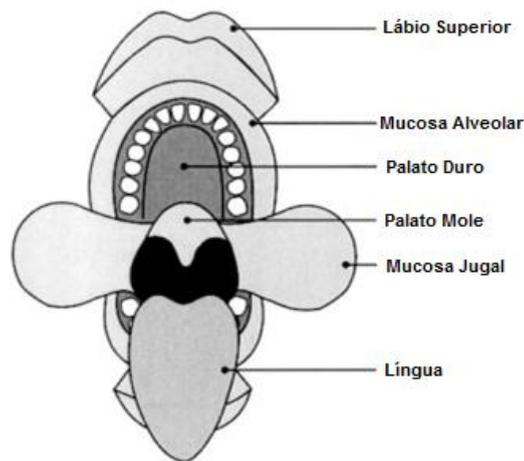


Figura 8 - Ilustração da cavidade oral (Adaptado de Squier e Kremer, 2001).

Segundo Markiewicz *et al.* (2007), anatomicamente, a mucosa jugal é limitada superior e inferiormente pelos maxilares e pelas pregas vestibulares da mandíbula. Lateralmente é limitada pela comissura labial e pela fossa amigdalina anterior. Esta estrutura par, é inervada pelo nervo bucal, e pelos nervos alveolares superiores e inferiores do nervo trigêmeo (Figura 9).

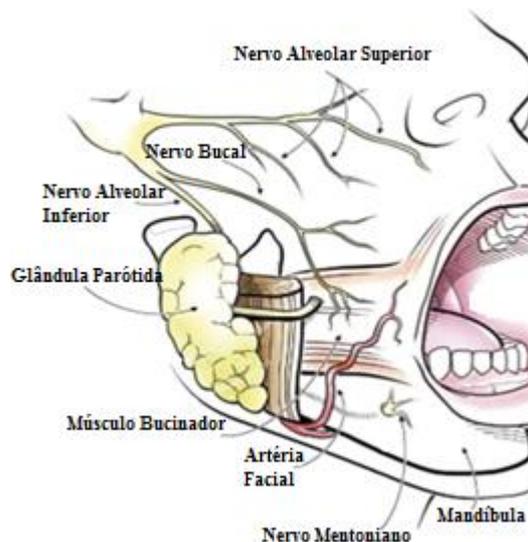


Figura 9 - Estrutura da mucosa jugal (Adaptado de Markiewicz *et al.*, 2007).

1.4.1 Constituição da mucosa jugal

De acordo com Squier e Kremer (2001), a proliferação celular atua de modo a equilibrar a população de células existente na mucosa jugal. O epitélio oral é mantido pela renovação celular contínua, novas células são produzidas na camada basal e migram para a superfície, de modo a substituir aquelas que foram eliminadas de forma natural - células esfoliadas (Holland *et al.*, 2008). O

envelhecimento ou o aparecimento de patologias podem ser alguns dos fatores que levam à alteração deste equilíbrio epitelial.

A mucosa jugal proporciona uma proteção à cavidade oral, face a potenciais agentes cancerígenos (Vondracek *et al.*, 2001). Contudo, segundo Thomas *et al.* (2009) grande parte dos tumores são de origem epitelial. Deste modo, a utilização de células da mucosa jugal é uma mais-valia na biomonitorização de eventos genotóxicos. Estes eventos são resultado da metabolização de substâncias que entram no organismo humano através da ingestão ou da inalação (Holland *et al.*, 2008).

A mucosa jugal é formada por um epitélio escamoso estratificado, constituído por cinco camadas distintas, o tecido conjuntivo (Holland *et al.*, 2008), estrato germinativo, estrato espinhoso, estrato granuloso e o estrato córneo (Figura10) (Squier e Kremer, 2001; Thomas *et al.*, 2009).

1.4.2 Tipos de célula existentes na mucosa jugal

Na Figura 10 é possível observar a variedade de células que constituem a mucosa jugal, representando a biodiversidade celular que coopera na manutenção da mesma.

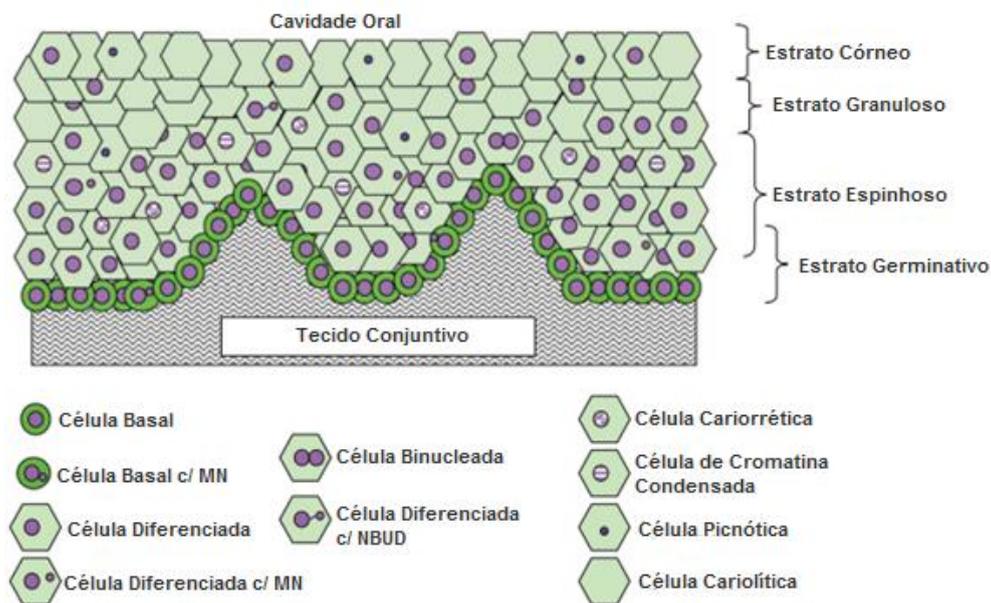


Figura 10 - Esquema da secção transversal da mucosa jugal (Adaptado de Thomas *et al.*, 2009). MN - micronúcleo; NBUD - vesícula nuclear.

O estrato córneo reveste a cavidade oral e contém células que são eliminadas constantemente devido ao uso do tecido superficial (Holland *et al.*, 2008). Seguidamente, apresenta-se o estrato granuloso e o estrato espinhoso, que possuem populações de células diferenciadas (CD), apoptóticas e necróticas. O estrato germinativo possui uma divisão celular ativa de células basais (CB) e células estaminais (CE), que se diferenciam, mantendo toda a estrutura e integridade do tecido (Thomas *et al.*,

2009). Estas células depois de obtidas podem ser diferenciadas tendo em conta a sua forma e coloração.

A mucosa oral é constituída por:

- CB, surgem da camada basal do estrato germinativo e possuem um citoplasma largo em comparação com as CD. Têm uma coloração uniforme no núcleo e possuem um tamanho menor que as CD (Figura 11; a));
- CD, contêm uma coloração uniforme no núcleo, têm forma oval ou redonda e são diferentes das CB devido ao seu tamanho mais largo com uma relação núcleo-citoplasma menor que as CB (Figura 11; b));
- Células binucleadas, são células que não completaram a divisão celular permanecendo na fase de citocinese, possuem dois núcleos em vez de um. Os núcleos normalmente estão perto um do outro, podendo por vezes tocarem-se (Figura 11; f)) (Thomas *et al.*, 2007, 2008, 2009).

Células em diferentes estadios de apoptose, caracterizadas pela fragmentação do ADN e desagregação do invólucro nuclear:

- Células de cromatina condensada, possuem um núcleo com regiões de cromatina agregada, enquanto que outras áreas do núcleo se apresentam vazias (Figura 11; g));
- Células cariorréticas, têm um núcleo caracterizado pela agregação de cromatina extensa relativamente às células de cromatina condensada, conduzindo à fragmentação nuclear e eventual desintegração do mesmo (Figura 11; h));
- Células picnóticas são pequenos núcleos que possuem elevada densidade do material nuclear, apresentando uma coloração uniforme, mas intensa. O diâmetro do núcleo é normalmente um a dois terços mais pequeno que o núcleo de uma CD (Figura 11; i));
- Células cariolíticas, nestas células não existe a presença de núcleo (Figura 11; j)) (Thomas *et al.*, 2007, 2008, 2009).

E, por fim, pode apresentar células com lesões no ADN:

- Células com micronúcleos, caracterizadas pela presença de um núcleo principal e de um ou mais núcleos mais pequenos, denominados de micronúcleo. Os micronúcleos normalmente, são redondos ou de forma oval com um diâmetro que pode alcançar de um terço a um sexto do núcleo principal. O núcleo destas células pode possuir uma morfologia característica das células normais (CB, CD ou binucleadas) ou células que se encontram num processo de morte celular (Figura 11; c) e d));
- Células com vesículas nucleares (NBUD), possuem uma constrição na sua forma, como um ponto ou algo sugestivo de um núcleo num processo de formação de vesículas. Estas vesículas têm as mesmas propriedades na sua morfologia e coloração que os núcleos principais. Contudo, o seu diâmetro pode alcançar metade a um quarto do núcleo principal (Figura 11; e)) (Thomas *et al.*, 2007, 2008, 2009).

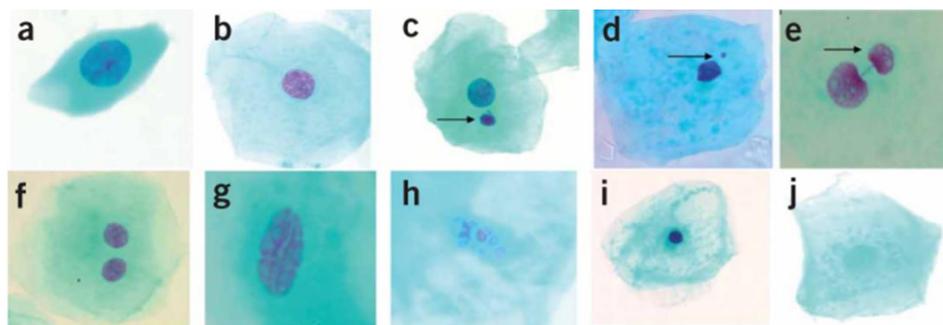


Figura 11 - Ilustração dos diferentes tipos de células que fazem parte da constituição da mucosa jugal, visualizadas no estudo de Thomas *et al.*, (2009). a) Célula basal; b) Célula diferenciada; c) Célula diferenciada precoce c/ 1 MN (seta); d) Célula diferenciada tardia c/ 1 MN (seta); e) Célula diferenciada c/ 1 NBUD (seta); f) Célula binucleada; g) Célula de cromatina condensada; h) Célula cariorrética; i) Célula picnótica; j) Célula cariolítica. MN - micronúcleo; NBUD - vesícula nuclear.

As células da mucosa jugal demoram cerca de 7 a 21 dias a migrarem da camada basal para a superfície, de modo a manter a integridade deste tecido (Figura 12) (Thomas *et al.*, 2009).

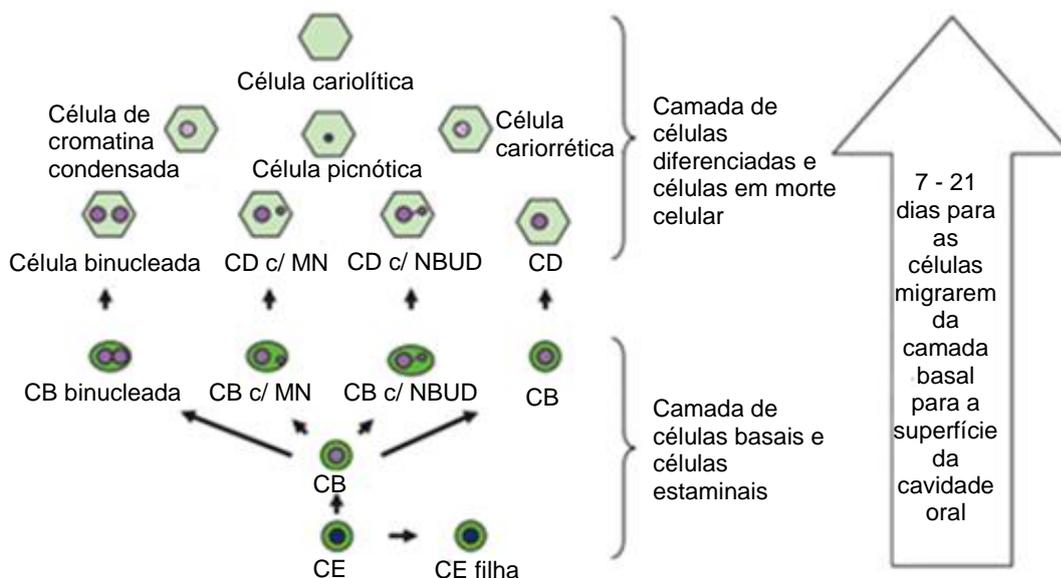


Figura 12 - Sequência da origem dos vários tipos de células que constituem a mucosa jugal (Adaptado de Thomas *et al.*, 2009). CB - célula basal; CD - célula diferenciada; CE - célula estaminal; MN - micronúcleo; NBUD - vesícula nuclear.

As células filhas originadas na camada basal podem conter, ou não, micronúcleos, diferenciando-se em células da camada espinhosa, alcançando posteriormente a superfície da cavidade oral. Algumas destas células, podem no entanto degenerar em células de cromatina condensada, células cariorréticas, células binucleadas, células picnóticas ou células cariolíticas (Holland *et al.*, 2008).

1.5 Avaliação da lesão genética

A exposição a agentes genotóxicos da mucosa jugal pode desenvolver algumas alterações na sua estrutura celular e também na informação genética contida nas células. Tem sido demonstrado que o aparecimento de alterações genéticas nas células da mucosa jugal está correlacionado com alteração do genoma, o envelhecimento precoce das células, a exposição a agentes genotóxicos e o risco de desenvolvimento de tumores (Bonassi *et al.*, 2009). As alterações no genoma humano podem ser causadas pela exposição a agentes genotóxicos, como a radiação e produtos químicos, carência de micronutrientes, hábitos (consumo de álcool, tabaco, drogas) e fatores genéticos (Holland *et al.*, 2008). O ADN pode sofrer lesões provocadas por agentes genotóxicos que podem ou não ser reparadas. As lesões não reparadas podem conduzir a efeitos biológicos como a morte celular ou alterações na estrutura celular (Antunes, 2012), dando origem a micronúcleos ou a outro tipo de alterações genéticas. Estudos de biomonitorização envolvendo grandes populações de trabalhadores ocupacionalmente expostos a doses de RI demonstram a correlação da formação de micronúcleos com a dose cumulativa (Vral *et al.*, 2011).

1.5.1 Micronúcleos

A análise dos micronúcleos em células da mucosa jugal é realizada desde 1980 (Holland *et al.*, 2008) e é um ensaio citogenético que avalia lesões induzidas em populações humanas (Fenech *et al.*, 1999). Os biomarcadores de susceptibilidade indicam variáveis genéticas que condicionam a resposta do indivíduo a um agente genotóxico. A quantificação de micronúcleos é utilizada como biomarcador para avaliação da toxicidade genética *in vivo* ou *ex vivo* (Holland *et al.*, 2008). Mais de 90% dos tumores surgem de células epiteliais (Holland *et al.*, 2008), em que a deteção de uma elevada frequência de micronúcleos numa dada população está relacionada com o aumento do risco de aparecimento de tumores (Angelieri *et al.*, 2011).

O estudo dos micronúcleos em células esfoliadas da mucosa jugal é um ensaio fiável e utiliza um processo de recolha de células minimamente invasivo, que pode ser realizado sem recorrer a culturas de células para avaliação de lesões cromossómicas (Bonassi *et al.*, 2011). Pode ser utilizado em linfócitos do sangue periférico ou células esfoliadas de vários tecidos (Cerqueira *et al.*, 2008), possibilitando a avaliação de eventos como amplificação de genes, reestruturação cromossómica (Bonassi *et al.*, 2005) e radiosensibilidade dos cromossomas (Chua e Rothkamm, 2013).

Os micronúcleos são pequenos corpos extranucleares (Bonassi *et al.*, 2011), originados a partir de fragmentos de cromossomas ou cromossomas inteiros (Fenech, 2007; Fenech *et al.*, 1999) que foram deixados para trás durante o processo de divisão celular (Holland *et al.*, 2008), e que não são incorporados nos núcleos principais das células filhas durante a mitose (Angelieri *et al.*, 2011; Bonassi *et al.*, 2011) (Figura 13).

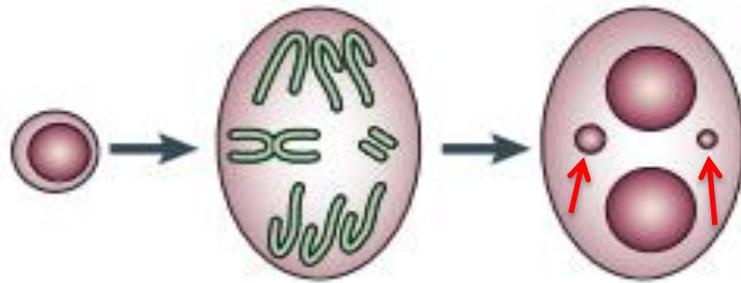


Figura 13 - Esquema da formação dos micronúcleos (setas vermelhas) (Adaptado de Fenech, 2007).

Existem vários fatores que influenciam o aparecimento de micronúcleos:

- Idade: Existe uma relação entre o envelhecimento de um indivíduo e o aumento da frequência de micronúcleos nas células da mucosa jugal (Kashyap e Reddy, 2012; Minicucci *et al.*, 2005);
- Género: não existe um consenso. Alguns autores referem que as mulheres possuem maior frequência de micronúcleos (Hintzsche *et al.*, 2012; Khlifi *et al.*, 2013), enquanto que o estudo de Dórea *et al.* (2012) refere não existirem diferenças;
- Tabaco: o efeito cancerígeno do cigarro é em grande parte influenciado pela mutagenicidade de vários produtos químicos existentes no fumo (Gabriel *et al.*, 2006). Alguns tipos de tabaco possuem nitrosaminas que atuam como agentes mutagénicos podendo ser responsáveis pela formação de micronúcleos (MR *et al.*, 2014);
- Raios-X: provocam alterações no sistema biológico. O estudo de Vral *et al.* (2011) demonstra que o número de micronúcleos induzidos pela RI está fortemente correlacionado com a dose de radiação recebida. A utilização da RI em radioterapia é responsável pelo aumento de células com micronúcleos na mucosa jugal dos pacientes (Minicucci *et al.*, 2005);
- Dieta: a quantidade de alimentos e suplementos ingeridos influenciam a concentração celular de micronutrientes (Fenech e Bonassi, 2011). Assim, indivíduos que consomem fruta e vegetais têm uma frequência de micronúcleos mais baixa em comparação com os indivíduos que não têm o hábito de ingerir este tipo de alimentos (Bonassi *et al.*, 2011);
- Álcool: o aldeído, primeiro metabolito do etanol, é responsável pelo potencial cancerígeno do etanol (Reis *et al.*, 2006). Estudos realizados em linfócitos demonstram uma associação entre o consumo de álcool e o aumento da frequência de micronúcleos nas células (Fenech e Bonassi, 2011).

1.6 Objetivos do estudo

Este estudo tem como objetivo a implementação e validação de um ensaio que permita avaliar a formação de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa jugal. Após a implementação da técnica, pretende-se avaliar os efeitos induzidos pela exposição às baixas doses de RI provenientes do exame de ortopantomografia em indivíduos sujeitos ao exame, uma vez que é um exame muito frequente nas especialidades da estomatologia, maxilofaxial e ortodontia. Para tal, ir-se-á estudar num grupo de indivíduos, antes e 10 dias após a realização do exame, o aparecimento da lesão genética através do ensaio do micronúcleo. Adicionalmente, ir-se-á estudar os efeitos induzidos pelo tabaco noutra grupo de indivíduos, comparando os resultados obtidos nestes dois grupos com os de um grupo controlo.

CAPÍTULO 2

Materiais e Métodos

2.1 Amostra

Para a realização do estudo, dividiu-se a amostra de 60 participantes em 3 grupos independentes. Cada um deles composto por 20 participantes:

- Grupo exposto à RI (GE), indivíduos que realizaram um exame de ortopantomografia;
- Grupo de fumadores (GF);
- Grupo de controlo (GC), pessoas saudáveis, não fumadoras e que não foram expostas a RI num período de pelo menos 6 meses anteriores à colheita da amostra.

A população estudada é constituída pelo GC: 11 mulheres e 9 homens numa faixa etária dos 6 aos 83 anos; GE: 12 mulheres e 8 homens numa faixa etária dos 18 aos 86 anos e pelo GF: por 8 mulheres e 12 homens numa faixa etária dos 27 aos 65 anos. Na Tabela 5 estão representados todos os dadores do estudo, caracterizados por idade, género e grupo de estudo a que pertencem.

Tabela 5 - Caracterização da amostra do estudo.

Grupo	Dador	Idade	Género	Grupo	Dador	Idade	Género
GC	D11	62	M	GF	D14	53	F
	D12	17	F		D20	65	M
	D15	49	M		D23	33	F
	D16	6	M		D32	35	F
	D17	83	M		D36	41	M
	D18	80	F		D37	44	M
	D19	49	F		D38	41	M
	D21	16	M		D39	32	M
	D52	26	F		D41	52	M
	D53	38	M		D43	41	M
	D54	23	F		D44	35	F
	D55	71	F		D45	63	M
	D56	54	F		D46	40	M
	D57	31	M		D47	41	M
	D58	35	F		D48	57	M
	D59	40	F		D49	30	F
	D61	26	M		D50	27	F
	D62	25	F		D51	28	F
	D63	24	F		D60	56	M
	D65	25	M		D64	45	F
GE	D1	69	F	GE	D24	44	M
	D2	19	F		D25	55	F
	D3	18	F		D26	24	M
	D4	53	F		D27	24	F
	D5	30	M		D29	52	M
	D6	47	F		D30	37	M
	D7	33	F		D31	86	F
	D8	62	F		D33	24	M
	D9	44	F		D34	36	M
	D10	68	M		D35	54	F

GC - grupo de controlo; GE - grupo exposto à radiação ionizante; GF - grupo de fumadores; D- dador; F - sexo feminino; M - sexo masculino.

O GE é composto por 8 dadores fumadores e 12 dadores sem hábitos tabágicos. Idealmente, este grupo devia ser apenas composto por não-fumadores, mas devido à dificuldade de obtenção das amostras optou-se por considerar também dadores fumadores. No presente estudo, as doses de exposição variam entre 7,2 - 35,4 μ Sv para os indivíduos que realizaram o exame de ortopantomografia. O ortopantomógrafo possui um sistema de controlo automático de exposição, que ajusta os parâmetros tendo em conta a estrutura facial do paciente levando a que a exposição não seja idêntica em todos os pacientes.

O GF não possui uma homogeneidade no número de cigarros fumados por dia, variando entre 5 e 40 cigarros/dia. Em média o GF fuma 16 cigarros/dia (Tabela 6).

Tabela 6 - Número de cigarros consumidos por dia pelos dadores do grupo de fumadores.

Dador	Nº Cigarros/dia
D14	10
D20	20
D23	12
D32	5
D36	20
D37	20
D38	20
D39	15
D41	20
D43	15
D44	15
D45	40
D46	15
D47	7
D48	15
D49	8
D50	10
D51	15
D60	20
D64	20

D - dador.

Todos os dadores deram o seu consentimento informado para a participação neste estudo. Responderam a um questionário, especialmente formulado para o mesmo, baseado nos seus dados pessoais, na sua história clínica, nos seus hábitos tabágicos, alimentares e na sua atividade profissional e extra profissional (Anexo - 1).

2.1.1 Considerações éticas

O estudo foi submetido à Comissão de Ética do Centro Hospitalar de Lisboa Central, E.P.E., o qual foi aprovado de acordo com o Processo N^o97/2014. Apesar da ciência se desenvolver através da investigação, isso não significa que o progresso do conhecimento científico ofereça garantias éticas e

morais para a população interveniente. O direito e o dever de decidir livremente é inerente a todo o ser humano, tendo sempre em mente o valor absoluto das pessoas, desde a sua integridade física à moral. Foi explicado a cada participante os objetivos do trabalho, a finalidade do estudo e que a sua participação seria de livre vontade podendo sempre abandonar o estudo se e quando o entendesse. Foi garantido o anonimato e confidencialidade que o estudo envolve (Anexo - 2).

2.2 Otimização do protocolo para a técnica dos micronúcleos em células da mucosa jugal

Durante os primeiros meses do estudo foi feita uma pesquisa intensiva com o objetivo de escolher e otimizar o protocolo a utilizar, para análise dos micronúcleos em células esfoliadas da mucosa jugal.

Através da pesquisa bibliográfica, foi possível identificar que, antes de se proceder à colheita das células, os participantes envolvidos no estudo teriam que enxaguar a cavidade oral com água de modo a minimizar a contaminação das amostras (Angelieri *et al.*, 2010a; Angelieri *et al.*, 2010b; Angelieri *et al.*, 2011; Arora *et al.*, 2014; Carlin *et al.*, 2010; Carrard *et al.*, 2007; Gattás *et al.*, 2001; Kb *et al.*, 2014; Kassie *et al.*, 2001; Karahalil *et al.*, 1999; Khlifi *et al.*, 2013; Lorenzoni *et al.*, 2012; Nersesyan *et al.*, 2006). Outros autores não mencionam este passo (Bartolotta *et al.*, 2011; Basu *et al.*, 2002; Kashyap e Reddy, 2012; Lucero *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2005; Majer *et al.*, 2001; Pinto *et al.*, 2000; Reis *et al.*, 2002; Stich *et al.*, 1992; Surrallés *et al.*, 1997; Tian *et al.*, 2001; Titenko-Holland *et al.*, 1998; Warner *et al.*, 1994). No entanto, Sellappa *et al.* (2011) refere que se deve enxaguar a cavidade oral com 20 mL de solução salina (0,9% de NaCl), uma vez que este tipo de solução isotónica mantém o equilíbrio osmótico em meio celular.

Relativamente à colheita das células da mucosa jugal foi possível identificar vários processos de recolha, utilizando:

- Uma espátula de madeira humedecida (Angelieri *et al.*, 2010a; Angelieri *et al.*, 2010b; Angelieri *et al.*, 2011; Carlin *et al.*, 2010; Carrard *et al.*, 2007; Fenech *et al.*, 1999; Holland *et al.*, 2008; Karahalil *et al.*, 1999; Kashyap e Reddy, 2012; Khlifi *et al.*, 2013; Lorenzoni *et al.*, 2012; Majer *et al.*, 2001; Nersesyan *et al.*, 2006; Pinto *et al.*, 2000; Stich *et al.*, 1992; Titenko-Holland *et al.*, 1998; Warner *et al.*, 1994);
- Uma espátula de metal (Arora *et al.*, 2014);
- Uma espátula de plástico (Carrard *et al.*, 2007);
- Um “*cytobrush*” (Carrard *et al.*, 2007; Fenech *et al.*, 1999; Gattás *et al.*, 2001; Holland *et al.*, 2008; Kashyap e Reddy, 2012; Reis *et al.*, 2002);
- Uma escova de dentes (Basu *et al.*, 2002; Gattás *et al.*, 2001; Kashyap e Reddy, 2012; KB *et al.*, 2014; Martínez *et al.*, 2005; Majer *et al.*, 2001; Sellappa *et al.*, 2011; Surrallés *et al.*, 1997);
- Um palito (Kassie *et al.*, 2001);

- Um cotonete ou uma zaragatoa (Bartolotta *et al.*, 2011; Holland *et al.*, 2008; Kashyap e Reddy, 2012).

Todos os materiais mencionados são utilizados em condições estéreis, de modo a não alterar os resultados fornecidos pelas células da mucosa jugal e a proteger o dador.

Após a recolha das células da mucosa jugal estas podem ser colocadas diretamente em lâminas através de um esfregaço (Kalita *et al.*, 2013; Karahalil *et al.*, 1999; Lorenzoni *et al.*, 2012; Stich *et al.*, 1992) ou podem ser colocadas em suspensão numa solução de Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7,4. Existe uma variedade de descrições na literatura acerca da utilização deste tipo de solução de que são exemplo:

- Ressuspensão das células em 20 mL de solução tampão (0,1 M EDTA, 0,01 M Tris-HCl e 0,02 M NaCl, pH 7,0) e centrifugação durante 10 minutos (min) a 1500 rotações por minuto (rpm) (Lucero *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2005);
- Ressuspensão das células em 25 mL de solução tampão (0,1 M EDTA, 0,01 M Tris-HCl e 0,02 M NaCl, pH 7,0) (Basu *et al.*, 2002; Kb *et al.*, 2014; Surrallés *et al.*, 1997) e centrifugação durante 5 min a 800 rpm (Arora *et al.*, 2014).

Alguns autores mencionam a utilização de uma solução salina (0,9% NaCl) em vez de uma solução tampão (0,1 M EDTA, 0,01 M Tris-HCl e 0,02 M NaCl, pH 7,0) (Carrard *et al.*, 2007; Majer *et al.*, 2001) e centrifugação durante 10 min a 1200 rpm (Gattás *et al.*, 2001), ou então, centrifugação durante 5 min a 800 rpm (Angelieri *et al.*, 2010a; Angelieri *et al.*, 2010b; Angelieri *et al.*, 2011; Carlin *et al.*, 2010).

Foram encontrados também vários métodos de fixação para este tipo de células. A fixação com metanol: ácido acético nas proporções de 3:1 (v/v), é um dos métodos de fixação mais utilizados. O tempo de fixação das células varia de autor para autor, alguns referem 30 min e outros referem um período de 5-10 min. (Angelieri *et al.*, 2010a; Angelieri *et al.*, 2010b; Angelieri *et al.*, 2011; Carlin *et al.*, 2010; Gattás *et al.*, 2001; Kalita *et al.*, 2013; Khlifi *et al.*, 2013; Lorenzoni *et al.*, 2012; Reis *et al.*, 2002; Sellappa *et al.*, 2011). Há autores que utilizam técnicas de fixação diferentes, fixação com 80-85% de etanol (Stich *et al.*, 1992) ou fixação com 80% de metanol (Arora *et al.*, 2014; Bartolotta *et al.*, 2011; Basu *et al.*, 2002; Kashyap e Reddy, 2012; Karahalil *et al.*, 1999; Kb *et al.*, 2014; Lucero *et al.*, 2000; Majer *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2005; Nersesyan *et al.*, 2006; Surrallés *et al.*, 1997; Titenko-Holland *et al.*, 1998; Warner *et al.*, 1994). Estes métodos de fixação podem ser realizados diretamente sobre as células colocadas em lâminas através de um esfregaço, ou em células que se encontrem em suspensão.

Um dos corantes utilizados para a coloração das células da mucosa jugal é o Giemsa. Para a utilização deste corante foram revistas várias percentagens da utilização deste composto, com diferentes variações no tempo de exposição das células (Arora *et al.*, 2014; Fenech *et al.*, 1999; Kashyap e Reddy, 2012; KB *et al.*, 2014; Khlifi *et al.*, 2013; Sellappa *et al.*, 2011).

Tendo em conta os diversos métodos referidos pelos diferentes autores executaram-se várias tentativas para otimização do protocolo a utilizar, tendo-se chegado ao protocolo descrito no Anexo - 3.

Após a otimização da técnica, os principais passos implementados foram:

1. Colheita das células da mucosa jugal: espátula de plástico;
2. Ressuspensão das células num tubo estéril com 5 mL de PBS (Anexo - 4) e centrifugar durante 5 min, a 104xg;
3. Método de fixação: 4 mL de mistura fixadora metanol: ácido acético na proporção de 3:1 (v/v) (Anexo - 4);
4. Corante: Giemsa a 10% em tampão fosfato pH 6,8 (v/v) (Anexo - 4).

2.3 Colheita de células na mucosa jugal

Retiraram-se a cada dador células da mucosa jugal, para análise dos micronúcleos. Em relação ao GE, a recolha das células foi feita no Hospital de São José - Centro Hospitalar de Lisboa Central, E.P.E., no serviço de estomatologia. A cada um dos 20 dadores deste grupo, foi feita uma recolha das células da mucosa jugal, antes e 10 dias após (aproximadamente) a realização da ortopantomografia. O intervalo de tempo decorrido entre a primeira e a segunda recolha tem em conta o tempo de migração das células da camada basal para a superfície da mucosa jugal. Nos restantes dadores, correspondentes ao GF e ao GC, as colheitas foram realizadas na grande maioria no IST/CTN.

O método de recolha utilizado foi o mesmo para todos os indivíduos. Depois dos dadores enxaguarem a cavidade oral com água, as células foram recolhidas com uma espátula de plástico estéril, fazendo movimentos de baixo para cima, de modo a retirar o maior número de células possível. Primeiro efetuou-se este procedimento na mucosa jugal do lado direito, três vezes, e depois na mucosa jugal do lado esquerdo repetindo-se o mesmo processo. As células foram ressuspensas em dois tubos estéreis, com 5 mL de PBS cada, previamente etiquetados e identificados, um para as células da mucosa jugal do lado direito e outro para o lado esquerdo. As amostras foram posteriormente transportadas para o laboratório de citogenética do Grupo de Protecção e Segurança Radiológica do IST/CTN.

2.4 Técnica dos micronúcleos

As células em suspensão foram centrifugadas durante 5 min, a 104xg. Retirou-se o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta de Pasteur de plástico, ressuspendeu-se o botão celular suavemente no agitador e adicionou-se novamente 5 mL de PBS. As amostras foram novamente centrifugadas de modo a remover a maior parte da contaminação existente na amostra. Posteriormente, adicionou-se cerca de 4 mL de mistura fixadora metanol: ácido acético na proporção de 3:1 (v/v), previamente arrefecido a -20 °C, centrifugando-se novamente durante 5 min a 104xg. Retirou-se o sobrenadante, e ressuspendeu-se o botão celular suavemente no agitador. O processo de fixação repetiu-se duas vezes. Depois de se homogeneizar muito bem a suspensão celular, colocou-se, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur de vidro, algumas gotas por lâmina fazendo as células deslizar da

parte superior para a parte inferior da mesma. Neste processo, as lâminas previamente etiquetadas e identificadas estavam colocadas a 45°. Todas as amostras foram feitas em duplicado. Deixaram-se as lâminas secar, durante 24 horas, à temperatura ambiente. Por fim, procedeu-se à coloração das lâminas com uma solução de Giemsa a 10% em tampão fosfato pH 6,8 (v/v), durante 10 min. Passaram-se as lâminas por água corrente com pouca pressão, de modo a retirar o excesso de corante e por fim, deixaram-se as lâminas a secar durante 24 horas. As lâminas foram então seladas com Entellan e procedeu-se posteriormente à sua leitura no microscópio ótico.

2.5 Critérios de leitura

Neste estudo foram contabilizadas 2000 células mononucleadas (células que possuem um único núcleo principal) por amostra, perfazendo um total 160000 células mononucleadas em todas as amostras. Para a análise das amostras contabilizou-se o número de células mononucleadas e binucleadas, com e sem micronúcleo. A visualização ao microscópio ótico foi realizada utilizando uma ampliação de 400x. Toda a identificação e caracterização das células micronucleadas foi efetuada segundo o descrito por Thomas *et al.* (2009). As células mononucleadas que contêm micronúcleos possuem um núcleo principal e um núcleo de tamanho inferior, cerca de 1/3 a 1/6 do diâmetro do núcleo principal. Os micronúcleos possuem uma forma redonda ou oval, com uma coloração e intensidade idêntica ao núcleo principal. Estão localizados no citoplasma da célula e não possuem contacto nem sobreposição com o núcleo principal (Bartolotta *et al.*, 2011; Fenech, 2007; Sarto *et al.*, 1987).

Paralelamente, também se averiguou o aparecimento de células binucleadas nos três grupos em estudo. O registo das células binucleadas foi realizado com o objetivo de verificar se havia um aumento ou diminuição da divisão celular nos indivíduos pertencentes aos grupos GE e GF comparativamente ao GC.

2.6 Análise estatística

Para o tratamento estatístico dos resultados foram consideradas variáveis dependentes: a frequência de células mononucleadas com micronúcleos e a frequência de células binucleadas, e variáveis independentes: a RI proveniente dos exames de ortopantomografia, a idade, o género e o consumo de tabaco.

O nível de significância considerado no teste paramétrico estatístico - teste *t* de Student foi de 0,05 ($p < 0,05$).

CAPÍTULO 3

Resultados

Ao longo do estudo foram visualizadas 80000 células mononucleadas no GE, 40000 antes do exame de ortopantomografia e 40000 depois do exame. Também foram observadas 40000 células mononucleadas no GF e 40000 no GC. Num total de 60 dadores foram contabilizados 642 micronúcleos em 160000 células mononucleadas, e foram registadas 2080 células binucleadas. Na Figura 14, 15 e 16, apresentam-se imagens recolhidas ao longo do trabalho dos vários tipos de células estudadas.

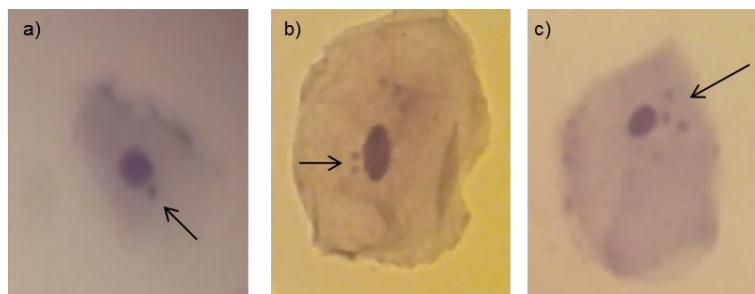


Figura 14 - Imagens de micronúcleos (setas) visualizados neste trabalho: a) Célula mononucleada com 1 micronúcleo; b) Célula mononucleada com 2 micronúcleos; c) Célula mononucleada com 3 micronúcleos.

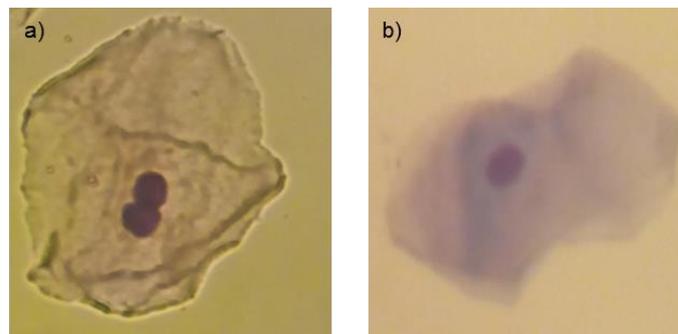


Figura 15 - Imagens de uma célula binucleada (a) e de uma célula mononucleada (b), contabilizadas neste trabalho.

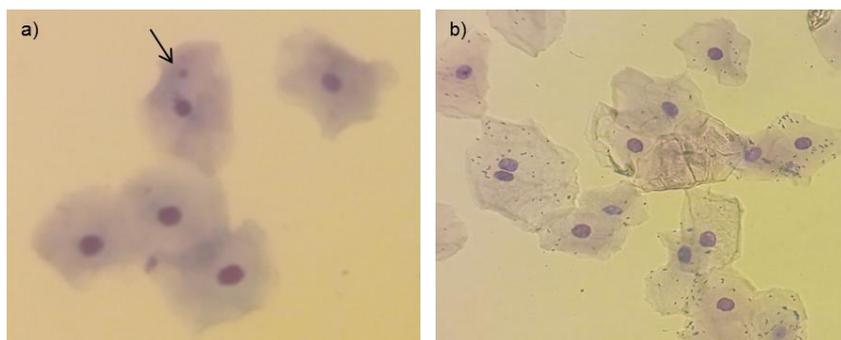


Figura 16 - Imagens de células mononucleadas e binucleadas sem e com contaminação a) e b) respectivamente. Na imagem a) observa-se um micronúcleo (seta).

3.1 Grupo controle

No GC foram contabilizados 77 micronúcleos em 40000 células mononucleadas (Tabela 7).

Tabela 7 - Caracterização e distribuição dos micronúcleos no grupo controle.

Dador	Gênero	Idade (Anos)	Nº Células	Distribuição de MN em células mono				Nº MN total	MN/Célula
				0	1	2	3		
D11	M	62	2000	1994	3	2	1	10	0,0050
D12	F	17	2000	1999	1	0	0	1	0,0005
D15	M	49	2000	1996	1	3	0	7	0,0035
D16	M	6	2000	1998	2	0	0	2	0,0010
D17	M	83	2000	1994	4	1	1	9	0,0045
D18	F	80	2000	1998	0	2	0	4	0,0020
D19	F	49	2000	1993	6	1	0	8	0,0040
D21	M	16	2000	1997	3	0	0	3	0,0015
D52	F	26	2000	1996	4	0	0	4	0,0020
D53	M	38	2000	1997	2	1	0	4	0,0020
D54	F	23	2000	1997	2	0	1	5	0,0025
D55	F	71	2000	1999	1	0	0	1	0,0005
D56	F	54	2000	1997	3	0	0	3	0,0015
D57	M	31	2000	1999	1	0	0	1	0,0005
D58	F	35	2000	1998	2	0	0	2	0,0010
D59	F	40	2000	1997	3	0	0	3	0,0015
D61	M	26	2000	1998	2	0	0	2	0,0010
D62	F	25	2000	1997	3	0	0	3	0,0015
D63	F	24	2000	1999	1	0	0	1	0,0005
D65	M	25	2000	1996	4	0	0	4	0,0020
Total			40000	39939	48	10	3	77	0,0019

D - dador; F - sexo feminino; M - sexo masculino; MN - micronúcleo; mono - células mononucleadas.

Na Tabela 7 é possível observar que o número de células mononucleadas sem micronúcleo tem maior incidência que o número de células mononucleadas com micronúcleo. Observou-se também que nas células mononucleadas, com micronúcleo, as que apresentam um micronúcleo são as que se

encontram em maior número. A frequência média de micronúcleos foi de $0,002 \pm 0,001$ (média \pm desvio padrão). A média de idades no GC é de $39,0 \pm 21,7$ anos.

3.1.1 Comparação entre dados do grupo controle

A análise entre dados do GC realizou-se em termos de gênero e faixa etária. O GC é constituído por 11 mulheres e 9 homens. No gênero feminino foram contabilizados 35 micronúcleos em 22000 células mononucleadas. Em relação ao gênero masculino foram visualizados 42 micronúcleos em 18000 células mononucleadas. É possível observar que o gênero masculino possui uma frequência de micronúcleos superior ao gênero feminino (Tabela 8).

Tabela 8 - Distribuição do número de micronúcleos entre o gênero masculino e feminino do grupo controle.

Gênero	Nº Células	Distribuição de MN em células mono				Nº MN total	Média (MN/célula) \pm DP
		0	1	2	3		
F	22000	21970	26	3	1	35	$0,0016 \pm 0,0010$
M	18000	17969	22	7	2	42	$0,0023 \pm 0,0016$

F - sexo feminino; M - sexo masculino; MN - micronúcleo; mono - células mononucleadas; DP - desvio padrão.

Para analisar a influência da idade na frequência de micronúcleos o GC (idades entre os 6 e 83 anos) foi dividido em 4 grupos etários: 6 - 24, 25 - 31, 35 - 49 e 54 - 83 anos, constituídos por 5 dados cada. Em cada grupo etário foram lidas 10000 células mononucleadas. O número de micronúcleos observado no grupo etário dos 6 - 24 anos foi de 12; no grupo etário dos 25 - 31 anos foram contabilizados 14; o grupo etário dos 35 - 49 anos apresentou 24 e por fim, no grupo etário dos 54 - 83 anos foram registrados 27 micronúcleos (Tabela 9).

Tabela 9 - Comparação e distribuição do número de micronúcleos entre as faixas etárias do grupo controle.

Grupo Etário (anos)	Nº Células	Distribuição de MN em células mono				Nº MN total	Média (MN/célula) \pm DP
		0	1	2	3		
6 - 24	10000	9990	9	0	1	12	$0,0012 \pm 0,0008$
25 - 31	10000	9986	14	0	0	14	$0,0014 \pm 0,0007$
35 - 49	10000	9981	14	5	0	24	$0,0024 \pm 0,0013$
54 - 83	10000	9982	11	5	2	27	$0,0027 \pm 0,0020$

MN - micronúcleo; mono - células mononucleadas; DP - desvio padrão.

Na Tabela 9 e na Figura 17 é possível observar um aumento da frequência de micronúcleos com o aumento da idade. Este aumento na frequência de micronúcleos foi de 0,02% no grupo etário dos 25 - 31 anos em relação ao grupo etário dos 6 - 24 anos. Entre o grupo etário dos 35 - 49 anos e o

grupo etário dos 25 - 31 anos existiu um aumento de 0,1%. Por fim, em relação ao grupo etário dos 54 - 83 anos houve um aumento de 0,03% em comparação com o grupo etário dos 35 - 49 anos.

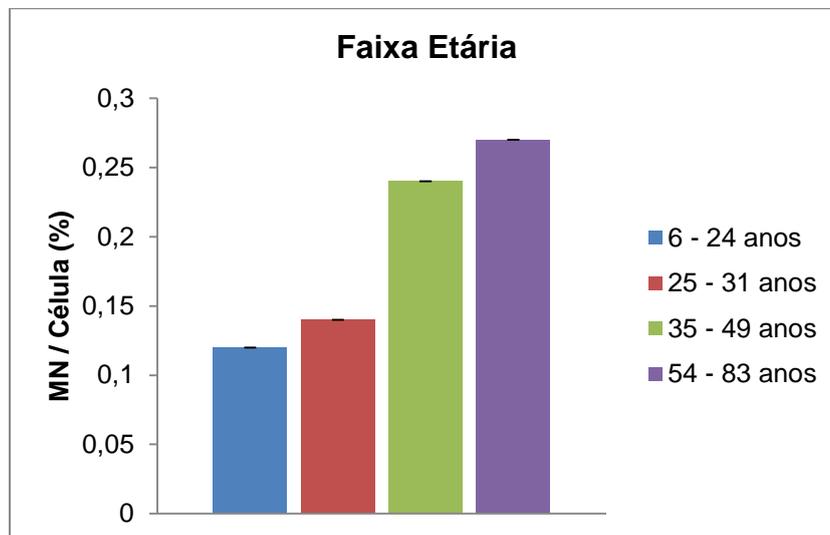


Figura 17 - Frequência de micronúcleos nos grupos etários do grupo de controlo.

3.2 Grupo exposto à radiação ionizante

Neste grupo de indivíduos foram observadas um total de 80000 células mononucleadas (40000 antes do exame e 40000 após o mesmo) e contabilizados 352 micronúcleos. Nas células recolhidas antes do exame de ortopantomografia foram lidas 40000 células mononucleadas, onde foram visualizados 159 micronúcleos. Nas células recolhidas aproximadamente 10 dias depois do exame de ortopantomografia, foram lidas 40000 células mononucleadas, contabilizando-se 193 micronúcleos (Tabela 10). Tendo existido um aumento de 0,09% na frequência de micronúcleos depois do exame.

No GE existem 8 indivíduos fumadores que apresentam uma frequência média de micronúcleos de $0,003 \pm 0,002$ antes do exame e $0,004 \pm 0,002$, 10 dias após o mesmo. No grupo de indivíduos não fumadores (12 indivíduos) do GE foi observada uma frequência média de micronúcleos de $0,005 \pm 0,003$ antes do exame e $0,005 \pm 0,003$ 10 dias depois. Dado que não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos, antes do exame ($p=0,233$) e 10 dias após o mesmo ($p=0,500$), optou-se por fazer uma análise global, juntando-se estes dois grupos num só.

Tabela 10 - Caracterização e distribuição dos micronúcleos no grupo exposto à radiação ionizante, antes e após a realização do mesmo.

Dador	Gênero	Idade (Anos)	Colheita	Nº Células	Distribuição de MN em células mono						Nº MN total	MN/Célula
					0	1	2	3	4	5		
D1	F	69	Antes	2000	1994	4	2	0	0	0	8	0,0040
			Depois	2000	1992	5	2	0	1	0	13	0,0065
D2	F	19	Antes	2000	1995	4	1	0	0	0	6	0,0030
			Depois	2000	1995	4	0	0	1	0	8	0,0040
D3	F	18	Antes	2000	1996	4	0	0	0	0	4	0,0020
			Depois	2000	1997	3	0	0	0	0	3	0,0015
D4	F	53	Antes	2000	1995	3	0	1	0	1	11	0,0055
			Depois	2000	1990	8	1	1	0	0	13	0,0065
D5	M	30	Antes	2000	1994	4	2	0	0	0	8	0,0040
			Depois	2000	1995	4	0	1	0	0	7	0,0035
D6	F	47	Antes	2000	1986	10	2	2	0	0	20	0,0100
			Depois	2000	1986	12	1	1	0	0	17	0,0085
D7	F	33	Antes	2000	1998	2	0	0	0	0	2	0,0010
			Depois	2000	1995	5	0	0	0	0	5	0,0025
D8	F	62	Antes	2000	1996	3	1	0	0	0	5	0,0025
			Depois	2000	1999	0	1	0	0	0	2	0,0010
D9	F	44	Antes	2000	1991	7	2	0	0	0	11	0,0055
			Depois	2000	1992	8	0	0	0	0	8	0,0040
D10	M	68	Antes	2000	1999	1	0	0	0	0	1	0,0005
			Depois	2000	1997	3	0	0	0	0	3	0,0015
D24	M	44	Antes	2000	1995	4	1	0	0	0	6	0,0030
			Depois	2000	1992	7	1	0	0	0	9	0,0045
D25	F	55	Antes	2000	1994	5	1	0	0	0	7	0,0035
			Depois	2000	1991	7	2	0	0	0	11	0,0055
D26	M	24	Antes	2000	1985	12	3	0	0	0	18	0,0090
			Depois	2000	1983	15	2	0	0	0	19	0,0095
D27	F	24	Antes	2000	1993	4	1	1	1	0	13	0,0065
			Depois	2000	1989	7	4	0	0	0	15	0,0075
D29	M	52	Antes	2000	1999	1	0	0	0	0	1	0,0005
			Depois	2000	1991	9	0	0	0	0	9	0,0045
D30	M	37	Antes	2000	1993	5	1	1	0	0	10	0,0050
			Depois	2000	1994	5	1	0	0	0	7	0,0035
D31	F	86	Antes	2000	1991	7	2	0	0	0	11	0,0055
			Depois	2000	1989	9	2	0	0	0	13	0,0065
D33	M	24	Antes	2000	1995	5	0	0	0	0	5	0,0025
			Depois	2000	1991	8	1	0	0	0	10	0,0050
D34	M	36	Antes	2000	1996	4	0	0	0	0	4	0,0020
			Depois	2000	1995	3	2	0	0	0	7	0,0035
D35	F	54	Antes	2000	1992	8	0	0	0	0	8	0,0040
			Depois	2000	1992	4	2	2	0	0	14	0,0070
Total				80000	79722	223	41	10	3	1		

D - dador; F - sexo feminino; M - sexo masculino; MN - micronúcleo; mono - células mononucleadas.

Na Tabela 10 é possível observar novamente que o número de células mononucleadas sem micronúcleo é superior ao número de células mononucleadas com micronúcleo, tanto nas células recolhidas antes como depois do exame de ortopantomografia. Verificou-se igualmente que nas células mononucleadas, com micronúcleo, as que apresentam um micronúcleo são as que se encontram em maior número quer antes da realização do exame quer após. Entre as células recolhidas antes e depois do exame de ortopantomografia foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p=0,028$). A frequência média de micronúcleos antes do exame foi de $0,004 \pm 0,003$. Depois do exame a frequência média de micronúcleos foi de $0,005 \pm 0,002$. A média de idades no GE é de $43,9 \pm 18,6$ anos. Neste grupo observou-se um aumento ligeiro da frequência de micronúcleos após a realização do exame.

Na Figura 18 e 19 é possível observar a distribuição e frequência de micronúcleos nos dadores pertencentes ao GE, antes e depois do exame de ortopantomografia.

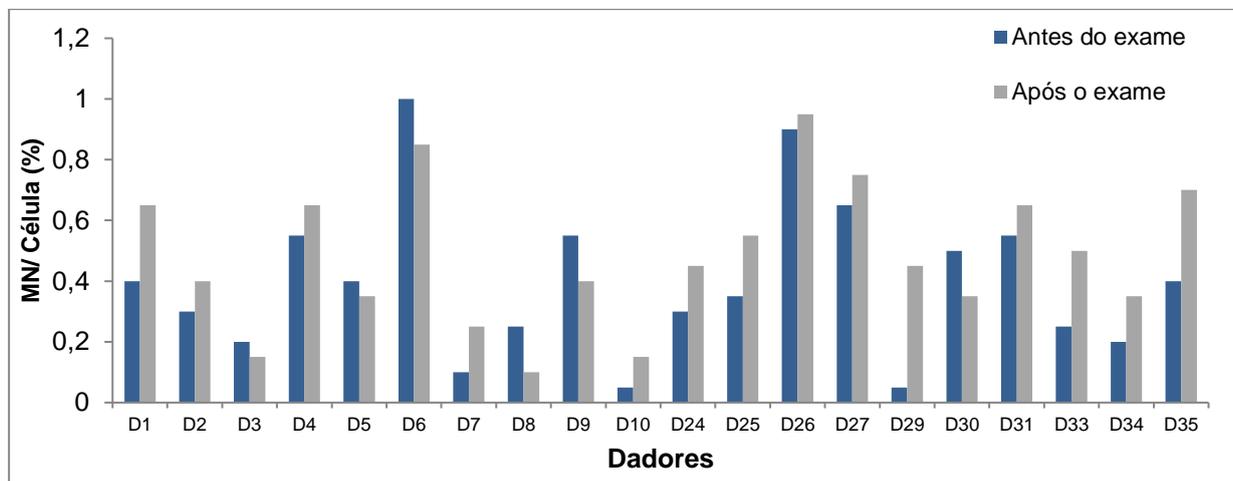


Figura 18 - Distribuição da frequência de micronúcleos no grupo exposto à radiação ionizante.

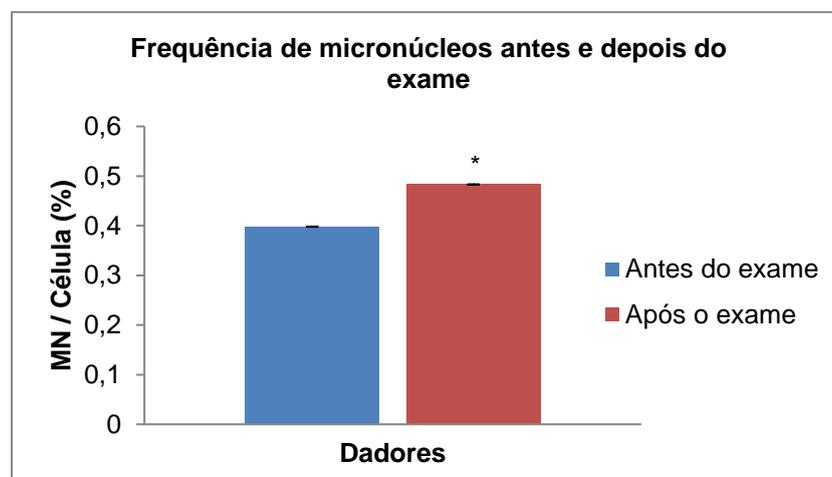


Figura 19 - Frequência de micronúcleos antes e após o exame de ortopantomografia. * - diferença estatisticamente significativa ($p=0,028$).

Os dados D3, D5, D6, D8, D9 e D30 apresentam uma descida na frequência de micronúcleos depois do exame, ao contrário dos restantes dados. O dado D29 apresenta a maior diferença na frequência de micronúcleos, antes e depois do exame, apresentando um aumento na frequência de micronúcleos após o exame.

3.2.1 Comparação entre dados do grupo exposto à radiação ionizante

Para o GE a análise entre dados foi realizada em termos de género e faixa etária. O GE é constituído por 12 mulheres e 8 homens. Foi verificado para os dois géneros um aumento da frequência de micronúcleos nas células recolhidas depois do exame, 0,07% no género feminino e de 0,11% no género masculino (Tabela 11).

Tabela 11 - Comparação entre os dados do género feminino e masculino antes e depois do exame de ortopantomografia tendo em conta a distribuição do número de micronúcleos.

Género	Nº Células	Colheita	Distribuição de MN em células mono						Nº MN total	Média (MN/célula) ± DP
			0	1	2	3	4	5		
F	24000	Antes	23921	61	12	4	1	1	106	0,0044 ± 0,0024
		Depois	23907	72	15	4	2	0	122	0,0051 ± 0,0024
M	16000	Antes	15956	36	7	1	0	0	53	0,0033 ± 0,0028
		Depois	15938	54	7	1	0	0	71	0,0044 ± 0,0023

F - sexo feminino; M - sexo masculino; MN - micronúcleo; mono - células mononucleadas; DP - desvio padrão.

Nas células recolhidas antes do exame de ortopantomografia e para o género feminino foram registados 106 micronúcleos em 24000 células mononucleadas. No género masculino foram visualizados 53 micronúcleos no total de 16000 células mononucleadas. A frequência de micronúcleos nas células recolhidas antes do exame de ortopantomografia foi superior para o género feminino. Para o género feminino após o exame de ortopantomografia contabilizaram-se 122 micronúcleos em 24000 células estudadas. No caso do género masculino foram contabilizados 71 micronúcleos em 16000 células mononucleadas. Mais uma vez o género feminino apresenta uma frequência de micronúcleos superior ao género masculino (Figura 20).

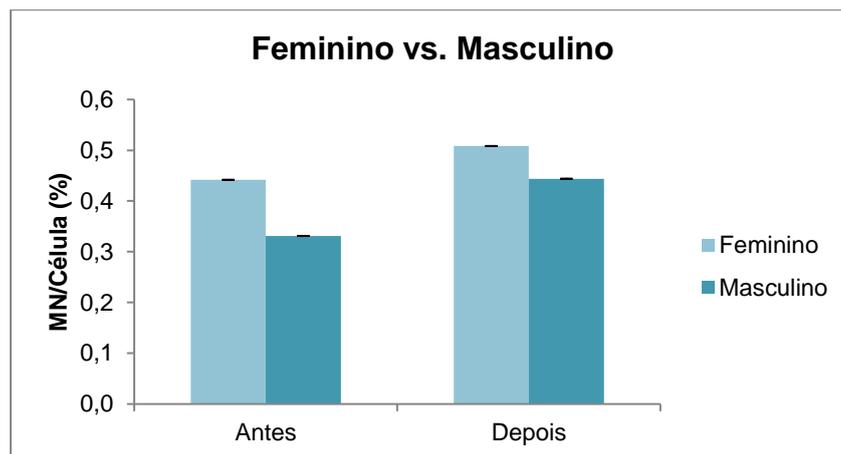


Figura 20 - Comparação da frequência de micronúcleos nos dadores do gênero feminino e masculino, antes e depois do exame.

O GE é constituído por dadores cuja idade varia entre os 18 e os 86 anos. Para analisar a influência da idade na frequência de micronúcleos, antes e após a realização do exame, o GE foi dividido em 4 subgrupos etários: 18 - 24, 30 - 44, 44 - 54 e 55 - 86 anos, constituído por 5 dadores cada (Tabela 12). Em cada subgrupo foram lidas 10000 células mononucleadas, antes do exame de ortopantomografia e 10 dias após o mesmo.

Tabela 12 - Comparação do número de micronúcleos entre grupos etários antes e depois da realização do exame.

Grupo Etário (anos)	Nº Células	Colheita	Distribuição de MN em células mono						Nº MN Total	Média (MN/célula) ± DP
			0	1	2	3	4	5		
18 - 24	10000	Antes	9964	29	5	1	1	0	46	0,0046 ± 0,0030
		Depois	9955	37	7	0	1	0	55	0,0055 ± 0,0031
30 - 44	1000	Antes	9972	22	5	1	0	0	35	0,0035 ± 0,0019
		Depois	9971	25	3	1	0	0	34	0,0034 ± 0,0005
44 - 54	1000	Antes	9967	26	3	3	0	1	46	0,0046 ± 0,0035
		Depois	9951	40	5	4	0	0	62	0,0062 ± 0,0017
55 - 86	1000	Antes	9974	20	6	0	0	0	32	0,0032 ± 0,0019
		Depois	9968	24	7	0	1	0	42	0,0042 ± 0,0027

MN - micronúcleo; mono - células mononucleadas; DP - desvio padrão.

No grupo etário dos 18 - 24 anos, foram contabilizados 46 micronúcleos antes do exame de ortopantomografia e 55 micronúcleos nas células recolhidas 10 dias após do exame, verificando-se assim um aumento na frequência de micronúcleos de 0,09% nas células recolhidas depois do exame de ortopantomografia.

No grupo etário dos 30 - 44 anos, foram contabilizados 35 micronúcleos antes do exame de ortopantomografia e 34 micronúcleos depois do exame. Neste grupo verificou-se uma diminuição de 0,01% na frequência de micronúcleos, nas células recolhidas depois do exame de ortopantomografia.

No grupo etário dos 44 - 54 anos, o número de micronúcleos visualizados antes do exame de ortopantomografia foi de 46. Depois do exame foram contabilizados 62 micronúcleos. Verificou-se um aumento na frequência de micronúcleos de 0,16% relativamente às células recolhidas após do exame de ortopantomografia.

Por fim, no grupo etário dos 55 - 86 anos, verificou-se novamente um aumento na frequência de micronúcleos de 0,1% nas células recolhidas depois do exame de ortopantomografia. Foram visualizados 32 micronúcleos nas células mononucleadas antes do exame e 42 micronúcleos depois do exame.

Os grupos etários que possuem maior frequência de micronúcleos antes e após o exame de ortopantomografia são dos 18 - 24 anos e dos 44 - 54 anos (Figura 21). Na comparação entre grupos etários antes e depois do exame de ortopantomografia não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas.

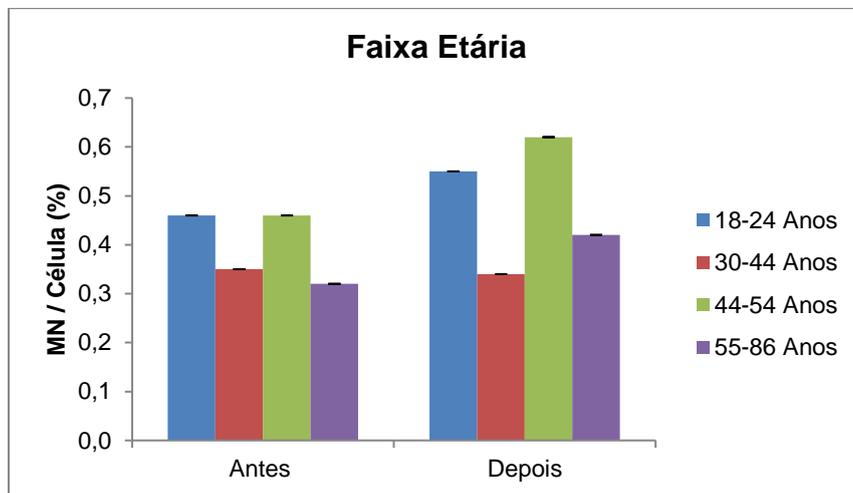


Figura 21 - Comparação entre os grupos etários, antes e após o exame de ortopantomografia.

3.3 Grupo de fumadores

No GF analisaram-se 40000 células mononucleadas e foram contabilizados 213 micronúcleos (Tabela 13).

Tabela 13 - Caracterização e distribuição dos micronúcleos no grupo de fumadores.

Dador	Género	Idade (Anos)	Nº Células	Distribuição de MN em células mono						Nº MN total	MN/Célula
				0	1	2	3	4	5		
D14	F	53	2000	1995	5	0	0	0	0	5	0,0025
D20	M	65	2000	1997	3	0	0	0	0	3	0,0015
D23	F	33	2000	1998	0	2	0	0	0	4	0,0020
D32	F	35	2000	1997	2	1	0	0	0	4	0,0020
D36	M	41	2000	1993	6	0	1	0	0	9	0,0045
D37	M	44	2000	1993	1	1	4	1	0	19	0,0095
D38	M	41	2000	1990	5	4	1	0	0	16	0,0080
D39	M	32	2000	1994	6	0	0	0	0	6	0,0030
D41	M	52	2000	1990	8	2	0	0	0	12	0,0060
D43	M	41	2000	1985	10	1	4	0	0	24	0,0120
D44	F	35	2000	1984	11	0	3	1	1	29	0,0145
D45	M	63	2000	1992	4	3	1	0	0	13	0,0065
D46	M	40	2000	1993	5	2	0	0	0	9	0,0045
D47	M	41	2000	1994	5	1	0	0	0	7	0,0035
D48	M	57	2000	1995	4	1	0	0	0	6	0,0030
D49	F	30	2000	1998	1	1	0	0	0	3	0,0015
D50	F	27	2000	1986	9	4	1	0	0	20	0,0100
D51	F	28	2000	1989	10	1	0	0	0	12	0,0060
D60	M	56	2000	1996	3	1	0	0	0	5	0,0025
D64	F	45	2000	1994	5	1	0	0	0	7	0,0035
Total			40000	39853	103	26	15	2	1	213	0,0053

D - dador; F - sexo feminino; M - sexo masculino; MN - micronúcleo; mono - células mononucleadas.

Tal como o observado no GE e no GC, o número de células mononucleadas sem micronúcleo é maior do que o número de células mononucleadas com micronúcleo. Verificou-se mais uma vez, que nas células mononucleadas com micronúcleo as que apresentam um micronúcleo são as que se encontram em maior número. A frequência de micronúcleos neste grupo é superior ao GC, havendo um aumento de 0,34% na frequência de micronúcleos, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p=0,001$). A frequência média de micronúcleos foi de $0,005 \pm 0,004$. A média de idades no GF é de $42,9 \pm 11,4$ anos.

3.3.1 Comparação entre dadores do grupo de fumadores

Tal como nos grupos anteriormente estudados a análise entre dadores do GF realizou-se igualmente em termos de género e faixa etária. Este grupo é constituído por 8 mulheres e 12 homens, verificando-se que a frequência de micronúcleos é idêntica para os dois géneros (Tabela 14).

Tabela 14 - Distribuição do número de micronúcleos entre o gênero masculino e feminino do grupo de fumadores.

Gênero	Nº Células	Distribuição de MN em células mono						Nº MN total	Média ± DP
		0	1	2	3	4	5		
F	16000	15941	43	10	4	1	1	84	0,0053 ± 0,0047
M	24000	23912	60	16	11	1	0	129	0,0054 ± 0,0031

F - sexo feminino; M - sexo masculino; MN - micronúcleo; mono - células mononucleadas; DP - desvio padrão.

O GF é constituído por dadores cuja idade varia entre os 27 e os 65 anos. Tal como nos dois grupos anteriores, o GF foi dividido em 4 subgrupos, cada um constituído por 5 dadores: 27 - 33, 35 - 41, 41 - 52 e 53 - 65 anos (Tabela 15).

Tabela 15 - Distribuição do número de micronúcleos nas faixas etárias do grupo de fumadores.

Grupo Etário (anos)	Nº Células	Distribuição de MN em células mono						Nº MN total	Média ± DP
		0	1	2	3	4	5		
27 - 33	10000	9965	26	8	1	0	0	45	0,0045 ± 0,0035
35 - 41	10000	9957	29	7	5	1	1	67	0,0067 ± 0,0049
41 - 52	10000	9956	29	6	8	1	0	69	0,0069 ± 0,0038
53 - 65	10000	9975	19	5	1	0	0	32	0,0032 ± 0,0019

MN - micronúcleo; mono - células mononucleadas; DP - desvio padrão.

A maior frequência de micronúcleos foi obtida pelos grupos etários dos 35 - 41 e dos 41 - 52 anos e a menor frequência foi verificada no grupo etário do 53 - 65 anos, existindo uma diminuição de 0,37% na frequência de micronúcleos entre o grupo etário 41 - 52 anos e 53 - 65 anos.

3.4 Células binucleadas

No decorrer deste trabalho foram também contabilizadas o número de células binucleadas de cada indivíduo, até se prefazer o total de 2000 células mononucleadas, tendo sido visualizadas 553 células binucleadas no GC como se encontra descrito na Tabela 16. A média de células binucleadas por dador foi de $27,65 \pm 12,60$.

Tabela 16 - Número de células binucleadas no grupo de controlo.

Dador	Nº células mono	Nº células BN	Células BN (%)
D11	2000	61	2,96
D12	2000	37	1,82
D15	2000	16	0,79
D16	2000	21	1,04
D17	2000	18	0,89
D18	2000	49	2,39
D19	2000	36	1,77
D21	2000	22	1,09
D52	2000	26	1,28
D53	2000	26	1,28
D54	2000	19	0,94
D55	2000	12	0,60
D56	2000	45	2,20
D57	2000	25	1,23
D58	2000	32	1,57
D59	2000	32	1,57
D61	2000	22	1,09
D62	2000	17	0,84
D63	2000	17	0,84
D65	2000	20	0,99
Total	40000	553	

D - dador; mono - células mononucleadas; BN - células binucleadas.

No GE, durante a análise das 80000 células mononucleadas foram contabilizadas 512 e 572 células binucleadas nas amostras recolhidas antes e depois do exame de ortopantomografia, respetivamente (Tabela 17). As células recolhidas depois do exame apresentaram maior número de células binucleadas em comparação com as células recolhidas antes do exame. Contudo não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p=0,275$). A média de células binucleadas por dador antes do exame foi de $25,60 \pm 11,79$ e depois do exame a média foi de $28,60 \pm 12,36$.

Tabela 17 - Número de células binucleadas antes e após do exame de ortopantomografia no grupo exposto.

Dador	Colheita	Nº células mono	Nº Células BN	Células BN (%)
D1	Antes	2000	45	2,25
	Depois	2000	42	2,06
D2	Antes	2000	10	0,50
	Depois	2000	8	0,40
D3	Antes	2000	14	0,70
	Depois	2000	40	1,96
D4	Antes	2000	18	0,89
	Depois	2000	40	1,96
D5	Antes	2000	35	1,72
	Depois	2000	48	2,34
D6	Antes	2000	13	0,65
	Depois	2000	22	1,09
D7	Antes	2000	35	1,72
	Depois	2000	16	0,79
D8	Antes	2000	22	1,09
	Depois	2000	30	1,48
D9	Antes	2000	19	0,94
	Depois	2000	20	0,99
D10	Antes	2000	32	1,57
	Depois	2000	33	1,62
D24	Antes	2000	35	1,72
	Depois	2000	24	1,19
D25	Antes	2000	23	1,14
	Depois	2000	24	1,19
D26	Antes	2000	6	0,30
	Depois	2000	18	0,89
D27	Antes	2000	32	1,57
	Depois	2000	43	2,15
D29	Antes	2000	48	2,34
	Depois	2000	50	2,44
D30	Antes	2000	12	0,60
	Depois	2000	26	1,28
D31	Antes	2000	35	1,72
	Depois	2000	38	1,86
D33	Antes	2000	31	1,53
	Depois	2000	18	0,89
D34	Antes	2000	29	1,43
	Depois	2000	13	0,65
D35	Antes	2000	18	0,89
	Depois	2000	19	0,94

D - dador; mono - células mononucleadas; BN - células binucleadas.

Por fim, no GF foram contabilizadas 443 células binucleadas ao longo do registro das 40000 células mononucleadas. Este grupo foi aquele que apresentou o menor número de células binucleadas (Tabela 18), não existindo contudo diferenças estatisticamente significativas em relação ao GC ($p=0,155$). A média de células binucleadas por dador foi de $22,15 \pm 8,21$.

Tabela 18 - Número de células binucleadas no grupo de fumadores.

Dador	Nº células mono	Nº células BN	Células BN (%)
D14	2000	25	1,23
D20	2000	30	1,48
D23	2000	16	0,79
D32	2000	36	1,77
D36	2000	17	0,84
D37	2000	18	0,89
D38	2000	12	0,60
D39	2000	13	0,65
D41	2000	11	0,55
D43	2000	22	1,09
D44	2000	25	1,23
D45	2000	36	1,77
D46	2000	8	0,40
D47	2000	23	1,14
D48	2000	21	1,04
D49	2000	27	1,33
D50	2000	36	1,77
D51	2000	20	0,99
D60	2000	23	1,14
D64	2000	24	1,19
Total	40000	443	

D - dador; mono - células mononucleadas; BN - células binucleadas.

Durante a contabilização das células binucleadas não foram observados micronúcleos na análise dos três grupos estudados.

CAPÍTULO 4

Discussão dos resultados

4.1 Células mononucleadas

4.1.1 Grupo controlo

O ensaio do micronúcleo na avaliação da instabilidade genética é uma ferramenta importante na deteção do risco de tumores. Como tal, é importante conhecermos o número médio de micronúcleos na população em geral. Segundo Ceppi *et al.* (2010) a frequência basal de micronúcleos em células da mucosa jugal de indivíduos saudáveis, não expostos a agentes genotóxicos, é de 1,10 em 1000 células diferenciadas. Este valor pode variar de população para população como é referenciado em alguns estudos. O presente trabalho apresenta resultados ligeiramente superiores aos obtidos noutros estudos relativamente ao número médio de micronúcleos do grupo controlo (Tabela 19).

Tabela 19 - Valor médio de micronúcleos, de diferentes grupos controlo de estudos em células da mucosa jugal.

Autor	Número de Participantes	Média ± Desvio Padrão	Número de células da mucosa jugal
Bastos Aires <i>et al.</i> , 2013	15	1,33 ± 0,90	1000
MR <i>et al.</i> , 2014	45	0,50 ± 0,80	2000
Presente trabalho	20	3,85 ± 2,70	2000

Considerando a idade e o género, as variáveis demográficas mais importantes na frequência de micronúcleos de uma população (Khlifi *et al.*, 2013), o estudo de Bonassi *et al.* (2011) refere que a relação entre o género masculino e feminino não é relevante na frequência de micronúcleos em células da mucosa jugal. No entanto, o estudo de Khlifi *et al.* (2013) defende que existem diferenças entre géneros ($p=0,04$), em que o género feminino possui uma frequência de micronúcleos superior ($2,99 \pm 2,48$) ao género masculino ($1,65 \pm 1,33$). Em contrapartida, o estudo de Bloching *et al.* (2008), refere que o género masculino apresenta aproximadamente 1 micronúcleo em 1000 células a mais do que o género feminino. Os nossos resultados estão de acordo com o estudo de Bloching *et al.* (2008), uma vez que o género masculino apresenta uma frequência de micronúcleos superior ($0,0023 \pm 0,0016$) ao género feminino ($0,0016 \pm 0,0010$) (Tabela 8).

No GC em estudo foi observado um aumento do número de micronúcleos com o aumento da idade (entre os 6 e os 83 anos), contudo as diferenças observadas não são estatisticamente significativas (Tabela 9). Segundo Thomas *et al.* (2008), num estudo realizado com um GC jovem (30 indivíduos) dos 18 aos 26 anos e um GC com idades avançadas (31 indivíduos) dos 64 aos 75 anos, verificou-se que existiam diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos estudados, apresentando o GC com idade mais avançada uma frequência de micronúcleos em células da mucosa jugal superior ao GC jovem.

Por outro lado, um estudo envolvendo 57 indivíduos controlo refere que a frequência de micronúcleos em células da mucosa jugal de indivíduos com idades inferiores ou iguais a 55 anos é menor ($2,26 \pm 1,97$) do que nos indivíduos com idades superiores a 55 anos ($2,43 \pm 2,24$), embora as diferenças observadas não sejam estatisticamente significativas (Khlifi *et al.*, 2013).

4.1.2 Grupo exposto à radiação ionizante

O valor da dose efetiva associado a cada exame de ortopantomografia (Tabela 1), está dependente do morfotipo de cada paciente. O painel de comando do ortopantomógrafo tem um seletor de programas de aquisição em modo automático para os diferentes exames, embora seja possível de realizar a seleção em modo manual, sempre que se justifique. Em adultos, é selecionado o programa standard, cujos fatores técnicos de exposição variam entre 66 kV - 77 kV e 8,0 mA - 16 mA, para um tempo de 17,6 segundos. Neste trabalho os valores de dose efetiva variaram entre $7,2 \mu\text{Sv}$ - $35,4 \mu\text{Sv}$. Estudos efetuados em células da mucosa jugal expostas à RI em exames de ortopantomografia também demonstram variações nos fatores técnicos de exposição a que os participantes foram submetidos (Angelieri *et al.*, 2010a; KB *et al.*, 2014 e Ribeiro *et al.*, 2008), existindo contudo fatores técnicos de exposição constantes nos estudos realizados por Ribeiro e Angelieri (2008) e Arora *et al.* (2014) (Tabela 20).

Tabela 20 - Fatores técnicos associados aos exames de ortopantomografia em diferentes estudos.

Autor	Fatores técnicos de exames de ortopantomografia		
	kV	mA	s
(KB <i>et al.</i> , 2014)	78 - 80	10	12
(Ribeiro e Angelieri, 2008)	71	15	14
(Ribeiro <i>et al.</i> , 2008)	60 - 80	10	14
(Arora <i>et al.</i> , 2014)	74	10	12
(Angelieri <i>et al.</i> , 2010a)	250 - 71	15	14
Presente trabalho	66 - 77	8,0 - 16	17,6

No GE existem indivíduos fumadores e não fumadores, tendo sido realizada uma análise global, agrupando-se estes dois grupos num só, dado que não foram observadas diferenças estatisticamente significativas antes nem após o exame de ortopantomografia, entre os dois subgrupos. No presente estudo as células da mucosa jugal foram recolhidas antes do exame de ortopantomografia e aproximadamente 10 dias depois, com o intuito de verificar se existiam diferenças na frequência de micronúcleos antes e depois da realização do exame. Sendo considerado em média 10 dias o tempo necessário para que as células da camada basal expostas aos raios-X migrem para a superfície (Angelieri *et al.*, 2007; Cerqueira *et al.*, 2008; Popova *et al.*, 2007). A existência de micronúcleos antes da realização do exame de ortopantomografia poderá estar relacionada com a exposição a agentes genotóxicos provenientes dos hábitos de cada indivíduo (tabágicos, alimentares, entre outros). Após a realização do exame, a frequência de micronúcleos provenientes da exposição à RI é dada pela

diferença entre o número de micronúcleos observados na segunda recolha de células da mucosa jugal e a primeira recolha, excluindo deste modo os micronúcleos intrínsecos do indivíduo (Lorenzoni *et al.*, 2012). Para este estudo efetuou-se uma seleção de indivíduos, excluindo aqueles que estiveram expostos a RI num intervalo igual ou inferior a 6 meses, assim como os indivíduos que apresentavam patologias passíveis de influenciar a frequência de micronúcleos.

Os resultados obtidos no GE revelaram um aumento da frequência de micronúcleos depois do exame, sendo este aumento estatisticamente significativo face à frequência de micronúcleos obtida antes do exame ($p=0,028$). Arora *et al.* (2014), num estudo efetuado numa população de 53 indivíduos (21 homens e 32 mulheres), submetidos à ortopantomografia, obteve resultados com uma tendência idêntica. A frequência de micronúcleos nas células da mucosa jugal antes do exame foi de $0,1000 \pm 0,0899$, depois do exame existiu um aumento na frequência de micronúcleos para $0,1264 \pm 0,0812$, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p=0,004$). Contudo, a maioria dos estudos realizados em células da mucosa jugal expostas à RI proveniente de exames de ortopantomografia, demonstram não existirem diferenças estatisticamente significativas na frequência de micronúcleos nas células recolhidas antes e depois do exame (Angelieri *et al.*, 2007; Angelieri *et al.*, 2010a; Angelieri *et al.*, 2010b; Cerqueira *et al.*, 2004, Lorenzoni *et al.*, 2012; Ribeiro, 2012; Ribeiro *et al.*, 2008; Ribeiro e Angelieri, 2008).

Relativamente à análise entre géneros, observou-se sempre uma frequência de micronúcleos superior para o género feminino comparativamente ao género masculino (Tabela 11), verificando-se um aumento na frequência de micronúcleos em ambos os géneros depois do exame, não tendo existido diferenças estatisticamente significativas. Noutros estudos como o de Madhavan *et al.* (2012), que compara a frequência de micronúcleos antes e depois do exame de ortopantomografia em 35 indivíduos saudáveis não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre géneros quer antes do exame ($p=0,640$), quer depois do exame ($p=0,710$).

Relativamente à análise das faixas etárias do GE, antes do exame não foi verificado um aumento da frequência de micronúcleos com o aumento da idade (Tabela 12), como seria de esperar segundo Kashyap e Reddy. (2012) e Minicucci *et al.* (2005). Depois do exame, os grupos etários não demonstraram uma subida da frequência de micronúcleos com o aumento da idade, não tendo sido verificados valores estatisticamente significativos. Contudo, o estudo de Popova *et al.* (2007) envolvendo um grupo etário constituído por indivíduos com idades entre 24 - 73 anos, refere existirem diferenças estatisticamente significativas na frequência de micronúcleos das células da mucosa jugal, antes da exposição à RI. Com o aumento da idade verificou-se um aumento da frequência de micronúcleos. Os indivíduos do grupo exposto à radiação ionizante que participaram neste estudo não tinham hábitos tabágicos.

Os resultados deste trabalho apresentam um aumento do número de micronúcleos em resposta à exposição a RI do exame de ortopantomografia, nas células da mucosa jugal. Observou-se que os resultados obtidos apontam para a existência de alterações citogenéticas, sugerindo a necessidade da continuação deste estudo numa população maior para a obtenção de resultados mais fiáveis do ponto de vista estatístico.

4.1.3 Grupo de fumadores

O tabaco e o fumo do tabaco são constituídos por matrizes complexas, formadas por vários compostos. Segundo a IARC (2004) os cigarros são constituídos por tabaco *flue-cured* e *light air-cured* que pertencem às classes 1 e 3A, respetivamente. Entre os compostos constituintes do tabaco existem agentes cancerígenos provenientes de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, nitrosaminas específicas, entre outros, aumentando o risco do aparecimento de tumores (Xue *et al.*, 2014). Estando estes compostos químicos em contacto com as células da mucosa jugal, torna-se pertinente a avaliação do seu impacto nestas células.

Vários estudos foram realizados com o intuito de avaliar se o consumo de tabaco tem influência no aumento da frequência de micronúcleos. Foram analisados vários parâmetros relativos ao seu consumo, nomeadamente se o número de cigarros fumados por dia, o tipo de tabaco e o número de anos de consumo seriam relevantes no aparecimento de lesões genéticas (Bonassi *et al.*, 2011; Naderi *et al.*, 2012; Sellappa *et al.*, 2009).

No presente trabalho foi estudada a influência do tabaco por comparação do GF com o GC. Observou-se que a frequência de micronúcleos nas células da mucosa jugal do GF foi superior à frequência no GC, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p=0,001$), estes resultados estão de acordo com vários estudos realizados (Bansal *et al.*, 2012; Bonassi *et al.*, 2011; Gabriel *et al.*, 2006; Naderi *et al.*, 2012). Segundo Bansal *et al.* (2012), a frequência de micronúcleos num grupo de 25 indivíduos fumadores é superior ($11,96 \pm 4,23$) à de um grupo de 25 indivíduos não fumadores ($4,17 \pm 2,99$), sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p=0,003$). Contudo, o estudo Angelieri *et al.* (2010b) revelou não existirem diferenças estatisticamente significativas na frequência de micronúcleos entre um grupo de 15 indivíduos fumadores e um grupo de 17 não fumadores. Por outro lado, o estudo realizado por Bonassi *et al.* (2011) que investigou o padrão de lesões genéticas associadas ao número de cigarros fumados por dia, demonstrou que os indivíduos que não tinham hábitos tabágicos tinham uma frequência de micronúcleos inferior ao dos indivíduos que tinham hábitos tabágicos e que consumiam mais de 40 cigarros por dia.

No presente estudo, o género masculino do GF apresenta uma frequência de micronúcleos idêntica ao género feminino (Tabela 14). O grupo etário dos 53 - 65 anos apresentou uma frequência de micronúcleos mais baixa comparativamente aos restantes grupos etários (Tabela 15). Nos restantes grupos etários com o aumento da idade foi verificado um aumento do número de micronúcleos, não existindo contudo diferenças estatisticamente significativas.

Através dos resultados obtidos é possível inferir que o fumo do tabaco está relacionado com o aumento da frequência de micronúcleos na mucosa jugal, suportando a hipótese de existir um aumento do risco de desenvolvimento de tumores da cavidade oral (Bansal *et al.*, 2012).

4.2 Células binucleadas

Ao longo do estudo, os resultados obtidos no GE revelaram um aumento do número de células binucleadas da mucosa jugal após o exame de ortopantomografia (Tabela 17), não tendo sido observadas diferenças estatisticamente significativas ($p=0,275$).

Quando se comparou o número de células binucleadas registadas no GC e no GF verificou-se que o número de células binucleadas é superior no GC (Tabelas 16 e 18), embora esta diferença não seja estatisticamente significativa ($p=0,155$). Resultados semelhantes foram obtidos por Khlifi *et al.* (2013) quando comparou um grupo de 13 fumadores com um grupo de 44 não fumadores. O grupo de fumadores apresentou uma frequência de células binucleadas da mucosa jugal menor ($2,83 \pm 1,73$) que o grupo de não fumadores ($3,95 \pm 1,90$), sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p=0,046$). Também no estudo de Raj e Mahajan (2011) observou-se que com o aumento da dose de radiação ionizante existiu um aumento do número de células binucleadas, indo ao encontro dos resultados obtidos no nosso GE.

Perante os resultados apresentados, a realização de mais estudos em células da mucosa jugal, envolvendo um grande número de amostras, poderá ajudar na compreensão do aparecimento deste tipo de células face à exposição a agentes genotóxicos, como a RI ou o fumo do tabaco.

CAPÍTULO 5

Conclusões e Trabalhos Futuros

O impacto causado pela exposição à RI em atos médicos, quer de diagnóstico quer de intervenção terapêutica, tem-se revelado de grande importância, mas também de grande preocupação pela necessidade crescente de compreender melhor as possíveis lesões causadas a nível celular. A segurança do paciente deve ser considerada como um elemento importante na prestação e na melhoria da qualidade dos cuidados de saúde. O desenvolvimento de novos equipamentos que assegurem baixos níveis de emissão de RI e que permitam, ainda assim, adquirir imagens com boa qualidade de diagnóstico, deve ser tido como um objetivo prioritário, promovendo, deste modo, menores índices de exposição quer dos pacientes quer dos profissionais.

Neste estudo foi possível concluir que quer a exposição ao fumo do tabaco quer a exposição à RI proveniente de exames de ortopantomografia, induzem o aparecimento de micronúcleos nas células da mucosa jugal. Relativamente às células binucleadas verificou-se que existe uma variação na frequência destas células, consoante o tipo de agente genotóxico a que as células da mucosa jugal são expostas.

As ortopantomografias expõem o paciente a valores de dose de radiação relativamente baixos em comparação com outros procedimentos de diagnóstico médico. Os resultados no GE não são totalmente concordantes com os resultados provenientes de outros estudos (que apresentaram diferenças não significativas) tendo apresentado diferenças estatisticamente significativas. Estudos epidemiológicos envolvendo um grande número de amostras podem revelar mais acerca da influência da exposição a baixas doses de RI dos exames de ortopantomografia em células da mucosa jugal.

Por outro lado, o estudo dos diferentes estadios de apoptose nas células da mucosa jugal após a exposição a RI nos exames de ortopantomografia, seria uma abordagem interessante no conhecimento dos mecanismos celulares envolvidos na resposta das células da mucosa jugal à RI. A mesma abordagem poderia igualmente ser utilizada para estudar os efeitos tóxicos induzidos pelo tabaco sob as células da mucosa jugal.

CAPÍTULO 6

6.1 Bibliografia

- Angelier, F., Carlin, V., Martins, R. A., Ribeiro, D. A. 2011. Biomonitoring of mutagenicity and cytotoxicity in patients undergoing fixed orthodontic therapy. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 139(4): e399-e404.
- Angelier, F., Carlin, V., Saez, D. M., Pozzi, R., Ribeiro, D. A. 2010a. Mutagenicity and cytotoxicity assessment in patients undergoing orthodontic radiographs. *Dentomaxillofacial Radiology*, 39(7): 437-440.
- Angelier, F., Moleirinho, T. de C. G., Carlin, V., Oshima, C. T. F., Ribeiro, D. A. 2010b. 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. *Clinical Oral Investigations*, 14(6): 669-674.
- Angelier, F., de Oliveira, G. R., Sannomiya, E. K., Ribeiro, D. A. 2007. DNA damage and cellular death in oral mucosa cells of children who have undergone panoramic dental radiography. *Pediatric Radiology*, 37(6): 561-565.
- Antunes, A. C. M. D. 2012. Dissertação: Avaliação da lesão genética induzida por exposição a radiação ionizante na população Portuguesa. Universidade Nova de Lisboa.
- Arora, P., Devi, P., Wazir, S. S. 2014. Evaluation of Genotoxicity in Patients Subjected to Panoramic Radiography by Micronucleus Assay on Epithelial Cells of the Oral Mucosa, 11(1): 47-55.
- Bansal, H., Sandhu, V. S., Bhandari, R., Sharma, D. 2012. Evaluation of micronuclei in tobacco users: A study in Punjabi population. *Contemporary Clinical Dentistry*, 3(2): 184-187.
- Bartolotta, S. A., Pacskowski, M. G., Hick, A., Carballo, M. A. 2011. Micronuclei assay in exfoliated buccal cells from individuals exposed to arsenic in Argentina. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 61(2): 337-343.
- Bastos-Aires, D., Azevedo, Á., Pereira, M. de L., M., Pérez-Mongiovi, D., Teixeira, A. 2013. Preliminary study of micronuclei levels in oral exfoliated cells from patients with periodontitis. *Journal of Dental Sciences*, 8(2): 200-204.

- Bastos-Aires, D., Azevedo, Á., Pereira, M. de L., Perez-Mongiovi, D., Teixeira, A. 2012. Estudo preliminar dos tipos celulares da mucosa oral em pacientes com doença periodontal. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*, 53(2): 99-102.
- Basu, A., Mahata, J., Roy, A. K., Sarkar, J. N., Poddar, G., Nandy, A. K., Sarar, P. K., Dutta, P. K., Banerjee, A., Das, M., Ray, K., Roychaudhury, S., Natarajan, A., T., Nilsson, R., Giri, A. K. 2002. Enhanced frequency of micronuclei in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India. *Mutation Research*, 516(1-2): 29-40.
- Bloching, M., Reich, W., Schubert, J., Grummt, T., Sandner, A. 2008. Micronucleus rate of buccal mucosal epithelial cells in relation to oral hygiene and dental factors. *Oral Oncology*, 44(3): 220-226.
- Bonassi, S., Biasotti, B., Kirsch-Volders, M., Knasmueller, S., Zeiger, E., Burgaz, S., Bolognesi, C., Holland, N., Thomas, P., Fenech, M. 2009. State of the art survey of the buccal micronucleus assay - a first stage in the HUMNXL project initiative. *Mutagenesis*, 24(4): 295-302.
- Bonassi, S., Coskun, E., Ceppi, M., Lando, C., Bolognesi, C., Burgaz, S., Holland, N., Kirsh-Volders, M., Knasmueller, S., Zeiger, E., Carnesoltas, D., Cavallo, D., da Silva, J., de Andrade, V. M., Demircigil, G. C., Odio, A. D., Donmez-Altuntas, H., Gattas, G., Giri, A., Giri, S., Gómez-Meda, B., Gómez-Arroyo, S., Hadjidekova, V., Haveric, A., Kamboj, M., Kurteshi, K., Martino-Roth, M. G., Montoya, R. M., Nersesyan, A., Pastor-Benito, S., Salvadori, D. M. F., Shaposhnikova, A., Stopper, H., Thomas, P., Torres-Bugarín, O., Yadav, A. S., González, G. Z., Fenech, M. 2011. The HUman MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMN XL): The role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutation Research*, 728(3): 88-97.
- Bonassi, S., Ugolini, D., Kirsch-Volders, M., Strömberg, U., Vermeulen, R., Tucker, J. D. 2005. Human population studies with cytogenetic biomarkers: review of the literature and future perspectives. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 45(2-3): 258-270.
- Carlin, V., Artioli, A. J., Matsumoto, M. A., Filho, H. N., Borgo, E., Oshima, C. T. F., Ribeiro, D. A. 2010. Biomonitoring of DNA damage and cytotoxicity in individuals exposed to cone beam computed tomography. *Dentomaxillofacial Radiology*, 39(5): 295-299.
- Carrard, V. C., Costa, C. H., Ferreira, L. A., Lauxen, I. S., Rados, P. V. 2007. Teste dos Micronúcleos - Um Biomarcador de Dano Genotóxico em Células Descamadas da Mucosa Bucal. *Oral Mucosa Cells. Revista Faculdade Odontológica*, 48(1-3): 77-81.
- Ceppi, M., Biasotti, B., Fenech, M., Bonassi, S. 2010. Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: Statistical and epidemiological issues. *Mutation Research*, 705(1): 11-19.

- Cerqueira, E. M. M., Meireles, J. R. C., Lopes, M. A., Junqueira, V. C., Gomes-Filho, I. S., Trindade, S., Machado-Santelli, G. M. 2008. Genotoxic effects of X-rays on keratinized mucosa cells during panoramic dental radiography. *Dentomaxillofacial Radiology*, 37(7): 398-403.
- Cerqueira, E. M., Gomes-Filho, I. S., Trindade, S., Lopes, M. A., Passos, J. S., Machado-Santelli, G. M. 2004. Genetic damage in exfoliated cells from oral mucosa of individuals exposed to X-rays during panoramic dental radiographies. *Mutation Research*, 562(1-2): 111-117.
- Chua, M. L. K., Rothkamm, K. 2013. Biomarkers of Radiation Exposure: Can They Predict Normal Tissue Radiosensitivity. *Clinical Oncology*, 25(10): 610-616.
- Dórea, L. T. M., Meireles, J. R. C., Lessa, J. P. R., Oliveira, M. C., Pereira, C. A. B., de Campos, A. P., Cerqueira, E. M. M. 2012. Chromosomal Damage and Apoptosis in Exfoliated Buccal Cells from Individuals with Oral Cancer. *International Journal of Dentistry*, Volume 2012, Article ID457054, 6 pages.
- Fenech, M. 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 2(5): 1084-1104.
- Fenech, M., Bonassi, S. 2011. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*, 26(1): 43-49.
- Fenech, M., Holland, N., Chang, W. P., Zeiger, E., Bonassi, S. 1999. The Human Micronucleus Project - An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research*, 428(1-2): 271-283.
- Gabriel, H. E., Crott, J. W., Ghandour, H., Dallal, G. E., Choi, S., Keyes, M. K., Hang, H., Liu, Z., Nadeau, M., Johnston, A., Mager, D., Mason, J. B. 2006. Chronic cigarette smoking is associated with diminished folate status, altered folate form distribution, and increased genetic damage in the buccal mucosa of healthy adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83(4): 835-841.
- Gattás, G. J. F., de Almeida Cardoso, L., de Araújo Medrado-Faria, M., Saldanha, P. H. 2001. Frequency of oral mucosa micronuclei in gas station operators after introducing methanol. *Occupational Medicine*, 51(2): 107-113.
- Hintzsche, H., Polat, B., Schewe, V., Djuzenova, S., Pfreundner, L., Flentje, M., Stopper, H. 2012. Micronucleus formation kinetics in buccal mucosa cells of head and neck cancer patients undergoing radiotherapy. *Toxicology Letters*, 212(1): 33-37.
- Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, S., Fenech, M. 2008. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutation Research*, 659(1-2): 93-108.

- Holland, N., Fucic, A., Merlo, D. F., Sram, R., Kirsch-Volders, M. 2011. Micronuclei in neonates and children: effects of environmental, genetic, demographic and disease variables. *Mutagenesis*, 26(1): 51-56.
- IAEA, 2004. Radiation, People and the Environment. International Atomic Energy Agency, Austria.
- IAEA, 2010. Radiation Biology: A Handbook for Teachers and Students. International Atomic Energy Agency Training course series No.42, Vienna.
- IAEA, 2011. Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies. International Atomic Energy Agency, Vienna.
- IAEA, 2014. Diagnostic Radiology Physics: A handbook for teachers and students. International Atomic Energy Agency, Vienna.
- IARC, 2004. Tobacco smoke and Involuntary Smoking. World Health Organization International Agency for Research on Cancer Vol.83, France.
- ICRP 2007. ICRP Publication 103 - The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection.
- Jin, Y., Jeong, M., Moon, K., Jo, M., Knag, S. 2010. Ionizing Radiation-induced Diseases in Korea. *Journal of Korean Medical Science*, 25: 70-76.
- Joiner, M., Kogel, A. van der. 2009. Basic Clinical Radiobiology, 4th Edition, London.
- Kalita, H., Boruah, D. C., Dutta, K., Devi, R. 2013. Genotoxic Effect on Buccal Epithelial Cells of Betel Quid Chewers by Micronuclei Assay. *Asian J. Exp. Biol. Sci.*, 4(3): 491-494.
- Karahalil, B., Karakaya, A. E., Burgaz, S. 1999. The micronucleus assay in exfoliated buccal cells: application to occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutation Research*, 442(1): 29-35.
- Kashyap, B., Reddy, P. S. 2012. Micronuclei assay of exfoliated oral buccal cells: Means to assess the nuclear abnormalities in different diseases. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 8(2): 184-191.
- Kassie, F., Darroudi, F., Kundi, M., Schulte-Hermann, R., Knasmüller, S. 2001. Khat (*Catha edulis*) consumption causes genotoxic effects in humans. *International Journal of Cancer*, 92(3): 329-332.
- KB, V., Kalappanavar, A. N., M, M. 2014. Genotoxic effects of panoramic radiation by assessing the frequency of micronuclei formation in exfoliated buccal epithelium. *International Journal of Research in Medical Sciences* 2(2): 541-544.

- Khelifi, R., Trabelsi-Ksibi, F., Chakroun, A., Rebai, A., Hamza-Chaffai, A. 2013. Cytogenetic abnormality in exfoliated cells of buccal mucosa in head and neck cancer patients in the Tunisian population: Impact of different exposure sources. *BioMed Research International*, Article ID 905252, 10 pages.
- Lorenzoni, D. C., Fracalossi, A. C. C., Carlin, V., Ribeiro, D. A., San't Anna, E. F. 2012. Cytogenetic biomonitoring in children submitting to a complete set of radiographs for orthodontic planning. *Angle Orthodontist*, 82(4): 585-590.
- Lucero, L., Pastor, S., Suárez, S., Durbán, R., Gómez, C., Parrón, T., Creus, A., Marcos, R. 2000. Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: Micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. *Mutation Research*, 464(2): 255-262.
- Madhavan, R., Kumaraswamy, M., Kailasam, S., Kumar, S. M. 2012. Genetic damage in exfoliated cells from oral mucosa of individuals exposed to X-rays after panoramic radiograph: A cross-sectional study. *Journal of Indian Academy of Oral Medicine and Radiology*, 24(2): 102-105.
- Majer, B. J., Laky, B., Knasmüller, S., Kassie, F. 2001. Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. *Mutation Research*, 489(2-3): 147-172.
- Markiewicz, M. R., Margarone III, J. E., Barbagli, G., Scannapieco, F. A. 2007. Oral Mucosa Harvest: An Overview of Anatomic and Biologic Considerations. *EAU-EBU UPDATE SERIES*, 5: 179-187.
- Martínez, V., Creus, A., Venegas, W., Arroyo, A., Beck, J. P., Gebel, T. W., Suarrallés, J., Marcos, R. 2005. Micronuclei assessment in buccal cells of people environmentally exposed to arsenic in northern Chile. *Toxicology Letters*, 155(2): 319-327.
- Minicucci, E. M., Kowalski, L. P., Maia, M. A. C., Pereira, A., Ribeiro, L. R., de Camargo, J. L. V., Salvadori, D. M. F. 2005. Cytogenetic damage in circulating lymphocytes and buccal mucosa cells of head-and-neck cancer patients undergoing radiotherapy. *Journal of Radiation Research*, 46(2): 135-142.
- MR, P., Guruprasad, Y., Jose, M., Saxena, K., K, D., Prahu, V. 2014. Comparative Study of Genotoxicity in Different Tobacco Related Habits using Micronucleus Assay in Exfoliated Buccal Epithelial Cells. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 8(5): ZC21-ZC24.
- Naderi, N. J., Farhadi, S., Sarshar, S. 2012. Micronucleus assay of buccal mucosa cells in smokers with the history of smoking less and more than 10 years. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 55(4): 433-438.

- Nersesyan, A., Kundi, M., Atefie, K., Schulte-Hermann, R., Knasmüller, S. 2006. Effect of staining procedures on the results of micronucleus assays with exfoliated oral mucosa cells. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 15(10): 1835-1840.
- Oliveira, G. G. 2004. *Dissertação: Avaliação Dosimétrica em Procedimentos de Radiografia Panorâmica e Teleradiografias*. Universidade Federal de Pernambuco.
- Pasler, F., Visser, H. 2001. *Radiologia Odontológica*. 857307745X, ARTMED.
- Pinto, D., Ceballos, J. M., García, G., Guzmán, P., Del Razo, L. M., Vera, E., Gómez, H., García, A., Gonsebatt, M. E. 2000. Increased cytogenetic damage in outdoor painters. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 467(2): 105-111.
- Popova, L., Kishkilo, D., Hadjidekova, V. B., Hristova, R. P., Atanasova, P., Hadjidekova, V. V., Ziya, D., Hadjidekov, V. G. 2007. Micronucleus test in buccal epithelium cells from patients subjected to panoramic radiography. *Dentomaxillofac Radiology*, 36(3): 168-171.
- Raj, V., Mahajan, S. 2011. Dose Response Relationship of Nuclear Changes with Fractionated Radiotherapy in Assessing Radiosensitivity of Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Exp Dent.*, 3(3): e193-200.
- Reis, S. R. de Almeida, Sadigursky, M., Andrade, M. G. S., Soares, L. P., Santo, A. R. do E., Bôas, D. S. V. 2002. Efeito genotóxico do etanol em células da mucosa bucal. *Pesquisa Odontológica Brasileira*, 16(3): 221-225.
- Reis, S. R. de Almeida, Santo, A. R. do E., Andrade, M. G. S., Sadigursky, M. 2006. Cytologic alterations in the oral mucosa after chronic exposure to ethanol. *Brazilian Oral Research*, 20(2): 97-102.
- Ribeiro, D. A. 2012. Cytogenetic biomonitoring in oral mucosa cells following dental X-ray. *Dentomaxillofacial Radiology*, 41(3): 181-184.
- Ribeiro, D. A., Angelieri, F. 2008. Cytogenetic biomonitoring of oral mucosa cells from adults exposed to dental X-rays. *Radiation Medicine*, 26(6): 325-330.
- Ribeiro, D. A., de Oliveira, G., de Castro, G. M., Angelieri, F. 2008. Cytogenetic biomonitoring in patients exposed to dental X-rays: comparison between adults and children. *Dentomaxillofacial Radiology*, 37(7): 404-407.
- Rushton, V. E., Horner, K. 1996. The use of panoramic radiology in dental practice. *Journal of Dentistry*, 24(3): 185-201.
- Sarto, F., Finotto, S., Giacomelli, L., Mazzotti, D., Tomanin, R., Levis, A. G. 1987. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. *Mutagenesis*, 2(1): 11-17.

- Sellappa, S., Balakrishnan, M., Raman, S., Palanisamy, S. 2009. Induction of micronuclei in buccal mucosa on chewing a mixture of betel leaf, areca nut and tobacco. *Journal of Oral Science*, 51(2): 289-292.
- Sellappa, S., Prathyumnar, S., Joseph, S., Keyan, K. S. 2011. Micronucleus Test in Exfoliated Buccal Cells from Chromium Exposed Tannery Workers. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 1(1): 58-62.
- Spotheim-Maurizot, M., Davidková, M. 2011. Radiation damage to DNA in DNA-protein complexes. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 711(1-2): 41-48.
- Squier, C. A., Kremer, M. J. 2001. Biology of Oral Mucosa and Esophagus. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, 29: 7-15.
- Stich, H. F., Parida, B. B., Brunneman, K. D. 1992. Localized Formation of Micronuclei in the Oral Mucosa and tobacco-specific nitrosamines in the saliva of "reserse" smokers, khaini-tobacco chewers and gudakhu users. *Int. J. Cancer*, 50(2): 172-176.
- Surrallés, J., Autio, K., Nylund, L., Järventaus, H., Norppa, H., Veidebaum, T., Sorsa, M. Peltonen, K. 1997. Molecular cytogenetic analysis of buccal cells and lymphocytes from benzene-exposed workers. *Carcinogenesis*, 18(4): 817-823.
- Thomas, P., Harvey, S., Gruner, T., Fenech, M. 2008. The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. *Mutation Research*, 638(1-2): 37-47.
- Thomas, P., Hecker, J., Faunt, J., Fenech, M. 2007. Buccal micronucleus cytome biomarkers may be associated with Alzheimer's disease. *Mutagenesis*, 22(6): 371-379.
- Thomas, P., Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, S., Fenech, M. 2009. Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 4(6): 825-837.
- Tian, D., MA, H., Feng, Z., Xia, Y., Le, X. C., Ni, Z., Allen, J., Collins, B., Schreinemachers, D., Mumford, J. L. 2001. Analyses of micronuclei in exfoliated epithelial cells from individuals chronically exposed to arsenic via drinking water in inner Mongolia, China. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 64(6): 473-484.
- Titenko-Holland, N., Jacob, R. A., Shang, N., Balaraman, A., Smith, M. T. 1998. Micronuclei in lymphocytes and exfoliated buccal cells of postmenopausal women with dietary changes in folate. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 417(2-3): 101-114.

- Toossi, M. T. B., Akbari, F., Roodi, S. B. 2012. Radiation Exposure to Critical Organs in Panoramic Dental Examination. *Dental Panoramic Dosimetry*, 50(12): 809-813.
- UNSCEAR. 2012. United National Scientific Committee on the Effects of the Atomic Radiation Report to the Biological Mechanisms of Radiation Actions At Low Doses, New York.
- User Manual & Technical Specification 2006. Orthopantomograph ® OP 200 Orthoceph ® OC200, Finland.
- Vondracek, M., Xi, Z., Larsson, P., Baker, V., Mace, K., Pfeifer, A., Tjalve, H., Donato, M. T., Gomez-Lechon, M. J., Grafström, R. C. 2001. Cytochrome P450 expression and related metabolism in human buccal mucosa. *Carcinogenesis*, 22(3): 481-488.
- Vral, A., Fenech, M., Thierens, H. 2011. The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionising radiation exposure. *Mutagenesis*, 26(1): 11-17.
- Warner, M. L., Moore, L. E., Smith, M. T., Kalman, D. A., Fanning, E., Smith, A. H. 1994. Increased micronuclei in exfoliated bladder cells of individuals who chronically ingest arsenic-contaminated water in Nevada. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 3(7): 583-590.
- Whaites, E., Drage, N. 2013. *Radiography and Radiology for Dental Care Professionals*, 3rd Edition.
- White, S. C., Pharoah, M. J. 2014. *Oral Radiology: Principles and Interpretation*, 7th Edition.
- Xue, J., Yang, S., Seng, S. 2014. Mechanisms of cancer induction by tobacco-specific NNK and NNN. *Cancers*, 6(2): 1138-1156.

6.1.1 Referências eletrônicas

URL 1, 2016. <http://www-naweb.iaea.org/nahu/DMRP/faq/index.html>.

URL 2, 2003. http://www.doh.wa.gov/portals/1/Documents/Pubs/320-056_ion_fs.pdf.

URL 3, 2014. <http://www.nrc.gov/about-nrc/radiation/health-effects/radiation-basics.html>.

Anexo 1



Grupo de Protecção e Segurança Radiológica

QUESTIONÁRIO

Complete ou assinale com um X as respostas que correspondem à sua situação:

1. DADOS PESSOAIS

1.1. Data de Nascimento: _____

1.2. Sexo: Masculino: Feminino:

1.3. Naturalidade: _____

1.4. Profissão: _____

1.5. Local de trabalho: _____

2. HISTÓRIA CLÍNICA

2.1. Tem alguma doença que necessite de fazer medicação específica? _____

_____. Se sim, por favor, especifique quais os medicamentos que toma: _____

2.2. Tomou alguns medicamentos nas últimas semanas? Sim Não

2.2.1. Se sim, indique quais: _____

2.3. Fez alguma operação nos últimos 12 meses? Sim Não

Especifique: _____

2.4. Tem, alergia ao algodão? _____

2.5. Fez algum exame complementar de diagnóstico nos últimos 6 meses? (RX, RX aos dentes, TAC, cintigrafias, mamografias, etc...)

Sim Não

Especifique: _____

3. HÁBITOS TABÁGICOS

3.1. É actualmente fumador? Sim Não

3.2. Alguma vez fumou? Sim Não

3.3. Se é ex-fumador:

3.3.1. Qual o tipo de tabaco que fumava? _____

3.3.2. Com que idade começou a fumar? _____

3.3.3. Com que idade deixou de fumar? _____

3.3.4. Fumava cigarros com filtro? Sim Não

3.4. Se é fumador:

3.4.1. Com que idade começou a fumar? _____

3.4.2. Fuma cigarros? Sim Não

3.4.2.1 Se sim, quantos cigarros por dia? _____

3.4.2.2 Fuma cigarros com filtro? Sim Não

3.4.3. Fuma cachimbo? Sim Não

3.4.3.1 Se sim, quantos cachimbos por dia? _____

4. HÁBITOS ALIMENTARES

4.1. É vegetariano? Sim Não

4.2. Come carne? Sim Não

4.3. Consumo de bebidas alcoólicas:

4.3.1. Que quantidade consome em média por dia?

(1 unidade = 1 caneca de cerveja; 1 copo de vinho ou 1 balão de aguardente)

Não bebo ≤ 2 3 a 5

Que tipo de bebida alcoólica bebe habitualmente? _____

5. ACTIVIDADE PROFISSIONAL E EXTRA-PROFISSIONAL

5.1. Está actualmente empregado? Sim Não 5.2. Qual a sua actividade profissional, há quanto tempo a exerce e, muito resumidamente, em que consiste? _____

5.3. Esteve exposto em algum dos seus empregos a alguma das substâncias abaixo indicadas?

Amianto	Sim	<input type="checkbox"/>
	Não	<input type="checkbox"/>
Carvão, hulha ou derivados	Sim	<input type="checkbox"/>
	Não	<input type="checkbox"/>
Partículas finas (metal, madeira, couro, sílica)	Sim	<input type="checkbox"/>
	Não	<input type="checkbox"/>
Pesticidas/herbicidas	Sim	<input type="checkbox"/>
	Não	<input type="checkbox"/>
Petróleo e derivados	Sim	<input type="checkbox"/>
	Não	<input type="checkbox"/>
Corantes	Sim	<input type="checkbox"/>
	Não	<input type="checkbox"/>
Tintas, diluentes e solventes	Sim	<input type="checkbox"/>
	Não	<input type="checkbox"/>
Radiações (RX, etc..)	Sim	<input type="checkbox"/>
	Não	<input type="checkbox"/>

Outras /Especifique: _____

5.4. Fora do seu trabalho esteve em contacto com alguma das substâncias anteriormente indicadas? (por exemplo: tintas, vernizes, diluentes, etc...)

Sim Não

5.4.1. Se sim, especifique:

5.4.2. Nos últimos 12 meses: _____

OBRIGADA!

Anexo 2

Grupo de Protecção e Segurança Radiológica

Número de código do participante: _____

INFORMAÇÃO SOBRE O ESTUDO:

Este estudo de natureza académica é realizado por um estudante de mestrado do IST, Daniel Esteves, do Mestrado em Tecnologias Biomédicas do Instituto Superior Técnico, no âmbito da tese de mestrado intitulada “*Avaliação da lesão genética induzida por exposição a radiação ionizante utilizando o ensaio do micronúcleo em células da mucosa jugal*”.

A radiação ionizante desempenha um papel fundamental na realização de exames de diagnóstico. Em estomatologia, os exames de ortodontia (ortopantomografia e telerradiografia) desempenham actualmente um papel muito importante, dado serem exames de utilização diária na avaliação da patologia estomatológica.

Contudo, devido à forte relação entre a exposição a radiação e lesão genética, são necessários mais estudos sobre os possíveis efeitos induzidos pelos exames de raios-X nos pacientes.

Este trabalho tem como objectivo avaliar a lesão induzida em células da mucosa jugal, resultante da exposição a raios-X em exames de estomatologia. Para atingir este objectivo iremos proceder à recolha, através de um cotonete (exame não evasivo e indolor) das células da mucosa jugal, imediatamente antes da realização do exame e 10 dias após o mesmo.

A sua autorização de colaboração no estudo irá contribuir para a investigação clínica realizada nesta área.

Toda a informação contida neste questionário é estritamente confidencial e será utilizada apenas para tratamento estatístico e inferência científica, considerando-se os participantes no trabalho como um grupo. A cada participante é atribuído um número de código sendo a primeira página do questionário a única em que o nome e o número de código aparecem relacionados. Esta página é guardada separadamente das restantes. Em todas as páginas subsequentes o participante é identificado apenas pelo número de código que será utilizado no tratamento estatístico para se manter a total anonimização do estudo.

Desde já muito obrigada pela sua colaboração e disponibilidade, e pelo tempo que nos dispensou.

Nome completo: _____

Número do Cartão de Identificação: _____

Fui informado acerca do objectivo deste estudo e participo de livre vontade.

Assinatura: _____

Data: _____

O Investigador:

Daniel Esteves

Os Investigadores Responsáveis:

Pedro Vaz

Octávia Monteiro Gil

Anexo 3

Procedimento de Análise

Preparação de Material Biológico para Análise de Micronúcleos em Células Esfoliadas

1. **Objetivo:** Obtenção de células da mucosa jugal para análise da lesão genética através do ensaio do micronúcleo.

2. **Campo de Aplicação:** Investigação de efeitos genotóxicos produzidos pela radiação ionizante em células da mucosa jugal.

3. **Soluções e Reagentes:**
 - 3.1. Mistura Fixadora: metanol absoluto/ ácido acético glacial (3:1) (v/v) (solução extemporânea, deve ser mantido a -20°C depois de feita). (40 mL)
 - 3.2. Solução de PBS (10 mL);
 - 3.3. Giemsa - Giemsa 10% (v/v) 10 mL Giemsa, previamente filtrado, mais 90 mL tampão fosfato 0.01 M, pH 6,8.
 - 3.4. Entellan.

4. **Equipamentos Utilizados:**
 - 4.1. Bata;
 - 4.2. Luvas descartáveis;
 - 4.3. Espátulas de café (estéril);
 - 4.4. Tubos de plástico;
 - 4.5. Pipetas de Pasteur de plástico;
 - 4.6. Hotte;
 - 4.7. Frasco com capacidade para 40 mL (Mistura fixadora);
 - 4.8. Pipeta de vidro com capacidade para 10 mL (Ácido acético);
 - 4.9. Pipeta de vidro com capacidade para 30 mL (Metanol);
 - 4.10. Lâminas;
 - 4.11. Pipeta de vidro com capacidade para 5 mL (PBS);
 - 4.12. Pompette;
 - 4.13. Centrífuga;
 - 4.14. Frasco para resíduos biológicos (colocar lixívia a 10%);
 - 4.15. Pipetas de Pasteur de vidro;
 - 4.16. Frasco para resíduos da mistura fixadora;
 - 4.17. Frasco com capacidade para 100 mL;
 - 4.18. Tiras de pH;
 - 4.19. Caixa de lâminas;
 - 4.20. Pinça;

4.21. Lamelas;

5. Procedimento:

- 5.1. Antes da recolha das células o dador deve enxaguar a boca com água.
- 5.2. As células são removidas com uma espátula de plástico esterilizada, fazendo movimento de baixo para cima de modo a retirar o maior número de células da mucosa jugal do dador. (Bochecha Direita ou Esquerda).
- 5.3. A colheita é depositada num tubo de plástico, previamente etiquetado e identificado, contendo 5 mL de solução PBS.
- 5.4. Centrifugar o tubo de plástico durante 5 min a 104xg à temperatura ambiente.
- 5.5. Remover, cuidadosamente, o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta de Pasteur de plástico, para um frasco de resíduos biológicos, deixando ficar apenas o sedimento celular no tubo de plástico.
- 5.6. Adicionar 5 mL de solução PBS.
- 5.7. Repetir o procedimento 5.4. e 5.5.
- 5.8. Adiciona-se em cada tubo cerca de 4 mL de mistura fixadora fria (3.1.) com ajuda de uma pipeta de Pasteur de plástico (fazer movimentos giratórios em cada tubo, durante a queda das primeiras gotas de mistura fixadora).
- 5.9. Centrifugar o tubo de plástico durante 5 min a 104xg à temperatura ambiente.
- 5.10. Remover, cuidadosamente, o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta de Pasteur de plástico, para um frasco de resíduos de mistura fixadora, deixando ficar apenas o sedimento celular no tubo de plástico.
- 5.11. Repetição do procedimento 5.8., 5.9. e 5.10.
- 5.12. Com a utilização de uma pipeta de Pasteur de vidro, faz-se a recolha de algumas células, e deixam-se cair sobre a lâmina com uma inclinação de 45°, deixando secar à temperatura ambiente para o outro dia.
- 5.13. Após secagem das lâminas procede-se à coloração com Giemsa a 10%.
- 5.14. Fazer imergir todas as lâminas numa solução de Giemsa, previamente filtrado, a 10% em tampão fosfato 0.01 M (pH 6,8), durante 10 minutos (3.3.) (não depositar a solução Giemsa diretamente sobre as lâminas).
- 5.15. Passar as lâminas por água corrente.
- 5.16. Deixar as lâminas secar à temperatura ambiente para o dia seguinte.
- 5.17. Colocar sobre as lâminas 3 gotas de meio de montagem Entellan em cima de uma lamela e colocar por cima da lâmina (colocar a lamela devagar, com uma inclinação diminuindo o ângulo aos poucos).

Anexo 4

Reagentes

Metanol

CARLO ERBA

Ácido acético glacial

CARLO ERBA

Giemsa

Merck

Tampão fosfato 0,01M, pH 6,8
(pastilhas)

VWR, BDH Prolabo

Entellan

Merck

Soluções

Metanol: Ácido acético glacial (3:1)

Para 1 L: 750 ml Metanol, 250 ml Ácido acético glacial. Solução extemporânea.

PBS

Para 1 L, pH 7,4 : 8g NaCl, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 0,669 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1L H_2O destilada estéril. Temperatura ambiente.

Giemsa 10% (v/v)

10 mL Giemsa, previamente filtrado 100 mL tampão fosfato 0,01 M, pH 6,8. Solução extemporânea.