

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS  
ENERGÉTICAS E NUCLEARES**

**QUANTIFICAÇÃO DE MICRONÚCLEOS EM LINFÓCITOS DE  
PACIENTES EXPOSTAS À RADIAÇÃO GAMA PARA A  
AVALIAÇÃO DA DOSE ABSORVIDA**

**ISVÂNIA MARIA SERAFIM DA SILVA BARBOSA**

**RECIFE – PERNAMBUCO – BRASIL  
FEVEREIRO – 2003**

**QUANTIFICAÇÃO DE MICRONÚCLEOS EM LINFÓCITOS DE  
PACIENTES EXPOSTAS À RADIAÇÃO GAMA PARA A  
AVALIAÇÃO DA DOSE ABSORVIDA**

**ISVÂNIA MARIA SERAFIM DA SILVA BARBOSA**

**QUANTIFICAÇÃO DE MICRONÚCLEOS EM LINFÓCITOS DE  
PACIENTES EXPOSTAS À RADIAÇÃO GAMA PARA A  
AVALIAÇÃO DA DOSE ABSORVIDA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, do Departamento de Energia Nuclear, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Dosimetria e Instrumentação Nuclear.

**ORIENTADOR: PROF. DR. ADEMIR DE JESUS AMARAL**

**CO-ORIENTADOR: PROF. DR. ANDRÉ MACIEL NETTO**

**RECIFE – PERNAMBUCO – BRASIL  
FEVEREIRO – 2003**

# QUANTIFICAÇÃO DE MICRONÚCLEOS EM LINFÓCITOS DE PACIENTES EXPOSTAS À RADIAÇÃO GAMA PARA A AVALIAÇÃO DA DOSE ABSORVIDA

Isvânia Maria Serafim da Silva Barbosa

APROVADA EM: 06.02.2003

ORIENTADOR : Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral

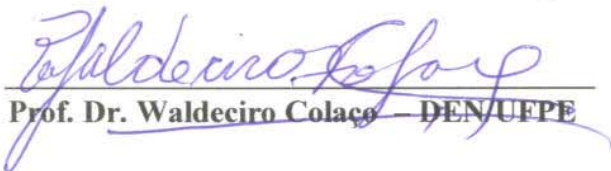
CO-ORIENTADOR : Prof. Dr. André Maciel Netto

COMISSÃO EXAMINADORA:



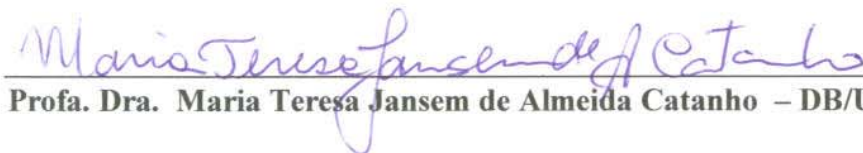
---

Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Júnior - DMFA/UFRPE



---

Prof. Dr. Waldecir Colaco - DEN/UFPE



---

Profa. Dra. Maria Teresa Janssem de Almeida Catanho - DB/UFPE

Visto e permitida a impressão



---

Coordenador do PROTEN/DEN/UFPE

A todas as pacientes que, na busca pela saúde, tornaram possível o desenvolvimento deste trabalho.

**A Teo e Narayani dedico.**

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que é o princípio de tudo.

Aos **meus pais** pelo esforço dedicado para que eu chegasse até aqui.

Ao meu marido, **Teo**, pela paciência, carinho, compreensão, amor, incentivo, cooperação e apoio em todas as circunstâncias em que juntos estivemos, bem como durante a execução deste trabalho e dissertação, e na espera pela chegada da nossa filha.

A minha filha, **Narayani**, que mesmo ainda no útero contribuiu muito durante este trabalho, mantendo-se comportada e muitas vezes sendo motivo de inspiração e estímulo.

Ao **Departamento de Energia Nuclear**, que me acolheu durante estes anos, fornecendo-me meios para o desenvolvimento da minha formação. Aos **professores** que nos transmitiram um pouco dos seus conhecimentos durante as disciplinas cursadas. E aos **colegas e funcionários** pela doce convivência e ajuda.

Ao orientador e amigo, **Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral**, pela confiança, compreensão, dedicação e disposição no desenvolvimento deste trabalho, bem como na elaboração desta dissertação, e também pela amizade estabelecida.

Ao **Prof. Dr. André Maciel Netto**, que muito contribuiu com suas observações e cuidados como co-orientador para o bom desempenho deste trabalho.

Aos **professores** que participaram das bancas dos seminários, e que por meio das suas observações e análise cautelosa, muito contribuíram para que este trabalho chegasse até aqui.

A amiga e **Prof. Dra. Maria Teresa Jansem**, que foi ponto de partida como orientadora no desempenho da área científica e que continua incentivando cada vez mais a busca pelo conhecimento.

A minha amiga, **Símei Magnata**, pelo incentivo, amizade, apoio, paciência, carinho, disponibilidade e cooperação em todos os períodos que precisei durante o decorrer deste trabalho, bem como pela força e os cuidados durante minha gestação. E a **Andréa Sarmento**, que por meio da sua amizade, sempre se prontificou a ajudar quando necessário.

Ao **HEMOPE**, nas pessoas do Dr. Polion Gomes e Dr. Raul Melo, pela confiança e disponibilidade do espaço físico. E as amigas e profissionais, **Júlia Netto, Graça Sotero, Márcia Bandeira, Ana Pedrosa e Bernadete**, pela amizade, carinho e apoio durante os experimentos no Laboratório de Citogenética.

Ao **CERAPE**, pela parceria e confiança no decorrer deste trabalho, principalmente ao Dr. Homero Cavalcanti e ao Dr. Ernesto Roester. Agradeço também a toda a equipe de apoio e a Dra. Taciana Soares pela contribuição em relação aos parâmetros físicos.

Ao **CNPq**, pelo recurso financeiro disponibilizado.

E a todos que contribuíram para o bom desenvolvimento deste trabalho.

**A mente humana uma vez ampliada por uma nova idéia, nunca mais volta ao seu tamanho original.**

*(Oliver W. Holmes)*

# SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>iv</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>vi</b>
<b>RESUMO</b>	<b>viii</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>ix</b>
<b>I. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>3</b>
<b>III. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>4</b>
<b>3.1 Interação da radiação ionizante com o tecido vivo</b>	<b>4</b>
<b>3.2 A utilização da radiação ionizante na medicina</b>	<b>7</b>
<b>3.3 Dosimetria</b>	<b>10</b>
<b>3.4 Grandezas em dosimetria</b>	<b>10</b>
3.4.1 Dose absorvida (D)	10
3.4.2 Dose equivalente ( $H_T$ )	11
3.4.3 Dose efetiva (E)	12
<b>3.5 Divisões da dosimetria</b>	<b>14</b>
3.5.1 Dosimetria física	14
3.5.2 Dosimetria biológica	14
3.5.2.1 Dosimetria clínica	17
3.5.2.2 Dosimetria citogenética	19
3.5.2.2.1 Importância do emprego dos linfócitos na citogenética	19
3.5.2.2.2 Micronúcleos	22
3.5.2.2.3 O ciclo celular e o bloqueio da citocinese	26
3.5.2.2.4 A curva de calibração na dosimetria citogenética	30



	<b>Página</b>
<b>IV. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>33</b>
4.1 As pacientes e o procedimento de administração de doses	33
4.2 Procedimento de coleta sanguínea	36
4.3 Processamento das amostras	36
4.3.1 O meio da cultura	38
4.3.2 Cultura celular <sup>40</sup>	40
4.3.3 Retirada da cultura	41
4.3.4 Preparo das lâminas	43
4.3.5 Análise microscópica	46
<b>V. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>49</b>
5.1 Influência da radiação natural	51
5.2 Frequência de micronúcleos após exposição a 0,08 Gy	53
5.3 Frequência de micronúcleos após exposição a 1,8 Gy	54
5.4 Obtenção da frequência de micronúcleos a partir de curva dose efeito biológico	55
<b>VI. CONCLUSÕES</b>	<b>63</b>
<b><u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u></b>	<b><u>65</u></b>
<b><u>APÊNDICE</u></b>	<b><u>71</u></b>
<b><u>ANEXO</u></b>	<b><u>74</u></b>

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
1- Efeito direto e indireto produzido pelas radiações ionizantes	5
2- Representação simplificada da radiólise da água	6
3- Efeitos somáticos estocásticos e somáticos determinísticos	16
4- Efeitos genéticos estocásticos	16
5- Síndrome aguda da radiação (SAR)	18
6- Pequeno linfócito (GARTNER & HIATT, 1993)	21
7- Células binucleadas e presença de micronúcleos	23
8- Ciclo celular de células que se dividem ativamente	27
9- Estágios da mitose esquemático	28
10- Curva dose-resposta de micronúcleos (VENKATACHALAM <i>et al.</i> , 2000)	31
11- Irradiador de $^{60}\text{Co}$ do CERAPE	34
12- Esquema dos campos de irradiação, com irradiador de $^{60}\text{Co}$	35
13- Esquema geral do processamento das amostras	37
14- Procedimentos de retirada da cultura	42
15- Preparo das lâminas	45
16- Coloração das lâminas	46
17- Microscópio de análise do Laboratório de Citogenética do HEMOPE	47
18- Esquema da análise microscópica	48

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
1- Fatores de ponderação da radiação ( $w_R$ )	12
2- Fatores de ponderação para órgãos ou tecidos ( $w_T$ )	13
3- Composição do meio RPMI	39
4- Procedimento de lavagem das lâminas microscópicas	44
5- Número de leucócitos e porcentagem de linfócitos das 05 pacientes avaliadas no trabalho	49
6- Comparação do número de leucócitos e linfócitos em relação a frequência de micronúcleos	50
7- Frequência de micronúcleos, células binucleadas contadas e micronúcleos visualizados resultantes da radiação natural	52
8- Frequência de micronúcleos, células binucleadas contadas e micronúcleos visualizados para a dose de 0,08 Gy	53
9- Frequência de micronúcleos, células binucleadas contadas e micronúcleos visualizados para a dose de 1,8 Gy	54
10- Comparação entre os valores previstos por VOISIN <i>et al.</i> (2001) e a frequência de micronúcleos obtido nesta pesquisa	56
11- Comparação entre as frequências de micronúcleos obtidas nesta pesquisa e aquelas previstas por VOISIN <i>et al.</i> (2001) considerando a irradiação parcial	58
12- Distribuição e frequência de micronúcleos em função das doses (0,0*; 0,08 e 1,8 Gy) administradas	58
13- Frequência de micronúcleos <i>versus</i> idade	59

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C	- graus celcius
$\alpha$	- alfa
$\beta$	- beta
$\gamma$	- gama
$\mu\text{g}$	- micrograma
$\mu\text{m}$	- micrometro
$^{137}\text{Cs}$	- céσιο-137
$^{192}\text{Ir}$	- irídio-192
$^{60}\text{Co}$	- cobalto-60
ADN	- ácido desoxirribonucléico
ARN	- ácido ribonucléico
BCC	- bloqueio da citocinese
Bq	- bequerel
CBC	- células binucleadas contadas
cGy	- centigray
Ci	- curie
cm	- centímetro
D	- dose
dE	- energia média depositada
dl	- unidade de percurso
DL <sub>100</sub>	- dose letal para 100 % da população
DL <sub>50/60</sub>	- dose letal para 50 % da população em 60 dias
dm	- volume de massa elementar
DP	- desvio padrão
D <sub>T,R</sub>	- dose absorvida no tecido T como resultado da exposição à radiação R
FCBMN	- frequência de células binucleadas com micronúcleos
FISH	- fluorescence <i>in situ</i> hybridisation (hibridização <i>in situ</i> por fluorescência)
FMN	- frequência de micronúcleos
F <sub>MNP</sub>	- frequência de micronúcleos prevista pela curva de calibração
F <sub>MNVI</sub>	- frequência de micronúcleos prevista considerando irradiação parcial
G <sub>0</sub>	- fase de inatividade celular
G <sub>1</sub>	- fase inicial da interfase
G <sub>2</sub>	- fase final da interfase
Gy	- gray
h	- hora
H <sub>E</sub>	- dose efetiva
H <sub>T</sub>	- dose equivalente
IAEA	- International Atomic Energy Agency
ICRP	- International Commission on Radiological Protection

ICRU	- International Commission on Radiation Units and Measurements
J	- Joule
keV	- kiloeletronvolt
kg	- kilograma
L	- litro
LET	- linear transference energy (transferência linear de energia)
MeV	- megaeletronvolt
mg	- miligrama
min	- minuto
mL	- mililitro
mM	- milimolar
mm <sup>3</sup>	- milímetro cúbico
MN	- micronúcleos
NaCl	- cloreto de sódio
pH	- potencial hidrogeniônico
P <sub>VI</sub>	- percentual do volume do corpo irradiado
RBE	- relative biologic effectiveness (eficiência biológica relativa)
rpm	- rotação por minuto
S	- fase intermediária da interfase
SAR	- síndrome aguda da radiação
SI	- sistema internacional
Sv	- sievert
w <sub>R</sub>	- fator de ponderação da radiação R
w <sub>T</sub>	- fator de ponderação do tecido T

# QUANTIFICAÇÃO DE MICRONÚCLEOS EM LINFÓCITOS DE PACIENTES EXPOSTAS À RADIAÇÃO GAMA PARA A AVALIAÇÃO DA DOSE ABSORVIDA

**Autor:** ISVÂNIA MARIA SERAFIM DA SILVA BARBOSA

**Orientador:** PROF. DR. ADEMIR DE JESUS AMARAL

**CO-ORIENTADOR:** Prof. Dr. André Maciel Netto

## RESUMO

A avaliação da dose absorvida é essencial para a análise dos efeitos biológicos decorrentes de uma exposição à radiação ionizante. Neste contexto, a dosimetria citogenética, baseada na quantificação de micronúcleos, tem-se revelado importante como metodologia complementar à dosimetria física, principalmente em casos de avaliação retrospectiva da dose absorvida. Neste trabalho, investigou-se o uso da técnica de quantificação de micronúcleos na determinação da dose devido à exposição parcial do corpo humano. Para tanto, foram utilizadas amostras de sangue periférico de 5 pacientes portadoras de carcinoma de colo uterino, submetidas à radioterapia com raios gama de uma fonte de  $^{60}\text{Co}$ . Uma alíquota de sangue periférico de cada paciente foi adicionada separadamente ao meio de cultura RPMI 1640, com soro bovino fetal e fitohemaglutinina, e incubada durante 44 horas. Em seguida, adicionou-se citocalasina B à cultura para bloqueio da citocinese, retornando-a ao processo de incubação por mais 28 horas. Após esse período, as células foram analisadas no sentido de correlacionar a frequência de micronúcleos em linfócitos binucleados com a dose absorvida durante o tratamento das pacientes. Os valores obtidos para as frequências de micronúcleos após irradiação parcial da região pélvica com absorção de 0,08 Gy e 1,8 Gy foram respectivamente 0,0021 e 0,052. Estes valores estão em boa concordância com os previstos por pesquisas objetivando a determinação de curvas de dose versus frequência de micronúcleos induzidos pela exposição à radiação gama, levando-se em consideração a fração do corpo irradiada. Os resultados apresentados neste trabalho evidenciam o emprego da quantificação de micronúcleos na avaliação retrospectiva da dose tanto na irradiação total quanto parcial do corpo humano.

# **QUANTIFICATION OF MICRONUCLEI IN BLOOD LYMPHOCYTES OF PATIENTS EXPOSED TO GAMMA RADIATION FOR DOSE ABSORBED ASSESSMENT**

**Author: ISVÂNIA MARIA SERAFIM DA SILVA BARBOSA**

**Adviser: PROF. DR. ADEMIR DE JESUS AMARAL**

**CO-ADVISER: Prof. Dr. André Maciel Netto**

## **SUMMARY**

Dose assessment is an important step to evaluate biological effects as a result of individual exposure to ionizing radiation. The use of cytogenetic dosimetry based on the quantification of micronuclei in lymphocytes is very important to complement physical dosimetry, since the measurement of absorbed dose cannot be always performed. In this research, the quantification of micronuclei was carried out in order to evaluate absorbed dose as a result of radiotherapy with  $^{60}\text{Co}$ , using peripheral blood samples from 5 patients with cervical uterine cancer. For this purpose, an aliquot of whole blood from the individual patients was added in culture medium RPMI 1640 supplemented with fetal calf serum and phytohaemagglutinin. The culture was incubated for 44 hours. Henceforth, cytochalasin B was added to block the dividing lymphocytes in cytokinesis. The culture was returned to the incubator for further of 28 hours. Thus, cells were harvested, processed and analyzed. Values obtained considering micronuclei frequency after pelvis irradiation with absorption of 0,08 Gy and 1,8 Gy were, respectively, 0,0021 and 0,052. These results are in agreement with some recent researchs that provided some standard values related to micronuclei frequency induced by gamma radiation exposure in different exposed areas for the human body. The results presented in this report emphasizes biological dosimetry as an important tool for dose assessment of either total or partial-body exposure to ionizing radiation, mainly in retrospective dose investigation.

## I. INTRODUÇÃO

As radiações ionizantes vêm sendo empregadas cada vez mais em diversos campos da ciência e tecnologia. Como resultado, as aplicações na medicina (terapêutica e diagnóstica) representam a principal fonte de radiação artificial no homem (AMARAL *et al.*, 2001).

A identificação dos efeitos da radiação ionizante em tecidos vivos resultou no desenvolvimento das atividades de radioproteção objetivando controlar os riscos associados às suas aplicações. Para tanto, instrumentos capazes de detectar e sinalizar a presença desse tipo de radiação são utilizados (GERMAIN, 1995). Além disso, o conhecimento da quantidade de energia absorvida por unidade de massa, ou seja, a dose absorvida, constitui uma etapa importante na avaliação dos riscos associados a uma exposição.

Em situações de exposição acidental, a avaliação retrospectiva da dose não é uma tarefa fácil. O levantamento das condições de irradiação nem sempre é evidente, aliado ao fato que, em geral, os indivíduos não portam dosímetros. Assim, tem-se procurado estimar a dose absorvida pelo indivíduo com base nas alterações que a radiação ionizante é capaz de produzir ao nível celular.

Esse tipo de avaliação é denominado de *dosimetria biológica*, onde os efeitos mais relevantes analisados estão relacionados com os danos provocados aos cromossomos. A dose estimada é obtida com o auxílio de curvas do tipo dose-efeito biológico induzido. Em ensaios com cromossomos, essa curva é obtida da exposição de linfócitos a feixes de radiação bem determinados *in vitro*. Essa curva serve como



parâmetro para obtenção dos valores de dose após irradiação *in vivo*, por produzir resposta similar a que é produzida *in vitro* (IAEA, 1986; DOLOY *et al.*, 1991).

Dentre as células que fazem parte do sangue, os linfócitos constituem as células alvo das investigações, pelo fato de serem células diferenciadas, e por normalmente não sofrerem divisões, permanecendo no estágio de interfase. Outra vantagem do estudo das alterações de linfócitos, decorrentes da ação da radiação ionizante, é seu tempo de vida longo o bastante, o que contribui para a manutenção dessas alterações por semanas ou meses após uma exposição (IAEA, 1986).

Os efeitos mais estudados em relação ao dano causado pela radiação dentro da dosimetria biológica são as aberrações cromossômicas instáveis, tais como a presença de cromossomos dicêntricos, em anel e fragmentos, e a formação de micronúcleos, os quais resultam de fragmentos de cromossomos ou de cromossomos inteiros, que se perdem durante a metáfase em decorrência da exposição à radiação, formando um aglomerado com aparência de um pequeno núcleo, além do núcleo celular propriamente dito.

A aplicação de métodos de quantificação de micronúcleos constitui uma técnica citogenética teoricamente mais simples e potencialmente mais rápida do que a citogenética convencional, podendo ser empregada em estudos que envolvem doses baixas (VOISIN *et al.*, 1999).

Esta pesquisa foi realizada como resultado da colaboração de quatro instituições: O Departamento de Energia Nuclear – DEN – UFPE (Pernambuco – Brasil), o Hemocentro de Pernambuco – HEMOPE (Pernambuco – Brasil), a Faculdade de Medicina Xavier Bichat (Paris-França) e o Centro de Radioterapia de Pernambuco - CERAPE (Pernambuco – Brasil).

## II. OBJETIVOS

### 2.1 – Objetivo geral

Investigar a utilização da quantificação de micronúcleos em linfócitos na avaliação de exposição parcial do corpo humano à radiação ionizante.

### 2.2 – Objetivos específicos

- ◆ Quantificação de micronúcleos;
- ◆ Aplicação da relação dose versus efeito biológico induzido;
- ◆ Avaliação retrospectiva da dose absorvida.

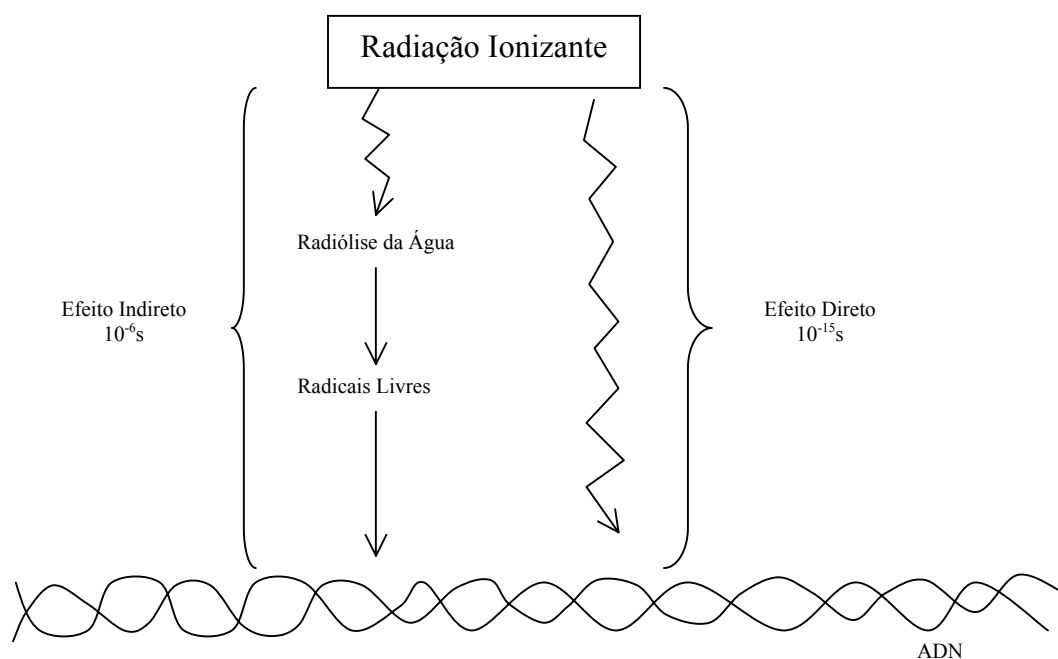
### III. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 – Interação da radiação ionizante com o tecido vivo

As radiações ionizantes, através das suas interações, transferem energia para a matéria viva, dando início a uma seqüência de eventos que pode levar a várias conseqüências biológicas. Estas conseqüências podem variar desde uma pequena modificação molecular, sem grande relevância, morte de uma ou mais células, disfunções orgânicas e até à morte do indivíduo exposto. Esses efeitos ocorrem de acordo com a sensibilidade dos organismos vivos à radiação ionizante, variando em função do tipo de radiação, da dose absorvida e da área do organismo que foi atingida.

A interação da radiação ionizante com o tecido vivo tem início através da excitação e/ou ionização de moléculas no organismo. As alterações decorrentes dessa interação podem ocorrer por meio de dois mecanismos básicos, de forma direta ou indireta, como ilustrado na Figura 1. O efeito direto resulta da interação da radiação diretamente com biomoléculas importantes, como quando ela atua sobre o ADN (ácido desoxirribonucléico), causando modificações na sua estrutura química, e levando ao rompimento de ligações que danificam o material genético. Os efeitos ditos indiretos são resultado da ação de radicais livres, principalmente devido a radiólise da água (Figura 2). Nesse caso, ocorrem interações da radiação ionizante com moléculas de água presentes no tecido vivo, levando a produção de radicais livres bastante reativos, os quais reagem com as moléculas biológicas provocando lesões. Entre as espécies de radicais primários e secundários derivados da radiólise da água, o radical livre hidroxila é considerado como o

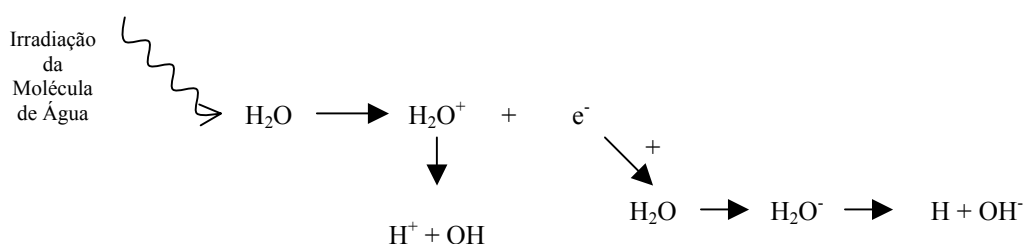
mais danoso, dentro da radiobiologia devido a sua grande reatividade (**BENDERITTER & VOISIN, 1999**). Os efeitos direto e/ou indireto da radiação ionizante ocorrem em intervalos de tempo diferentes. O efeito direto pode ocorrer em um espaço de tempo extremamente curto, de aproximadamente  $10^{-15}$  segundos. Já o efeito indireto pode surgir em aproximadamente  $10^{-6}$  segundos, pois, ele é decorrente da atuação dos radicais livres (**BENDERITTER & VOISIN, 1999**).



**Figura 1. Efeitos direto e indireto produzidos pelas radiações ionizantes**

Para que realmente se tenha os efeitos biológicos resultantes da radiação ionizante, é necessário que as estruturas atingidas absorvam a energia dessa radiação, ou seja, ocorra uma transferência da energia da partícula ou do fóton incidente para os átomos (**BENDERITTER & VOISIN, 1999**). A grandeza que relaciona a transferência de energia por unidade de comprimento é chamada de Transferência Linear de Energia [Linear Transference Energy (LET)].

A LET é definida como sendo o quociente de  $dE/dl$ , onde  $dE$  é a energia média depositada localmente, por unidade de percurso  $dl$ , no meio absorvedor do feixe de radiação, como estabelece a INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIATION UNITS AND MEASUREMENTS (ICRU, 1970). Geralmente a LET é expressa em  $keV/\mu m$ .



**Figura 2. Representação simplificada da radiólise da água**

A proporção dos efeitos diretos em relação aos efeitos indiretos é ainda mal definida. Nos casos das radiações de baixo LET, como fótons de alta energia, estima-se que 2/3 dos efeitos biológicos são resultantes dos efeitos indiretos. Por outro lado, os efeitos diretos são predominantes nos casos de exposição a radiações de alto LET (ZAIDER *et al.*, 1994).

Em trabalhos realizados com substâncias que capturam radicais livres, vários pesquisadores demonstraram que uma proporção significativa dos efeitos biológicos produzidos pela radiação é atribuída à ação indireta (ROOTS & OKADA, 1972; OKADA *et al.*, 1983; LITTLEFIELD *et al.*, 1988).

Em trabalho mais recente que aborda a ação indireta da radiação, utilizando a melatonina como capturador de radicais livres em concentrações crescentes, ficou comprovado, mais uma vez, que os danos provocados pela radiação são

reduzidos significativamente quando os radicais livres são capturados (VIJAYALAXMI *et al.*, 1995).

Cada tecido possui sensibilidade diferente em relação à interação da radiação ionizante e, segundo estudos de Bergonié e Tribondeau, essa sensibilidade varia proporcionalmente à atividade reprodutiva das células, e de maneira inversa com relação ao grau de diferenciação celular (AURENGO *et al.*, 1997).

A radiosensibilidade celular também difere no que se refere aos tipos de radiação ionizante, devido à quantidade de energia que cada radiação é capaz de depositar no tecido por unidade de trajeto percorrido, que é o LET. Em decorrência disto, foi introduzida a Eficiência Biológica Relativa (EBR) ou do inglês *Relative Biologic Effectiveness* (RBE) (ICRU, 1993), que é definida como a relação entre a dose de uma radiação padrão (geralmente, raios-X de 250 kVp) e uma dose de uma radiação “teste”, de tal forma que essas doses sejam capazes de produzir um mesmo efeito biológico. **Ou seja:**

$$RBE = \frac{\text{Dose de Raios X de 250 kVp que produz um efeito } E}{\text{Dose da Radiação "teste" para produzir o efeito } E} \quad (1)$$

### 3.2 – A utilização da radiação ionizante na medicina

Muitas descobertas contribuíram e contribuem para o avanço da medicina, entre essas, a descoberta dos raios-X por Röntgen em novembro de 1895 e a descoberta da radioatividade natural dois meses depois, em janeiro de 1896, por Becquerel (EARLY & LANDA, 1995; ICE, 1995).

A utilização dos raios-X no tratamento do câncer foi sugerida desde 1896 (**CAMERON & SKOFRONICK, 1978**). O casal Pierre e Marie Curie também utilizou as radiações ionizantes para destruir células cancerosas, só que dessa vez foi com a radiação emitida pelo elemento Rádio. A esse tratamento, deram inicialmente o nome de “Curieterapia” (**BRODSKY *et al.*, 1995**).

O tratamento que faz uso da radiação ionizante é chamado de radioterapia e consiste na aplicação programada de doses elevadas de radiação ionizante, com a finalidade de destruir as células tumorais e causar o menor dano possível aos tecidos saudáveis. Isso geralmente é conseguido pelo direcionamento dos feixes de radiação ao tumor em várias direções, até que a máxima dose seja obtida sobre o tumor (**CAMERON & SKOFRONICK, 1978**).

A radioterapia pode ser classificada em teleterapia e braquiterapia. A teleterapia é a terapia à distância, onde a fonte emissora de radiação é mantida a uma certa distância da região a ser tratada no paciente. Já na braquiterapia, que é a terapia próxima ou interna, a fonte radioativa pode estar próxima, em contato ou dentro do tumor (**SOARES, 2000**).

Na teleterapia podem ser utilizados equipamentos como o irradiador de cobalto, o qual faz uso de uma fonte de  $^{60}\text{Co}$ , que é emissor gama, ou de aceleradores lineares, os quais funcionam de forma semelhante aos tubos de raios-X, só que eles aceleram elétrons até energias superiores, que ao incidirem num alvo produzem raios X com energia bem mais alta que os raios gama do  $^{137}\text{Cs}$  e mesmo do  $^{60}\text{Co}$  (**SOARES, 2000**).

Até 1951, os únicos equipamentos existentes que usavam radioisótopos na teleterapia eram as unidades contendo fontes de Rádio. Essas unidades possuíam uma série de desvantagens, como o alto custo e radiações gama de baixa intensidade. Depois do surgimento dos reatores nucleares, foi possível a produção de radioisótopos de alta atividade para o uso médico, tais como o  $^{60}\text{Co}$  e o  $^{137}\text{Cs}$  (**SCAFF, 1997**).

O  $^{137}\text{Cs}$  entrou em desuso devido às suas desvantagens, pois o rendimento obtido com ele era baixo, as distâncias de tratamento tinham que ser curtas e a energia era relativamente baixa. Já o  $^{60}\text{Co}$  é uma das fontes mais utilizadas, possuindo uma meia-vida física de 5,3 anos e emite radiação gama em cascata de 1,17 e 1,33 MeV, e tem uma atividade de cerca de  $1,11 \cdot 10^{14}$  Bq (3000 Ci) até  $4,44 \cdot 10^{14}$  Bq (12000 Ci) (SCAFF, 1997). Os primeiros irradiadores de  $^{60}\text{Co}$  foram vendidos nos Estados Unidos entre os anos de 1950 e 1960 (CAMERON & SKOFRONICK, 1978).

Em todas as aplicações das radiações ionizantes, alguns princípios de radioproteção devem ser seguidos, e estão apresentados na Publicação de número 26 (ICRP, 1977):

- O princípio da JUSTIFICAÇÃO: Nenhuma prática que envolva exposição à radiação deve ser adotada a menos que produza suficiente benefício ao indivíduo exposto ou à sociedade.
- O princípio da OTIMIZAÇÃO: Todas as exposições às radiações devem ser tão baixas quanto razoavelmente exequíveis, levando-se em conta fatores sociais e econômicos.
- O princípio da LIMITAÇÃO DE DOSE: A exposição do indivíduo, resultante da combinação de todas as práticas relevantes, deve ser sujeita a limites de dose ou a algum tipo de controle de risco no caso de exposições potenciais.

Contudo, para aplicações na medicina, alguns princípios não podem ser plenamente utilizados, pois nestes casos não é possível determinar doses limites, devendo ser empregadas doses tão altas quanto necessárias.



### 3.3 – Dosimetria

Apesar da trágica história do uso da radiação após sua descoberta, pouco foi o esforço feito para monitorar e limitar a exposição daqueles que lidavam diretamente com ela. O primeiro pesquisador a recomendar limites para a exposição foi William Rollins (GERMAIN, 1995). O primeiro efeito biológico causado pela radiação ionizante notificado à comunidade científica ocorreu em 1896, quatro meses após a descoberta dos raios-X, por J. Daniels, da Universidade de Vanderbilt, que verificou a queda de cabelo de um de seus colegas, que havia se submetido à radiologia de crânio (OKUNO *et al.*, 1982).

A dosimetria surgiu da necessidade de se quantificar a energia da radiação ionizante absorvida por unidade de massa pelo indivíduo exposto, devido ao fato de que foram observados efeitos danosos causados pela irradiação ao tecido vivo. Na avaliação da dose absorvida é necessário supervisionar a exposição à radiação por meio da monitoração e da dosimetria, dentro da qual, existem algumas grandezas que são muito importantes e indispensáveis, pois fundamentam a dosimetria. Essas grandezas serão rapidamente abordadas a seguir.

### 3.4 – Grandezas em dosimetria

#### 3.4.1 – Dose absorvida (D)

A dose absorvida é definida como sendo a energia média  $dE$  depositada pela radiação ionizante em um volume de massa  $dm$ , como observado na Equação 2.

$$D = \frac{dE}{dm} \quad (2)$$

A unidade de dose absorvida no Sistema Internacional (SI) é o J/kg, com a denominação especial de gray (Gy). Antes da utilização do gray como unidade de dose absorvida, usava-se o rad (1 rad = 0,01 Gy).

### 3.4.2 – Dose equivalente ( $H_T$ )

A dose absorvida não é suficiente para avaliar os riscos associados à irradiação, uma vez que, para uma mesma dose absorvida, esses efeitos variam com o tipo de radiação ionizante. Assim, objetivando a proteção radiológica a ICRP 60 (1990) define dose equivalente, para um dado tecido ou órgão T, como sendo:

$$H_T = \sum_R w_R D_{T,R} \quad (3)$$

Onde  $w_R$  = fator de ponderação da radiação R (Tabela 1) e  $D_{T,R}$  = dose absorvida no tecido T como resultado da exposição à radiação R. As unidades da dose equivalente são as mesmas da dose absorvida. Assim, a unidade de dose equivalente no SI é J/kg, mas possui um nome especial que é o sievert (Sv), onde 1 J/kg equivale a 1 Sv.

**Tabela 1. Fatores de ponderação da radiação ( $w_R$ )**

<b>Tipo de Radiação</b>	<b>Faixa de Energia</b>	<b><math>w_R^*</math></b>
<b>Fótons</b>	Todas as energias	1
<b>Elétrons</b>	Todas as energias	1
<b>Nêutrons</b>	< 10 keV	5
<b>Nêutrons</b>	10 keV a 100 keV	10
<b>Nêutrons</b>	>100 keV a 2 MeV	20
<b>Nêutrons</b>	> 2 MeV a 20 MeV	10
<b>Nêutrons</b>	> 20 MeV	5
<b>Nêutrons</b>	desconhecida	
<b>Prótons, com exceção de prótons de recuo</b>	> 2 MeV	5
<b>Partícula alfa, fragmentos de fissão e íons pesados</b>	1500	20

\* - ICRP 60

### 3.4.3 – Dose efetiva (E)

Os tecidos vivos possuem sensibilidades diferentes à radiação ionizante. Para levar em consideração essa sensibilidade, foi definida a dose efetiva.

A dose efetiva é o somatório das doses equivalentes ponderadas para todos os tecidos e órgãos do corpo. O fator de ponderação ( $w_T$ ) de um determinado tecido, representa a contribuição relativa deste tecido ou órgão para o dano total, como se esses efeitos resultassem da irradiação uniforme de corpo inteiro.

A dose efetiva é expressa por:

$$E = \sum w_T \cdot H_T \quad (4)$$

Onde  $H_T$  é a dose equivalente no tecido ou órgão T e  $w_T$  é o fator de ponderação para o tecido T. Os valores referentes ao fator de ponderação dos tecidos, podem ser encontrados na Tabela 2.

**Tabela 2. Fatores de ponderação para órgãos ou tecidos<sup>1</sup> ( $w_T$ )**

<b>Tecido ou Órgão</b>	<b><math>w_T^*</math></b>
<b>Gônadas</b>	0,20
<b>Medula óssea vermelha</b>	0,12
<b>Cólon</b>	0,12
<b>Pulmão</b>	0,12
<b>Estômago</b>	0,12
<b>Bexiga</b>	0,05
<b>Seio</b>	0,05
<b>Fígado</b>	0,05
<b>Esôfago</b>	0,05
<b>Tireóide</b>	0,05
<b>Pele</b>	0,01
<b>Superfície óssea</b>	0,01
<b>Restante<sup>2</sup></b>	0,05
<b>TOTAL</b>	<b>1,00</b>

*1 – Baseado em um risco total de ocorrência de efeitos estocásticos de  $1,65 \times 10^{-2} \text{ Sv}^{-1}$*

*2 – Para fins de calculo, “restante” refere-se a qualquer dos órgãos listados a seguir, os quais podem ser irradiados seletivamente: adrenais, cérebro, intestino grosso superior, intestino delgado, rins, músculo, pâncreas, vesícula, timo e útero.*

*\* - ICRP 60*

### **3.5 – Divisões da dosimetria**

A princípio, a dosimetria pode ser dividida em física e biológica, sendo esta última subdividida em várias outras, tais como, dosimetria clínica, citológica, citogenética, bioquímica, imunológica e genética (**RIGHI *et al.*, 1998**).

#### **3.5.1 – Dosimetria física**

Esse tipo de dosimetria faz uso de instrumentos desenvolvidos especialmente para detectar e quantificar a dose absorvida, pois esses são sensíveis aos efeitos físicos da radiação ionizante. Logo, para obtenção de valores de dose, é necessário que os indivíduos estejam usando dosímetros físicos junto ao corpo.

A dosimetria física foi introduzida no início do século XX e, para sua determinação, vários tipos de dosímetros podem ser utilizados, tais como câmara de ionização, filmes dosimétricos, dosímetros termoluminescentes (**SCAFF, 1997; CEMBER, 1997**).

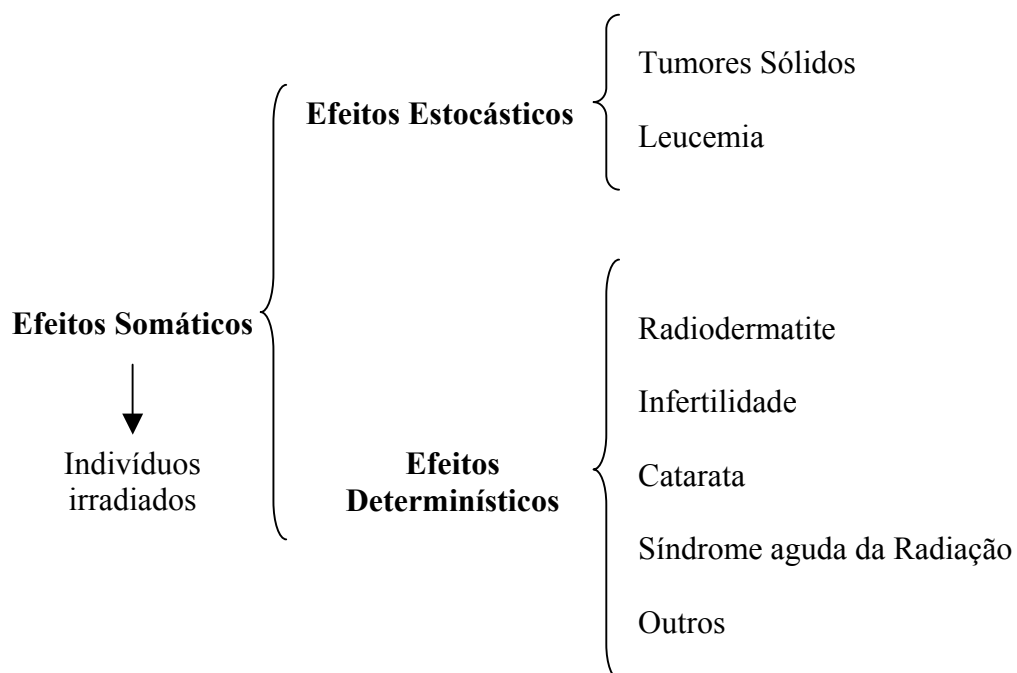
#### **3.5.2 – Dosimetria biológica**

A dosimetria biológica consiste no estudo de efeitos biológicos radioinduzidos como indicador de dose. Este tipo de dosimetria é aplicado principalmente em casos de acidentes, servindo também como uma importante ferramenta tanto em radiopatologia quanto em radioproteção.

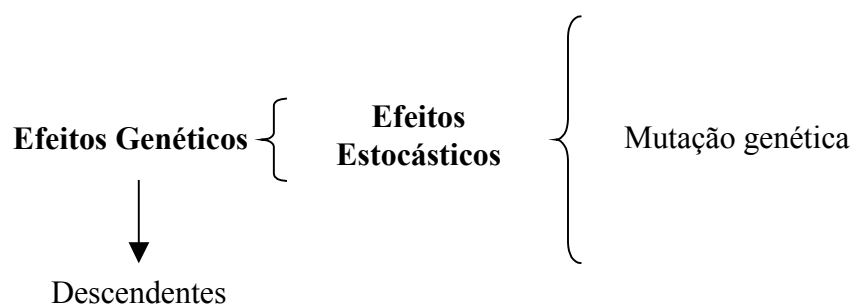
A base da dosimetria biológica é o efeito biológico causado pela radiação ionizante, quando esta interage com a matéria e perturba o equilíbrio elétrico. Este efeito biológico pode levar a um dano, caso ultrapasse os limites de eficiência dos mecanismos adaptativos do organismo; e isto varia segundo a idade, sexo, estilo de vida, dentre uma série de outros fatores (**CHECCUCCI, 1987**). Só teremos um efeito biológico causado pela radiação quando esta radiação modifica, morfológica e/ou fisiologicamente uma estrutura ou, mais especificamente, um tecido ou órgão.

Os efeitos decorrentes da exposição à radiação ionizante, podem ser classificados em estocásticos e determinísticos. Os efeitos estocásticos são aqueles cuja probabilidade de ocorrência é proporcional à dose e não existe limiar de dose para que ele venha a acontecer. Já os efeitos determinísticos são aqueles que certamente acontecerão a partir de um limiar de dose, e a severidade destes danos aumenta com a dose absorvida. Estes efeitos podem ser prevenidos pela manutenção de doses abaixo dos limites pré-determinados (**RIGHI *et al.*, 1998**). Valores limites são recomendados pela **ICRP 41 (1984)** e, mais recentemente na **ICRP 60 (1990)**, para o aparecimento de efeitos determinísticos.

Ainda com relação aos danos causados pela radiação ionizante, tem-se os efeitos somáticos e os hereditários. No primeiro caso, os efeitos podem ser observados no próprio indivíduo que foi exposto, enquanto que no segundo caso, os efeitos poderão estar presentes nos seus descendentes. Alguns exemplos de efeitos somáticos e genéticos induzidos pela radiação ionizante nos seres vivos, com suas correspondentes classificações são apresentadas a seguir (Figuras 3 e 4).



**Figura 3. Efeitos somáticos estocásticos e somáticos determinísticos**



**Figura 4. Efeitos genéticos estocásticos**

A dosimetria biológica se subdivide, dando origem a outros ramos, dentre os quais temos a dosimetria clínica e a dosimetria citogenética como sendo as mais comumente usadas.

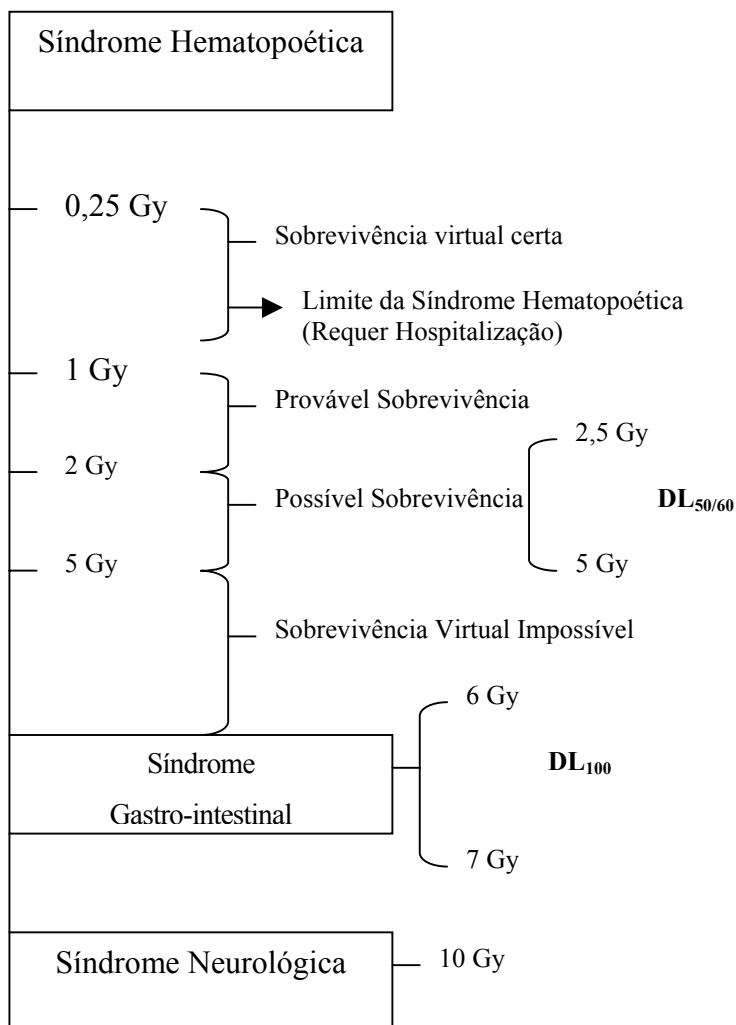
### 3.5.2.1 – Dosimetria clínica

A dosimetria clínica avalia os sinais e sintomas decorrentes das exposições à radiação ionizante, com o objetivo de obter informações capazes de determinar, pelo menos aproximadamente, a dose a que um indivíduo foi exposto. Desta forma, é um tipo de dosimetria que só pode ser usada quando a exposição foi decorrente de altas doses agudas, sejam estas localizadas ou de corpo inteiro.

Os parâmetros que são utilizados em um primeiro diagnóstico em dosimetria clínica quando um indivíduo sofre da Síndrome Aguda da Radiação (SAR), é o tempo de aparecimento e a intensidade dos sintomas iniciais gerais e localizados, bem com a gravidade dos sintomas hematológicos precoces (**RIGHI *et al.*, 1998**).

Existem escalas de valores de doses semiquantitativas que atendem a gravidade do prognóstico, baseadas no período de latência, intensidade e persistência dos sinais e sintomas decorrentes da SAR (**ICRP, 1990; ICRP, 1984; RIGHI & DI POFI, 1987; WALD, 1971**). Entre os parâmetros utilizados, temos o surgimento de algumas síndromes, como a síndrome hematológica, gastrointestinal e neurológica, que são correlatas com diferentes limiares induzidos (**RIGHI & DI POFI, 1987**), como mostra a Figura 5.





**Figura 5. Síndrome aguda da radiação (SAR)**

Apesar do uso dos sintomas clínicos como indícios na busca do valor aproximado da dose absorvida, o mais completo indicador de exposição à radiação dentro da dosimetria biológica é a dosimetria citogenética. Esta dosimetria foi implementada no desenvolvimento deste trabalho e passará a ser abordada a seguir.

### 3.5.2.2 – Dosimetria citogenética

Durante as últimas décadas tem-se observado uma grande quantidade de informações básicas sobre a indução de aberrações causadas pela radiação. Estas informações permitiram o desenvolvimento da dosimetria citogenética.

A dosimetria citogenética é uma importante ferramenta diagnóstica no campo da radioproteção médica. Nesta dosimetria, a dose é estimada através da comparação da frequência de aberrações cromossômicas instáveis (dicêntricos, fragmentos e anéis) observada ou da frequência de micronúcleos presentes, com curvas de dose-resposta geradas após a irradiação de linfócitos humanos *in vitro*.

A metodologia baseada na quantificação de micronúcleos dentro da dosimetria citogenética é mais simples e mais rápida que o uso da análise de aberrações cromossômicas instáveis, mas para a sua aplicação, é necessário um conhecimento das bases biológicas que a envolvem, como também da relação entre a dose e o efeito biológico decorrente da exposição à radiação. Neste contexto, estes aspectos são agora abordados.

#### 3.5.2.2.1 – Importância do emprego dos linfócitos na citogenética

Os linfócitos são células sanguíneas que fazem parte dos leucócitos (células brancas do sangue), compreendendo cerca de 20 a 25% desta população. São células arredondadas, podendo ser pleomórficas quando migram pelo tecido conjuntivo. Em esfregaços sanguíneos, são células que possuem em média de 8 a 15  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Possuem núcleo arredondado, discretamente indentado e que ocupa quase toda a célula (GARTNER & HIATT, 1999). Com base no tamanho dos linfócitos, estes sofrem uma

classificação, podendo ser descritos como pequeno (de 8 a 10  $\mu\text{m}$ ), médio (de 12 a 15  $\mu\text{m}$ ) e grande (de 15 a 18  $\mu\text{m}$ ) (**GARTNER & HIATT, 1999**). Os dois últimos estão presentes em menor número, e neste trabalho não são as células alvo.

A produção dos linfócitos começa nos órgãos primários ou órgãos linfóides centrais, que compreendem a medula óssea e o timo. Algumas destas células migram via sistema circulatório para tecidos linfóides secundários, como o baço, os linfonodos, as amídalas, entre outros (**ABBAS *et al.*, 1995; ROITT *et al.*, 1998**).

Os linfócitos podem ser subdivididos em três tipos funcionais: linfócitos B, linfócitos T e células nulas. Todos os tipos possuem características morfológicas semelhantes, o que os torna indistinguíveis, sendo apenas diferenciados por técnicas de imuno-histoquímica. Aproximadamente 80% dos linfócitos circulantes são células T, cerca de 15% são células B e o restante são células nulas (**GARTNER & HIATT, 1999**).

Os linfócitos do sangue periférico estão predominantemente no período  $G_0$  da interfase, dentro do ciclo celular. Nesta fase a atividade bioquímica e fisiológica é mínima, sendo também chamada de fase de inatividade celular, conforme a **INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA, 1986)**.

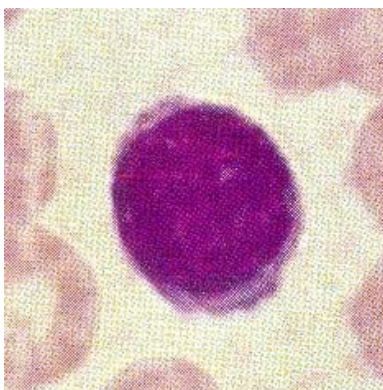
No processo de emprego da técnica de análise de micronúcleos é necessário que os linfócitos estejam em divisão. Para isso, é utilizado um mitógeno, que é uma substância capaz de estimular os linfócitos a entrar no processo de divisão celular. Existem várias substâncias que atendem a esta necessidade, mas a mais utilizada é a fitohemaglutinina, que estimula apenas os linfócitos T. Nowell<sup>1</sup>, citado pela **IAEA (1986)**, foi o primeiro a mostrar que os “leucócitos humanos” podiam ser estimulados pela fitohemaglutinina.

---

<sup>1</sup> NOWELL, P. C. Phytohemagglutinin. An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res.* v.20, p.462 – 466, 1960.

Os linfócitos são as células utilizadas em todos os procedimentos da dosimetria citogenética, por vários fatores. Estas células são facilmente obtidas do sangue periférico e facilmente cultivadas; elas estão presentes em todo o corpo; como normalmente encontram-se na fase  $G_0$  da interfase, elas podem “memorizar” o dano que foi induzido pela radiação e conseqüentemente expressar este dano através de aberrações cromossômicas ou micronúcleos, após o cultivo *in vitro*; e, uma fração da população de linfócitos possuem uma expectativa de vida longa, de aproximadamente 3 anos (DOLPHIN, 1969; IAEA, 1986), favorecendo ainda mais a manutenção da informação.

Na Figura 6 pode-se observar a presença de um pequeno linfócito humano normal em um esfregaço de sangue periférico.



**Figura 6. Pequeno linfócito (GARTNER & HIATT, 1993)**

### 3.5.2.2.2 – Micronúcleos

Os micronúcleos foram observados pela primeira vez há mais de um século, no citoplasma de eritrócitos, como sendo pequenas estruturas arredondadas coradas de forma semelhantes ao núcleo de outras células, uma vez que os eritrócitos maduros não possuem núcleos. Essas estruturas também foram observadas em outros tipos celulares. Em 1959, Evans fez a primeira contagem de micronúcleos para estimar o dano citogenético em raiz de *Vicia faba* após irradiação de nêutrons e exposição a raios gama (EVANS *et al.*, 1959).

A formação de micronúcleos é resultante de fragmentos acêntricos decorrentes de aberrações cromossômicas ou de cromossomos inteiros que se perderam durante a fase de mitose do ciclo celular. Cerca de 60% dos fragmentos acêntricos formados após irradiação terminam como micronúcleos (EVANS *et al.*, 1959). Os fragmentos acêntricos contribuem para a formação de micronúcleos porque não possuem centrômeros, isto faz com que eles não se integrem ao núcleo filho. Já os cromossomos inteiros se perdem quando têm o seu cinetocoro<sup>2</sup> danificado.

Durante análise microscópica, os micronúcleos são identificados por vários critérios, como os apresentados abaixo:

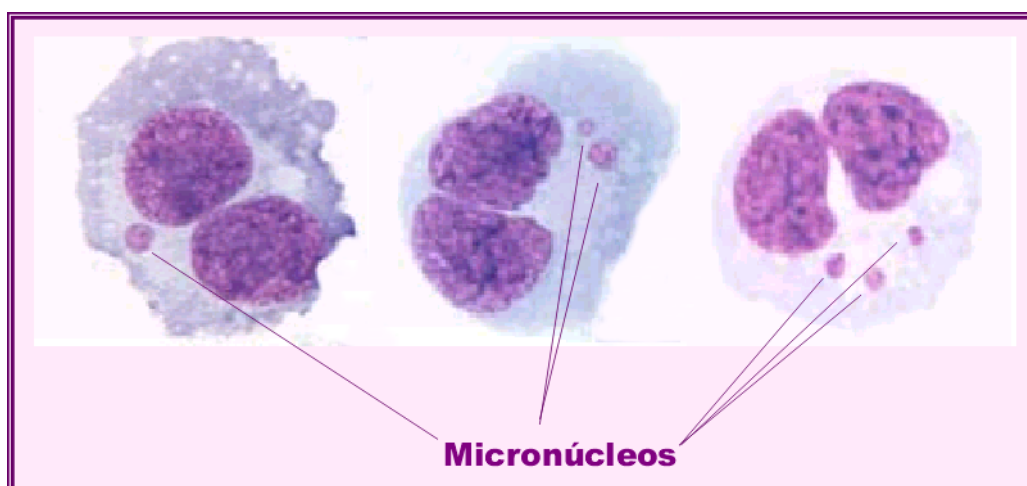
- São semelhantes ao núcleo celular, mas são pequenos,
- São DNA positivo,
- São redondos ou ovais com bordas distintas,
- Não são refratários,
- São coplanares com o citoplasma,
- Têm o tamanho dependente do tipo celular e agente aplicado. Em geral, o maior diâmetro aceito corresponde a 1/3 do diâmetro do núcleo celular (MÜLLER & STREFFER, 1994).

---

<sup>2</sup> Cinetocoro - estrutura presente no centrômero de cada cromátide, que permite a adesão das cromátides às fibras do fuso.

Existem algumas técnicas utilizadas para análise de micronúcleos, mas a técnica que faz uso do bloqueio da citocinese (BCC) com citocalasina B é a única que atinge dois objetivos importantes. O primeiro é que o micronúcleo recém formado permanece “preso” ao citoplasma, evitando a sua perda. Enquanto o segundo objetivo, está associado ao fato de que as células analisadas devem apresentar-se binucleadas, facilitando a leitura das amostras.

Na Figura 7, podem ser observadas três células binucleadas com 1, 2 e 3 micronúcleos, após o bloqueio da citocinese.



**Figura 7. Células binucleadas e presença de micronúcleos**

Com o emprego da técnica de micronúcleos por bloqueio da citocinese com citocalasina B, **VIJAYALAXMI *et al.* (1995)** foram capazes de analisar a variabilidade da resposta adaptativa de linfócitos humanos, após a irradiação destes com baixas doses.

No período de 1990 a 1992, cinco países participaram de uma intercomparação das técnicas em dosimetria citogenética, utilizando também a análise de micronúcleos pelo bloqueio da citocinese com citocalasina B. Foi estabelecido que todas as amostras fossem processadas em um único laboratório e após as lâminas estarem prontas é que fossem

enviadas aos laboratórios participantes para realização da análise. A contagem realizada entre os cinco laboratórios foi muito similar, assim, todos foram considerados aptos para execução da dosimetria citogenética em casos de acidentes em grandes proporções (**GARCIA *et al.*, 1995**).

Como em todo procedimento experimental, existem variáveis que podem influenciar a frequência de micronúcleos em células binucleadas obtidas por meio do BCC. Logo, determinadas variações encontradas podem ser decorrentes de variáveis experimentais ou fatores biológicos.

Ao analisar as variáveis experimentais, **FENECH (1998)** observou que o meio de cultura não tem efeito significativo sobre a frequência de micronúcleos, ao estudar 23 indivíduos saudáveis aplicando a mesma metodologia e diferindo apenas no tipo de meio. Uma outra análise realizada por ele foi à influência das estações do ano sobre as frequências de micronúcleos, pois **ANDERSON *et al.* (1991)** tinham sugerido em seu trabalho que os danos cromossômicos podem ser influenciados pelas estações do ano, mas **FENECH (1998)**, ao estudar 53 indivíduos saudáveis durante um período de 12 meses, verificou que não ocorreram diferenças significativas nos resultados obtidos, contrariando assim o trabalho de **ANDERSON *et al.* (1991)**.

**SURRALLÉS & NATARAJAN (1997)** revelaram que a utilização de uma concentração final de citocalasina B de 6 µg/mL era mais eficaz em deter a citocinese do que uma concentração de 3 µg/mL, no entanto, a frequência de micronúcleos obtida com o uso da concentração de 6 µg/mL mostrou-se menor frente à apresentada com o uso da concentração de 3 µg/mL. Contudo, um estudo similar realizado por **PROSSER *et al.* (1998)** não encontrou nenhum efeito diferente na frequência de micronúcleos.

**BONASSI *et al.* (2001)**, realizaram um trabalho que envolveu 16 países com a participação de um total de 25 laboratórios. Vários aspectos ligados a variações da metodologia foram analisados por meio de amostras de aproximadamente 7000 indivíduos. Dentre os aspectos analisados, foram verificados o uso de sangue total ou linfócitos

isolados, sendo o uso de sangue total empregado em 84 % dos laboratórios. Outro aspecto foi a razão do sangue total em relação ao meio de cultura, onde 52 % dos laboratórios fizeram uso de amostras menores que 10 % em relação ao meio. No total, foram analisados 11 parâmetros (tempo de duração do sangue na bancada antes do preparo da cultura; temperatura a que o sangue foi submetido antes da cultura; método de cultura usado: se sangue total ou linfócitos isolados; razão entre o sangue total e o meio de cultura; tipo de meio usado; percentual de soro bovino fetal adicionado; tempo de exposição a citocalasina-B; concentração final da citocalasina-B; tempo de incubação pós-estimulação com fitohemaglutinina; uso de tratamento hipotônico; análise realizada por um único indivíduo), o que permitiu averiguar que alguns dos fatores podem interferir nos valores das freqüências de micronúcleos obtidas, no entanto as modificações apresentadas não foram significativas.

Para a visualização dos micronúcleos ao microscópio ótico, pode ser usada uma coloração hematológica simples, como a coloração com o Giemsa, ou a hibridização *in situ* por fluorescência [Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH)]. Sendo o segundo, um método de visualização mais eficaz, o que diminui o risco de erros durante a contagem, pois nele são utilizadas sondas específicas ligadas a substâncias fluorescentes, para marcação do material genético.

Os testes com micronúcleos são os únicos entre os testes citogenéticos que proporcionam uma medida confiável das perdas e quebras cromossômicas em conjunto (STEPHANOU *et al.*, 1998). Com o uso de técnicas de citogenética molecular por FISH é possível verificar os micronúcleos resultantes de quebras cromossômicas ou de cromossomos inteiros perdidos, ao visualizar sondas centroméricas fluorescentes (STEPHANOU *et al.*, 1998).

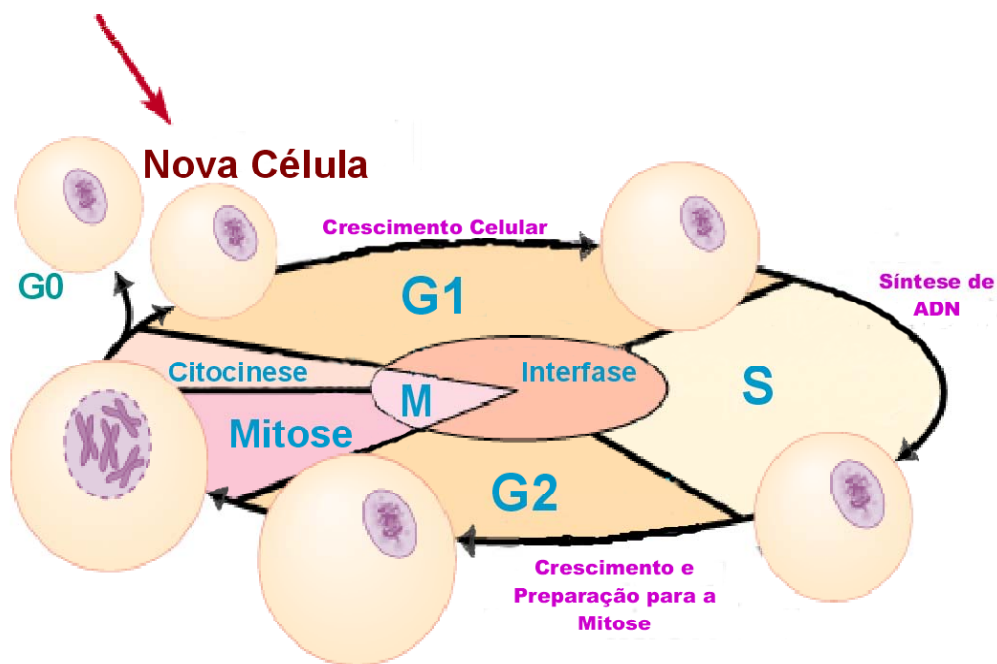


### 3.5.2.2.3 – O ciclo celular e o bloqueio da citocinese

Existem dois eventos principais que dividem o ciclo celular; a mitose e a interfase. Na interfase, a célula aumenta seu tamanho e seu conteúdo, e replica seu material genético. Esse evento apresenta três fases. A fase G<sub>1</sub>, onde ocorre a síntese de ARN (ácido ribonucléico), de proteínas reguladoras e enzimas, entre outras substâncias. A fase S, na qual ocorre a duplicação do genoma. E a fase G<sub>2</sub>, onde há armazenamento de energia para a mitose, além de haver síntese de ARN e de proteínas essenciais à divisão celular. A Figura 8 mostra o ciclo celular em células que se dividem ativamente, incluindo também a fase G<sub>0</sub>, de células como os linfócitos, que ficam nesse período de repouso, podendo ser ativadas e retornarem ao ciclo.

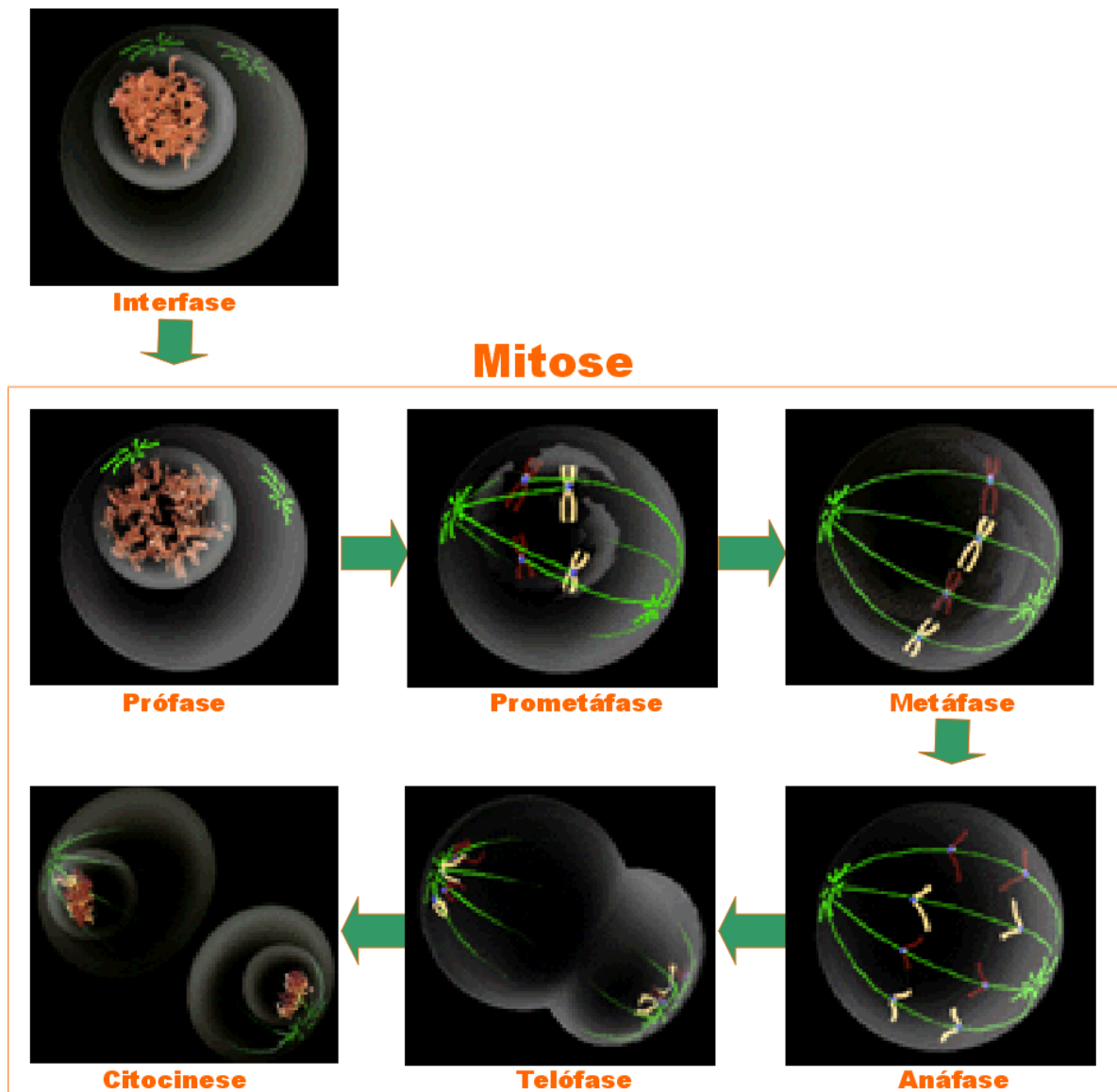
Para que uma célula passe de uma fase a outra, é necessário que ela produza determinadas proteínas (ciclina). Existem células que não produzem essas proteínas e conseqüentemente ficam em repouso (**GARTNER & HIATT, 1999**). Esse repouso é conhecido como fase G<sub>0</sub>, citada anteriormente.

A mitose é o processo por meio do qual o citoplasma e o núcleo da célula se dividem igualmente em duas células filhas idênticas. Esse é o processo mais dramático da célula, pois nele a carioteca (envelope nuclear) se desintegra, o conteúdo nuclear se condensa em cromossomos visíveis e os microtúbulos se reorganizam para formar o *fuso mitótico* que irá separar os cromossomos (**ALBERTS et al., 1997**).



**Figura 8. Ciclo celular em células que se dividem ativamente**

Para que todo o processo de divisão mitótica (ALBERTS *et al.*, 1997) seja acompanhado de forma mais clara, ele é subdividido em seis estágios distintos e seqüenciados, denominados de prófase, prometáfase, metáfase, anáfase, telófase e citocinese, visualizados na Figura 9.



**Figura 9. Estágios da mitose**

A prófase é a fase inicial da mitose, nela a cromatina condensa-se vagarosamente em cromossomo bem definido e o *fuso mitótico*, que é o principal componente do aparato mitótico, começa a ser formado. Essa estrutura é bipolar e consiste de microtúbulos e proteínas associadas. O fuso é inicialmente formado fora do núcleo entre os centrossomos em separação.

O início da pró-metáfase acontece quando o envelope nuclear é rompido e a partir de então, os microtúbulos do fuso, que estavam fora do núcleo, entram na região nuclear. Nos centrômeros dos cromossomos há a presença de cinetocoros, que são responsáveis pela fixação dos cromossomos aos microtúbulos do fuso. Após a fixação, os microtúbulos com cinetocoros tencionam os cromossomos, os quais entram em movimento agitado.

Durante a metáfase propriamente dita, os microtúbulos com cinetocoros eventualmente alinham os cromossomos em um plano a meio caminho dos pólos do fuso. Cada cromossomo é mantido tencionado nessa *placa metafásica* pelos cinetocoros pareados e seus microtúbulos associados, os quais estão ligados a pólos opostos do fuso.

Quando os cinetocoros dos cromossomos se separam, permitindo que cada cromátide seja lentamente movida em direção ao pólo do fuso a sua frente; dá-se o início da anáfase. A velocidade com que os cromossomos movem-se é de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ /minuto e ocorre o distanciamento dos pólos do fuso. Esta fase dura, normalmente, poucos minutos.

Quando os cromossomos-filhos separados chegam aos pólos e os microtúbulos com cinetocoros desaparecem, ocorre a telófase. É nessa fase que um novo envelope nuclear é reconstituído ao redor de cada grupo de cromossomos-filhos, a cromatina condensada expande-se cada vez mais e o nucléolo, que estava ausente desde o início da prófase, reaparece, marcando assim o final da mitose.

A conclusão do processo de divisão celular culmina com a citocinese ou clivagem do citoplasma. Nessa fase, a membrana mais próxima do meio da célula é puxada para dentro, formando o sulco de clivagem, até que finalmente ocorra a quebra, deixando as duas células-filhas separadas.

A citocinese é a fase de maior interesse com relação à obtenção de células binucleadas e micronúcleos. É nesta fase, que a citocalasina B vai atuar para impedir que a célula tenha o seu citoplasma dividido. Isto tem sido relatado em vários trabalhos que

utilizaram os micronúcleos como ferramenta para a dosimetria (VOISIN *et al.*, 1999; CASTELLO & SILVESTRI, 1999; VIJAYALAXMI *et al.*, 1995; KÖKSAL *et al.*, 1996).

A citocalasina B é uma substância bloqueadora da citocinese, que se liga a complexos de alto peso molecular da membrana citoplasmática, induzindo a polimerização da actina e, portanto, aglomerando os microfilamentos indispensáveis para a formação da rede de clivagem (CASTELLO & SILVESTRI, 1999).

#### 3.5.2.2.4 – A curva de calibração na dosimetria citogenética

A dosimetria citogenética necessita de parâmetros que permitam relacionar os achados biológicos, como a presença de micronúcleos, com a dose absorvida referente àqueles achados. Para isso, conta com uma ferramenta importante, que é a curva de calibração.

Segundo a IAEA (1986), todo laboratório de dosimetria biológica deveria determinar a sua própria curva, usando critérios de processamento bem definidos, dentre os quais os parâmetros físicos (taxa de dose, LET). A curva de calibração utilizada na avaliação de micronúcleos relaciona a frequência de micronúcleos com a dose absorvida, após a irradiação *in vitro*, em um determinado número de células binucleadas, como pode ser visualizada na Figura 10.

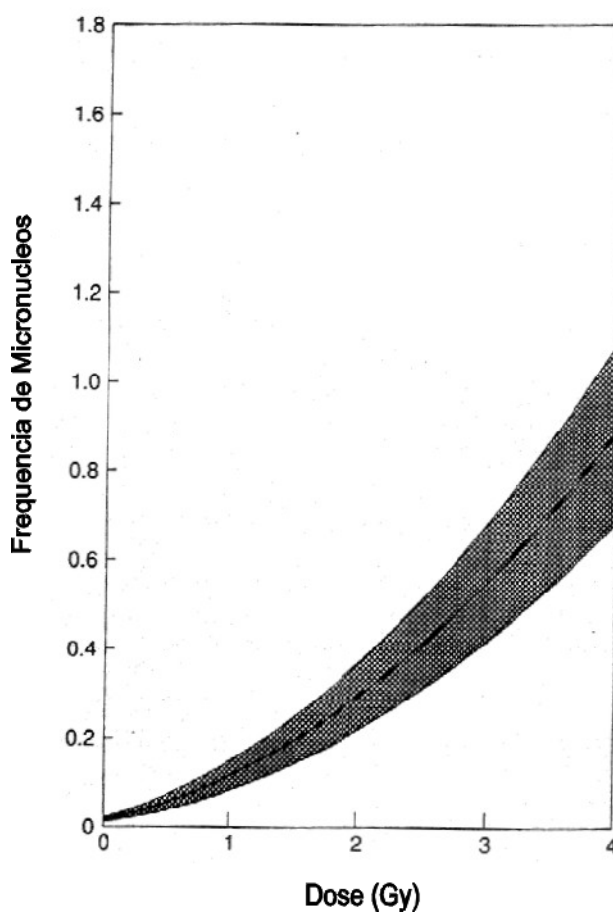


Figura 10. Curva dose-resposta de micronúcleos (VENKATACHALAM *et al.*, 2000)

A dosimetria tem sido de grande importância na área nuclear, isto porque devido à ausência de sensores humanos à radiação, não é possível sentir a presença, nem tão pouco quantificar a radiação a que um indivíduo foi exposto. Em casos de acidentes como o de Goiânia (Brasil) em 1987 (RAMALHO *et al.*, 1998) e em outros incidentes que ocorreram entre 1948 e 1967 no Sul dos Urais, nas províncias de Chelyabinsk, Sverdlovsk e Tyumen na Rússia, bem como na avaliação de pilotos de aviação, que se encontram mais expostos à radiação cósmica (ROMANO *et al.*, 1997), além de indivíduos submetidos a tratamento com radiação ionizante (OLIVEIRA *et al.*, 2001), a dosimetria citogenética veio suprir uma lacuna deixada pela dosimetria física, pois a dosimetria citogenética leva em consideração a sensibilidade individual e permite a análise pontual, ou seja, a obtenção de valores de dose recebidos por pessoa, o que complementa a avaliação dosimétrica.

Assim, no desenvolvimento desta pesquisa, procurou-se quantificar as frequências de micronúcleos resultantes da radiação localizada em pacientes com câncer de colo de útero sob tratamento radioterápico, cujo planejamento dosimétrico já havia sido pré-estabelecido.

## IV. MATERIAL E MÉTODOS

Para este trabalho, foram utilizadas amostras de sangue de pacientes do sexo feminino submetidas à radioterapia para tratamento de câncer de colo uterino. As pacientes concordaram gentilmente em fornecer amostras sanguíneas antes e durante a radioterapia a que foram submetidas. Elas foram selecionadas levando-se em consideração alguns aspectos, citados a seguir, com o objetivo de diminuir, ao máximo, possíveis variações.

### 4.1 – Pacientes e procedimento de administração de doses

As pacientes escolhidas, em número de 5, tinham idades entre 40 e 60 anos, todas portadoras de Carcinoma de Colo de Útero, nos estágios II a IV da doença (ver apêndice) e estavam iniciando o tratamento radioterápico por teleterapia, no Centro de Radioterapia de Pernambuco (CERAPE).

Todas as pacientes foram acompanhadas por um psicólogo, tendo este orientado as mesmas sobre os detalhes do trabalho. Após estarem cientes e demonstrarem interesse em participar da pesquisa, todas assinaram termos de consentimento livre e esclarecido (Anexo). A partir de então, foi iniciada a coleta de sangue, a qual foi realizada em três momentos distintos. A primeira coleta ocorreu antes do início do tratamento, ou seja, antecedeu à exposição à radiação ionizante. A segunda foi realizada 24 horas após cada paciente ter recebido uma dose de 0,08 Gy, durante a checagem em relação ao posicionamento adequado para o tratamento. A terceira foi realizada 24 horas após a primeira aplicação de teleterapia com uma dose de 1,8 Gy.



O tempo de 24 horas foi selecionado, por ser suficiente para que fosse obtida uma alíquota de sangue decorrente da recirculação, ou seja, os linfócitos que receberam a dose de radiação estivessem bem distribuídos na circulação sanguínea das pacientes, permitindo, assim, que a amostra fosse homogênea.

Ao todo, considerando o número de 5 pacientes selecionadas e a quantidade de coletas realizadas por paciente, um total de 15 amostras foram avaliadas.

O tratamento teleterápico a que as pacientes foram submetidas foi realizado com um irradiador de  $^{60}\text{Co}$  do CERAPE (Figura 11). No mês da realização das coletas a fonte de  $^{60}\text{Co}$  apresentava uma taxa de dose de 0,33 Gy/minuto.



**Figura 11. Irradiador de  $^{60}\text{Co}$  do CERAPE**

Na administração da dose média de 1,8 Gy, as pacientes receberam a dose fracionada em quatro posições: 0,6 Gy na região pélvica anterior; 0,6 Gy na região

pélvica posterior; 0,3 Gy na lateral direita e 0,3 Gy na lateral esquerda, variando para cada paciente apenas o tempo, em decorrência do posicionamento do tumor e diferenças na constituição física da paciente.

O campo determinado para as posições anterior e posterior foi de 17 cm X 17 cm, para as laterais foi de 17 cm X 9 cm, com o irradiador de  $^{60}\text{Co}$  a uma distância de 70 cm da pele do paciente (Figura 12).

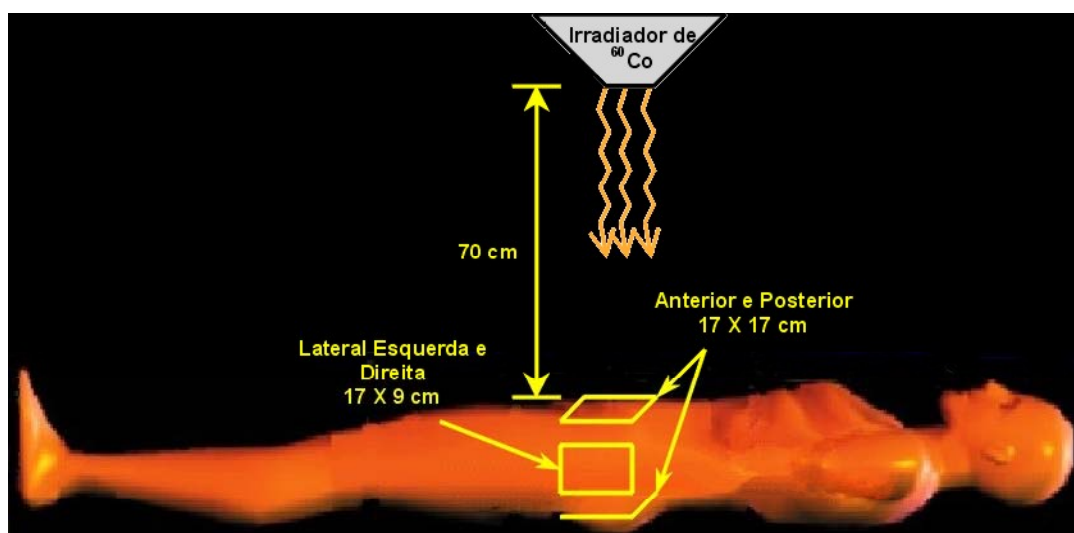


Figura 12. Esquema dos campos de irradiação, com irradiador de  $^{60}\text{Co}$

## **4.2 – Procedimento de coleta sangüínea**

A coleta sangüínea foi realizada por meio de punção venosa, com seringa estéril previamente heparinizada, logo após a assepsia do local com álcool a 70 %, com as devidas precauções que envolvem tal procedimento.

Foram obtidos aproximadamente 5 mL de sangue venoso periférico total em cada coleta. As amostras coletadas no CERAPE foram identificadas e acondicionadas em recipiente térmico, para manutenção da temperatura de ~ 24° C, durante o transporte, e em seguida foram encaminhadas ao Laboratório de Citogenética do Departamento de Laboratórios do Hemocentro de Pernambuco (HEMOPE), para processamento.

## **4.3 – Processamento das amostras**

O processamento das amostras pode ser visualizado, de forma simplificada, na Figura 13, que apresenta esquematicamente todos os passos realizados desde a coleta até a análise do material.

O material utilizado para o preparo da cultura é muito importante no processamento da metodologia. Assim, é apresentada uma breve descrição desse material e a sua aplicação na cultura.

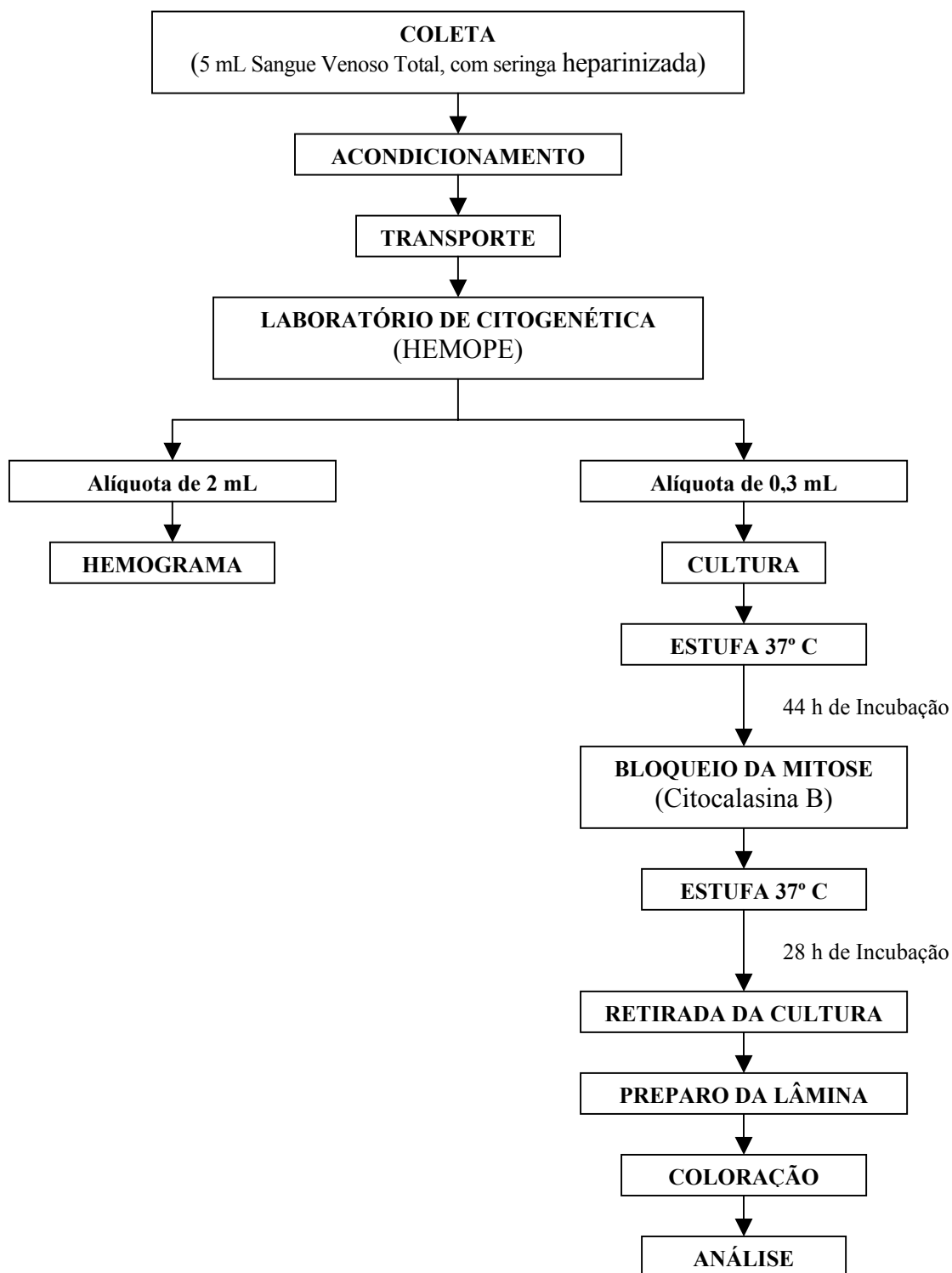


Figura 13. Esquema geral do processamento das amostras

#### 4.3.1 – O meio da cultura

O meio utilizado neste experimento foi o RPMI 1640 (Cultilab) que contém 25 mM de HEPES, um tampão para manter o equilíbrio do pH. O meio RPMI 1640 é uma mistura de vários sais, aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular, sendo por isso utilizado para cultura de células humanas bem como de outros animais. A composição do meio pode ser verificada na Tabela 3. O meio também contém outras substâncias essenciais para a cultura, como antibióticos (penicilina e estreptomicina), além de receber fitohemaglutinina (Gibco) e ser enriquecido com soro bovino fetal (Cultilab). Os antibióticos são utilizados mais como uma medida adicional de segurança evitando as eventuais contaminações pela manipulação externa ao fluxo laminar. Caso as condições de assepsia sejam adequadas, pode-se descartar o uso destes antibióticos. O soro bovino fetal é utilizado pela sua capacidade de estimular o crescimento celular. O soro deve ser de origem confiável para que as propriedades e qualidades sejam mantidas. Para o uso em culturas, o soro deve ser inativado, com o objetivo de evitar interferência do soro sobre a cultura.

A fitohemaglutinina é uma proteína derivada do de uma variedade do *Phaseolus vulgaris* (Feijão) e que tem atividade mitogênica, ou seja, possui a capacidade de estimular a transformação de linfócitos T maduros em blastos (células imaturas e em fase de divisão) *in vitro*.

**Tabela 3. Composição do meio RPMI**

<b>Produtos</b>	<b>Componentes</b>	<b>Concentração (mg/L)</b>
<b>Sais Inorgânicos</b>	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	100
	KCl	400
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	100
	NaCl	600
	NaHCO <sub>3</sub>	2000
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	800
<b>Aminoácidos</b>	L-arginina.HCl	200
	L-asparagina.H <sub>2</sub> O	50
	Ácido L-aspártico	20
	L-cistina	50
	Ácido L-glutâmico	20
	L-glutamina	300
	Glicina	10
	L-histidina.HCl.H <sub>2</sub> O	15
	L-hidroxiprolina	20
	L-isoileucina	50
	L-leucina	50
	L-lisina.HCl	40
	L-metionina	15
	L-fenilalanina	15
	L-serina	30
	L-valina	20
L-treonina	20	
<b>Vitaminas</b>	Biotina	0,2
	Pantotenato de cálcio	0,25
	Cloreto de colina	3
	Ácido fólico	1
	Inositol	35
	Nicotinamida	1
	Ácido p-aminobenzóico	1
	Piridoxina.HCl	1
	Riboflavina	0,2
	Tiamina.HCl	1
Vitamina B12	0,005	
<b>OUTROS COMPONENTES</b>	Glicose	2000
	Glutationa	1
	Vermelho de fenol	5

### 4.3.2 – Cultura Celular

Os métodos de cultura de leucócitos do sangue periférico são baseados nas técnicas originalmente publicadas por **MOOREHEAD *et al.* (1960)**, com determinadas modificações. A técnica apresentada neste tópico é empregada no Laboratório de Citogenética do Departamento de Laboratórios do HEMOPE.

Antes do início do cultivo, o meio foi separado em alíquotas de 4 mL (dividido em porções aproximadamente iguais) para tubos âmbar ou recobertos por papel alumínio. No momento do preparo da cultura foi acrescentado ao meio 1,5 mL do soro bovino fetal, para se ter uma concentração final média de soro de 25% e 0,1 mL de fitohemaglutinina.

Com a chegada do material ao laboratório, as amostras foram levadas à câmara de fluxo laminar, onde foi iniciado o processo de cultivo com a inclusão de uma alíquota de 0,3 mL de sangue total bem homogeneizado ao meio, ajustando-se o pH em torno de 7,0.

Após a inoculação do sangue ao meio, a cultura é levada à estufa a uma temperatura de  $37 \pm 0,5$  °C e deixada em incubação inicial por 44 h. Decorrido este tempo, é adicionado ao meio a citocalasina B na concentração final de 5 µg/mL, prosseguindo com a incubação por mais 28 h, o que resulta em uma incubação de 72 h.

Segundo **PURROTT *et al.* (1981)**, a manutenção da temperatura dentro da faixa acima mencionada é extremamente importante, pois temperaturas baixas podem resultar em uma produção pobre de micronúcleos e uma temperatura alta (40 °C ou acima) pode levar a presença de um número elevado de células resultantes de uma segunda divisão celular devido a uma maior velocidade no ciclo de desenvolvimento celular.

A citocalasina B (Sigma), que é adicionada à cultura após um determinado período de incubação, tem como função bloquear a mitose na citocinese, como já citado anteriormente, dando origem a células binucleadas.

### **4.3.3 – Retirada da Cultura**

Ao término da incubação, as culturas foram retiradas da estufa para o processamento do material até a obtenção do “botão” celular, que é um precipitado de células sanguíneas, dentre as quais estão presentes as células binucleadas. Este processo de retirada é composto de algumas etapas, visualizadas de forma esquemática na Figura 14.

Antes de iniciar a retirada, é feito o preparo do fixador, que é composto de ácido acético (Merck) e metanol (Merck) na proporção de 1:4, ou seja, se for utilizado 10 mL de ácido acético, deve-se completar com 30 mL de metanol. Este fixador, como o próprio nome já indica, será utilizado para fixar as células, impedindo que estas sofram modificações bruscas ocasionando a perda de informações.

Ao interromper o processo de incubação com a retirada das culturas da estufa, o material incubado é colocado em tubos cônicos de centrifuga, e centrifugado a 1500 rpm por 6 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante é desprezado. Tendo o precipitado em mãos, é dado início ao processo de lavagem, que é realizado acrescentando-se 8 mL de NaCl a 0,9 %, procede-se com uma homogeneização, em seguida é acrescentado 1 mL de fixador (anteriormente preparado), novamente o material é homogeneizado e realiza-se nova centrifugação.



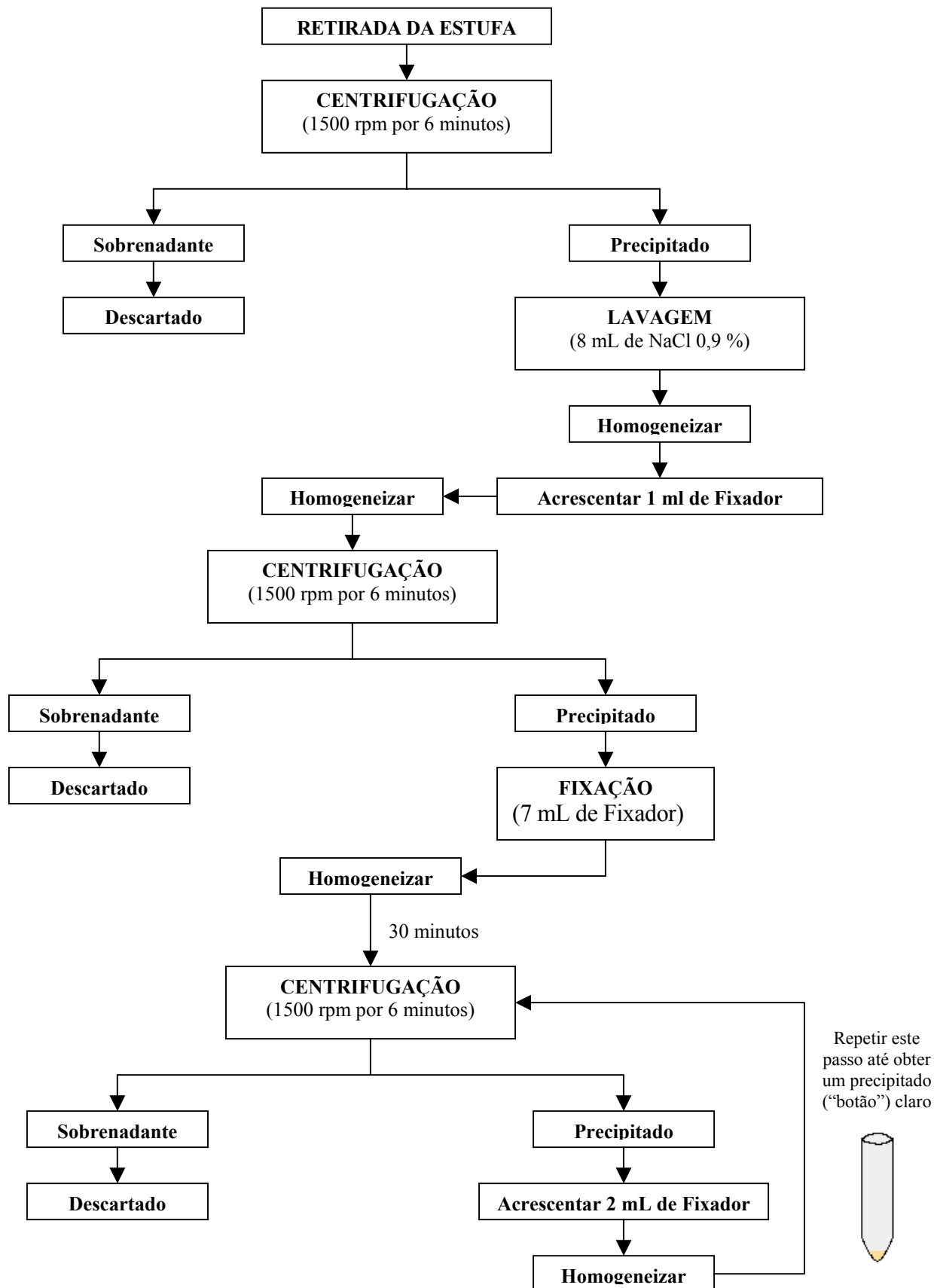


Figura 14. Procedimentos de retirada da cultura

Após a centrifugação dá-se início ao processo de fixação, com a adição de 7 mL de fixador ao precipitado, misturando-se bem até a completa homogeneização e deixando repousar por 30 minutos em temperatura ambiente. Decorridos os 30 minutos, o material é novamente centrifugado a 1500 rpm por 6 minutos, o sobrenadante é desprezado e o precipitado passará por processos de lavagem com o fixador para que o material fique o mais limpo possível, ou seja, sem a presença de resíduos.

Nestas lavagens são acrescentados 2 mL de fixador ao precipitado, e seqüencialmente é realizada uma nova centrifugação a 1500 rpm por 6 minutos, com a eliminação do sobrenadante em todas elas. Este processo de lavagem é repetido até a obtenção de um precipitado claro (“botão” celular). A este “botão” celular é acrescentado aproximadamente 1 mL de fixador, executa-se uma homogeneização e está pronta a suspensão que é utilizada para o preparo das lâminas.

#### **4.3.4 – Preparo das lâminas**

As lâminas utilizadas nesta etapa devem ter passado por uma lavagem adequada (Tabela 4). Com as lâminas limpas, e estando com a suspensão celular em mãos, é feito o gotejamento (duas gotas com uma pipeta Pasteur) do material sobre as lâminas ainda molhadas e na posição horizontal. Em seguida, estas devem ficar secando ao ar livre e a temperatura ambiente. Este processo pode ser melhor visualizado na Figura 15.

**Tabela 4. Procedimento de lavagem das lâminas microscópicas**

---

**Lavagem das Lâminas**

---

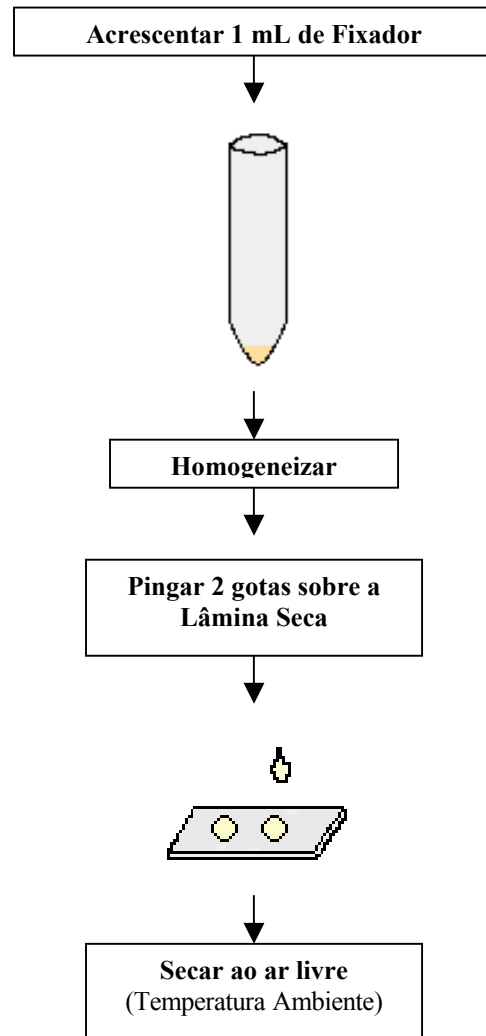
A lavagem das lâminas consiste em um processo de desengorduramento, acompanhando os passos a seguir:

- 1- Pega-se uma caixa de lâminas novas e põe de molho no detergente (EXTRAN, da marca Merck) diluído em água de torneira a 20%, por pelo menos 12h;
- 2- Após o molho, é realizada uma lavagem utilizando escovas adequadas (escova de dente ou escova de barbear), se necessário;
- 3- Retira-se o detergente, passando as lâminas 7 vezes em água fria (água da torneira, que pode ser corrente);
- 4- Lava-se 3 vezes com água fervendo (água deionizada ou destilada);
- 5- Colocam-se as lâminas em recipiente com água deionizada;
- 6- Tapa o recipiente e leva à geladeira (estão prontas para o uso).

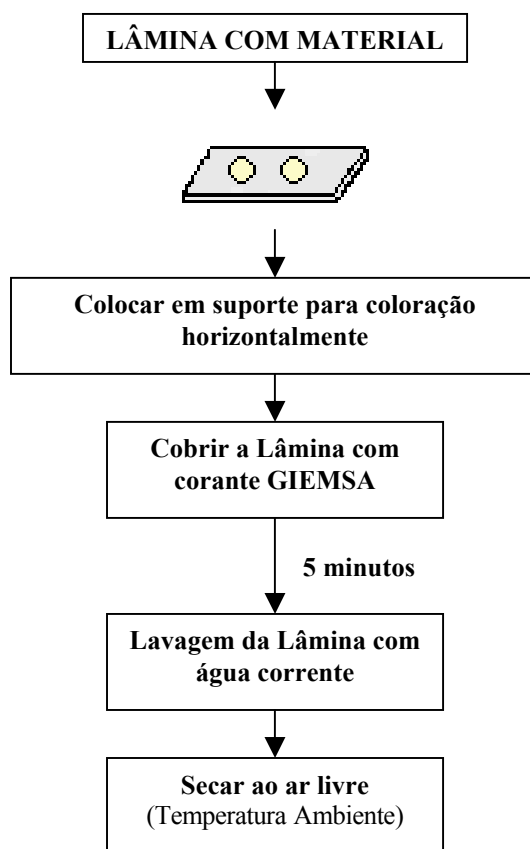
(Obs.: A lavagem deve ser executada com cuidado para não riscar as lâminas.)

---

Após a secagem, as lâminas podem passar para o processo de coloração, conforme Figura 16, que é realizado com a utilização do corante Giemsa (Merck), o qual é depositado de forma uniforme sobre as lâminas, por um tempo médio de 5 minutos, sendo em seguida lavadas com água corrente e novamente devem secar ao ar livre. A partir de então elas estão prontas para a análise microscópica.



**Figura 15. Preparo das lâminas**



**Figura 16. Coloração das lâminas**

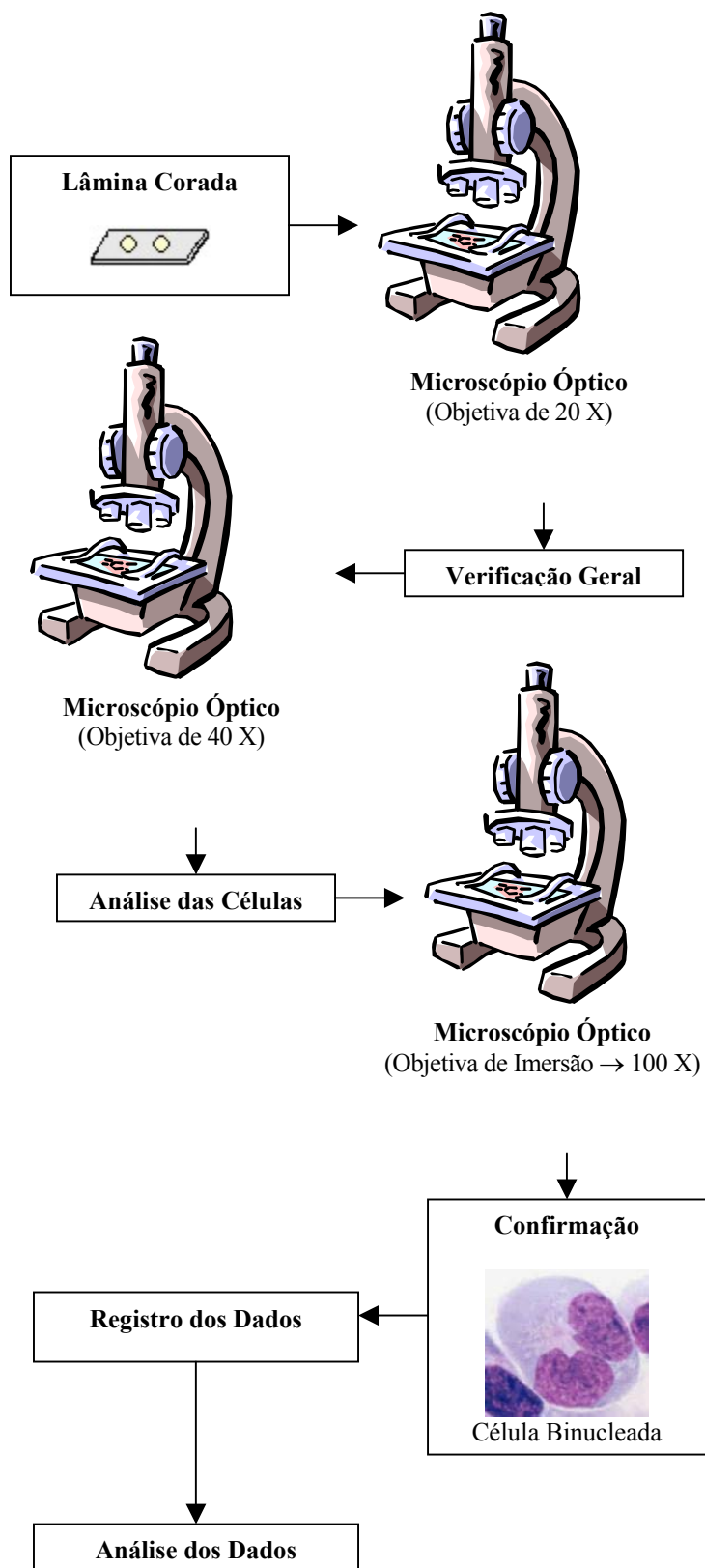
#### **4.3.5 – Análise microscópica**

A análise foi realizada em microscópio ótico (Olympus BX 60), Figura 17. A lâmina preparada foi analisada primeiramente na objetiva de 20x, onde foi feita uma rápida varredura para observar as condições das células. Logo em seguida, foi utilizada a objetiva de 40x. Com esta objetiva, foi realizada a contagem das células binucleadas sem micronúcleos e células com 1, 2, 3, 4 ou mais micronúcleos.



**Figura 17. Microscópio de análise do Laboratório de Citogenética do HEMOPE**

Ao localizar as células com micronúcleos, realizou-se a mudança da objetiva de 40x pela objetiva de imersão (100x), para a confirmação das alterações encontradas, procedendo-se o registro dos dados. Com a razão encontrada entre o total de micronúcleos e o total das células binucleadas, determinou-se a frequência de micronúcleos. A análise dos dados foi feita logo em seguida. Todo este processo de análise é esquematizado na Figura 18.



**Figura 18. Esquema da Análise Microscópica**

## V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na quantificação de micronúcleos, amostras de sangue periférico de cinco pacientes antes do tratamento radioterápico e em duas fases após exposição à radiação ionizante foram analisadas, totalizando quinze amostras. Todas as amostras foram preparadas segundo a técnica de bloqueio da citocinese (BCC) por citocalasina B.

Antes do desenvolvimento da técnica BCC, foram realizados os leucogramas de todas as pacientes, após cada coleta de sangue, cujos resultados estão apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5. Número de leucócitos e porcentagem de linfócitos das 5 pacientes avaliadas no trabalho**

Indivíduos	Dose (Gy)	Leucócitos (mm <sup>3</sup> )	Linfócitos (%)
A	0,0*	9.100	36
	0,08	7.400	39
	1,8	9.100	37
B	0,0*	7.500	35
	0,08	5.700	30
	1,8	6.600	30
C	0,0*	7.100	31
	0,08	8.800	28
	1,8	7.000	26
D	0,0*	5.600	33
	0,08	5.700	26
	1,8	4.600	24
E	0,0*	8.600	32
	0,08	8.100	30
	1,8	7.400	31

\* - Valor considerado para a exposição decorrente da radiação natural



Com base nos resultados obtidos observa-se que o número de leucócitos totais e a porcentagem de linfócitos encontravam-se dentro dos valores tidos como normais, que para os leucócitos totais podem variar de 4.500 a 11.000 por  $\text{mm}^3$  e para os linfócitos de 20 a 50 % conforme apresentado por FAILACE (1995).

Ao analisar o agrupamento dos dados de leucócitos e linfócitos frente a frequência de micronúcleos (Tabela 6), é possível visualizar que os resultados não oscilaram dos valores considerados normais, apresentando leves variações após as exposições, o que contribui para a não interferência destes fatores (número de leucócitos totais e porcentagem de linfócitos), no presente trabalho.

**Tabela 6. Comparação do número de leucócitos e linfócitos em relação a frequência de micronúcleos**

Dose (Gy)	Leucócitos ( $\text{mm}^3$ )	Linfócitos (%)	FMN
<b>0,0*</b>	9.100	36	0,0008
	7.500	35	0,0009
	7.100	31	0,0013
	5.600	33	0,0010
	8.600	32	0,0016
<b>0,08</b>	7.400	39	0,0021
	5.700	30	0,0020
	8.800	28	0,0020
	5.700	26	0,0021
	8.100	30	0,0024
<b>1,8</b>	9.100	37	0,041
	6.600	30	0,052
	7.000	26	0,047
	4.600	24	0,055
	7.400	31	0,066

FMN – Frequência de Micronúcleos

\* - Valor considerado para a exposição decorrente da radiação natural

## 5.1 – Influência da radiação natural

No emprego da técnica BCC para a obtenção das células binucleadas para análise, procurou-se inicialmente avaliar o número médio de micronúcleos resultantes da exposição natural à radiação sofrida pelos indivíduos envolvidos neste trabalho. Nesta etapa, contamos com uma amostra de sangue de cada paciente, o que nos forneceu cinco amostras.

Todos as pacientes foram questionadas, a princípio, sobre a possível ocorrência de exames radiológicos nos 2 anos anteriores ao tratamento. As cinco pacientes não se recordavam se já haviam sido submetidas a esse tipo de exame no referido período. Também foi interrogada a possibilidade do uso de drogas potencialmente ativas na produção de danos cromossômicos, como os organoclorídeos e o butadieno (FENECH *et al.*, 1999; STEPHANOU *et al.*, 1998), que pudessem resultar na presença de um número maior de micronúcleos na análise. Foi verificado junto as pacientes que as mesmas não foram expostas a essas substâncias tóxicas, mesmo porque, são drogas envolvidas normalmente com a exposição ocupacional.

Os resultados encontrados nesta primeira etapa do trabalho, decorrentes da exposição à radiação natural, estão apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7. Frequência de micronúcleos, células binucleadas contadas e micronúcleos visualizados resultantes da radiação natural**

Paciente / Idade	CBC	MN	FMN
<b>A/40</b>	1200	01	0,0008
<b>B/42</b>	1140	01	0,0009
<b>C/44</b>	1500	02	0,0013
<b>D/53</b>	1000	01	0,0010
<b>E/59</b>	1820	03	0,0016
<b>Média ± DP</b>			<b>0,0011 ± 0,0003</b>

FMN – Frequência de Micronúcleos  
 CBC – Células Binucleadas Contadas  
 MN – Micronúcleos Visualizados  
 DP – Desvio Padrão

O valor médio encontrado para a frequência de micronúcleos devido à radiação natural foi de **0,0011 ± 0,0003** (Tabela 7). Publicações anteriores prevêm variações na frequência devido à radiação natural de 0,001 a 0,018 (**KÖKSAL et al., 1996; VENKATACHALAM et al., 1999; VENKATACHALAM et al., 2000; STREFFER et al., 1998; LLOYD et al., 1979; HUBER et al., 1983; FENECH & MORLEY, 1985a, b**). Assim, o valor apresentado neste trabalho apresenta-se dentro dos valores previstos anteriormente e consistentes entre as cinco pacientes. Estas variações são supostamente atribuídas a várias causas como o efeito da idade, pequenas variações na técnica e índices diferentes de radiação natural em regiões distintas.

A obtenção dos valores da frequência de micronúcleos decorrentes da radiação natural em cada laboratório é muito importante no intuito de minimizar pequenas variações nas técnicas de culturas, referentes à manipulação durante a execução da técnica (**KÖKSAL et al., 1996**), bem como de qualquer outro fator.

A radiação natural corresponde aos efeitos resultantes da radiação cósmica e da radiação proveniente de elementos radioativos existentes na crosta terrestre. Devido à presença destes materiais em concentrações diferentes, existem regiões que possuem

valores médios de radiação natural (ou radiação de fundo) que diferem de região a outra. Assim, a obtenção de valores diferentes para as frequências de micronúcleos decorrentes da radiação natural em diferentes localidades é esperada.

## 5.2 – Frequência de micronúcleos após exposição a 0,08 Gy

Para a avaliação da frequência de micronúcleos relacionada à exposição das pacientes a uma dose de 0,08 Gy (dose esta empregada para a identificação da região do corpo onde as pacientes deveriam sofrer exposição posterior, a doses maiores, referentes ao tratamento necessário), amostras de sangue foram coletadas para análise 24 h após irradiação, cujos resultados encontram-se presentes na Tabela 8.

**Tabela 8. Frequência de micronúcleos, células binucleadas contadas e micronúcleos visualizados para a dose de 0,08 Gy**

Paciente / Idade	CBC	MN	FMN
A/40	1415	03	0,0021
B/42	1000	02	0,0020
C/44	1500	03	0,0020
D/53	1400	03	0,0021
E/59	1640	04	0,0024
<b>Média ± DP</b>			<b>0,0021 ± 0,0002</b>

*FMN – Frequência de Micronúcleos*  
*CBC – Células Binucleadas Contadas*  
*MN – Micronúcleos Visualizados*  
*DP – Desvio Padrão*

As frequências acima se apresentam duas vezes maior quando comparadas às frequências obtidas devido à radiação natural (Tabela 7). A avaliação da frequência de

micronúcleos para a dose de 0,08 Gy não havia sido anteriormente estudada. Contudo, VENKATACHALAM *et al.* (1999) e VENKATACHALAM *et al.* (2000) utilizaram as doses de 0,05 e 0,10 Gy, obtendo respectivamente as frequências de  $0,024 \pm 0,005$  e  $0,023 \pm 0,005$  para a dose de 0,05, e para a dose de 0,10 as frequências foram  $0,027 \pm 0,005$  e  $0,029 \pm 0,005$ . Ao observar os valores das doses notamos que a dose de 0,08 Gy é intermediária as descritas, o que nos levou a supor que as frequências obtidas fossem similares às citadas. No entanto, as frequências obtidas foram menores. Ao verificar cuidadosamente os trabalhos citados observamos que em ambos foi utilizado apenas um doador de sangue. Mas, outros pontos mostraram-se distintos, tais como, a taxa de dose que era maior, a região onde os mesmos foram executados e a exposição que foi de corpo inteiro.

### 5.3 – Frequência de micronúcleos após exposição a 1,8 Gy

A Tabela 9 mostra a frequência de micronúcleos, com os respectivos números de células binucleadas contadas e micronúcleos visualizados, das amostras das 05 pacientes.

**Tabela 9. Frequência de micronúcleos, células binucleadas contadas e micronúcleos visualizados para a dose de 1,8 Gy**

Paciente / Idade	CBC	MN	FMN
A/40	1000	41	0,041
B/42	1000	52	0,052
C/44	450	21	0,047
D/53	1000	55	0,055
E/59	1200	79	0,066
Média ± DP			<b>0,052 ± 0,009</b>

FMN – Frequência de Micronúcleos  
 CBC – Células Binucleadas Contadas  
 MN – Micronúcleos Visualizados  
 DP – Desvio Padrão

Os resultados das frequências visualizados na Tabela 9 são superiores tanto aos apresentados na Tabela 7 quanto os da Tabela 8. Isto nos permite averiguar se a técnica foi empregada corretamente. Apesar disso, os valores são menores do que os previstos na literatura. A razão para que isso tenha ocorrido será discutido logo em seguida.

#### 5.4 - Obtenção da frequência de micronúcleos a partir de curva dose efeito biológico

VOISIN *et al.* (2001) analisaram amostras de sangue periférico de 47 doadores saudáveis (com idades entre 25 e 30 anos) irradiadas *in vitro* com fonte de  $^{60}\text{Co}$  ( $0,5 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$ ), objetivando a quantificação de micronúcleos, utilizando o mesmo protocolo empregado nesta pesquisa. Como resultado, eles obtiveram uma curva de calibração, dada pela equação:

$$Y = 0,012 + 0,071.D + 0,028 D^2 \quad (5)$$

Na equação anterior Y representa a frequência de micronúcleos após irradiação com dose D em grays. Substituindo-se os valores de dose avaliados nesta pesquisa, veremos que para uma dose de 0,08 Gy, o número de aberrações será da ordem de 0,0179, enquanto que para uma dose de 1,8 Gy o número previsto de aberrações é de aproximadamente 0,23. A Tabela 10 permite comparar o número de aberrações obtido experimentalmente com os previstos pela equação anterior.

**Tabela 10. Comparação entre os valores previstos por VOISIN *et al.* (2001) e a frequência de micronúcleos obtido nesta pesquisa**

Dose (Gy)	$\bar{Y}$ Previsto (VOISIN <i>et al.</i> , 2001)	Y Obtido nesta pesquisa
0,0*	0,012**	0,0011
0,08	0,0179**	0,0021
1,8	0,23**	0,052

\* - Valor considerado para a exposição decorrente da radiação natural

\*\* - Valor obtido com o emprego da equação 5

A simples comparação dos resultados apresentados na tabela anterior demonstra diferenças entre a frequência de micronúcleos prevista pela curva de calibração e os valores obtidos experimentalmente. Entretanto, é preciso observar que se está comparando os resultados obtidos após irradiação parcial do corpo humano com valores previstos para formação de micronúcleos, supondo uma irradiação homogênea total.

Como a maior parte das exposições externas do homem à radiação ionizante, acidental ou não, são exposições localizadas, o conhecimento prévio das condições de irradiação externa permite a avaliação retrospectiva da dose com base na quantificação do número de micronúcleos em linfócitos do sangue periférico, com o auxílio de curvas de calibração obtidas supondo uma irradiação homogênea do corpo inteiro.

Sabe-se que a avaliação de doses inferiores a 0,3 Gy, pelo método de contagem de micronúcleos, tem uma grande incerteza associada (VOISIN *et al.*, 2001). Trabalhos de STREFFER *et al.* (1998) apresentam como valores de dose limite para um crescimento da frequência de micronúcleos significativa, as dose de 0,3 a 5,0 Gy para o uso de raios X, no entanto, com o uso da hibridização com sondas de ADN para marcação de centrômeros, o limite de detecção cai para 0,1 Gy de raios X. Também é aparentemente possível, com uso da técnica de citogenética molecular, detectar exposições à radiação que ocorreram décadas antes da medida. Logo, esta técnica é

mais uma vertente a que este trabalho pode levar, buscando assim, o aprimoramento do limite de detecção.

De acordo com os dados utilizados no planejamento da teleterapia das pacientes solicitadas como doadoras, o volume corporal irradiado corresponde aproximadamente a 1/5 do volume total do corpo. Supondo uma distribuição volumétrica do sangue como sendo homogênea no corpo humano, pode-se inferir que, 24 h após a irradiação, os linfócitos irradiados estarão distribuídos no sangue periférico. Com isso, a frequência de aberrações terá um valor proporcional ao percentual do volume de corpo irradiado, ou seja:

$$F_{MNVI} = F_{MNP} \times P_{VI} \quad (6)$$

Onde:  $F_{MNVI}$  = frequência de micronúcleos previstas considerando irradiação parcial,

$F_{MNP}$  = frequência de micronúcleos prevista pela curva de calibração,

$P_{VI}$  = percentual do volume do corpo irradiado.

Com base nesta hipótese, é possível deduzir a dose absorvida pelas pacientes multiplicando-se o valor estimado pelo fator resultante da relação entre o volume irradiado e volume total do corpo do indivíduo. Assim, a partir da frequência de micronúcleos prevista pela curva ( $F_{MNP}$ ), e do percentual do volume irradiado ( $P_{VI} = 20\%$ ), pode-se inferir as frequências de micronúcleos previstas considerando irradiação parcial ( $F_{MNVI}$ ). Substituindo-se na equação (6), obtêm-se os valores destacados e apresentados na Tabela 11.



**Tabela 11. Comparação entre as frequências de micronúcleos obtidas nesta pesquisa e aquelas previstas por VOISIN *et al.* (2001) considerando a irradiação parcial.**

Dose (Gy)	Valor previsto considerando irradiação parcial	Y Obtido nesta pesquisa
0,08	0,0036*	0,0021
1,8	0,046*	0,052

\* - Valor obtido com o emprego da equação 6

A contagem de micronúcleos em células binucleadas após o BCC tem se mostrado como um excelente biomarcador para exposições à radiação ionizante, e apresenta um aumento na contagem da frequência de micronúcleos quando ocorre o aumento da dose, como pode ser constatado na literatura. Este aumento também pode ser visualizado nos resultados obtidos neste trabalho.

A Tabela 12 resume os resultados agrupados, onde além da frequência de micronúcleos para as três etapas do trabalho, tem-se o valor total de células binucleadas contadas, dos micronúcleos visualizados, da distribuição destes micronúcleos dentro das células binucleadas, como também da frequência de células binucleadas com presença de micronúcleos.

**Tabela 12. Distribuição e frequência de micronúcleos em função das doses (0,0\*; 0,08 e 1,8 Gy) administradas**

Dose (Gy)	FMN	FCBMN	CBC	MN	Distribuição de Micronúcleos			
					0	1	2	3
0,0*	0,0011 ± 0,0003	0,0011 ± 0,0003	6660	08	6652	08	--	--
0,08	0,0021 ± 0,0002	0,0021 ± 0,0002	6955	15	6940	15	--	--
1,8	0,052 ± 0,009	0,042 ± 0,007	4650	248	4449	162	31	08

FMN – Frequência de Micronúcleos

FCBMN – Frequência de Células Binucleadas com Micronúcleos

CBC – Células Binucleadas Contadas

MN – Micronúcleos Visualizados

\* - Valor considerado para a exposição decorrente da radiação natural

As freqüências de células binucleadas com micronúcleos mostraram resultados similares aos decorrentes das freqüências de micronúcleos apenas. E assim como em outros trabalhos (GARCIA *et al.*, 1995; KÖKSAL *et al.*, 1996; VENKATACHALAM *et al.*, 2000), a distribuição de micronúcleos dentro das células binucleadas foi maior para a dose de 1,8 Gy, na qual foi observada a presença de células binucleadas com 1, 2 e 3 micronúcleos.

Vários estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de verificar se a idade dos indivíduos possui relação com a freqüência de micronúcleos, pois baseado em observações, vários autores notaram que esta freqüência apresenta-se maior com o aumento da idade (NORMAN *et al.*, 1985; FENECH & MORLEY, 1985b; WOJCIK *et al.*, 2000).

Na Tabela 13 é possível observar uma sutil variação para cima nas freqüências de micronúcleos com o aumento da idade das pacientes. Isto poderia vir reforçar a hipótese da interferência da idade. No entanto, seria necessário um número maior de casos para validar esta hipótese.

**Tabela 13. Freqüência de micronúcleos *versus* idade**

<b>Paciente / Idade</b>	<b>FMN (0,0* Gy)</b>	<b>FMN (0,08 Gy)</b>	<b>FMN (1,8 Gy)</b>
<b>A/40</b>	0,0008	0,0021	0,041
<b>B/42</b>	0,0009	0,0020	0,052
<b>C/44</b>	0,0013	0,0020	0,047
<b>D/53</b>	0,0010	0,0021	0,055
<b>E/59</b>	0,0016	0,0024	0,066

\* - Valor considerado para a exposição decorrente da radiação natural

**PEACE & SUCCOP (1999)** realizaram um estudo comparativo entre 11 trabalhos, no qual analisou a frequência de micronúcleos *versus* a idade dos envolvidos nos trabalhos, e constatou que em 10 dos 11 trabalhos ocorreu aumento da frequência de micronúcleos com a idade. No entanto, os valores para uma determinada idade não se apresentaram uniforme.

Durante a execução deste trabalho foi possível sentir as dificuldades decorrentes da ausência de um laboratório estruturado para a execução da técnica de BCC, pois antes de iniciar a avaliação dos pacientes, foi necessário buscar uma padronização local para esta técnica. Na literatura é possível encontrar detalhes a respeito da técnica de BCC, mas só na manipulação é que se pode estabelecer os parâmetros que melhor resultado nos fornece. Mesmo assim, variações encontradas nos resultados apresentados podem ter sido em decorrência das variações metodológicas como referido na literatura.

Todas as pacientes envolvidas no presente trabalho sofreram uma exposição a uma dose de 0,08 Gy antes da dose de 1,8 Gy e segundo **VIJAYALAXMI *et al.* (1995)**, isto poderia resultar em frequências de micronúcleos menores para a dose de 1,8 Gy, devido à resposta adaptativa, que é a redução dos danos decorrentes de uma exposição prévia a baixas doses. Como observado em trabalho realizado por eles, onde verificaram que ao expor as amostras sanguíneas a uma dose de 0,01 Gy seguida pela exposição a uma dose de 1,5 Gy era possível se obter valores significativamente menores das frequências de micronúcleos quando comparado com o grupo controle. Contudo, como pode ser visto na Tabela 11, os resultados desta pesquisa não mostraram a possível resposta adaptativa.

Existem possíveis variáveis que não têm sido estudadas, com ênfase, na literatura, quando da análise da frequência de micronúcleos frente à exposição à radiação ionizante. Dentre estas possíveis variáveis temos a taxa de exposição, a irradiação localizada, o tipo de exposição (se a raios X ou a um elemento radioativo como o  $^{60}\text{Co}$ ), o tipo de radiação (se alfa, beta, gama ou nêutrons). Todas estas variáveis

podem estar influenciando os valores de micronúcleos encontrados na literatura, e quaisquer destes fatores podem também estar modificando os resultados apresentados neste trabalho, portanto, para excluir estas variáveis, um estudo mais aprofundado seria necessário. Para isto, este estudo tem que ser realizado em conjunto com vários laboratórios, devido à necessidade de um grande número de amostras.

Em um estudo citogenético com o objetivo de avaliar o efeito da radiação  $\beta$  do  $^{90}\text{Sr}$  em células humanas, **OLIVEIRA *et al.* (2001)** observaram que uma fonte deste elemento a uma taxa de exposição de 0,2 Gy/min era menos eficiente em induzir aberrações cromossômicas do que o  $^{60}\text{Co}$ , o  $^{137}\text{Cs}$ , o  $^{192}\text{Ir}$  e os raios X. Isto nos impulsiona a supor que os valores reduzidos das frequências de micronúcleos encontradas neste trabalho, não seriam em decorrência do elemento radioativo utilizado, que foi o  $^{60}\text{Co}$ , mas podem estar relacionadas à taxa de exposição que foi de 0,33 Gy/min, a qual apresenta-se menor do que outras utilizadas em trabalhos que analisaram a frequência de micronúcleos na avaliação da dose de radiação, como no trabalho de **VENKATACHALAM *et al.* (1999)**, que empregaram o  $^{60}\text{Co}$  a uma taxa de dose de 0,75 Gy/min.

O tempo de persistência<sup>3</sup> tanto das aberrações cromossômicas instáveis quanto de micronúcleos nos linfócitos ainda é controverso, e está ligado ao tempo de vida dos linfócitos. **SLOZINA *et al.* (1997)**, citaram em seu trabalho que a maioria dos linfócitos possuem uma vida média de três anos, e que alguns linfócitos têm uma duração de várias décadas. Contudo, **STREFFER *et al.* (1998)** citaram que o número de micronúcleos induzidos após o tratamento com iodo radioativo, de crianças com carcinoma de tireóide, sofreu uma redução após quatro a seis meses da exposição, chegando a valores similares aos apresentados em decorrência da irradiação natural, ou seja, valores de pré-exposição. Já em adultos, os valores apresentados após um ano da exposição são apenas 50 % menores. Isto o permitiu supor que a maior velocidade de remoção dos danos apresentada pelas crianças seja devido à alta renovação dos

---

<sup>3</sup> Tempo de persistência – tempo que os danos decorrentes da radiação nas células podem ser encontrados sem modificações.

linfócitos. No presente trabalho, alterações decorrentes do tempo pós-irradiação, nem da idade, foram consideradas, pois todas as coletas foram realizadas 24 horas após a exposição à radiação e em pacientes com idades entre 40 e 59 anos.

Como a frequência de danos cromossômicos aumenta com a dose, como pode ser observado em diversos trabalhos que envolvem a dosimetria citogenética, é possível, após a obtenção de uma curva de calibração, o estudo epidemiológico de uma região, o que é de grande importância em casos de acidentes com radiação. O estabelecimento de uma curva de calibração que leve em conta a irradiação localizada também se mostra necessária, tendo em vista que nem sempre as exposições ocorrem de forma uniforme e de corpo inteiro, como foi apresentado neste trabalho.

Como foi visto até o momento, existem algumas variáveis dentro da dosimetria citogenética, a qual faz uso do BCC, que devem ser mais bem estudadas. Contudo, baseado nos trabalhos apresentados e no que foi desenvolvido, podemos verificar que este tipo de dosimetria pode ser empregado e nos oferece informações extremamente importantes em várias áreas que envolvem a radiação ionizante. Pois, apesar das variações a que está submetida, ainda assim, fornece resultados confiáveis.

Este tipo de dosimetria, por BCC, também não demanda custos altos, pois os equipamentos exigidos para o seu emprego, como microscópios, centrífugas e estufas, possuem valores acessíveis quando comparados com outros de tecnologia avançada. Quanto ao material de consumo, são necessárias drogas de baixo custo e de fácil acesso no mercado de análises clínicas. Já a mão-de-obra não precisa ser tão especializada quanto aquela que é exigida na análise de aberrações cromossômicas, o que facilita o treinamento de pessoal no emprego da dosimetria citogenética por BCC para estudos mais extensos.

## VI. CONCLUSÕES

- ◆ O número de leucócitos totais e a porcentagem de linfócitos em todas as amostras analisadas apresentam-se na faixa de normalidade do indivíduo saudável e, portanto, não se mostram como fatores de variação nos resultados das frequências de micronúcleos;
- ◆ A quantificação de micronúcleos está bem estabelecida e o custo para sua execução é baixo, isto reforça a viabilidade do emprego desta técnica, regionalmente, como dosímetro biológico;
- ◆ No emprego da relação dose versus efeito biológico induzido, o aumento da dose de exposição proporciona uma contagem superior na frequência de micronúcleos, bem como, no número de micronúcleos presentes por células binucleadas;
- ◆ Na avaliação retrospectiva da dose absorvida, as frequências de micronúcleos resultantes da radiação natural se apresentam dentro dos valores previstos anteriormente, bem como, demonstram-se consistentes entre as cinco pacientes. Já quanto aos resultados obtidos experimentalmente para as doses de 0,08 Gy e 1,8 Gy após irradiação local, comparados aos previstos por uma curva de calibração resultante de uma exposição total, os valores das frequências de micronúcleos apresentam-se menores, contudo, são ligeiramente proporcionais considerando-se que o volume irradiado foi aproximadamente do volume total do corpo;

◆ Os resultados obtidos no presente trabalho estão em boa concordância com estudos precedentes, o que evidencia a possibilidade do uso da quantificação de micronúcleos como técnica complementar a dosimetria física na avaliação da dose interna resultante tanto da irradiação total quanto parcial do corpo humano, bem como de controle de qualidade em aplicações médicas da radiação ionizante e em estudos epidemiológicos de populações.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Revinter, 1995. 440 p.

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D. *Biologia molecular da célula*. 3. ed. São Paulo: Artes Médicas, 1997. 1294 p.

AMARAL, A., COLAS-LINHART, N., STABIN, M., PETIET, A., GUIRAUD-VITAU, F., JACQUET, N. In vitro irradiation of blood with  $^{99m}\text{Tc}$ : evaluation of dose and chromosome aberrations in irradiated lymphocytes. *Cel. and Molec. Biol.*, v.47, n.3, p. 545 – 548, 2001.

ANDERSON, D., FRANCIS, A.J., GODBERT, P., JENKINSON, P.CP, BUTTERWORTH, K.R. Chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and mitogen-induced blastogenesis in cultured peripheral blood lymphocytes from 48 control individuals sampled 8 times over two years. *Mutat. Res.*, v.250, p.467 – 476, 1991.

AURENGO, A., PETITCLERC, T., GRÉMY, F. *Biophysique*. 2. ed. França: Médecine Sciences Flammarion, 1997. 571p.

BENDERITTER, M., VOISIN, P. Effet des rayonnements ionisants: de la physique à la biologie. *Dosimétrie Biologique à la SARAM*, Paris, v.15, p.2 – 8, 1999.

BONASSI, S., FENECH, M., LANDO, C., LIN, Y., CEPPI, M., CHANG, W.P., HOLLAND, N., KIRSCH-VOLDERS, M., ZEIGER, E., BAN, S., BARALE, R., BIGATTI, M.P., BOLOGNESI, C., JIA, C., DI GIORGIO, M., FERGUSON, L.R., FUCIC, A., LIMA, O.G., HRELIA, P., KRISHNAJA, A.P., LEE, T., MIGLIORE, L., MIKHALEVICH, L., MIRKOVA, E., MOSESSO, P., MÜLLER, W., ODAGIRI, Y., SCARFI, M.R., SZABOVA, E., VOROBTSOVA, I., VRAL, A., ZIJNO, A. Human Micronucleus Project: International database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environm. And Molec. Mutag.*, v.37, p.31 – 45, 2001.

BRODSKY, A., KATHREN, R.L., WILLIS, C.A. History of the medical uses of radiation regulatory and voluntary standards of protection. *Health Phys.*, v.69, n.5, p.783 – 823, 1995.

CAMERON, J.R., SKOFRONICK, J. G. *Medical physics*. Singapore: John Wiley & Sons, 1978. p.487 – 519.



---

CASTELLO, G., SILVESTRI, I. Il linfocita quale dosimetro biologico. *Caleidoscopio Italiano*, Genova, p. 1 – 33, 1999.

CEMBER, H. *Introduction to health physics*. 3. ed. New York: The McGraw-Hill Inc, 1997. 733p.

CHECCUCCI, A. in Interaction of radiation with matter. Pisa. *Quaderno Scuola Normale Superiore*, p.266 – 288, 1987.

COTRAN, R.S., KUMAR, V., ROBBINS, S.L., SCHOEN, F.J. *Patologia estrutural e funcional*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 1277 p.

DOLOY, M.T., MALARBET, J.L., GUEDENEY, G., BOURGUIGNON, M., LEROY, A., REILLAUDOU, M., MASSE, R. Use of unstable chromosome aberrations for biological dosimetry after the first post-irradiation mitosis. *Radiat. Res.*, v.125, p.141 – 151, 1991.

DOLPHIN, G.W. in *Proceedings of symposium on the handling of radiation accidents*, IAEA. Wien. 1969.

EARLY, P.J., LANDA, E.R. Use of therapeutic radionuclides in medicine. *Health Phys.*, v.69, n.5, p.677 – 694, 1995.

EVANS, H.J., NEARY, C.J., WILLIAMSON, F.S. *Internat. J. Radiat. Biol.* 3. ed. 1959. 216p.

FAILACE, R. *Hemograma: manual de interpretação*. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1995. 198p.

FENECH, M. Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes: a biomarker for DNA damage in human populations. *Mutat. Res.*, v.199, p.37 – 45, 1998.

FENECH, M., HOLLAND, N., CHANG, W.P., ZEIGER, E., BONASSI, S. The Human Micronucleus Project – An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat. Res.*, v.428, p.271 – 283, 1999.

FENECH, M., MORLEY, A.A. The effect of donor age on spontaneous and induced micronuclei. *Mutat. Res.*, v.148, p.99 – 105, 1985a.

FENECH, M.; MORLEY, A.A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res.*, v.147, p.29 – 36, 1985b.

---

GARCIA, O.F., RAMALHO, A.T., DI GIORGIO, M., MIR, S.S., ESPINOZA, M.E., MANZANO, J., NASAZZI, N., LOPEZ, I. Intercomparison in cytogenetic dosimetry among five laboratories from Latin América. *Mutat. Res.*, v.327, p.33 – 39, 1995.

GARTNER, L.P., HIATT, J.L. *Atlas de histologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 1993. 322 p.

GARTNER, L.P., HIATT, J.L. *Tratado de histologia: em cores*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 1999. 426 p.

GERMAIN, J. St. Radiation Monitoring with reference to the medical enviroment. *Health Phys.*, v.69, n.5, p.728 – 749, 1995.

HUBER, R.; STRENG, S.; BAUCHINGER, M. The suitability of the human lymphocyte micronucleus assay system for biological dosimetry. *Mutat. Res.*, v.111, p.185 – 193, 1983.

ICE, R.D. History of medical radionuclide production. *Health Phys*, v.69, n.5, p.721 – 727, 1995.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA). *Biological Dosimetry: chromosomal aberration analysis for dose assessment*. IAEA. Technical report series nº 260. 69 p. 1986.

INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIATION UNITS AND MEASUREMENTS (ICRU). Linear energy transfer. *ICRU Report 16*, Washington, DC., 1970.

INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIATION UNITS AND MEASUREMENTS (ICRU). Radiation quantities and units in radiation protection dosimetry. *ICRU Report 51*, Bethesda, MD., 1993.

INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION (ICRP). Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. *ICRP report 26*, Elmsford, NY.: Pergamon Press, ICRP Publications, 1977.

INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION (ICRP). Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. *ICRP Report 41*, Elmsford, NY.: Pergamon Press, ICRP Publication, 1984.

INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION (ICRP). Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. *ICRP Report 60*, Elmsford, NY.: Pergamon Press, ICRP Publication, 1990.

---

KÖKSAL, G., DALCÍ, D.Ö., PALA, F.S. Micronuclei in human lymphocytes: the Co-60 gamma-ray dose-response. *Mutat. Res.*, v.359, p.151 – 157, 1996.

LITTLEFIELD, L.G., JOINER, E.E., COLYER, S.P., SAYER, A.M., FROME, E.L. Modulation of radiation-induced chromosome aberrations by DMSO, an OH radical scavenger. 1: Dose-response studies in human lymphocytes exposed to 220 kV X-rays. *Int. J. Radiat. Biol.*, v.53, p.875 – 890, 1988.

LLOYD, D.C., PURROTT, R.J., PROSSER, J.S. The study of chromosome aberration yield in human lymphocytes as an indicator of radiation dose: revised Techniques National Radiological Protection Board. *Technical Memorandum, NRPB-M-70*, Chilton Didcot Oxon., 1979.

MOORHEAD, P.S., NOWELL, P.C., MELLMANN, W.J., BATTIPS, D.M., HUNGERFORD, D.A. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.*, v.20, p.613 – 616, 1960.

MÜLLER, W. U., STREFFER, C. in *Advances in mutagenesis research*. Berlin, Heidelberg, New York: G. Obe. Springer, 1994. v. 5, 134p.

NORMAN, A.; BASS, D.; ROE, D. Screening human populations for chromosome aberrations. *Mutat. Res.*, v.143, p.155 – 160, 1985.

OKADA, S., NAKAMURA, N., SASAKI, K. *Radioprotection of intracellular genetic material: radioprotectors and anticarcinogens*. New York: Academic Press. p.339 – 356. 1983.

OKUNO, E., CALDAS, I.L., CHOW, C. *Física para ciências biológicas e biomédicas*. São Paulo: Harper & Row do Brasil, 1982.

OLIVEIRA, E.M., SUZUKI, M.F., NASCIMENTO, P.A., SILVA, M.A., OKAZAKI, K. Evaluation of the effect of <sup>90</sup>Sr β-radiation on human blood cells by chromosome aberration and single cell gel electrophoresis (comet assay) analysis. *Mutat. Res.*, v.476, p.109 – 121, 2001.

PEACE, B.E., SUCCOP, P. Spontaneous micronucleus frequency and age: what are normal values?. *Mutat. Res.*, v.425, p. 225 – 230, 1999.

PROSSER, J.S., MOQUET, J.E., LLOYD, D.C., EDWARDS, A.A. Radiation induction of micronuclei in human lymphocytes. *Mutat. Res.*, v.199, p.37 – 45, 1988.

---

PURROTT, R.J., VULPIS, N., LLOYD, D.C. The influence of incubation temperature on the rate of human lymphocyte proliferation in vivo. *Experientia*, v.37, p.407 – 408, 1981.

RAMALHO, A.T., COSTA, M.L.P., OLIVEIRA, M.S. Conventional radiation-biological dosimetry using frequencies of unstable chromosome aberrations. *Mutat. Res.*, v.404, p.97 – 100, 1998.

RIGHI, E., DI POFI, M. *Medicina*. 7. ed. 1987. 291p.

RIGHI, E., CATENA, C., CONTI, D., TRENTA, G. Biodosimetric diagnostic profile. *Rivista Del Nuovo Cimento*, v.21, n.1, p.1 – 57, 1998.

ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. *Immunology*. 4. ed. Barcelona: Mosby, 1998. 406p.

ROMANO, E., FERRUCCI, L., NICOLAI, F., DERME, V., DE STEFANO, G.F. Increase of chromosomal aberrations induced by ionizing radiation in peripheral blood lymphocytes of civil aviation pilots and crew members. *Mutat. Res.*, v.377, p.89 – 93, 1997.

ROOTS, R., OKADA, S. Protection of DNA molecules of cultured mammalian cells from radiation – induced single-strand scissions by various alcohols and SH compounds. *Int. J. Radiat. Biol.*, v.21, p.329 – 342, 1972.

SCAFF, L.A.M. *Física da radioterapia*. São Paulo: Sarvier, 1997. 351p.

SLOZINA, N., NERONOVA, E., KHARCHENKO, T., NIKIFOROV, A. Increased level of chromosomal aberrations in lymphocytes of Chernobyl liquidators 6-10 years after the accident. *Mutat. Res.*, v.379, p.121 – 125, 1997.

SOARES, T. dos S. *Avaliação do controle de qualidade da braquiterapia de altas taxas de dose no tratamento do câncer de colo do útero*. 2000. 89f.. Dissertação (Mestrado em Biofísica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

STEPHANOU, G., RUSSO, A., VLASTOS, D., ANDRIANOPOULOS, C., DEMOPOULOS, N.A. Micronucleus induction in somatic cells of mice as evaluated after 1,3-butadiene inhalation. *Mutat. Res.*, v.397, p.11 – 20, 1998.

STREFFER, C., MÜLLER, W.-U., KRYSCIO, A., BÖCKER, W. Micronuclei – biological indicator for retrospective dosimetry after exposure to ionizing radiation. *Mutat. Res.*, v.404, p.101 – 105, 1998.

---

SURRALLÉS, J.; NATARAJAN, A.T. Human lymphocytes micronucleus assay in Europe: an international survey. *Mutat.Res.*, v.392, p.165 – 174, 1997.

VENKATACHALAM, P., SOLOMON, F.D.P., PRABHU, B.K., MOHANKUMAR, M.N., GAJENDIRAN, N., JEEVANRAM, R.K. Estimation of dose in cancer patients treated with fractionated radiotherapy using translocation, dicentrics and micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes. *Mutat. Res.*, v.429, p.1 – 12, 1999.

VENKATACHALAM, P., PAUL, S.F.D., MOHANKUMAR, M.N., PRABHU, B.K., GAJENDIRAN, N., JEEVANRAM, R.K. Dose-response curve for translocation frequency with a single pair of painted chromosomes: a comparison with dicentric and micronuclei frequency. *Radiat. Protec. Dosim.*, v.87, n.2, p.101 – 108, 2000.

VIJAYALAXMI, LEAL, B.Z., DEAHL, T.S., MELTZ, M.L. Variability in adaptive response to low dose radiation in human blood lymphocytes: consistent results from chromosome aberrations and micronuclei. *Mutat. Res.*, v.348, p.45 – 50, 1995.

VOISIN, P., PAILLOLE, N., BENDERITTER, M., CHAMBRETTE, V., CLARAZ, M., DELBOS, M., DURAND, V., LE ROY, A., SOROKINE-DURM, I. De l'expertise à la crise: dicentriques ou micronoyaux. *Dosimétrie Biologique à la SARAM*, Paris, v.15, p.24 – 28, 1999.

VOISIN, P., BENDERITTER, M., CLARAZ, M., CHABRETTE, V., SDROKINE-DURM, I., DELBOS, M., DURAND, V., LEROY, A., PAILLOLE, N. The cytogenetic dosimetry of recent accidental overexposure. *Cell. Mol. Bio.* 47(3): 557-564, 2001.

WALD, N. in Manual on Radiation Haematology, IAEA. *Technical Report Series 123*, Vienna, p.253 – 264, 1971.

WOJCIK, A., KOWALSKA, M., BOUZYK, E., BURACZEWSKA, I., KOBIALKO, G., JAROCWICZ, N., SZUMIEL, I. Validation of the micronucleus-centromere assay for biological dosimetry. *Genet. and Molec. Biol.*, v.23, n.4, p.1083 – 1085, 2000.

ZAIDER, M., BARDASH, M., FUNG, A. Molecular damage induced directly by ionizing radiation in DNA. *Int. J. Radiat. Biol.*, v.66, n.5, p.459 – 465, 1994.

## APÊNDICE

### Câncer do Colo Uterino

O câncer do colo do útero e seus precursores evoluem lentamente no decorrer de muitos anos. Neste intervalo, o único sinal da doença pode ser a descamação de células anormais do colo uterino. Por estes motivos, é consenso geral que todas as mulheres devem ser submetidas a exames periódicos depois que se tornam sexualmente ativas. O exame citológico apenas detecta a possível presença de um pré-câncer ou de um câncer cervical; não faz um diagnóstico absoluto, o que requer uma avaliação histológica de fragmentos de biopsia adequados. A identificação das alterações é facilitada pela colposcopia do colo uterino. É comum a observação de uma vascularização altamente anormal no câncer cervical invasivo. Por fim, os cânceres clinicamente visíveis geralmente produzem sangramento vaginal irregular, leucorréia, hemorragia ou dor durante o coito e disúria (COTRAN *et al.*, 1996).

O tratamento do câncer epidermóide do colo uterino depende do estágio da neoplasia. O tratamento dos precursores inclui o acompanhamento com exames de Papanicolau nas lesões discretas. De maneira geral, opta-se por histerectomia nos cânceres invasivos e por radiação nas lesões avançadas. O prognóstico e a sobrevida dos carcinomas invasivos depende muito do estágio da neoplasia quando descoberta pela primeira vez (COTRAN *et al.*, 1996).

O carcinoma cervical invasivo manifesta-se em três aspectos distintos: câncer vegetante, ulcerado e infiltrante. A variante mais comum é o tumor vegetante, que produz uma massa obviamente neoplásica com projeções acima da mucosa adjacente (Figura A). O carcinoma cervical avançado cresce por

continuidade direta, indo acometer todas as estruturas contíguas, incluindo o peritônio, a bexiga, os ureteres, o reto e a vagina. Os linfonodos regionais e distantes também são atingidos. Ocorre metástase a distância para o fígado, pulmões, medula óssea e outras estruturas (COTRAN *et al.*, 1996).



**Figura A – Carcinoma do colo uterino bem avançado.**

O câncer cervical é estagiado da seguinte maneira (COTRAN *et al.*, 1996):

- ✧ Estágio 0 – Carcinoma *in situ*.
- ✧ Estágio I – Carcinoma limitado ao colo uterino.
  - Ia – Carcinoma pré-clínico, diagnosticado apenas na microscopia, porém mostrando: Ia1 → Invasão microscópica mínima do estroma (carcinoma minimamente invasivo) (Figura B). Ia2 → Invasão microscópica do estroma com menos de 5 mm de profundidade (carcinoma microinvasivo).
  - Ib – Carcinoma histologicamente invasivo do colo uterino em um estágio mais avançado do que o Ia2.
- ✧ Estágio II – Carcinoma vai além do colo uterino mas não chega à parede da pelve. Acomete a vagina, mas não seu terço inferior.

- ✧ Estágio III – O carcinoma atingiu a parede pélvica. No exame retal não existe espaço livre de câncer entre o tumor e a parede da pelve. O tumor acomete o terço inferior da vagina.
- ✧ Estágio VI – O carcinoma propagou-se além da pelve verdadeira ou comprometeu a mucosa da bexiga ou do reto. É óbvio que este estágio inclui aquele com disseminação metastática.



**Figura B – Invasão precoce do estroma (seta) em uma neoplasia intraepitelial cervical.**

Os métodos de tratamento contemporâneos proporcionam um índice de sobrevivência de cinco anos para aproximadamente 80 a 90 % na doença no estágio I, 75 % no estágio II, 35 % no estágio III e 10 a 15 % no estágio IV. Muitas pacientes com câncer no estágio IV morrem em consequência da propagação local do tumor – ex., para a bexiga e os ureteres e suas adjacências, o que determina a obstrução ureteral, pielonefrite e uremia – e não de metástases a distância (COTRAN *et al.*, 1996).



**ANEXO****CERAPE & DEN/UFPE****Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

**Projeto:** Dosimetria Biológica: Avaliação de alterações cromossômicas instáveis e micronúcleos decorrentes da exposição “in vivo” à radiação eletromagnética ionizante.

**Equipe:** Dr. Homero Cavalcante, Dr. Ernesto Roester, Dra. Roberta, Dra. Vera, Dr. Ademir Amaral, Dr. André Maciel, Dra. Isvânia Barbosa e Dra. Símei Magnata.

Eu \_\_\_\_\_  
residente a \_\_\_\_\_  
município de \_\_\_\_\_ Estado \_\_\_\_\_  
portador da identidade N° \_\_\_\_\_ CPF \_\_\_\_\_  
autorizo a coleta de amostras de sangue periférico para finalidade científica, visando contribuir também com os parâmetros clínicos do tratamento.

Recife, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Assinatura do Paciente: \_\_\_\_\_

Assinatura do Pesquisador: \_\_\_\_\_

Testemunhas: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_