CNEN/SP
ipen Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
AUTARQUIA ASSOCIADA A UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ANÁLISE DA RADIOSSENSIBILIDADE DE LINFÓCITOS PERIFÉRICOS DE PACIENTES COM CÂNCER DE PELE E DE INDIVÍDUOS SADIOS POR MEIO DO MÉTODO DO MICRONÚCLEO

TANIA HELENA OCHI LOHMANN

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear.

Orientador:
Dra. Kayo Okazaki

São Paulo
1995

12:

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ANÁLISE DA RADIOSSENSIBILIDADE DE LINFÓCITOS PERIFÉRICOS DE PACIENTES COM CÂNCER DE PELE E DE IDIVÍDUOS SADIOS POR MEIO DO MÉTODO DO MICRONÚCLEO

TANIA HELENA OCHI LOHMANN

Dissertação apresentada ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares IPEN/CNEN-SP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear.

Orientadora: Dra. Kayo Okazaki

SÃO PAULO

1995

IPEN
LIVRO
Nº 20906
BIBLIOTECA

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP IPEN

"Contei, pois, com Locke e comigo mesmo e encontrei-me possuidor de quatro ou cinco verdades, libertado de uma centena de erros e carregaddo de uma quantidade imensa de dúvidas. Em seguida, disse a mim mesmo: essas poucas verdades que adiquiri com minha razão serão um bem estéril em minhas mãos... se não retirar daí regras para a conduta da minha vida."

Voltaire

Aos amigos, por assim o serem.

Agradeço, de alma, a professora e amiga Kayo Okazaki, pela real orientação, apoio e amizade durante o período do desenvolvimento deste trabalho.

Agradecimentos

Aos meus pais, Anna Luiza e Roberto pelo apoio e incentivo que se iniciaram na minha infância e aos meus irmãos Carlos e Dani,

Ao Professor Dr. Carlos Pereira e MSc. Maria Regina Madruga do Departamento de Matemática e Estatística da USP, pela assistência dada nas análises estatísticas dos resultados,

Ao Dr. Fausto F. Alonso e equipe do Setor de Dermatologia da Santa Casa de São Paulo, pelo material de análise cedido,

À Dra Maria Nazareth Rabello-Gay pela sua constante participação e sugestões fornecidas,

Àos Drs Heitor Andrade Junior e Orlando Rebelo Santos pelo apoio, assistência e sugestões,

Aos Drs. José Roberto Rogero e Paolo Bartolini por possibilitarem o desenvolvimento desse trabalho,

Ao grupo do Prof. Dr. Luis R. G. Britto do Departamento de Neurofisiologia e Biofísica (ICB/USP) e ao Sérgio do Instituto Biológico por permitirem o uso dos fotomicroscópios,

Aos amigos da Divisão de Radiobiologia, especialmente à Erika, Marisa e Patrick que acompanharam a mim e ao meu trabalho, com muito entusiasmo,

A todos da Divisão de Radioensaio, em especial aos companheiros Johny e Rute, Lígia, Yoko, Maria Helena e Mônica pelas dicas e ajuda,

Aos funcionários do CPD, em especial o amigo Fran, pela imensurável ajuda no computador,

Aos pacientes que permitiram realizar este trabalho,

À CAPES pela concessão de bolsa de mestrado e

Ao namorado pela paciência e orgulho.

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP IPEN

SUMÁRIO

RESUMO---------- i
ABSTRACT---------- ii
1. INTRODUÇÃO---------- 1
1.1. Fatores ambientais e sócio-culturais relacionados com a indução de câncer---------- 4
1.1.1 Tabaco---------- 4
1.1.2. Álcool---------- 5
1.1.3. Medicamentos---------- 5
1.1.4. Agentes infecciosos e parasitários---------- 5
1.1.5. Dieta---------- 6
1.1.6. Fatores ocupacionais---------- 6
1.1.7. Pesticidas---------- 7
1.1.8. Radiações ionizantes---------- 11
1.2. Fatores hereditários, familiares e étnicos relacionados com o câncer---------- 12
1.3. Considerações Gerais sobre o Câncer de Pele---------- 17
1.4. Técnicas Citogenéticas na Detecção de Danos no DNA---------- 19
1.5. Considerações Gerais sobre o Micronúcleo (MN)---------- 19
1.5.1. Origem---------- 20
1.5.2. Método do bloqueio citocinético pela citocalasina-B (Cito-B)---------- 22
1.5.3. Vantagens da técnica---------- 24
1.5.4. Curvas de dose-resposta---------- 25
1.5.5. Aplicações ---------- 25
1.5.5.1. Avaliação da mutagenicidade e de carcinogenicidade---------- 26
1.5.5.2. Dosimetria biológica---------- 26
1.5.5.3. Monitoramento de populações---------- 27
1.5.5.4. Avaliação de grupos de risco---------- 24
2. OBJETIVOS---------- 30
3. MATERIAL E MÉTODOS---------- 31
3.1. Material---------- 31
3.1.1. Pacientes portadores de Carcinoma Basocelular (C)---------- 31
4.1.2. Indivíduos sadios (A e B)---------- 31
3.2. Métodos---------- 33
3.2.1. Coleta---------- 33
3.2.2. Irradiação---------- 33
3.2.3. Cultura de linfócitos e preparação de lâminas---------- 33
3.2.4. Análise citogenética---------- 34
3.2.5. Tratamento estatístico---------- 39
4. RESULTADOS---------- 40
4.1.Freqüência de Micronúcleo Espontâneo---------- 40
4.2. Freqüência e Distribuição de Micronúcleo Radioinduzido---------- 41
4.3. Cinética do Ciclo Celular---------- 61
5. DISCUSSÃO---------- 64
6. CONCLUSÕES---------- 70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS---------- 71

ANÁLISE DA RADIOSSENSIBILIDADE DE LINFÓCITOS PERIFÉRICOS DE PACIENTES COM CÂNCER DE PELE E DE INDIVÍDUOS SADIOS POR MEIO DO MÉTODO DO MICRONÚCLEO

Tânia Helena Ochi Lohmann

Resumo

Câncer, uma das doenças que mais causam a morte em países desenvolvidos , tem sido relacionado com mutações somáticas que podem ser detectadas citogenéticamente. Das técnicas citogenéticas, a do micronúcleo vem sendo amplamente utilizada em monitoramento populacional, dosimetria biológica e detecção precoce de grupos susceptíveis ao câncer. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a suscetibilidade cromossômica de linfócitos do sangue de indivíduos portadores de carcinoma basocelular e de indivíduos sadios à ação da radiação ionizante, utilizada como um mutagênico-teste, por meio do método do micronúcleo. Para tanto, os linfócitos periféricos desses indivíduos foram irradiados in vitro em fonte de 60Co com diversas doses e processadascitogenéticamente. Os parâmetros como freqüência e distribuição de micronúcleo, cinética do ciclo celular, índice de nucleação e relação dose-resposta foram analisados. Os resultados mostraram que os pacientes com carcinoma basocelular apresentaram freqüência espontânea de micronúcleo mais alta que a dos indivíduos sadios jovens, porém, mais baixa que a dos indivíduos sadios não jovens. Quanto a radioindução de micronúcleo, o grupo com carcinoma apresentou proporções de linfócitos danificados similares às dos grupos sadios, porém, a extensão das lesões induzidas foi diferente: os linfócitos de pacientes com carcinoma foram mais danificados nas doses mais altas, em relação aos indivíduos sadios. Diferença foi também observada no índice de nucleação que foi mais baixo nesse grupo em todas as doses analisadas, indicando um ciclo celular mais lento em comparação ao dos grupos sadios. Nossos dados mostram que os pacientes com carcinoma basocelular são mais radiossensíveis em doses acima de 400 cGy quando comparados aos grupos sadios.

RADIOSEMSITIVITY OF BLOOD LYMPHOCYTES FROM SKIN CANCER PETIENTS AND HEALTHY VOLUNTEERS AS DETERMINED BY MICRONUCLEUS ASSAY

Tânia Helena Ochi Lohmann

Abstract

Cancer, a major death cause in developed countries, has been related to somatic mutyations that could be detect by cytogenetic analysis. Among the tools used in these tests, the micronucleus assay has been largely applied at population surveillance, biological dosimetry and early detectionof groups with higher risks to developing cancers. In this study, we analysed the chromossomic susceptibility of blood lymphocytes from basocellular skin cancer patients and healthy volunteersThe cytogenetic analysis was performed by a micronucleus assay, using progressive doses of ionizing radiation from a ^{60}Co sourse as mutagen. Briefly, the blood lymphocyteswere irradiated in vitro, as processed by the cytokinesis-blocked method. The micronucleus'frequency and distribution, cell cycle kinetics, nucleation index and dose-response relationship were determined in each patient. The results showedthat the basocellular skin cancer patients, lymphocytes presented higher spontaneous micronucleus frequency as compared with those from healthy youngvolunteers but lower than healthy volunteers from similar age group. The radiation-induced micronucleus analysis showed that the basocellular skin cancer patients' lymphocytes presented similar proportion of damage lymphocytes as compared with those from healthy volunteers. Nevertheless, the magnitude of this damage was higher in this group over 400 cGy, which was not occurred in healthy volunteers. Cell cycle kinetics, as determined by the nucleation index, was lower in basocellular skin cancer patients as compared with healthy volunteers, indicating a more slow cell cycle. Our dadt showed that the lymphocytes from carcinoma basocellular patients were more radiosensitive as compared with those from healthy volunteers.

ANÁLISE DA RADIOSSENSIBILIDADE DE LINFÓCITOS PERIFÉRICOS DE PACIENTES COM CÂNCER DE PELE E DE INDIVÍDUOS SADIOS POR MEIO DO MÉTODO DO MICRONÚCLEO

1. INTRODUÇÃO

Na sociedade contemporânea, numerosos agentes químicos e físicos identificados como mutagênicos estão sendo utilizados rotineiramente. Um estudo da Organização Mundial de Saúde a respeito dos efeitos das substâncias químicas na saúde humana estima que, dos quatro milhões de substâncias naturais ou sintéticas já isoladas, 60 mil estão em uso cotidiano. Entre estas, 5 mil são usadas como aditivos alimentares e 1,5 mil, na preparação de pesticidas, sem incluir os aromatizantes e os medicamentos. É importante salientar que a maioria dos produtos químicos atualmente em uso não foram devidamente testados quanto à sua toxicidade crônica e aos seus efeitos carcinogênicos (Mendonça *et al*, 1992). São várias as evidências que apontam o papel dos fatores ambientais como a principal causa de muitos cânceres humanos (Evans, 1987).

Segundo a teoria da mutação somática, os agentes carcinogênicos podem ser classificados didaticamente como iniciadores e promotores tumorais: os iniciadores são aqueles que afetam diretamente o DNA celular, enquanto que os promotores podem não ser necessariamente mutagênicos, mas por um mecanismo epigenético são capazes de desencadear o processo maligno. Um mesmo carcinógeno pode também agir, ao mesmo tempo, como iniciador e promotor tumoral (Coggle, 1985).

As alterações causadas em certos genes específicos do tumor, proto-oncogenes e genes supressores, podem desencadear uma série de eventos que levam ao desenvolvimento neoplásico. Esses genes tumorais estão presentes normalmente nos genomas de organismos superiores que, uma vez

ativados ou inativados inadequadamente, causam descontrole da proliferação e diferenciação celular.

Apesar das células terem desenvolvido mudanças iniciadoras, elas podem não expressar suas características malígnas até serem estimuladas por agentes promotores que podem agir independentemente dos agentes iniciadores.

O desenvolvimento neoplásico, portanto, não deve ser o resultado de um único evento e sim da ocorrência de várias alterações genéticas e epigenéticas em uma dada célula somática, com efeitos cumulativos. Portanto, o aumento na taxa de mutações pode implicar no aumento da probabilidade da célula adquirir mudanças suficientes para a transformação neoplásica, aumentando, então, o risco de desenvolver o tumor (Sugimura, 1992).

Há evidência, também, de que nem todos os indivíduos apresentem uma resposta similar à ação de um mesmo mutagênico, estabelecendo uma variabilidade de resposta. Esta variabilidade decorre, em parte, do grau de eficiência do mecanismo de reparo. Setlow (1978) e Hsu *et al* (1989) sugeriram que existe na população humana um amplo espectro de capacidade de reparo do DNA e que a eficiência desse mecanismo pode ser determinada geneticamente. Partindo da hipótese de que o reparo do DNA está envolvido no mecanismo de transformação neoplásica, muitas mutações são reparadas prontamente em pessoas sadias. No entanto, aquelas que apresentam deficiência ou defeito em alguma etapa do reparo podem acumular mais alterações genéticas e, portanto, possuem um maior risco de desenvolver o câncer. Os indivíduos podem ainda apresentar uma sensibilidade diferencial a vários tipos de mutagênicos, associada a mecanismos específicos de reparo de DNA. Sendo assim, a deficiência em um tipo de mecanismo de reparo pode ser expressa mais intensamente com um mutagênico do que com outro (Hsu *et al*, 1985).

É importante, portanto, identificar certos fatores de risco dentro de estudos epidemiológicos. O termo risco é utilizado para definir a probabilidade de que indivíduos não portadores de uma certa doença, mas expostos a determinados fatores, podem adquirir essa moléstia. Contrariamente, há fatores que conferem ao organismo a capacidade de se proteger contra o acometimento de determinada doença e são chamados fatores de proteção. A interação entre os fatores de risco e os de proteção a que as pessoas estão submetidas pode alterar a probabilidade delas adoecerem.

O mesmo fator pode ser de risco para várias doenças, por exemplo, o tabagismo, que é fator de risco para diversos cânceres (Sterling *et al*, 1994) e para doenças cardiovasculares e respiratórias. Outrossim, vários fatores de risco podem estar envolvidos na gênese de uma mesma doença, constituindo-se de agentes causais múltiplos (Mendonça *et al*, 1992). A multicasualidade é a ocorrência que prepondera na carcinogênese e pode ser exemplificada pela associação verificada entre o câncer de esôfago e o álcool, tabaco e residência rural (Victora, 1987) e entre o câncer da cavidade bucal e o álcool, tabaco, chimarrão, churrasco e o cozimento de alimentos em fogão à lenha (Franco, 1989).

Os fatores de risco envolvidos na carcinogênese podem ser de origem exógena ou endógena e muitas vezes ocorre a interação entre eles. As evidências epidemiológicas indicam que cerca de 80% a 90% dos casos de cânceres humanos são direta ou indiretamente dependentes de fatores exógenos (Mendonça *et al*, 1992).

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP IPEN

1.1. Fatores ambientais e sócio-culturais relacionados com a indução de câncer

Há muito tempo é reconhecido que as dietas alimentares influenciam na incidência de câncer. Certos alimentos possuem carcinógenos como as micotoxinas, os alcalóides de plantas, os nitritos e nitrosaminas. Fumo, hormônios, viroses, drogas, exposições aos raios X, (aplicações médicas ou odontológicas) e aos raios ultravioleta ou traumatismo são alguns dos agentes que podem contribuir para o surgimento do câncer, uns em proporção maior que outros.

Existem certos fatores que estão intimamente relacionados à cultura e estilo de vida; sendo assim, a incidência de cânceres causados por esses fatores é mais alta em certas populações, por exemplo a mudança no estilo de vida pode previnir certos cânceres (Sugimura, 1992). Portanto, os aspectos concernentes ao estilo de vida das populações devem receber atenção quanto a gênese dos tumores, pois a persistência, a acentuação ou a adição de novos hábitos podem induzir ou propiciar o desenvolvimento de neoplasias malígnas (Henderson *et al*, 1991; Mendonça *et al*, 1992).

1.1.1. Tabaco

O hábito de fumar cigarros, charutos, cachimbos e cigarros de palha apresenta relação causal com cânceres de pulmão (Baskaran *et al*, 1994), laringe (Zhang *et al*, 1994), cavidade bucal, lábio, faringe, esôfago, pâncreas e bexiga. O tabaco é considerado pela Organizaçao Mundial da Saúde, a maior causa isolada e evitável de doenças e mortes no mundo. No Brasil, os cânceres de trato respiratório, de esôfago e de pâncreas que mais matam a população brasileira, são indubitavelmente relacionadas com o tabagismo. O câncer de pulmão é relatado em mais de 90% dos casos em tabagistas crônicos (Gadelha, 1990).

1.1.2. Álcool

A relação entre álcool e câncer tem sido avaliada, no Brasil, por meio de estudos caso-controle, que estabeleceram a associação epidemiológica entre o consumo de álcool e cânceres da cavidade bucal e de esôfago (Victora, 1987). O uso combinado de álcool e tabaco aumenta ainda mais o risco de incidência desses tipos de cânceres, assim como em outras localizações anatômicas, faringe e laringe supraglótica. Além de ser agente causal da cirrose hepática, o álcool pode estar relacionado com o câncer do fígado, em interação com outros fatores de risco, como por exemplo, o vírus da hepatite B (Natarajan, 1984; Victora, 1987).

1.1.3. Medicamentos

Apesar da contribuição no controle de muitas doenças, a incorporação das drogas à prática clínica produz, também, efeitos indesejáveis, entre os quais, a carcinogênese. Há evidências de que medicamentos como o clorambucil e a ciclofosfamida são indutores de leucemia e câncer de bexiga. Agentes imunossupressores como a azatioprina e prednizona já foram relacionados à linfomas malignos e ao câncer de pele. A fenacetina tem sido responsabilizada por causar tumores de pelve renal. É discutível a relação epidemiológica entre o uso de pílulas anticoncepcionais e de estrogênios na menopausa, e o desenvolvimento de tumores malignos de mama e do endométrio (Henderson *et al*, 1991).

1.1.4. Agentes Infecciosos e Parasitários

Alguns agentes biológicos tem sido apontados na etiologia de certos cânceres (do Valle, 1986) como o vírus Epstein-Barr na indução de linfoma maligno e carcinoma nasofaríngeo; e a infecção por *Schistosoma*

hematobium que induz uma inflamação crônica na bexiga urinária que está associada a um aumento do carcinoma na bexiga (Rosin *et al*, 1994). As propriedades oncogênicas de vários vírus tem sido estudadas e relacionadas aos cofatores (de Vita, 1989) que potencializam a formação do câncer. É o caso do tabagismo e do vírus da herpes simples que são cofatores do papiloma vírus relacionados ao câncer do colo uterino; as anomalias genéticas e a luz solar que são cofatores do papiloma vírus relacionados ao câncer de pele (Safai & Koziner, 1985; Hausen, 1991).

1.1.5. Dieta

Muitos componentes da dieta têm sido relacionados com o processo de desenvolvimento do câncer (Winn, 1995). Evidências epidemiológicas mostram que existe uma relação inversa entre o consumo de frutas frescas e vegetais e a incidência de câncer no estômago. Foi evidenciado, também, que a vitamina A tem ação protetora que minimiza o desenvolvimento de cânceres da cavidade bucal, da faringe, da laringe e do pulmão (Rosin, 1993). Dietas ricas em fibras estão associadas à menor incidência do câncer do cólon. Por outro lado, os nitritos foram identificados como agentes carcinogênicos (Sugimura, 1992) e seu uso, no Japão, foi interrompido. Porém, as nitrosaminas podem ser formadas de óxidos nítricos endógenos e, portanto, torna-se difícil eliminar a exposição a estes compostos (Mendonça *et al*, 1992).

1.1.6. Fatores Ocupacionais

Algumas substâncias como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, o níquel, o asbesto e o ácido vinil-clorídrico estão relacionadas aos diversos cânceres ocupacionais. A industrialização tem acarretado a

produção de substâncias altamente tóxicas ao homem (Krischnan & Brodeur, 1994). Até o ano de 1975, cerca de 3000 substâncias novas foram introduzidas nas indústrias, sem que os trabalhadores a elas expostos tivessem consciência dos seus efeitos tóxicos (Stellman & Daumn, 1975). Rumell (1988) demonstrou que o tipo de atividade exercida tem influência no risco de óbito por câncer. Na Europa, a relação entre a exposição a agentes ocupacionais e as neoplasias de origem hematopoiética tem sido estabelecida e relacionada com as profissões que se ocupam da agricultura, do processamento de alimentos e da indústria química. Uma outra evidência é o fato de que os trabalhadores que destilam benzidina e que são expostos de forma intensa e contínua a este composto, desenvolvem câncer de bexiga em 100% dos casos (Mendonça *et al*, 1992). As normas que controlam a exposição dos trabalhadores a produtos tóxicos são severas e estabelecem limites de tolerância para uma jornada de oito horas de trabalho. Este limite, conhecido como valor limite de tolerancia, até 1981, no Brasil, só estava determinado para 200 substâncias tóxicas.

1.1.7. Pesticidas

A ação carcinogênica dos pesticidas deve ser salientada, visto ser sua disseminação e utilização bastante amplas. Há várias formas de exposição aos pesticidas. Uma delas dá-se através da persistência de resíduos nos alimentos pelo uso contínuo ou constante na agricultura e na pecuária. A produção industrial desses compostos também contribui para a contaminação do ambiente, na medida em que polui as águas, o ar e o solo. Finalmente, o homem se expõe aos pesticidas, também no ambiente familiar. O uso indiscriminado de inseticidas domésticos representa a maior

fonte de contaminação com ação direta para indução de tumores do fígado e de pele (Mendonça *et al*, 1992).

1.1.8. Radiações ionizantes

O potencial carcinogênico da radiação ionizante é conhecido desde o início do século, embora, o mecanismo de ação no desenvolvimento da neoplasia não está bem elucidado.

A radiação à qual a população humana está exposta é proveniente de diversas fontes. Algumas delas são naturais do ambiente; outras são resultantes da atividade humana. Como fontes de radiação natural figuram a radiação cósmica, a radiação externa de radionuclídeos na crosta terrestre e a radiação interna de radionuclídeo inalado ou ingerido e retido no corpo. A magnitude destas exposições depende da localização geográfica e de algumas atividades humanas.

Em relação a fontes artificiais de radiação, estão incluidos, os equipamentos de raios X, fonte de ^{60}Co, aceleradores de partículas e reatores nucleares utilizados na medicina, pesquisa, operações industriais e na geração de energia elétrica, entre outras.

Informações sobre a indução de câncer por radiação vêm de estudos epidemiológicos de populações expostas como sobreviventes da bomba atômica (Hakoda *et al*, 1988), de populações que vivem em locais onde existe radiação natural mais elevada ou nas próximidades das instalações nucleares (Pietrzak-Flis *et al*, 1988) e de pessoas acidentadas com fontes artificiais (Ramalho *et al*, 1991) ou com materiais radioativos (Hendee, 1986). Estes estudos permitiram relacionar as leucemias e os tumores de tireóide, de mama e de ossos como sendo cânceres causados pelas radiações ionizantes.

A radiação ionizante é considerada um agente carcinogênico completo por ser tanto um iniciador como um promotor da carcinogênese (Coggle, 1985; Kondo, 1988). É possível, então, que a radiação atue em vários dos múltiplos estádios da carcinogênese. A ação da radiação é somente um dos muitos processos que influenciam o desenvolvimento do câncer: o tipo e o período de latência de um câncer induzido pela radiação são semelhantes aos de um câncer espontâneo.

As mutações causadas pela radiação ionizante circundam uma completa variedade de mudanças extendendo-se desde alterações bem sutis na base do DNA (mutação gênica), quebras das fitas simples ou duplas do DNA permitindo perda ou troca de segmentos cromossômicos (aberração cromossômica estrutural); mudanças refletidas no ganho ou na perda de cromossomos inteiros do genoma (aberração numérica).

A radiação ionizante pode danificar biomoléculas importantes como o DNA, por dois mecanismos básicos: a) por ação direta, quando ocorre a interação da energia da radiação com o DNA ou b) por ação indireta, quando a transferência de energia da radiação à molécula-alvo é feita através de moléculas intermediárias que circundam a célula, como os produtos da radiólise da água (radical $^{\bullet}OH$, $e^{-}aq$, H_2O_2, radical $^{\bullet}O_2^{-}$ etc). Esses mecanismos são de natureza probabilística, relacionando diretamente o aumento da ocorrência em função da dose de radiação e o volume do alvo. Há, entretanto, outras causas de dano ao DNA pela radiação, como o erro na replicação quando as células se dividem.

A influência de algumas características físicas da radiação são conhecidas. De modo geral, à medida que aumenta a dose de radiação, aumenta também o dano biológico. Um outro fator é a taxa de dose, que é definida como a quantidade de radiação liberada ao sistema por unidade de

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP IPEN

tempo. Uma mesma dose pode causar mais dano se for aplicada em um menor tempo, ou seja, com uma taxa de dose alta. Isto ocorre porque, sendo o tempo curto, o sistema de reparo não pode impedir o acúmulo de danos subletais. Assim sendo, com taxa de dose baixa, quanto maior o tempo de exposição, menor será o dano biológico. O fracionamento de dose também leva em consideração o tempo e o sistema de reparo: ele provoca menos danos biológicos do que com a exposição única de radiação, pois o intervalo entre as doses permite que as células reparem um certo número de danos produzidos pela primeira dose antes da segunda ser dada, levando, portanto, mais tempo para atingir a quantidade letal de danos.

Todos os tipos de radiação ionizante interagem com a matéria viva de modo similar, mas diferentes tipos de radiação diferem na eficácia em produzir danos ao sistema biológico.

A "eficácia biológica relativa" (RBE) dos diferentes tipos de radiação é sempre expressa em relação a dose de um tipo padrão de radiação (raios X de 250 kVp).O fator mais importante que influencia a RBE de um tipo de radiação é a quantidade de ionizações e a distribuição destas ionizações na matéria por unidade de comprimento do trajeto (transferência linear de energia-LET) e é expressa em keV/μm, ou seja, a energia média liberada em keV por μm de tecido atravessado. É afetada pela velocidade e carga da radiação ionizante. A eficácia biológica relativa (RBE) de uma radiação aumenta quando aumenta a transferência linear de energia (LET). De modo geral, as radiações de alta transferência linear de energia (LET), como as partículadas alfa, beta e neutrons são mais eficazes na produção de danos biológicos que as radiações de baixa LET, como raios X e gama de natureza eletromagnética.

Dados obtidos de ensaios experimentais com animais mostram que a radiação ionizante liberada com alta taxa de dose é, geralmente, mais eficaz na indução de tumor que a liberada com baixa taxa de dose. O mesmo equivale também para a radiação de alta LET em relação a de baixa LET (Coggle, 1985).

Outra característica da radiação ionizante é o fato de que ela pode causar o dano em células proliferativas independente da fase do ciclo celular (S-independente), em contraste com a ação de agentes químicos que necessitam que a célula passe por uma fase de síntese de DNA para que os danos sejam expressos (S-dependentes) (Natarajan, 1984).

1.2. Fatores hereditários, familiares e étnicos relacionados com indução de câncer

Além dos fatores de risco ambiental e os sócio-culturais, existem os de natureza constitucional que podem propiciar o aparecimento de tumor. São raros os casos de cânceres que se devem exclusivamente a fatores constitucionais. Como exemplos tem-se os casos de indivíduos portadores de retinoblastoma (Sasaki, 1989), os de indivíduos com as síndromes de Li-Fraumeni (Srivastava *et al*, 1990) e os de "fragilidade cromossômica" (Taylor, 1983) que são disfunções genéticas transmitidas por herança autossômica recessiva. Outros tipos de cânceres mais comuns, como o de mama, colorretal (Peltomaki *et al*, 1993) entre outros, parecem ter um forte componente familiar, embora não se possa afastar a hipótese de exposição dos membros da família a uma causa comum.

Determinados grupos étnicos parecem estar "protegidos" de certos tipos de câncer: a leucemia linfocítica é rara em indivíduos orientais, assim como o

sarcoma de Ewing é muito raro em indivíduos negros. Por outro lado, o melanoma maligno é mais frequente em indivíduos caucasianos.

1.3. Considerações Gerais sobre Câncer de Pele

A luz ultravioleta (UV) da radiação solar é considerada como o principal carcinógeno para o desenvolvimento de câncer de pele (Kamb, 1994), embora o mecanismo biológico não esteja totalmente elucidado (Lopes *et al*, 1992).

Recentemente, Ziegler *et al* (1994) relataram possíveis eventos genéticos, celulares e teciduais envolvidos no desenvolvimento de câncer de pele. A luz UV induz dímeros de pirimidina e fotoprodutos no DNA de células epidérmicas expostas que são reparados normalmente em indivíduos sadios.

O principal alvo molecular da radiação UV é o gene supressor tumoral p53 localizado na região cromossômica 17 p 13,1 que, além de estar intimamente associado com cânceres de pele, está também, envolvido com outros tipos de cânceres humanos como os de pulmão, mama, cólon, esôfago, fígado, rim, ovário, cérebro, linfomas e leucemias (Hollstein *et al*, 1991).

A radiação UV causa mutações no gene p53, particularmente do tipo substituição de base simples ou dupla, predominantemente as de citosina para timina (C→T) que altera a identidade de um aminoácido. Estudos moleculares mostram que estas são específicas da luz UV (Dumaz *et al*, 1993; Ziegler *et al*, 1994).

As mutações causadas pela luz UV parecem não depender da carga genética do indivíduo já que os pacientes com xeroderma pigmentosum, uma doença genética transmitida por genes recessivos autossômicos, que são deficientes no reparo por excisão, apresentam a mesma incidência predominante de troca da base C pela T (Brash *et al*, 1991).

Uma das funções do p53 é a de manter o controle do ciclo celular na preservação da integridade do material genético ("guardião do genoma"). Outra atribuição igualmente importante do p53 é o seu envolvimento no processo denominado de apoptose, que consiste na auto destruição ou na morte programada de células danificadas, para impedir a propagação de células mutadas e a subseqüente instalação de um processo maligno ("guardião de tecido") (Kamb, 1994). A apoptose, portanto, faz parte dos mecanismos de proteção do organismo contra os efeitos nocivos do insulto genotóxico (Lane, 1993).

Uma das conseqüências da apoptose é o descamamento da pele, composta de células epidérmicas afetadas e mortas e, dessa maneira, o risco do câncer de pele é minimizado. O bronzeamento da pele também está envolvido no processo de proteção contra o risco carcinogênico. Neste caso, uma enzima de reparo do DNA parece estar envolvida. Aventa-se a hipótese de que após a exposição a luz solar, o acúmulo de danos nas células da pele pode propiciar a ativação dessa enzima para o reparo do DNA juntamente com o aumento de melanina na célula (Eller *et al*, 1994). À medida que aumenta a lesão no DNA, ocorreria um aumento na produção enzimática e, portanto, um aumento na produção de melanina. O bronzeamento, seria assim, um indicador do grau de eficiência do mecanismo anti-câncer da célula do indivíduo.

As mutações no gene p53 podem resultar, portanto, em conseqüências biológicas de grande significado, como a desregulação da proliferação celular e a apoptose comprometida. As células com a capacidade apoptótica reduzida apresentam uma vantagem competitiva na expansão clonal em relação às células não mutadas circunvizinhas. Uma nova exposição ao sol , pode causar a eliminação gradativa de células apoptóticas, favorecendo as células que contêm a mutação no p53, as quais podem escapar da apoptose e sobreviver, passando a acumular e a invadir o tecido sadio.

Nesse sentido, a radiação UV pode agir como uma pressão seletiva para as células mutadas mais resistentes, promovendo a sobrevivência dessas sobre as células normais. Assim sendo, a radiação UV pode funcionar também como promotor tumoral da carcinogênese (Ziegler *et al*, 1994).

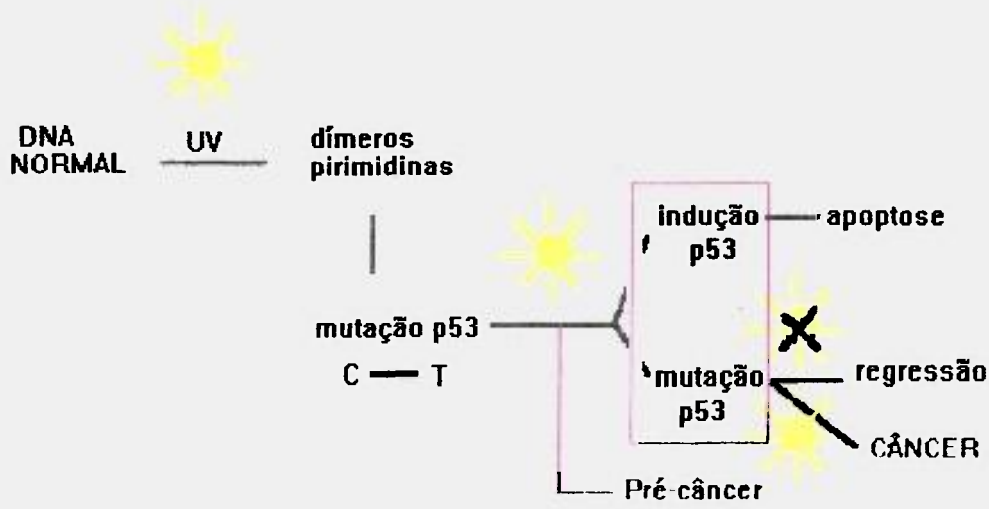


Figura 1: Esquema mostrando as várias etapas onde a radiação UV do sol pode agir e causar o câncer pelos seus efeitos,tais como formação de dímeros e mutação no gene oncossupressor p53, que em condições normais causa a apoptose, mecanismo de proteção do tecido.

O câncer mais comumente produzido pela radiação solar é o carcinoma basocelular, seguido pelo espinocelular. A freqüência relativa de câncer de pele não melanocítico comparada a todos os demais cânceres varia de 0,8% no Japão a 50% nos Estados Unidos e Austrália. No Brasil, as taxas de incidência de tumores de pele não melanocíticos revelam-se expressivas em Recife, São Paulo, Fortaleza e Porto Alegre, situando-se em um padrão inferior ao observado nos países de mais alta incidência, mas muito maior que o observado em países de população de raça amarela (Tabela 1). Os últimos dados publicados pelo Registro de Câncer de Base Populacional em Belém, Fortaleza, Porto Alegre e Goiânia fornecem uma idéia de que o câncer de pele não melanocítico foi a neoplasia maligna mais freqüente no sexo masculino em Belém e Goiânia, em Fortaleza ela foi a segunda, e em Porto Alegre, a terceira. No sexo feminino, ela

foi a terceira, precedida pelo câncer do colo do útero e de mama (Tabelas 2 e 3) (Lopes *et al*, 1992).

Tabela 1: Taxas de incidência de tumores de pele não melanocíticos em quatro capitais brasileiras e em outras regiões do mundo.

REGIÕES	Taxa de Incidência por 100.000 habitantes*	
	HOMENS	MULHERES
Tansmânia, Austrália**	167,2	89,3
Colônia Britânica, Canadá**	109,1	75,5
Prince Eduard Island, Canadá**	99,3	65,8
Alberta, Canadá**	80,1	58,7
Vaud, Suiça: população urbana	79,8	49,5
Recife (1980)	66,8	46,8
São Paulo (1978)	62,4	55,9
Fortaleza (1978-82)	50,23	34,5
Porto Alegre (1979-82)	42,1	26,6
Poona, India***	1,8	1,3
Miyagi, Japão***	1,6	1,3
Osaka, Japão***	1,6	1,0
Nagpur, India***	1,3	1,6
Madras, India***	0,9	0,9

* Taxas padronizadas segundo a população mundial
**Regiões de mais altas taxas
***Regiões de taxas mais baixas.
Fonte: Lopes *et al* (1992).

Tabela 2: Taxas de incidência das neoplasias malignas mais freqüentes, em homens, em quatro capitais brasileiras, por localização anatômica.

Localização anatômica	Belém 1987	Fortaleza 1983	Porto Alegre 1987	Goiânia 1988
Pele	53,5	48,4	33,4	82,5
Estômago	42,5	50,6	29,0	25,3
Pulmão	27,7	23,8	75,9	25,0
Próstata	21,3	32,5	35,4	23,1
Todas	245,3	309,0	386,7	250,8

Fonte: Ministério da Saúde/INCa, 1991.

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP IPEN

Tabela 3: Taxas de incidência das neoplasias malignas mais freqüentes, em mulheres, em quatro capitais brasileiras, por localização anatômica.

Localização anatômica	Belém 1987	Fortaleza 1983	Porto Alegre 1987	Goiânia 1988
Colo do Útero	86,2	66,6	34,6	62,3
Mama	40,5	61,6	76,2	38,8
Pele	26,4	29,3	18,2	111,4
Todas	247,0	301,5	259,7	325,0

Fonte: Ministério da Saúde/INCa, 1991.

O câncer de pele é mais comum em indivíduos de pele clara que se expõem ao sol em decorrência de atividades profissionais ou de lazer em regiões tropicais e temperadas, haja vista que as taxas de incidência desses tipos de cânceres detectadas nas populações de raças negra e amarela são menores.

Além dos cânceres de pele não melanocíticos, existe o melanoma, que é um tumor de pele da mais alta malignidade. É o mais raro, porém, é o responsável por 75% das mortes causadas por câncer de pele. A relação entre radiação solar e o melanoma não é clara (Lopes *et al*, 1992).

Carcinomas basocelular e espinocelular têm origem epitelial. O basocelular não chega a formar células espinhosas ou planas e apresentam-se constituídas só por elementos da camada basal do epitélio. Assim, o tecido epitelial que se forma nesse carcinoma é constituído exclusivamente por células do estrato basal ou germinativo do epitélio. Por isso são tidos como os mais indiferenciados de todos os tumores oriundos dos epitélios de revestimento do tipo malpighiano. Este câncer raramente metastatiza (Wagner *et al*, 1988). As células deste câncer podem se espalhar, mas é um evento raro, porém possuem tendência a destruir tecidos moles circunvizinhos. Raramente envolvem tecido ósseo, cartilaginoso e causam a morte. Ele pode ocorrer em qualquer parte do corpo, porém é mais comum em locais mais expostos ao sol, tais como o rosto,

mãos, pescoço e braços. Os tumores basocelulares evoluem lentamente e possuem um comportamento relativamente benigno, levando a um baixo índice de letalidade. Apresentam-se com várias formas, porém a mais freqüente é uma saliência lisa semelhante a uma pérola. O tratamento usado é, geralmente uma simples excisão cirurgica. Porém outros tipos de tratamentos podem ser utilizados, como a radioterapia ou a criocirurgia. Cada um destes métodos poderá ser útil em condições clínicas específicas (Preston & Stern, 1992).

Segundo Friedmann *et al* (1985), pessoas que possuem cânceres não melanocíticos apresentam uma maior probabilidade de desenvolver outro câncer de pele.

1.4. Técnicas Citogenéticas para Detecção de Danos no DNA

Uma vez que lesões não reparadas do DNA estão intimamente associadas com o risco carcinogênico, o desenvolvimento e o aperfeiçoamento de métodos que permitam uma detecção precoce de mutações são de grande valia.

Para tanto, vários métodos (químicos, bioquímicos, imunoquímicos) foram propostos (Lohman *et al*, 1984), mas somente um número limitado de métodos é utilizado e a maioria deles permanece em fase de aperfeiçoamento.

Dentre os vários métodos propostos, o método citogenético vem sendo amplamente utilizado com relativo sucesso em diversos sistemas biológicos, por exemplo, na detecção de diversos agentes genotóxicos como os compostos fenólicos (Stich, 1991), a N-nitrosamina (Ashby *et al*,1991), o sulfur-35 (Monakhov, 1991) e a ação da radiação ionizante (Shimid *et al*, 1980; Natarajan *et al*, 1986; de Jong *et al*, 1988; Littlefield *et al*, 1989; Eisele *et al*, 1991; Doloy *et al*, 1991).

Os testes citogenéticos utilizam células obtidas de animais ou de indivíduos expostos profissional, terapêutica ou acidentalmente aos agentes mutagênicos e carcinogênicos, aplicando o método de cultivo celular. Com esse método são detectados agentes clastogênicos que produzem quebras cromossômicas (métodos de aberração cromossômica- AC e micronúcleo-MN), agentes aneugênicos que interferem no fuso mitótico, provocando alterações na distribuição dos cromossomos durante a divisão celular e causando aberrações numéricas (método do micronúcleo-MN) e agentes alquilantes que interagem diretamente com o DNA formando adutos covalentes (método de troca entre cromátides-irmãs-TCI).

A análise de aberrações cromossômicas (AC) é, sem dúvida, o método mais desenvolvido para o biomonitoramento de indivíduos expostos à radiação ionizante. Esse desenvolvimento foi possível porque nenhum metabolismo está envolvido e os resultados de estudos *in vitro* podem ser diretamente comparados com os observados *in vivo*. A situação é diferente para os produtos químicos que, muitas vezes, sofrem uma conversão metabólica *in vivo*.

A análise da freqüência de aberrações cromossômicas em linfócitos do sangue periférico humano tem sido usada nestas últimas décadas como um indicador biológico sensível de dano genético induzido pela radiação ionizante (IAEA, 1986; Lloyd & Edwards, 1990; Sinuès *et al*, 1991; Sevan'kaev, 1991). Para este propósito, o método tem sido específico e sensível, capaz de ser usado como "dosímetro biológico", nos casos de exposição à radiação. Na biomonitoração de compostos químicos, as aberrações cromossômicas não são específicas para o agente e sim para o efeito clastogênico total de uma mistura de produtos químicos que, por sua vez, pode estar relacionado com o risco carcinogênico.

A principal desvantagem deste método, para fins de biomonitoramento, decorre do fato de ser laborioso e subjetivo, o que pode limitar a sua aplicação em pesquisa populacional em larga escala.

O método de trocas entre cromátides-irmãs (TCI) tem sido usado com relativo sucesso como indicador sensível de exposição à radiação ultravioleta e aos agentes alquilantes, mas não à radiação ionizante e às substâncias radiomiméticas (Wolff, 1991).

Outra desvantagem desta técnica reside no fato do mecanismo molecular responsável pela TCI ser pouco conhecido e a relação com a clastogenicidade ou a genotoxicidade não estar bem estabelecida (Carrano & Natarajan, 1988; Ikushima, 1989).

1.5. Considerações Gerais sobre Micronúcleo (MN)

O teste de MN foi utilizado pela primeira vez em células da ponta da raiz de *Vicia faba* por Evans *et al* (1959), em seu estudo com neutrons rápidos e raios gama de ^{60}Co. Fliedner *et al* (1964) chamaram de cariômeros os MN observados pela primeira vez em eritroblastos de ser humano exposto acidentalmente à mistura de neutrons e raios gama. Em 1965, Russell denominou os MN de subnúcleo, ao observá-los em preparações histológicas de embrião de camundongo irradiado no estadio de pré-implantação. Apesar de se ter sido observada uma correlação positiva entre dose e efeito, os primeiros resultados mostrando uma relação quantitativa entre a dose absorvida de radiação e a freqüência de MN foram relatados por Countryman e Heddle (1976) em linfócitos periféricos humanos.

1.5.1. Origem

Os MN originam-se principalmente de fragmentos cromossômicos acêntricos (Streffer, 1993) e de cromossomos inteiros que não foram incluídos nos núcleos-filhos durante a divisão celular (Kramer *et al*, 1990) (fig. 2). Podem também originarem-se de fragmentos cromossômicos e cromatídicos cêntricos ou de quebras de cromossomos multicêntricos durante a mitose. Foi demonstrado

demonstrado imunoquimicamente que alguns MN contém o anticorpo anticinetócoro reativo (CREST), o que indica a presença de centrômeros, e portanto, cromossomos inteiros ou fragmentos cêntricos. Sendo a presença do centrômero indispensável para o deslocamento regular dos cromossomos para os polos em células normais, lesões no centrômero podem também propiciar a formação de MN (Molls *et al*, 1986; Fuhrmann *et al*, 1992).

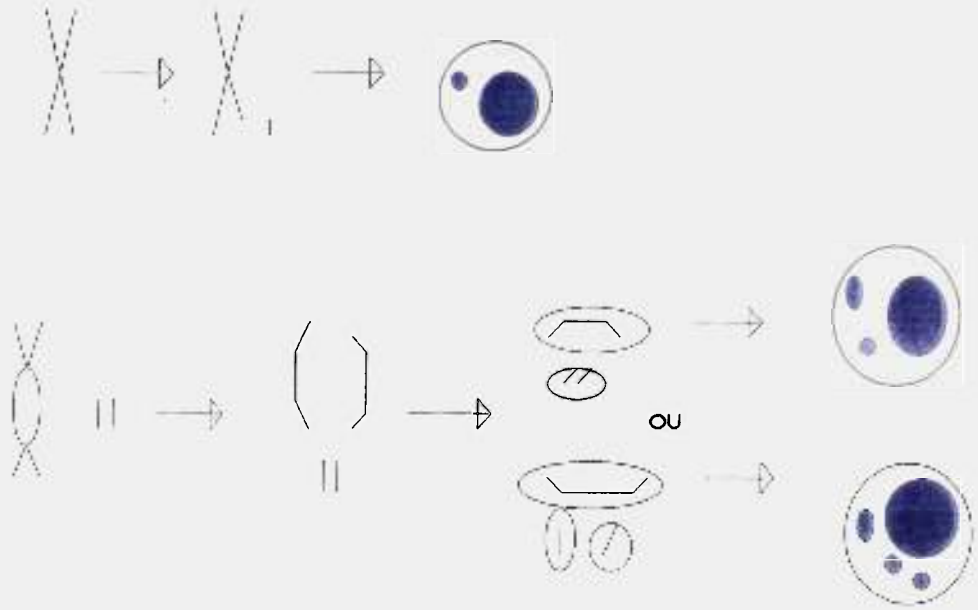


Figura 2: **Formação de MN a partir de fragmentos acêntricos provenientes de quebras e rearranjos cromossômicos.**

Em análise por meio da microscopia eletrônica foi observado que o MN possui duas unidades de membrana com poros nucleares e que pode sintetizar RNA se um fragmento cromossômico com região organizadora de nucléolo estiver incluída (Streffer, 1993). Também sintetiza DNA que pode ser medido por incorporação de timidina triciada (Nusse *et al*, 1992; Streffer, 1993).

1.5.2. Método do bloqueio citocinético pela citocalasina-B (Cito-B)

A precisão da técnica do MN está, em parte, relacionada com a possibilidade de atribuir o dano diretamente aos agentes clastogênicos e

aneugênicos. Assim, a identificação de dano causado pelo agente estudado deve ser restrito às células que sofreram somente uma divisão do núcleo após o insulto mutagênico. A análise de células binucleadas permite uma contagem correta e de maior precisão, já que elas representam células que sofreram uma única divisão celular após a exposição aos agente clastogênico ou aneugênico. A técnica de MN inicialmente proposta era pouco precisa,visto que havia dificuldade de se distinguir as células que não se dividiram daquelas que já se dividiram (Muller & Streffer, 1991).

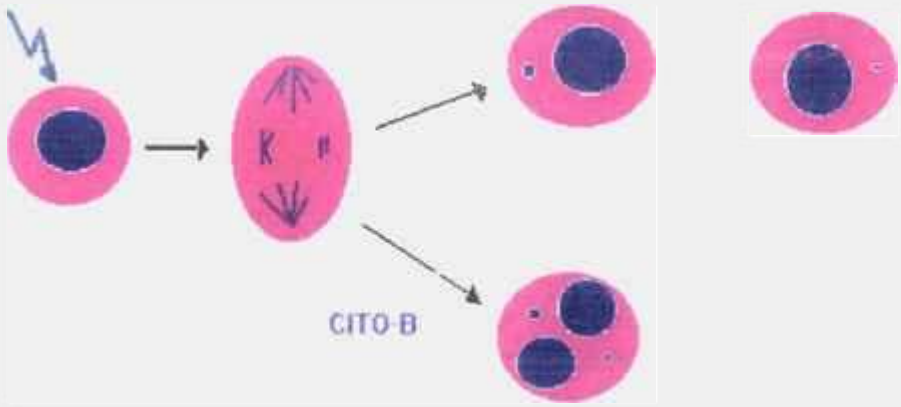


Figura 3: Expressão de MN em uma célula em divisão. Os danos cromossômicos, em células que não se dividem, não serão expressos em forma de MN.

Para que isso fosse possível, Fenech e Morley, em 1985(a), introduziram o método do "bloqueio citocinético" que utiliza uma substância denominada citocalasina-B (cito-B), um bloqueador da polimerização de actina que inibe a citocinese enquanto permite a cariocinese normal (fig. 3). Conseqüentemente, as células tratadas e bloqueadas pela droga apresentam um aspecto binucleado característico e, portanto, aumenta consideravelmente a sensibilidade e validade

deste método pela limitação da contagem de MN em apenas células binucleadas (Miller *et al*, 1993).

Dependendo do tempo de cultivo, as células submetidas à ação da cito-B, podem desenvolver mais do que uma divisão nuclear, dando origem a células multinucleadas com 3 ou 4 núcleos.

O fato da indução de MN ser uma conseqüência de dano não reparado no DNA, foi evidenciado por experimentos onde a inibição do processo de reparo era realizada após o dano ao DNA, resultando em um aumento na freqüêcia de MN em células binucleadas (Catena *et al*, 1992).

1.5.3. Vantagens da técnica

O método do MN foi proposto como uma alternativa ao método de Aberrações Cromossômicas (AC), por apresentar uma série de características vantajosas. Constitui um parâmetro convenientemente capaz de medir quantitativamente aberrações estruturais ou numéricas induzidas tanto pela radiação ionizante (Balasem & Ali, 1991; Miller *et al*, 1993) como pelos agentes químicos (Mavournin *et al*, 1990; Shelby *et al*, 1993). Apresenta uma alta sensibilidade; simplicidade, ao criar condições de rapidez de análise; baixo custo e possibilidade de automatização (Castelain *et al*, 1993), além de ser um bom indicador de risco genético induzido por agentes mutagênicos ambientais.

Pode ser utilizado em qualquer tipo de célula do organismo desde que ela desenvolva uma divisão mitótica, como por exemplo, as células esfoliadas da mucosa bucal, do ureter, da bexiga (Tolbert *et al*, 1991), da medula óssea (Goldberg *et al*, 1991; Tinwell, 1991; Wild, 1991; Fomenko, 1991), em hepatócitos (Casciano & Schop, 1991; Sakahara *et al*, 1992), em esplenócitos (Ren *et al*, 1991), em reticulócitos (Asita *et al*, 1992) e em linfócitos (Erexon *et al*, 1991; Garaj-Vhrovac *et al*, 1992; Fenech & Neville, 1992).

1.5.4. Curvas de dose-resposta

Um dos objetivos básicos dos ensaios de genotoxicidade é o de tornar possível extrapolar os efeitos obtidos *in vitro* para os *in vivo*, ocorridos em exposições ambientais e ocupacionais. Para tal, a forma da curva dose-resposta *in vitro* deve ser conhecida, sendo a ideal aquela que abrange todo o intervalo de dose necessário. Por razões práticas, isso não é possível. A avaliação do dano em doses baixas é dificultada principalmente pela necessidade de se analisar uma quantidade relativamente grande de material para se ter uma significância estatística (Zettemberg & Growe, 1993).

Dessa maneira, cada laboratório elabora sua própria curva dose-efeito utilizando as técnicas de AC e de MN, associadas ou não à técnica de hibridização IN SITU por fluorescência (FISH), na sua maioria envolvendo irradiações de linfócitos periféricos.

Com relação a curva dose-resposta para a indução de aberrações cromossômicas (AC), o modelo mais utilizado tem sido o linear-quadrático. Vários autores vem adotando, também, o modelo linear quadrático e a distribuição de Poisson, como aproximação da distribuição binumial para a indução de MN, baseados na consistência da relação entre AC e MN, já que as AC podem ser uma das causas da formação de MN (Xue *et al*, 1991): as deleções e os rearranjos cromossômicos produzem fragmentos acêntricos. Além disso, os resultados obtidos por Garaj-Vhrovak et al (1992) mostraram uma correlação positiva entre MN e AC (fragmentos acêntricos e dicêntricos) em experimentos utilizando radiação na faixa de micro-ondas. Embora exista uma associação entre MN e AC, a relação quantitativa de dose-resposta não está muito elucidada (Wolff, 1991; Heddle *et al*, 1991; Lopez *et al*, 1993), tanto para o caso de agentes químicos como para os agentes físicos.

Madruga *et al* (1994) apontaram o modelo linear quadrático como não sendo o mais adequado, pois ocorre a superdispersão dos MN em doses mais elevadas (Prosser *et al*, 1988; Wolff, 1991; Fuhrmann *et al*, 1992; Thierens et al, 1991). Outro fator que sugere a inadequação do modelo linear quadrático é a formação de MN radioinduzidos. Os MN podem se originar de um único fragmento acêntrico nas doses baixas, enquanto que para doses suficientemente mais elevadas, dois ou mais fragmentos acêntricos podem se fundir e serem expressos como um único MN (Savage, 1988), não existindo uma correlação direta entre MN e AC. Além disso, nas doses suficientemente altas não é mais possível visualizar a formação de MN, pois estas doses podem acarretar a morte celular. Sendo assim, é difícil explicar a existência de uma relação entre a freqüência de células com MN e as doses de radiação por um modelo cujos valores não respeitem os limites biológicamente estabelecidos.

Nesse sentido, Madruga *et al* (1994) propuseram a análise Bayesiana com transformação logística dos dados. Essa análise estatística se baseia na probabilidade da distribuição de danos ocorridos em cada célula para cada dose de radiação, permitindo obter um modelo de calibração para o estabelecimento de intervalos de doses desconhecidas de exposição aos agentes, uma vez observada a resposta biológica.

A relação dose-efeito para agentes químicos é menos definida que para radiação ionizante, em parte por envolver processos complexos, incluindo por exemplo, variáveis da farmacocinética como o transporte, a distribuição e a excreção da droga; a ativação metabólica e a detoxicação e as várias reações que levam à produção de lesões ao DNA e seu subseqüênte reparo, seja esse efetuado corretamente ou não.

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP IPEN

1.5.5. Aplicações

O método do micronúcleo se apresenta como um dos ensaios de curta duração mais utilizado nos últimos anos e vem sendo aplicado em diferentes tipos celulares, sadios ou malignos, *in vitro* ou *in vivo*, para diferentes finalidades.

1.5.5.1. Avaliação de mutagenicidade e de carcinogenicidade

O método do MN é amplamente utilizado para detecção de agentes físicos ou químicos com potenciais carcinogênico, mutagênico e clastogênico utilizados pelo homem. O uso destes agentes, muitas vezes deve ser controlado ou interrompido.

O composto 2-(2-furil)-3-(5-nitro-2-furil)acrilamida) (AF-2), usado no Japão como preservante, foi demonstrado ser carcinogênico quando testado em fibroblasto de camundongo, e mutagênico em *Escherichia coli*. (Sugimura, 1992). O potencial clastogênico de compostos de piridina (2-cloro-5-fluorometil) foi detectado em linfoma de camundongo (Dearfield *et al*, 1993) e de dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA) e forbol-12-miristrato-13-acetato (TPA) em queratinócitos de camundongo (Haensen *et al*, 1993). Em relação ao potencial aneugênico do inseticída buprofezin foi observado que ele causa transformações morfológicas pela associação do composto ou do metabólito com o aparelho mitótico (Herrera *et al*, 1993).

A técnica de MN vem sendo utilizada também para detectar a ação anti-mutagênica de certos compostos como o bioginsem, um produto obtido da raiz do ginseng (Salikhova *et al*, 1994), a ação anti-carcinogênica do α-tocoferol (Winn e Hong 1994), dos carotenóides (Rosin & Gilbert, 1990), dos nutrientes antioxidantes (Garewal *et al*, 1993), do retinol e do ácido retinóico (Benner *et al*, 1993) e a ação radioprotetora dos carotenóides como o β-caroteno (Oldini *et al*, 1992).

1.5.5.2. Dosimetria biológica

Assim como as aberrações cromossômicas, os MN têm sido utilizados na estimativa quantitativa de dose absorvida de radiação (alta ou baixa LET) em casos de pessoas com suspeita de exposição à radiação ou em indivíduos irradiados acidental ou ocupacionalmente (Coutryman e Heddle, 1976; Huber *et al*, 1983, Almassy *et al*, 1986; Ramalho *et al*, 1988; Prosser *et al*, 1988; Littllefield *et al*, 1989; Thierens *et al*, 1991). Este método permite fazer uma estimativa quantitativa de dose absorvida com limite mínimo de detecção de 2 a 3 cGy de radiação de baixa LET (Zettemberg *et al*, 1993; Jagetia & Ganopathi, 1994).

A dosimetria biológica consiste basicamente na comparação das freqüências de AC ou de MN observadas em células de indivíduos expostos acidental ou ocupacionalmente à radiação ionizante com a freqüência observada em células irradiadas *in vitro* com doses conhecidas. Para tanto, curvas padrão de dose-resposta são elaboradas para cada tipo de radiação.

As células utilizadas na dosimetria biológica são os linfócitos do sangue periférico, por apresentarem certas vantagens sobre os outros tipos celulares: facilidade de obtenção, população naturalmente sincrônica de células, ampla distribuição corpórea, cultivo relativamente simples (Coutryman & Heddle, 1976) e principalmente, alta radiossensibilidade.

1.5.5.3. Monitoramento de populações

O teste do MN tem sido aplicado no biomonitoramento de populações com o objetivo de averiguar e prevenir riscos de exposição excessiva ou desnecessária a um determinado agente.

É o caso de populações que vivem em áreas geográficas que possuem níveis acima do normal para certas substâncias, como no nordeste da

COMISSAO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP IPEN

Grécia onde ocorre uma incidência elevada de mesotelioma pleural maligno por asbestos (Athanasiou *et al*, 1992), em Taiwan, onde a incidência elevada de câncer da bexiga, entre outros, é causada pela ingestão de água da região e pelo mesmo motivo, na China, onde a incidência de câncer de estômago é maior em determinadas regiões (Gao, 1989).

O método do MN tem auxiliado, também, nos estudos epidemiológicos de populações expostas ocupacionalmente aos agentes físicos ou químicos. São os casos de trabalhadores em minas de urânio (Loomis *et al*, 1990), de fabricações de benzidinas (Mirkova & Lalchev, 1990), de aminas aromáticas (Ribeiro *et al*, 1990), de solventes, de sais de cromo, de tanino, de tintas (Migliore *et al*, 1991), de metanol, de mercúrio, de raios X, de pesticidas (San *et al*, 1989) e de óxido de etileno (Sarto *et al*, 1990) que podem apresentar uma maior probabilidade para o desenvolvimento de neoplasias.

1.5.5.4. Avaliação de grupos de risco

Um quarto uso potencial da técnica do MN tem sido aplicado na detecção precoce de lesões do DNA em indivíduos que apresentam uma maior probabilidade de desenvolver câncer (Brogger *et al*, 1990). Desde que as alterações genéticas estão intrinsicamente relacionadas com o desenvolvimento de câncer, a quantificação destas lesões em tecidos pode servir como marcador para o risco carcinogênico. Estes estudos incluem indivíduos expostos aos carcinógenos físicos (da Cruz *et al*, 1994) ou químicos (Hogstedt *et al*, 1984; Barregard *et al*, 1991; Fucic *et al*, 1990); indivíduos com lesões pré-malígnas (Rosin, 1994a) ou com história de incidência aumentada de câncer e pessoas com hábitos não salutares, como nos casos de consumo de tabaco (Sarto *et al*, 1987; Reali *et al*, 1987; Tomanin *et al*, 1991) e de álcool (Stick *et al*, 1982; Stick & Rosin, 1983). Em todos esses casos, foi observada uma taxa significativamente mais alta de MN em relação aos indivíduos controle.

Os portadores de síndrome da "fragilidade ou quebra cromossômica" apresentam uma predisposição genética ao câncer (Taylor, 1983; Sasaki, 1989) por apresentarem deficiência ou defeito no sistema de reparo do DNA. As doenças pertencentes a esta síndrome são o xeroderma pigmentosum (XP), ataxia telangiectasia (AT), síndrome de Bloom (SB) e anemia de Fanconi (AF). Pacientes portadores de XP podem desenvolver tumor de pele nas áreas que estão expostas ao sol, pois, entre outras anomalias, são deficientes no reparo por excisão em DNA danificado pela luz UV (Dumaz *et al*, 1993). Em relação aos pacientes com AT, o defeito parece estar relacionado ao reparo de quebras na fita do DNA, são sensíveis à ação da radiação ionizante e a bleomicina, e apresentam um número elevado de quebras cromossômicas tanto induzidas como espontâneas (Taylor, 1983). Os pacientes com SB apresentam o mesmo problema de instabilidade genética, porém o defeito parece estar na ligase 1 do DNA e pode ser identificado pela alta freqüência de trocas entre cromátides-irmãs (Willis *et al*, 1987). Os pacientes portadores de AF apresentam células que possivelmente façam reparo defeituoso de ligações cruzadas do DNA (Chaganti e Houldsworth, 1991).

Nesse contexto, é importante verificar a susceptibilidade cromossômica de indivíduos que desenvolveram câncer quanto a ocorrência de danos espontâneos ou induzidos por vários agentes. Roser *et al* (1989a) mostraram que a taxa de MN espontâneos em fibroblastos de pacientes com melanoma foi maior que a de indivíduos sadios. Roser *et al* (1989b), utilizando a radiação ultravioleta como agente carcinógeno em pacientes portadores da mesma doença, verificaram também uma incidência maior de MN em fibroblastos destes pacientes.

A bleomicina como um agente mutagênico radiomimético foi utilizada por vários autores na verificação da suscetibilidade cromossômica de pacientes portadores de diferentes tipos de câncer : de tireóide (Cherry e Hsu,

1983), carcinomas medulares de tireóide, adenocarcinomas de cólon, retinoblastoma, carcinoma de pulmão e de células renais (Hsu *et al*, 1985), de mama, de cólon, de pulmão (Hsu *et al*, 1989), de trato digestivo superior (Spitz *et al*, 1989) e de cabeça e pescoço (Hsu *et al*, 1989; Schantz & Hsu, 1989; Schantz *et al*, 1989, 1990). Os autores verificaram que os pacientes com câncer mostram valores de quebras cromatídicas induzidas pela bleomicina significativamente mais altas que os indivíduos sadios, sugerindo que esses pacientes apresentam alguma deficiência nos mecanismos de reparo do DNA.

Com relação a radiação ionizante, foi encontrado na literatura apenas o trabalho de Gantemberg *et al* (1991) que analisaram a fragilidade cromossômica de linfócitos de pacientes com leucemia, irradiando *in vitro* com doses de 0 a 5 Gy de raios X (1 Gy/min) e irradiando *in vivo* com duas frações de 1,25 Gy de ^{60}Co (33 mGy/min). Os autores observaram que as freqüências de células binucleadas com MN dos pacientes com leucemia não variaram significativamente com relação ao controle.

Em geral, os estudos citogenéticos de pacientes portadores de câncer tem por finalidade a avaliação da eficácia do tratamento radioterápico (Milanache *et al*, 1989) e o acompanhamento de pacientes submetidos a sessões de radioterapia (Fenech, 1991; Fenech *et al*, 1990; Migliore *et al*, 1991).

2. OBJETIVOS

O presente trabalho foi realizado com o intuito de avaliar a suscetibilidade de indivíduos portadores de carcinoma basocelular e de indivíduos sadios à ação da radiação ionizante, utilizando a técnica de MN em linfócitos periféricos irradiados *in vitro* com ^{60}Co.

A radiação ionizante foi escolhida como indutor de mutações por produzir danos aos cromossomos em qualquer fase do ciclo celular e por induzir uma taxa considerável de quebras cromossômicas.

Para a análise da radiossensibilidade dos indivíduos foram levados em consideração os seguintes parâmetros:

- incidência e distribuição de MN espontâneos e induzidos por radiação gama de ^{60}Co nos diferentes estadios de nucleação de linfócitos;

- relação dose-resposta para a indução de MN radioinduzidos nos três estadios de nucleação de linfócitos;

- análise da cinética de ciclo celular.

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP IPEN

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Foram utilizadas amostras sangüíneas de três doadores portadores de carcinoma basocelular na face, diagnosticados pelo Serviço de Dermatologia da Santa Casa de São Paulo, e de seis indivíduos sadios.

3.1.1. Pacientes portadores de carcinoma basocelular (C):

O grupo com carcinoma basocelular foi constituído por um indivíduo do sexo masculino (68 anos) e por dois indivíduos do sexo feminino (47 e 67 anos); cor branca e que não haviam recebido quaisquer tratamentos quimio ou radioterápico, antes da coleta do sangue.

As amostras sangüíneas foram gentilmente cedidas pelo Dr. Fausto Alonso, do Serviço de Dermatologia da Santa Casa de São Paulo,

3.1.2. Indivíduos sadios

O grupo sadio foi composto por indivíduos não fumantes, sem histórico de pré-irradiações, que não estavam consumindo álcool ou qualquer medicamento e nem apresentavam sintomas de quaisquer doenças no momento da coleta do sangue. Os indivíduos sadios foram agrupados de acordo com a idade:

•**Grupo jovem (A):** Dois indivíduos do sexo masculino (24 e 27 anos, cor branca) e dois indivíduos do sexo feminino (20 e 27 anos, cor branca).

•***Grupo não jovem (B):*** Um indivíduo do sexo feminino (46 anos, cor amarela) e um indivíduo do sexo masculino (50 anos, cor branca).

Todos os doadores foram submetidos a um questionário para a obtenção de informações adicionais relacionadas com o estilo de vida, por exemplo, hábitos alimentares, história médica e exposição prévia aos agentes químicos e à radiação ionizante.

Na escolha dos doadores foram levados em consideração a idade (Barregard *et al*, 1991; Migliore *et al*, 1991), o sexo (Tomanin *et al*, 1991), o hábito de fumar (Barregard *et al*, 1991; Tolbert *et al*, 1991; Tomanin *et al*, 1991; Ashby *et al*, 1991), o consumo de álcool (Xue *et al*, 1992), o conhecimento prévio do histórico médico de pré-irradiações (Thierens *et al*, 1991), por ser conhecida a influência destes na indução de MN.

3.2. Métodos

3.2.1. Coleta

As amostras sangüíneas (5 ml) de cada doador foram coletadas através de punção venosa com seringa e agulha devidamente heparinizadas.

3.2.2. Irradiação

As amostras sangüíneas foram divididas em 8 lotes e irradiadas em fonte de ^{60}Co (Gammacell 220, Irradiation Unit-Comissão de Energia Nuclear do Canadá, IPEN/CNEN-SP) nas doses de 20, 50, 100, 200, 300, 400 e 500 cGy com taxa de dose média de 1 Gy/min. Um lote serviu de controle (0cGy).

A taxa de dose foi recalculada mensalmente levando-se em consideração o decaimento de 0,989% ao mês.

3.2.3. Cultura de linfócitos e preparo das lâminas

Para a obtenção de linfócitos binucleados foi utilizado o método do bloqueio citocinético pela citocalasina-B (cito-B) desenvolvido por Fenech e Morley (1985a), com algumas modificações, conforme o protocolo:

•Incubar 0,5 ml de sangue total acrescido de 4,0 ml de meio RPMI 1640 (Cultilab), 20% soro fetal bovino (Cultilab) e 50µl de fitohemaglutinina (M-form, liofilizada para 5 ml, GIBCO) a 37°C. A solução foi ajustada para pH 7,0 com HCl 1N.

•Adicionar 50 µl de cito-B (Sigma) na concentração final de 3µg/ml, 44 horas após a estimulação mitogênica. A escolha desta concentração foi baseada nos dados de Nath & Ong (1990) e de Fuhrmann et al (1992), que

demonstraram ser esta a concentração ideal, além de não haver evidências de que ela cause aumento na freqüência de MN.

A solução estoque de cito-B foi preparada em dimetil sulfóxido (DMSO) a 6%, na concentração de 2mg/ml, dividida em pequenas alíquotas e estocadas à -80° C. A solução estoque de cito-B foi diluída em água estéril até a concentração final de 3μg/ml.

•Tratar com solução isotônica (NaCl a 0,85%) após 72 horas de cultivo. O tratamento isotônico substituiu a hipotonização, diminuindo a ação drástica do fixador, sendo este adicionado na proporção 1:1 com a solução isotônica na primeira centrifugação. Na técnica convencional, o citoplasma nem sempre é bem preservado e os núcleos tendem a agrupar-se tornando difícil a avaliação. O intervalo de tempo de 72 horas foi escolhido por permitir a obtenção de um número maior de células binucleadas (Fuhrmann *et al*, 1992).

•Fixar as culturas em ácido acético e metanol (1:3), adicionando 5 ml da solução fixadora a cada centrifugação (3 vezes), realizadas a 700 G por 10 minutos cada;

•Aplicar cerca de 6 gotas de suspensão celular sobre lâminas previamente limpas e secas, fixar as lâminas parcialmente em vapor de água (65°C) por 3 minutos e deixar 24 horas em temperatura ambiente;

•Corar as lâminas com Giemsa (Merck) a 5% em tampão fosfato pH 7,0 por 10 minutos, lavar em água destilada e secar à temperatura ambiente.

3.2.4. Análise citogenética

As freqüências de MN, espontâneos ou radioinduzidos, foram analisadas em células mono, bi, tri e quadrinucleadas até completar cerca de 500

células binucleadas de cada doador por dose de radiação ionizante. Os MN foram analisados em microscópio óptico com aumento de 320 vezes. As fotomicrografias foram obtidas no aparelho da Leitz (East Germany, ICB/USP) (figs. 4 à 11). Para a identificação de MN foram adotados os critérios de Countryman & Heddle (1976) e de Fuhrmann et al (1992): os MN foram contados somente em células com citoplasma preservado, não confluentes, no mesmo plano focal, apresentando diâmetro de até 1/3 e com a mesma coloração ou a coloração mais clara que o núcleo principal.

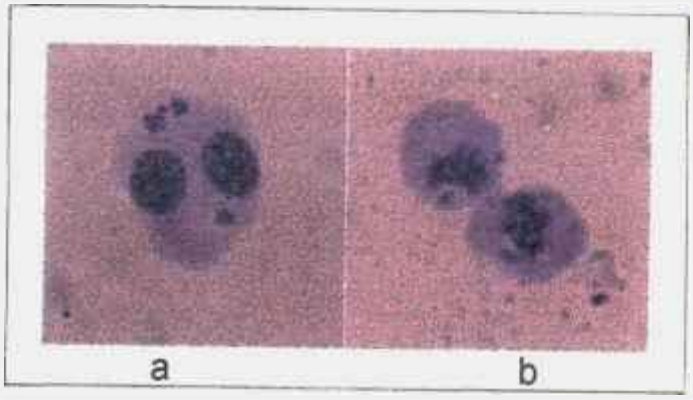


Figura 4: Fotomicrografias de: linfócito sob a ação da citocalasina-B (3µg/ml), 44 horas após indução mitogênica com sua citocinese interrompida (a) e linfócito sem a ação da droga e a divisão do citoplasma prossegue normalmente (b). Aumento de 320 X.

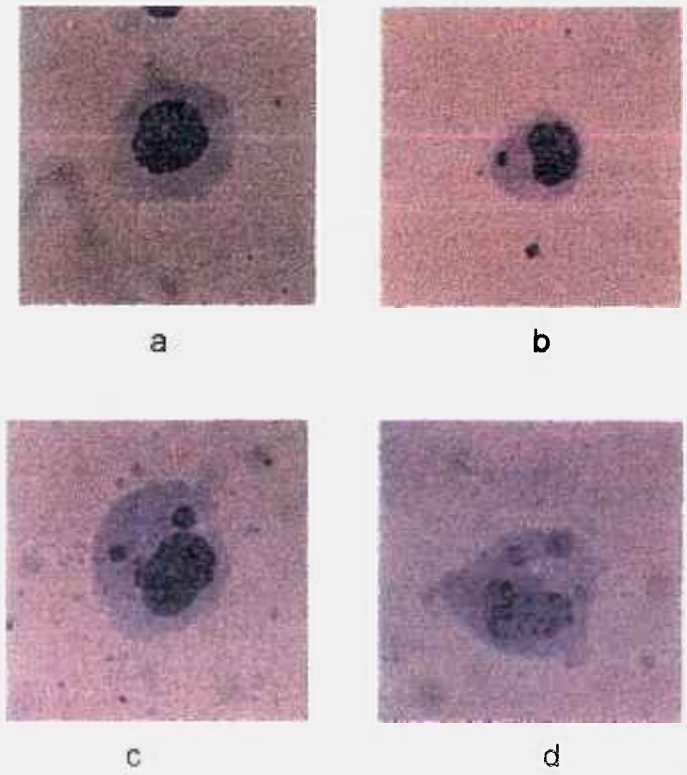


Figura 5: Fotomicrografiaa de linfócitos mononucleados: sem MN (a); com um MN (b); com dois MN (c) e com três MN (d) (320X).

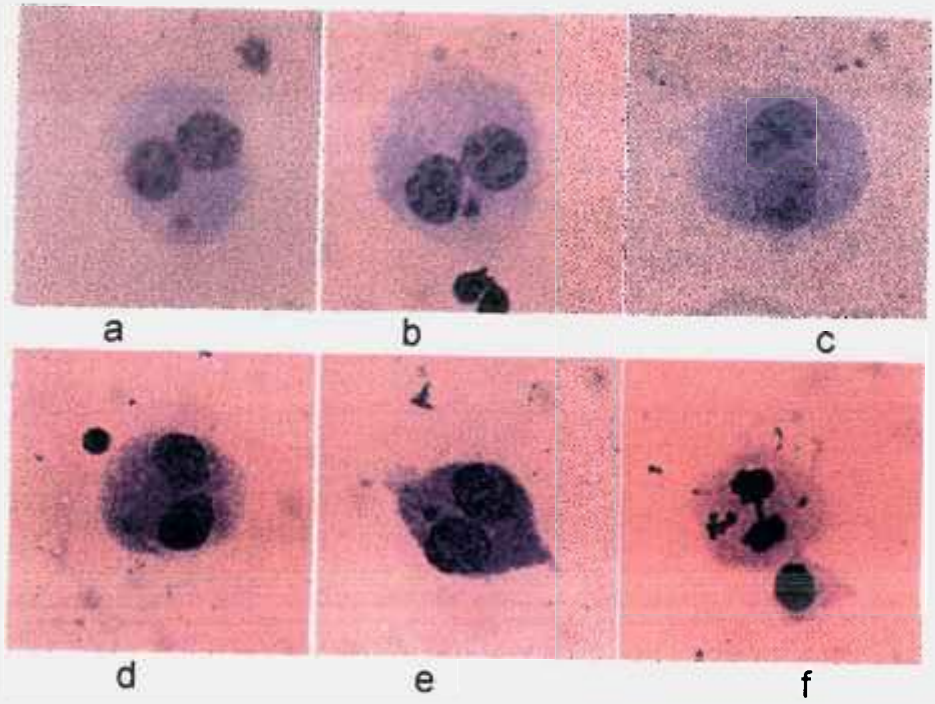


Figura 6: Fotomicrografias de linfócitos binucleados com um MN (a, b, c, d, e) e binucleada com ponte anafásica (f). (320 X)

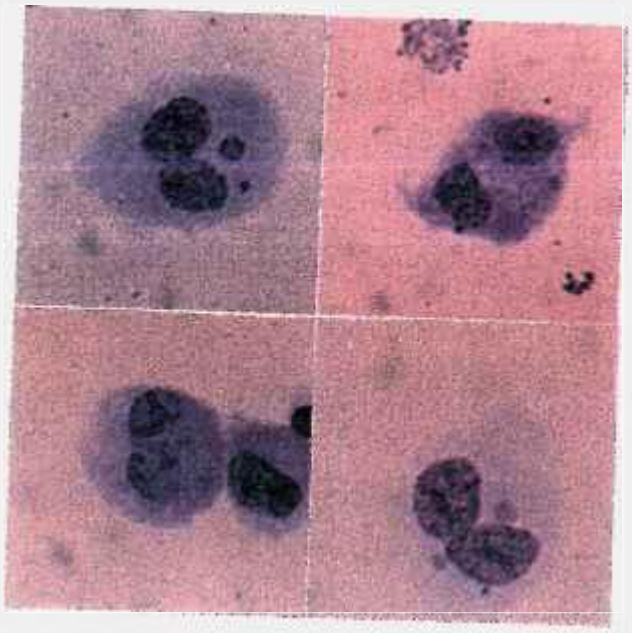


Figura 7: Fotomicrografias de linfócitos binucleados com dois MN. (320X)

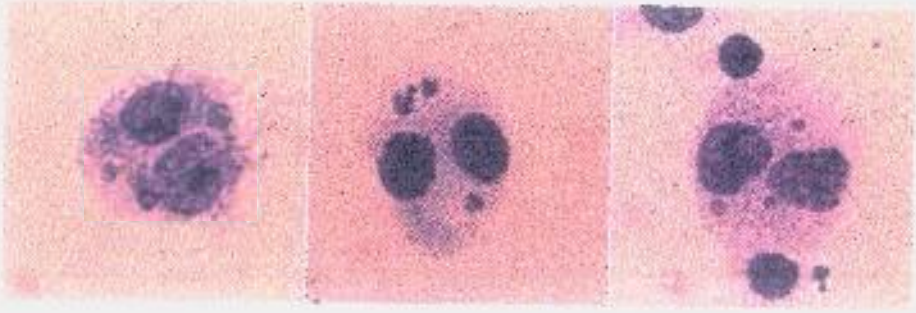


Figura 8: Fotomicrografias de linfócitos binucleados com três MN (320 X)

Figura 9: Fotomicrografias de linfócitos binucleados com quatro MN (320 X).

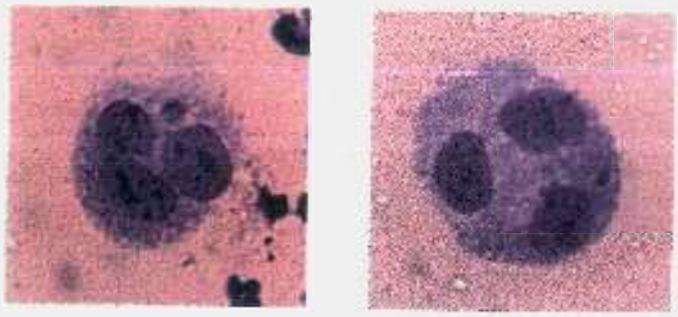


Figura 10: Fotomicrografias com linfócitos trinucleados com um MN (320 X).

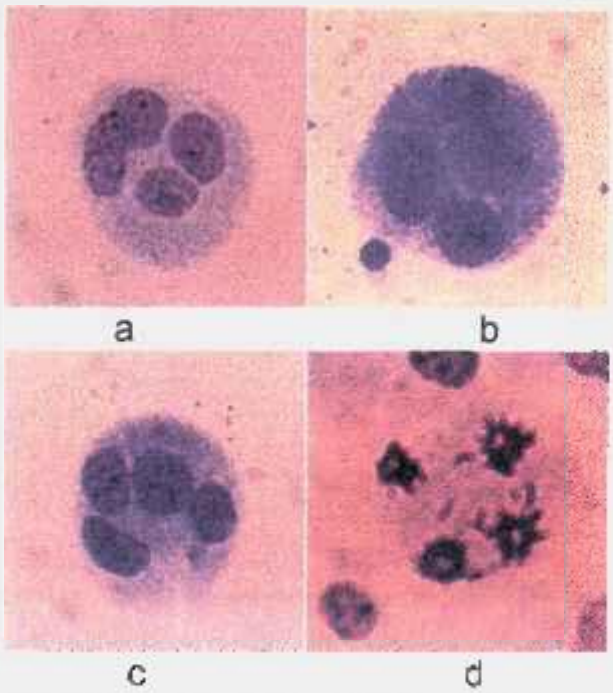


Figura 11: Fotomicrografias de linfócitos quadrinucleados: sem MN (a e b); com um MN (c) e em fase de condensação (d).Aumento de 320 X.

As células com número de MN superior a 5 não foram consideradas para impedir a inclusão de células em processo de fragmentação nuclear.

Para a avaliação da cinética do ciclo celular de linfócitos cultivados, foi empregado o índice de nucleação (IN) que foi obtido pela seguinte fórmula (Erexson *et al*, 1989):

$$IN = [(\%\ mono \times 1) + (\%\ bi \times 2) + (\%\ tri \times 3) + (\%\ quadrinucleadas \times 4)] / 100$$

3.2.5. Tratamento estatístico

Para a análise estatística, as freqüências de linfócitos contendo MN foram agrupados em zero, um e dois ou mais MN.

As curvas de dose-resposta para os linfócitos mono e binucleados obtidas para os três grupos de doadores, foram ajustadas segundo a transformação logística e analisadas pelo método Bayesiano (Madruga *et al*, 1994). Os linfócitos multinucleados não foram considerados em virtude da quantidade insuficiente para a análise estatística.

Para a comparação de freqüências espontâneas e radioinduzidas de MN entre os grupos sadios (A e B) e pacientes com câncer (C) foi utilizado o teste Qui-Quadrado (χ^2).

4. RESULTADOS

4.1. Freqüência de MN espontâneos

A tabela 4a mostra as freqüências espontâneas de MN por linfócito nos três estadios de nucleação nos três grupos de doadores analisados: indivíduos sadios (A e B) e pacientes com carcinoma basocelular (C).

Tabela 4a: Freqüência espontânea de MN por célula apresentada pelos três grupos estudados nas três classes de nucleação.

DOADORES	FREQÜÊNCIA ESPONTÂNEA		
	Mononucleados	Binucleados	Multinucleados
A	0.001	0,014	0,024
B	0.009	0,039	0,12
C	0,004	0,018	0

Os doadores C apresentaram valores mais elevados que os do grupo A, porém menores que os apresentados pelo grupo B. A análise estatística de freqüências espontâneas de MN em linfócitos mono e binucleados é apresentada na tabela 4b. Os testes de χ^2 mostraram que os três grupos são estatisticamente diferentes quando comparados simultaneamente.

Tabela 4b: Comparação entre as freqüências espontâneas dos grupos estudados. Análise estatística pelo método χ^2.

	Simultâneo	A x B	A x C	B x C
MONONUCLEADOS				
1 MN	263,08	256,07	83,99	27,68
2 ou mais MN	14,6	16,73	1,97	3,99
Resultado	diferença significativa	diferença significativa	diferença significativa	diferença significativa
BINUCLEADOS				
1 MN	22,96	13,81	1,62	18.72
2 ou mais MN	6,44	2,12	6,46	0,63

A tabela 4b mostra que existe uma diferença estatísticamente significante entre células mono e binucleadas contendo um e dois ou mais MN dos doadores sadios (A e B) e dos pacientes com câncer (C).

Os resultados obtidos mostram que os doadores sadios não jovens (B) foram os que apresentaram a freqüência mais alta de linfócitos com MN espontâneo.

4.2. Freqüência e distribuição de MN radioinduzidos

As tabelas 5 a 13 sintetizam os resultados obtidos sobre a incidência de MN induzidos pela radiação ionizante e sua distribuição em linfócitos mono, bi e multinucleados nos três grupos de doadores analisados. Tanto os pacientes com câncer como os doadores sadios mostraram um aumento na freqüência de linfócitos com MN bem como no número de MN por célula com o aumento da dose de radiação. Não houve diferença digna de nota entre os grupos.

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP IPEN

TABELA 5: Freqüência e Distribuição de Micronúcleos Induzidos por Diferentes Doses de Radiação Gama em Linfócitos Mononucleados de Indivíduos Sadios Jovens (A).

dose (cGy)	total células analisadas	(%) *	número de células com MN (%)					total MN	total cél. com MN	MN / célula	MN/ total célula
			1	2	3	4	5				
0	51272	94,43	28 (80,00)	1 (2,86)	5 (14,29)	1 (2,86)	0 (0)	49	35	1,40	0,001
20	24000	89,51	81 (74,31)	20 (18,35)	6 (5,50)	2 (1,83)	0 (0)	147	109	1,35	0,006
50	26892	92,52	172 (83,90)	22 (10,73)	6 (2,93)	4 (1,95)	1 (0,49)	255	205	1,24	0,009
100	26437	92,28	465 (89,25)	44 (8,44)	10 (1,92)	1 (0,19)	1 (0,19)	592	521	1,14	0.022
200	24549	90,01	926 (86,62)	132 (12,35)	8 (0,75)	2 (0,19)	1 (0,09)	1227	1069	1,15	0,050
300	9344	76,30	681 (82,95)	106 (12,91)	23 (2,80)	11 (1,34)	0 (0)	1006	821	1,22	0,108
400	10811	80,90	799 (79,66)	178 (17,75)	13 (1,29)	3 (0,30)	10 (1,00)	1256	1003	1,25	0,093
500	8814	83,00	842 (74,51)	233 (20,60)	41 (3,63)	11 (0,97)	3 (0,26)	1490	1130	1,32	0,169

*Porcentual de células mononucleadas em relação ao total de células analisadas (mono, bi e multinucleadas)

TABELA 6: **Freqüência e Distribuição de Micronúcleos Induzidos por Diferentes Doses de Radiação Gama em Linfócitos Binucleados de Indivíduos Sadios Jovens (A).**

dose (cGy)	total células analisadas	(%) *	número de células com MN (%) 1	2	3	4	5	total MN	total cél. com MN	MN / célula	MN / total célula
0	2373	4,42	31 (96,87)	1 (3,13)	0 0	0 0	0 0	33	32	1.03	0,014
20	2662	9,93	45 (88,23)	3 (5,88)	2 (3,92)	1 (1,96)	0 0	61	51	1,20	0,023
50	1991	6,85	117 (82,39)	21 (14,79)	2 (1,41)	2 (1,41)	0 0	173	142	1,22	0,087
100	2047	7,14	189 (80,08)	36 (15,25)	7 (2,97)	2 (0,85)	2 (0,85)	300	236	1,27	0,146
200	2611	9,57	325 (79,85)	62 (15,23)	19 (4,67)	1 (0,25)	0 0	510	407	1,25	0,195
300	2442	20,46	501 (70,76)	155 (21,89)	36 (5,08)	15 (2,12)	1 (0,14)	984	708	1,39	**0,403**
400	2398	17,94	523 (67,31)	192 (24,71)	53 (6,82)	9 (1,16)	0 0	1102	777	1,42	0,459
500	1746	16,44	456 (61,54)	197 (26,59)	64 (8,64)	19 (2,56)	5 (0,67)	1143	741	1,54	**0,655**

*** Porcentagem de células binucleadas em relação ao total de células analisadas (mono, bi e multinucleadas).**

TABELA 7: **Freqüência e Distribuição de Micronúcleos Induzidos por Diferentes Doses de Radiação Gama em Linfócitos Multinucleados de Indivíduos Sadios Jovens (A).**

dose (cGy)	total células analisadas	(%) *	número de cél. com MN (%) 1	2	3	total MN	total cél. com MN	MN / célula	MN / total célula
0	84	0,16	2 (100)	0 0	0 0	2	2	1,00	0,024
20	150	0,56	6 (85,71)	1 (14,29)	0 0	8	7	1,14	0,053
50	183	0,53	18 (90,00)	2 (10,00)	0 0	22	20	1,10	0,120
100	164	0,57	24 (92,31)	2 (7,69)	0 0	28	26	1,08	0,171
200	112	0,41	17 (80,95)	4 (19,05)	0 0	25	21	1,19	0,223
300	148	1,24	44 (78,57)	10 (17,86)	2 (3,57)	70	56	1,25	0,473
400	154	1,15	37 (74,00)	9 (18,00)	4 (8,00)	67	50	1,34	0,435
500	59	0,56	30 (100)	0 0	0 0	30	30	1,00	0,508

*** Porcentagem de células multinucleadas com relação ao total de células analisadas (mono, bi e multinucleadas)**

TABELA 8 :Freqüência e Distribuição de Micronúcleos Induzidos por Diferentes Doses de Radiação Gama em Linfócitos Mononucleados de Indivíduos Sadios Idosos (B).

dose (cGy)	total células analisadas	(%) *	número de células com MN (%) 1	2	3	4	5	total MN	total cél. com MN	MN / célula	MN / total célula
0	15677	94,08	114 (79,17)	7 (4,86)	4 (2,78)	1 (0,69)	0 (0)	144	126	1,14	0,009
20	14069	92,94	96 (67,61)	17 (11,97)	1 (0,70)	1 (0,70)	1 (0,70)	142	116	1,22	0,010
50	16361	94,03	180 (81,08)	13 (5,85)	4 (1,08)	1 (0,45)	0 (0)	222	198	1,12	0,013
100	13648	92,35	291 (77,60)	32 (8,53)	4 (1,07)	2 (0,53)	0 (0)	375	329	1,14	0,027
200	6796	86,19	333 (74,16)	42 (9,35)	9 (2,02)	0 (0)	1 (0,22)	449	385	1,17	0,066
300	7140	87,77	366 (69,32)	67 (12,69)	5 (0,95)	2 (0,38)	1 (0,19)	528	441	1,20	0,074
400	4825	80,46	409 (63,31)	82 (12,69)	20 (3,09)	2 (0,31)	1 (0,15)	646	514	1,26	0,134
500	5211	80,05	370 (51,82)	120 (16,81)	24 (3,36)	8 (1,12)	0 (0)	714	522	1,37	0,137

* Porcentagem de células mononucleadas com relação ao total de células analisadas (mono, bi e multinucleadas)

TABELA 9: Freqüência e Distribuição de Micronúcleos Induzidos por Diferentes Doses de Radiação Gama em Linfócitos Binucleados de Indivíduos Sadios Idosos (B).

dose (cGy)	total células analisadas	(%) *	número de células com MN (%) 1	2	3	4	5	total MN	total cél. com MN	MN / célula	MN / total célula
0	953	5,72	31 (83,78)	1 (2,70)	0 (0)	1 (2,70)	0 (0)	37	33	1,12	0,039
20	1038	6,86	41 (69,49)	6 (10,17)	2 (3,39)	0 (0)	0 (0)	59	49	1,20	0,057
50	1003	5,76	56 (65,12)	12 (13,95)	2 (2,32)	0 (0)	0 (0)	86	70	1,23	0,086
100	1085	7,34	114 (57,57)	19 (9,59)	6 (3,03)	7 (3,54)	0 (0)	198	146	1,36	0,182
200	1037	13,15	176 (55,52)	60 (18,93)	7 (2,21)	0 (0)	0 (0)	317	243	1,30	0,306
300	951	11,94	209 (62,02)	50 (14,84)	8 (2,37)	1 (0,30)	0 (0)	337	268	1,26	0,354
400	1105	18,42	256 (51,82)	89 (18,02)	12 (2,43)	6 (1,21)	0 (0)	494	363	1,36	0,447
500	1241	19,06	327 (49,17)	102 (15,34)	32 (4,81)	7 (1,05)	2 (0,30)	665	470	1,41	0,536

* Porcentagem de células binucleadas com relação ao total de células analisadas (mono, bi e multinucleadas).

TABELA 10: **Freqüência e Distribuição de Micronúcleos Induzidos por Diferentes Doses de Radiação Gama em Linfócitos Multinucleados de Indivíduos Sadios Idosos (B).**

dose (cGy)	total células analisadas	(%) *	número de cél. c/ MN (%) 1	2	3	total MN	total cél. com MN	MN / célula	MN / total célula
0	33	0,20	2 (66,67)	1 (33,33)	0 0	4	3	1,33	0,12
20	33	0,20	3 (100,0)	0 0	0 0	3	3	1,00	0,10
50	36	0,21	3 (60,0)	2 (40,0)	0 0	7	5	1,40	0,194
100	46	0,31	7 (70,0)	3 (30,0)	0 0	13	10	1,30	0,283
200	52	0,66	13 (72,22)	3 (16,67)	2 (11,11)	25	18	1,39	0,481
300	44	0,54	5 (50,0)	1 (10,0)	4 (40,0)	19	10	1,90	0,432
400	67	1,12	12 (54,54)	6 (27,27)	4 (18,18)	36	22	1,64	0,537
500	58	0,89	12 (50,0)	6 (25,0)	6 (25,0)	42	24	1,75	0,724

*** Porcentagem de células multinucleadas com relação ao total de células analisadas (mono, bi e multinucleadas).**

TABELA 11: Freqüência e Distribuição de Micronúcleos Induzidos por Diferentes Doses de Radiação Gama em Linfócitos Mononucleados de Indivíduos com Carcinoma Basocelular (C).

dose (cGy)	total células analisadas	(%) *	número de células com MN (%) 1	2	3	4	5	total MN	total cél. com MN	MN / célula	MN / total célula
0	20516	69,50	68 (91,89)	4 (5,40)	2 (2,70)	0 (0)	0 (0)	82	74	1,11	0,004
20	25265	70,55	68 (82,93)	11 (13,41)	3 (3,66)	0 (0)	0 (0)	99	82	1,21	0,004
50	28057	70,59	362 (81,71)	69 (15,58)	12 (2,71)	0 (0)	0 (0)	536	443	1,21	0,019
100	28267	71,16	392 (92,79)	21 (4,98)	9 (2,13)	0 (0)	0 (0)	461	422	1,09	0,016
200	13977	67,61	527 (87,98)	66 (11,02)	6 (1,00)	0 (0)	0 (0)	677	599	1,13	0,048
300	6831	58,78	398 (84,32)	60 (12,71)	13 (2,75)	1 (0,21)	0 (0)	561	472	1,189	0,082
400	6913	60,05	531 (78,20)	123 (18,11)	19 (2,80)	5 (0,74)	1 (0,15)	859	679	1,26	0,124
500	4549	54,14	427 (71,38)	125 (19,87)	48 (7,63)	5 (0,79)	2 (0,32)	851	607	1,40	0,187

*Porcentagem de células mononucleadas com relação ao total de células analisadas (mono, bi e multinucleadas).

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP IPEN

TABELA 12: Freqüência e Distribuição de Micronúcleos Induzidos por Diferentes Doses de Radiação Gama em Linfócitos Binucleados de Indivíduos com Carcinoma Basocelular (C).

dose (cGy)	total células analisadas	(%) *	número de células com MN (%) 1	2	3	4	5	total MN	total cél. com MN	MN / célula	MN / total célula
0	1511	5,36	13 (68,42)	4 (21,05)	2 (10,53)	0	0	27	19	1,42	0,018
20	1527	4,36	45 (91,84)	3 (6,12)	1 (2,04)	0	0	54	49	1,10	0,035
50	1689	4,41	150 (81,08)	33 (17,84)	2 (1,08)	0	0	222	185	1,20	0,131
100	1443	3,76	125 (90,58)	11 (7,97)	2 (1,45)	0	0	153	138	1,11	0,106
200	1472	7,18	203 (84,23)	37 (15,35)	1 (0,41)	0	0	280	241	1,16	0,190
300	1553	15,38	286 (72,04)	79 (19,90)	25 (5,80)	5 (1,26)	2 (0,50)	549	397	1,38	0,353
400	1469	14,07	305 (70,77)	87 (20,19)	25 (5,80)	10 (2,32)	4 (0,93)	614	431	1,42	0,418
500	1615	19,48	392 (63,74)	146 (23,74)	39 (6,34)	26 (4,23)	11 (1,79)	960	614	1,56	0,594

* Porcentagem de células binucleadas com relação ao total de células analisadas (mono, bi e multinucleadas).

TABELA 13: **Freqüência e Distribuição de Micronúcleos Induzidos por Diferentes Doses deRadiação Gama em Linfócitos Multinucleados de Indivíduos com Carcinoma Basocelular (C).**

dose (cGy)	total células analisadas	(%) *	número de cél. com MN (%) 1	2	3	total MN	total cél. com MN	MN / célula	MN / total célula
0	39	0,14	0 (0)	0 0	0 0	0	0	0	0
20	31	0,09	5 (100)	0 (0)	0 0	5	5	1	0,161
50	36	0,09	6 (100)	0 (0)	0 0	6	6	1	0,167
100	30	0,08	6 (100)	0 (0)	0 0	6	6	1	0,200
200	43	0,21	10 (90,90)	1 (9,10)	0 0	12	11	1,09	0,279
300	90	0,84	27 (72,97)	9 (24,32)	1 (2,70)	48	37	1,30	0,533
400	94	0,88	17 (65,38)	6 (23,08)	3 (11,54)	38	26	1,46	0,404
500	114	1,38	19 (52,78)	16 (44,44)	1 (2,78)	54	36	1,50	0,473

* Porcentagem de células multinucleadas com relação ao total de células analisadas (mono, bi e multinucleadas).

A análise estatística feita pelo método bayesiano mostrou que os dados obtidos se ajustam bem ao modelo logístico, que pode ser representado pela equação:

$$Pi = \frac{\exp\{-[\alpha+(\beta/\gamma+Di)]\}}{1+\exp\{-[\alpha\ (\beta/\gamma+Di)]\}}$$

onde Pi é a probabilidade da célula apresentar MN (0, 1 e 2 ou mais MN), α, β e γ são as constantes (.α=*0* para linfócitos mono e multinucleados) e Di é a dose de radiação ionizante.

Tem-se, portanto, para os tres grupos analisados, os seguintes parâmetros estimados :

a) Mononucleadas

- sadios jovens (A):

i=1, α= 0; β= 1625,43 e γ= 247,09

i=2, α= 0; β= 2866,95 e γ= 368,85

- sadios não jovens (B):

i=1, α= 0; β= 2225,71 e γ= 469,58

i=2, α= ; β= 3274,67 e γ= 460,49

- pacientes com câncer (C):

i=1, α= 0; β= 1732,40 e γ= 312,87

i=2, α= 0; β= 272,66 e γ= 343,17

b) binucleadas

- sadios jovens (A)

  i=1, α=0,18; β= 449,01; γ= 107,05

  i=2, α=0,78; β= 506,63; γ= 78,20

- sadios não jovens (B)

  i=1, α= -0,08; β= 625,81; γ= 177,66

  i=2, α= 1,13; β= 411,63; γ= 87,74

- pacientes com câncer(C)

  i=1, α=-0,89; β= 165,69; γ= 44,57

  i=2, α= -2,60; β= 4282,26; γ= 530,69

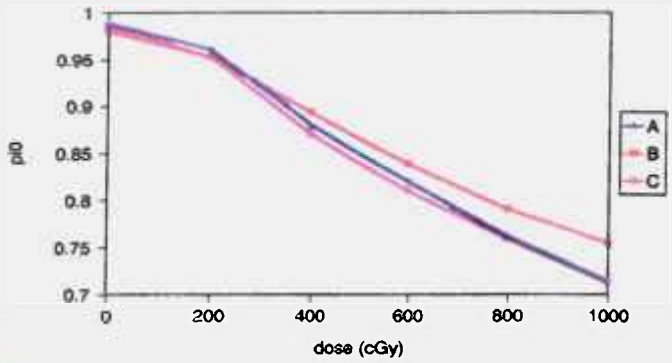
As curvas ajustadas de dose-resposta avaliando a radioindução de MN em função da dose de radiação em células mononucleadas contendo 0, 1 e 2 ou mais MN dos três grupos estudados (A, B e C) estão ilustradas nas figuras 12, 13 e 14, respectivamente, e em células binucleadas, nas figuras 15, 16 e 17.

Os três grupos apresentaram um decréscimo tanto na freqüência de linfócitos mono (fig 12) como na de binucleados sem MN (fig 15) em função da dose de radiação, e portanto, um aumento no número de células micronucleadas. Os grupos apresentaram comportamento citogenéticos similares, visto que não houve diferença digna de nota.

Quanto a distribuição de MN, não houve diferenças significativas nas curvas de dose-resposta ajustadas para os três grupos, sadios e com

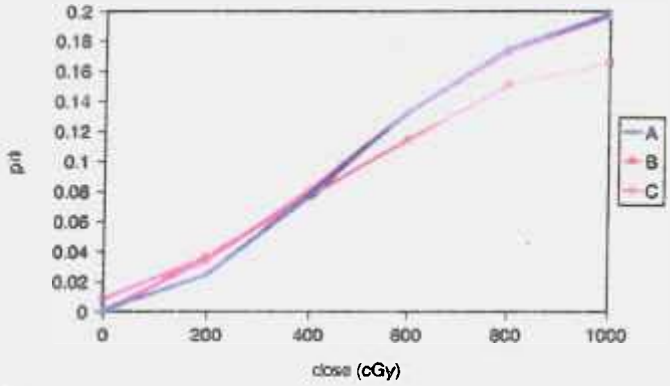
carcinoma, para os linfócitos mononucleados contendo 1 MN (fig 13) e dois ou mais MN (fig 14). Já para os linfócitos binucleados, os pacientes com câncer mostraram um comportamento diferenciado em relação aos grupos sadios, A e B, que por sua vez, mostraram-se similares. O grupo C apresentou um decréscimo na proporção de infócitos com 1 MN com o aumento da dose de radiação (fig 16), enquanto que os grupos sadios (A e B) mostraram uma curva crescente não linear. Em relação a linfócitos contendo dois ou mais MN (fig. 17), o grupo C mostrou uma curva crescente acentuada a partir de 400 cGy, já o grupo sadio mostrou uma resposta mais estável para a mesma faixa de dose.

mononucleadas



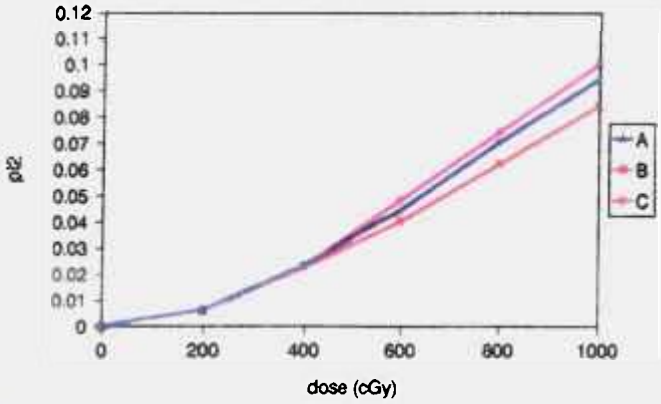
a

Figura 12: **Proporção de linfócitos mononucleados sem MN ajustada para cada grupo de doadores em função da dose de radiação.**



b

Figura 13: **Proporção de linfócitos mononucleados com um MN ajustada para cada grupo de doadores em função da dose de radiação.**



c

Figura 14: Proporção de linfócitos mononucleados com dois ou mais MN ajustada para os três grupos de doadores em função da dose de radiação.

binucleadas

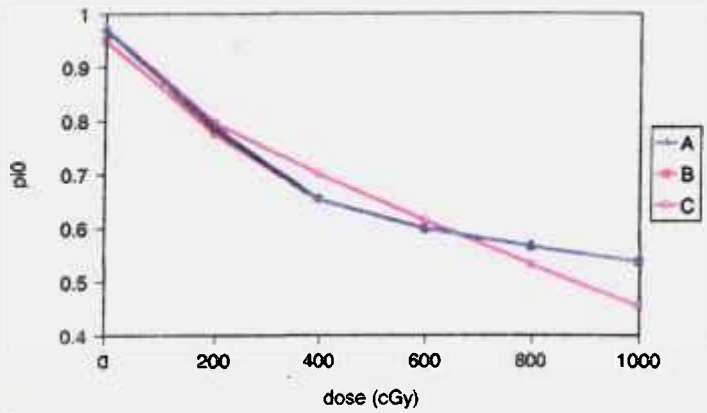


Figura 15: Proporção de linfócitos binucleados sem MN ajustada^ para os tres grupos de doadores em função da dose de radiação.

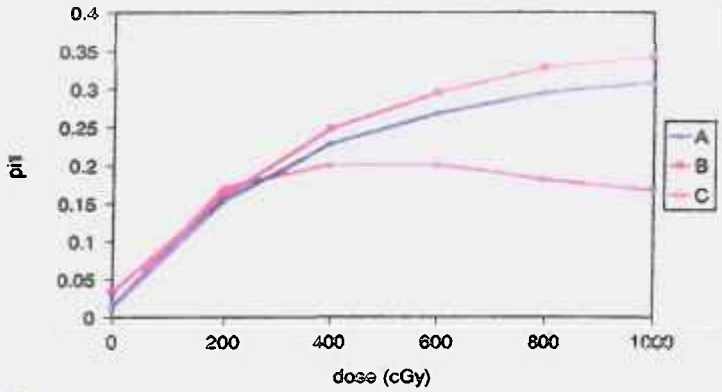


Figura 16: Proporção de linfócitos com um MN ajustada para os três grupos de doadores em função da dose de radiação.

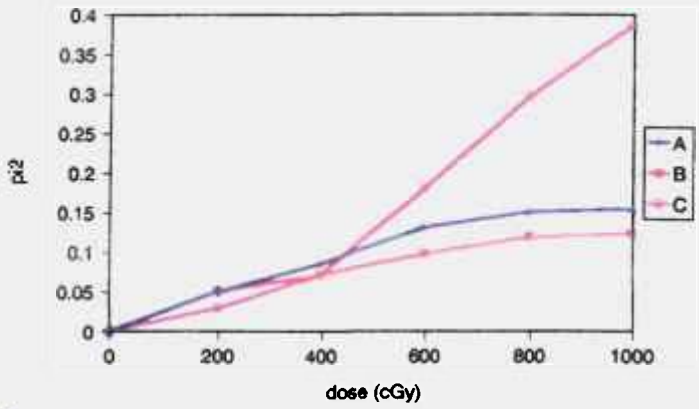
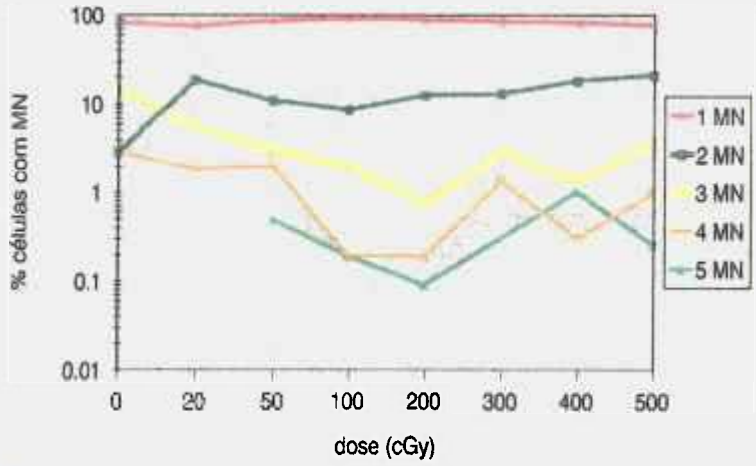


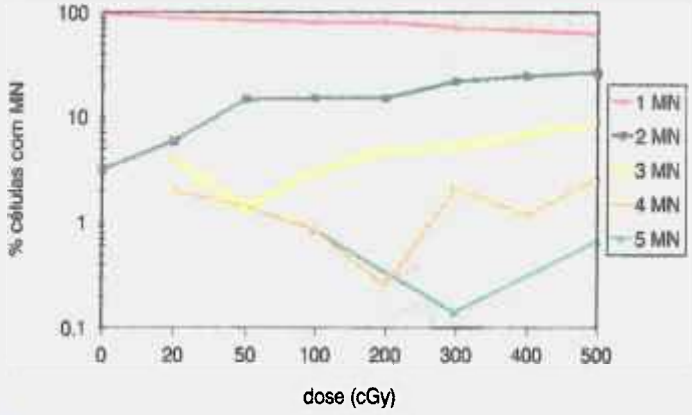
Figura 17: Proporção de linfócitos com dois ou mais MN ajustada para os três grupos de doadores em função da dose de radiação.

As distribuições de MN radioinduzidos nos três estadios de nucleação de linfócitos para os três grupos estudados são apresentadas nas tabelas 5 a 13. As figuras 18 a 20 mostram de maneira sucinta, as porcentagens de linfócitos contendo diferentes números de MN em função da dose de radiação.

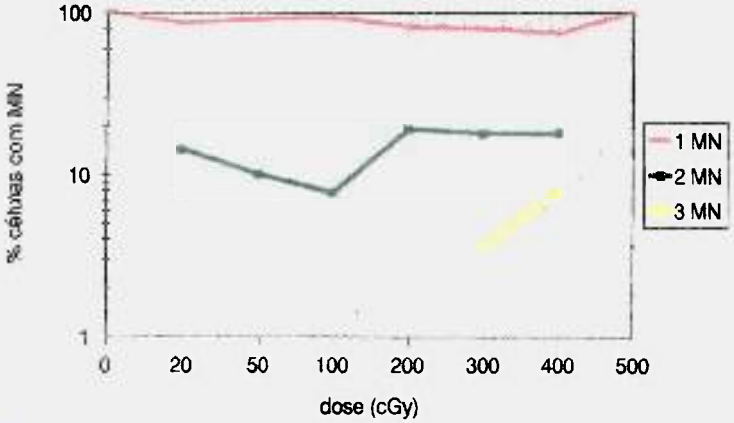
Os resultados mostram que houve o predomínio de células contendo 1 MN e que estas se mantiveram praticamente constantes em todas as doses analisadas nos três estadios de nucleação, não ocorrendo o mesmo com os linfócitos com três ou mais MN. Os números de células contendo 2 MN foram relativamente estáveis somente para estadios de mono e binucleação.



a

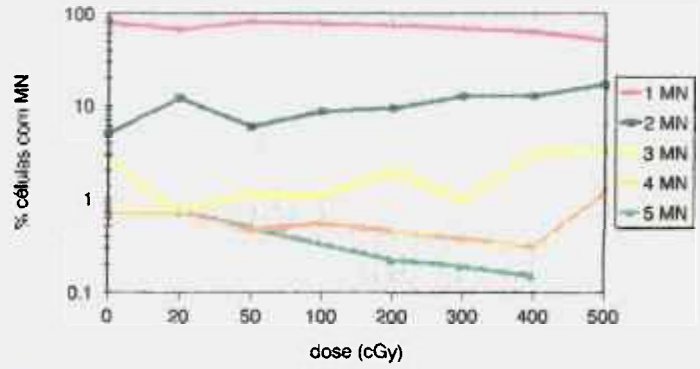


b

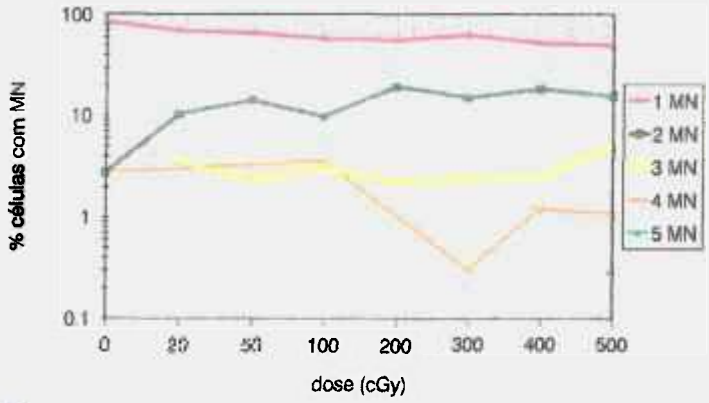


c

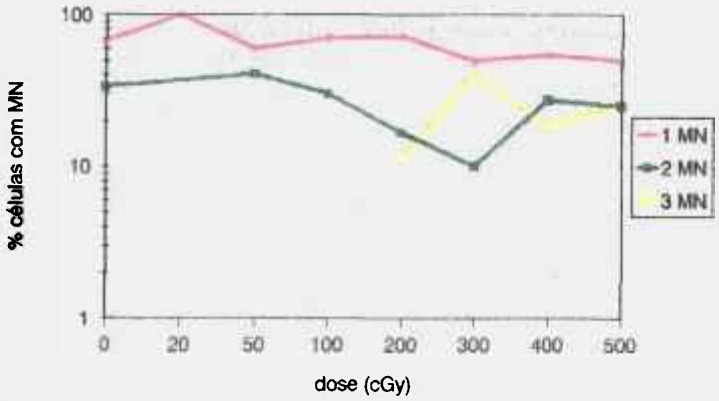
Figura 18: Porcentagem de linfócitos de doadores sadios mono (a), bi (b) e multinucleados (c) com 1 a 5 MN.



a

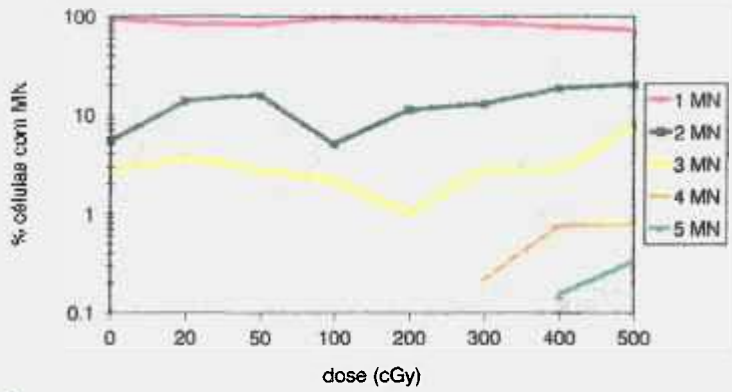


b

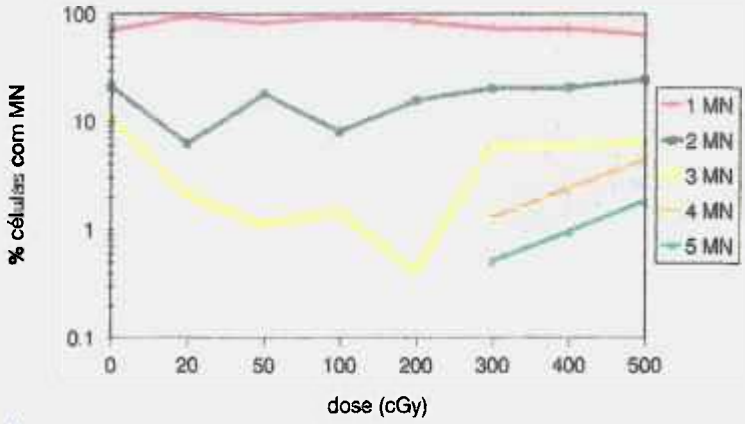


c

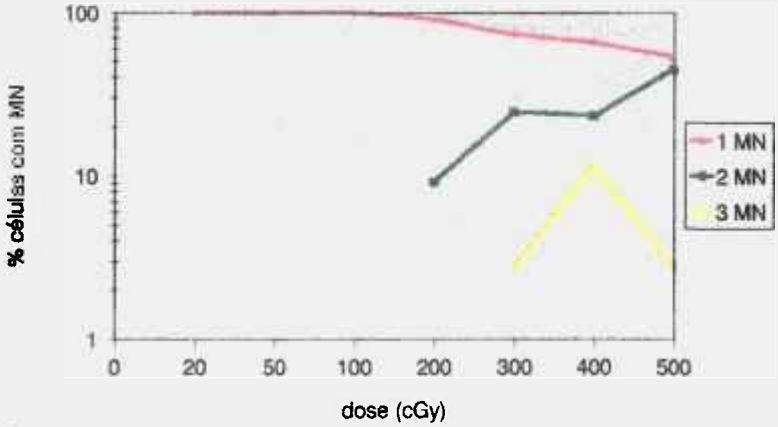
Figura 19: Porcentagem de linfócitos de doadores sadios não jovens mono (a), bi (b) e multinucleados (c) com 1 a 5 MN.



a



b



c

Figura 20: Porcentagem de linfócitos de pacientes com carcinoma basocelular mono (a), bi (b) e multinucleados(c) com 1 a 5 MN.

Observou-se ainda que a maioria dos MN foi encontrada em linfócitos binucleados (cerca de 5,4 vezes mais que em mononucleados), em todas as doses analisadas, nos três grupos de doadores (tabela 14 a e b).

Tabela 14a : **Número de MN por total de células mono e binucleadas encontrado na análise dos grupos sadios jovens (A), sadios não jovens (B) e nos indivíduos com carcinoma basocelular (C).**

	MONONUCLEADAS			BINUCLEADAS		
DOSE (cGy)	A	B	C	A	B	C
0	0,001	0,009	0,004	0,014	0,039	0,018
20	0,006	0,010	0,004	0,023	0,057	0,035
50	0,009	0,013	0,019	0,087	0,086	0,131
100	0,022	0,027	0,016	0,146	0,182	0,106
200	0,050	0,066	0,048	0,195	0,306	0,190
300	0,108	0,074	0,082	0,403	0,354	0,353
400	0,093	0,134	0,124	0,459	0,447	0,418
500	0,169	0,137	0,187	0,655	0,536	0,594

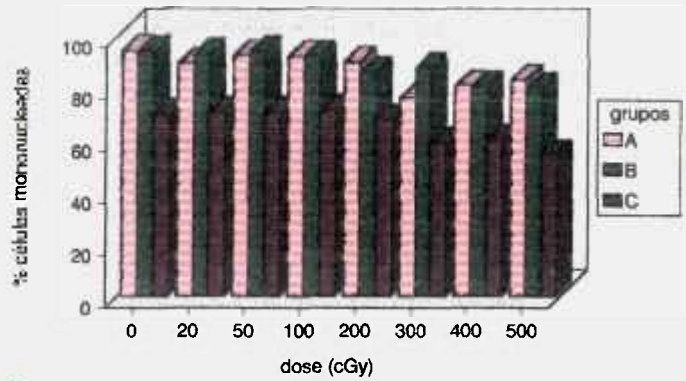
COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP IPEN

Tabela 14b: Fator de relação quantitativa entre as freqüências de células binucleadas e mononucleadas com MN, nos três grupos analisados.

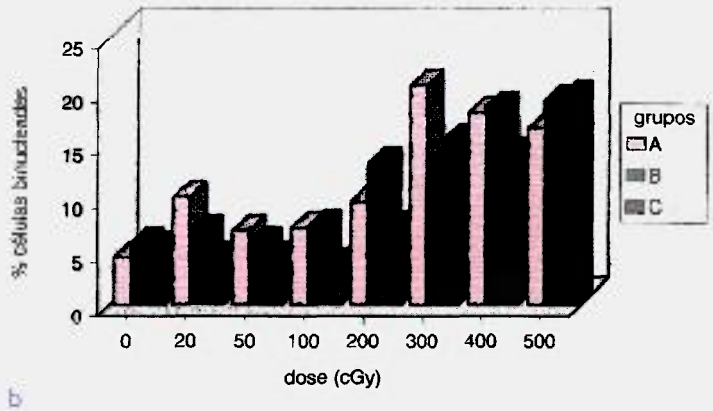
	FATOR			
dose (cGy)	A	B	C	
0	14	4,3	4,5	
20	3,8	5,7	8,7	
50	9,7	6,6	6,8	
100	6,6	6,7	6,6	
200	3,9	4,6	3,9	
300	3,7	4,7	4,3	
400	4,9	3,3	3,3	
500	3,8	3,9	3,1	MÉDIA
	6,3	4,9	5,1	5,4

4.3. Cinética do ciclo celular

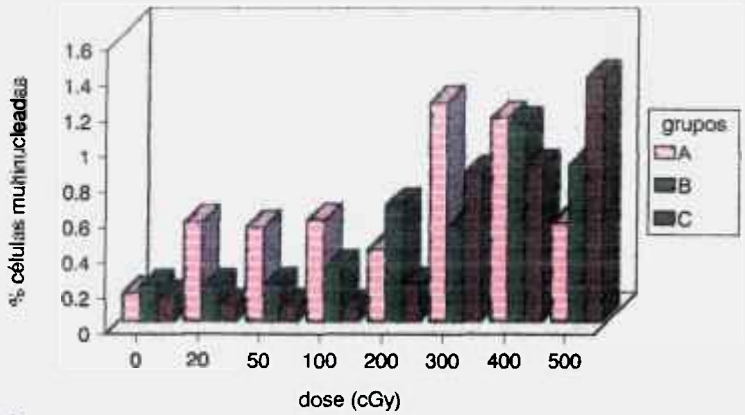
A figura 21 ilustra as porcentagens de linfócitos mono (21a), bi (21b) e multinucleados (21c), micronucleados ou não, em função da dose de radiação. O número total de células binucleadas (21b) e multinucleadas (com e sem MN) (21c) se manteve praticamente constante até em torno de 200 cGy. Entretanto, aproximadamente, a partir de 300 cGy, houve um aumento no número total das células nestes estadios de nucleação, acompanhado de uma tendência à diminuição da porcentagem de células mononucleadas (21a). Este fenômeno ocorreu nos três grupos estudados (A, B e C).



a



b



c

Fig 21: Porcentagens de células mononucleadas (a), binucleadas (b) e multinucleadas (c), com ou sem MN, em função da dose de radiação nos três grupos estudados. O aumento no número de células binucleadas e multinucleadas é evidente apartir da dose de, aproximadamente, 300 cGy e, na mesma faixa de dose, com uma tendência a queda de mononucleadas.

63

A tabela 15 mostra os índices de nucleação (IN) obtidos para os três grupos nas diferentes doses. O grupo com carcinoma basocelular (C) apresentou valores de índice de nucleação mais baixos que para os doadores sadios (A e B) na faixa de dose analisada. Houve uma tendência ao aumento no IN a partir da dose de 300 cGy, nos três grupos.

Tabela 15: Índice de Nucleação obtido para os três grupos de doadores nas diferentes doses de radiação gama, dada a seguinte fórmula:

IN=[(% mono) + (% bi x 2) + (% (tri + quadri) x 3.5) / 100

Grupos	doses (cGy)	% mono	% bi x 2	% multi x 3,5	IN
A	0	94.43	8.84	0.56	1.04
	20	89.51	19.86	1.96	1.11
	50	92.52	13.70	1.85	1.08
	100	92.28	14.28	1.99	1.08
	200	90.01	19.14	1.43	1.11
	300	76.30	40.92	4.34	1.22
	400	80.90	35.88	4.02	1.21
	500	83.00	32.88	1.96	1.18
B	0	94.08	11.44	0.70	1.06
	20	92.94	13.72	0.70	1.07
	50	94.03	11.52	0.73	1.06
	100	92.35	14.68	1.08	1.08
	200	86.19	26.30	2.31	1.15
	300	87.77	23.88	1.89	1.13
	400	80.46	36.84	3.92	1.21
	500	80.05	38.12	3.11	1.21
C	0	69.50	10.72	0.49	0.81
	20	70.55	8.72	0.31	0.79
	50	70.59	8.82	0.31	0.89
	100	71.16	7.52	0.28	0.79
	200	67.61	14.36	0.73	0.83
	300	58.78	30.76	2.94	0.92
	400	60.05	28.14	3.08	0.91
	500	54.14	38.96	4.83	0.98

5.DISCUSSÃO

Os dados obtidos após a análise citogenética dos três grupos de doadores (A, B e C) mostraram que os indivíduos sadios não jovens (B) foram os que apresentaram as freqüências espontâneas de MN mais altas seguida da dos pacientes com câncer(C).

Nesse estudo, os indivíduos pertencentes aos grupos B e C foram mais sensíveis que os do grupo A: os integrantes dos grupos B e C apresentam idades entre 46 e 68 anos, em contraste com os do grupo A, cujas idades variam entre 20 e 27 anos.

Estes dados coincidem com os de Hall e Wells (1988), Huber *et al* (1989), Migliore *et al* (1991) e Hando *et al* (1994), que verificaram um aumento no número de células com MN espontâneo relacionado com o aumento da idade.

Vários autores (Fenech e Morley, 1986; Hsu *et al*, 1989) admitem que os sistemas de reparo do DNA são responsáveis, pelo menos em parte, pela manutenção da integridade do material genético após os danos espontâneos ou induzidos no DNA. Partindo dessa premissa, um aumento na freqüência de MN espontâneo relacionado com a idade, pode ser indicativo da vulnerabilidade do genoma causado pelo envelhecimento *in vivo*. Sendo assim, é possivel que as freqüências mais altas apresentadas pelos indivíduos dos grupos B e C, sejam conseqüências do aumento da deficiência de reparo do DNA decorrente da idade mais elevada.

O aumento da freqüência de MN espontâneo relacionado com a idade pode estar associado a várias causas: a) indução de aneuploidia resultante de defeito no fuso e na ligação centrômero-fuso, centrômero anormal ou decréscimo na produção de tubulina; b) aumento da taxa de quebras cromossômicas espontâneas; c) ambos os fenômenos (Fenech e Morley, 1986; Hando *et al*, 1994).

Existem autores (de Jong *et al*, 1988; Prosser *et al*, 1988; Gantemberg *et al*, 1991), contudo, que não encontraram diferença significante entre os doadores jovens e não jovens, atribuindo o resultado encontrado a diferenças interindividuais. Gantemberg *et al* (1991), no entanto, ressaltaram que a não

65

correlação encontrada pode ser em virtude da pequena variação da idade (de 27 a 37 anos) dos doadores analisados.

O fato dos indivíduos sadios não jovens (B) apresentarem freqüências espontâneas mais altas que a dos indivíduos com câncer (C) é dificil de explicar, principalmente se levar em consideração a multiplicidade de fatores tanto exógenos quanto endógenos que podem intervir na resposta mutagênica. A variabilidade interindividual pode ser decorrente de uma série de fatores como imunológico, hormonal, vascular, metabólico e nutricional, bem como os relacionados a constituição genética, estilo de vida etc. Outro fator que deve ser considerado, também, é o número reduzido de indivíduos analisados. Além disso, os indivíduos portadores de doenças, ou com informações de incidência de doença familiar aumentada, mudam o comportamento relativo a precauções e cuidados, bem como o estilo de vida e hábitos alimentares. Desses fatore, um ou mais de um, tenham contribuido para uma menor incidência de MN espontâneos nestes casos.

A tabela 16 apresenta as freqüências espontâneas de MN por célula binucleada de indivíduos sadios obtidas por vários autores e as encontradas no presente trabalho nos três grupos de doadores. Houve uma variação nas respostas de 0,002 a 0,039 MN/célula. As freqüências mais altas foram encontradas por Ramalho *et al* (1988) e no presente trabalho em doadores não jovens (B). A variação de resposta das freqüências espontâneas pode ter sido causada pela diferença no número de doadores e nas faixas etárias as quais pertenciam, além de, possivelmente, as condições experimentais empregadas pelos vários laboratórios teriam sido diferentes),. O estudo de freqüências espontâneas apresenta dificuldades por essas serem, geralmente, baixas na maioria dos indivíduos, incluindo aqueles com câncer. Além disso, danos cromossômicos e induzidos por algum agente mutagênico parecem ser fenômenos independentes (Hsu, 1987baseado em estudos de pacientes com Xeroderma pigmentosum que apresentam freqüência espontânea de quebras semelhante a de indivíduos sadios e quando submetidos à ação mutagênica da luz ultravioleta apresentam uma alta taxa de quebras cromossômicas. Sendo assim, análise de danos induzidos por algum agente é mais informativo

66

Tabela 16: Comparação da freqüência espontânea de MN entre vários laboratórios

Referências	idade (anos)	número de doadores	freqüência espontânea (MN/cél.bin.)
Fenech e Morley, 1985a	20-51	8	0.0088
Fenech e Morley, 1985b	0-35	15	0.0073
Fenech e Morley, 1985b	65-82	33	0.0123
Mitchell e Norman, 1987	?	?	0.0028
Kormos e Koteles, 1988	20-22	4	0.0140
Ramalho *et al*, 1988	?	2	0.0360
Prosser *et al*, 1988	20-45	14	0.0140
Kormos e Koteles, 1989	20-22	5	0.0080
Huber *et al*, 1989	20-52	14	0.0160
Gantemberg *et al*, 1991	22-27	12	0.0200
Catena *et al*, 1992	22-67	5-25	0.0190
presente trabalho	20,24 e 27	4	0.0140
	46 e 50	2	0.0390
	47, 67 e 68	3*	0.0180

* doadores com câncer de pele

Com relação aos MN radioinduzidos, tanto em pacientes com câncer como em doadores sadios, houve um aumento na freqüência de linfócitos micronucleados bem como no número de MN por célula com o aumento da dose de radiação. Resultados análogos foram obtidos por outros autores (Lloyd *et al*, 1986; Mitchell e Norman, 1987; Ramalho *et al*, 1988; Khadzhidekova, 1989; Balasem *et al*, 1991) que documentaram um aumento na freqüência de MN em função da dose de radiação.

As proporções de linfócitos danificados (células micronucleadas) pela radiação ionizante foram similares nos três grupos: indivíduos com carcinoma (C) e indivíduos sadios (A e B). No entanto, a extensão das lesões induzidas foi diferente, demonstrada pela análise de distribuição de MN radioinduzidos em linfócitos binucleados: no grupo com carcinoma basocelular, a proporção de células menos danificadas (contendo somente 1 MN) decresceu com o aumento da dose de radiação, dando lugar às celulas mais afetadas (contendo vários MN) nas doses mais altas (> 400 cGy). Neste contexto, pode-se dizer que o grupo C foi mais radiossensível em relação aos grupos sadios.

Embora os indivíduos não jovens (B) apresentem uma freqüência mais alta de MN espontâneos,a sensibilidade à radiação ionizante parece não estar associado com a idade, visto que a resposta foi similar a dos indivíduos jovens (A).

Essas observações mostram a importância de se analisar não somente a incidência de MN numa dada célula do indivíduo, mas também a sua distribuição, para uma avaliação mais acurada de danos ocorridos no genoma.

Essas informações não foram obtidas com os linfócitos mononucleados, o que era de se esperar, já que eles constituem uma população composta de células que passaram pelo processo de divisão mitótica ou não. Assim sendo, a utilização dessas células nem sempre é adequada para a avaliação do dano cromossômico induzido por algum agente genotóxico.

Os indivíduos do grupo C, provavelmente, são deficientes no reparo por fotorreativação e excisão, mecanismos acionados para o reparo de danos causados pela radiação UV, o principal carcinógeno envolvido no desenvolvimento de câncer de pele (Brash *et al*, 1991; Kamb, 1994).

Cosiderando que a principal lesão causada pela radiação ionizante é a quebra das fitas duplas do DNA (IAEA, 1986) e que os MN são originários predominantemente de fragmentos acêntricos (Streffer, 1993), os resultados obtidos permitem aventar a hipótese de que os pacientes com carcinoma basocelular aqui analisados podem até apresentar o mesmo grau de eficiência no reparo de quebras das fitas do DNA quando comparados com os indivíduos sadios, porém, o mecanismo de reparo pode não ser eficaz para células contendo várias lesões.

Ainda em relação à distribuição de MN radioinduzidos, verificou-se um predomínio de linfócitos contendo um MN, seguido de dois MN, nos três estadios de nucleação nos três grupos de doadores. As porcentagens dessas células foram praticamente constantes em todas as doses analisadas.

Observou-se ainda que a maioria dos MN foi encontrada em linfócitos binucleados (cerca de 5,4 vezes mais que em mononucleados). A ocorrência de um número elevado de células interfásicas mononucleadas pode indicar que essas células passaram por uma divisão celular antes da adição da cito-B ou que algumas células tenham escapado da ação da droga, não contribuindo para a formação de binucleadas (Fenech e Morley, 1986; Fuhrmann, 1992) ou não foram estimuladas pelo agente mitogênico.

A contagem de MN, assim, pode ser limitada somente as células binucleadas contendo um e dois MN, proporcionando uma contagem mais

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP IPEN

68

eficiente e rápida sem que ocorra a imprecisão de análise, fator importante particularmente em dosimetria biológica e monitoramento de populações.

Com relação a avaliação da cinética do ciclo celular verificou-se um aumento considerável no número total de células bi e multinucleadas (com e sem MN) a partir de 300 cGy, nos três grupos analisados e que foi acompanhado por uma diminuição gradativa de células mononucleadas (com e sem MN).

Uma possível explicação para esse fato poderia ser a interferência da radiação ionizante no processo de divisão celular. A radiação ionizante é relatada como causadora de retardo mitótico dependente de dose (Kihlman *et al*, 1982; Purrot *et al*, 1980). A visualização do efeito da cito-B ocorre somente quando as células se encontram em anáfase-telófase do ciclo celular e esse efeito é expresso pela presença de células binucleadas ou quando as células atingem a segunda mitose, pela presença de células multinucleadas. Com o aumento da dose de radiação, pode ter ocorrido um retardo mitótico mais pronunciado permitindo, portanto, um maior acúmulo de células nessas fases da mitose, resultando conseqüentemente, no aumento de células bi ou multinucleadas. Em contrapartida, a proporção de células mononucleadas tendeu a declinar com o aumento da dose de radiação. Uma relação direta entre o atraso do ciclo celular e a expressão de MN induzidos em eritrócitos policromáticos de camundongos , irradiados com doses de 1 a 8 Gy de raios X (58 Gy/min), foi aventada por Mc Fee *et al* (1994). Os autores sugeriram o atraso mitótico induzido pela radiação ionizante como a principal causa da relação negativa observada entre a dose e os MN radioinduzidos.

Da mesma maneira, Gantemberg *et al* (1991) verificaram um decréscimo no número de células binucleadas com o aumento da dose de raios X (1Gy/min.) na faixa de dose de 5 a 10 Gy. Os autores atribuiram o fato a um mecanismo de seleção e eliminação de linfócitos severamente danificados pelo aumento da dose de radiação.

Outro aspecto investigado foi o índice de nucleação (IN) que mostrou ser mais baixo em pacientes portadores de câncer quando comparados ao dos indivíduos sadios, indicando um ciclo celular mais lento que os dos indivíduos sadios. Essas observações sugerem que a resposta imune desses pacientes pode estar de algum modo comprometida, já que o IN indica a capacidade de

69

resposta a indução mitogênica por parte do hospedeiro. Isso, de certa forma, era esperado para esse grupo (C), visto que a presença de células tumorais no organismo pode estar relacionada com o desenvolvimento de um processo associado a uma falha na vigilância imunológica. A vigilância imunológica refere-se à capacidade de reconhecimento e eliminação de células tumorais, que, muitas vezes, está diminuida em pacientes com câncer (Greenberg, 1987).

Um ligeiro aumento no valor de IN nas doses mais altas pode estar relacionado com a proporção maior dos componentes bi e multinucleados como mostra a tabela 15, nos três grupos. A contribuição maior, particularmente de células binucleadas nas doses mais altas, pode ser uma conseqüência direta do retardo do ciclo celular induzido pela radiação ionizante, o que fez com que se elevasse o valor de IN, dando uma idéia de uma cinética celular mais acelerada nas doses acima de 300 cGy. Partindo dessa hipótese, uma boa parte das células interfásicas mononucleadas nas doses mais baixas pode ser oriunda da primeira divisão celular, antes da aplicação da cito-B.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos por meio da análise da radiossensibilidade de linfócitos periféricos de pacientes com carcinoma basocelular e de indivíduos sadios, irradiados *in vitro* com doses de 20 a 500 cGy de ^{60}Co realizada nas condições experimentais empregadas, permite concluir que:

•Os indivíduos com carcinoma basocelular apresentaram freqüência espontânea de MN mais alta que os indivíduos sadios jovens, porém mais baixa que os indivíduos sadios não jovens.

•Houve um aumento no número de linfócitos micronucleados e no número de MN por célula com o aumento da dose de radiação ionizante nos três grupos analisados.

•Os pacientes com carcinoma basocelular mostraram as proporções de linfócitos danificados (células com MN) similares a de indivíduos sadios.

•As curvas ajustadas de dose-resposta mostraram, no entanto, que a extensão de lesões induzidas pela radiação ionizante em linfócitos binucleados foi diferente nos três grupos: o grupo com câncer mostrou-se mais afetado nas doses mais altas (> 400 cGy), em relação aos grupos de indivíduos sadios. Para os linfócitos mononucleados , não houve diferença significativa entre os grupos.

•Houve predomínio de linfócitos contendo um MN nos três estadios de nucleação nos três grupos de doadores analisados;

•A maioria dos MN foi encontrada em linfócitos binucleados (cerca de 5,4 vezes mais que em mononucleados) em todas as doses analisadas, nos três grupos de doadores;

•Houve um aumento pronunciado no número total de células bi e multinucleadas (com e sem MN) com subseqüente diminuição de células mononucleadas a partir da dose de 300 cGy nos três grupos;

•Os pacientes com câncer de pele apresentam os valores de índice de nucleação (IN) mais baixos que os indivíduos sadios jovens e não jovens em todas as doses analisadas indicando uma cinética de ciclo celular mais lenta.

71

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMÁSSY, Z.; ZANYÁR, B.; KOTELES, G. J.. Frequency of micronuclei in X-irradiated human lymphocytes. ***Int. J. Radiat Biol.*** 49: 719-24, 1986.

ASHBY, J.; TINWELL, H.; CALLANDER, R. D.; CLARE, N.. Protective effects of vitamin A against the genotoxicity of NKK, a nicotine-derived N-nitrosamine. ***Carcinogenesis***. 12(3): 379-42, 1991

ASITA, A. O.; HAYASHI, M.; KODAMA, Y.; MATSUOKA, A.; SUZUKI, T. AND SUFUNI, T.. Micronucleated reticulocyte induction by ethylating agents in mice. ***Mutat Res***. 271: 29-37, 1992.

ATHANASIOU, K. ; CONSTANTOPOULOS, S. H.; RIEDAL, E.; FITZGERALD, D. J.; YAMASAKI, H.. Metsovo-tremolite asbestos fibres: *in vivo* effects on mutation, chromosome aberration, cell transformation and intercellular communication. ***Mutagenesis***. 7: 343-7, 1992.

BALASEM, A. N. & ALI, A. S. K. Establishment of dose-response relationship between doses of Cs-137 gamma-rays and frequencies of MN in human peripheral blood lymphocytes. ***Mutat. Res.***. 259: 133-8, 1991.

BARREGARD, L.; HOEGSTEDT, B.; SCHUTZ, A., KARISSON, A.; SALLSTEN, G.; THIRINGER, G.. Effects of occupational exposure to mercury vapor on lymphocytes micronuclei. ***Scand. J. Work Environ. Health***. 17(4): 263-8, 1991.

BENNER, S. E.; WARGOVICH, M. J.; LIPPMAN, S. M.; HONG, N. K.. Micronuclei: a potencial ntermediate marker for chemopevention of aerodigestive tract cancer. ***J. Cell. Biochem.*** Suppl.. 17F: 250-4, 1993.

BONDY, M. L.; SPITZX, M. R.; HALABI, S.; FUEGER, J. J.; SCHANTZ, S. P.; SAMPLE, D.; HSU, T. C.. Association between framily history of cancer and mutagen sensitivity in upper aerodigestivetract cancer patients. ***Cancer Epidem. Biom. Prev.***. 2: 103-6, 1993.

BRASH, D. E.; RUDOLPH, J. A.; SIMON, J. A.; LIN, A.; MCKENNA, G. J.; RADEN, H. P.; HALPERIN, A,. J.; PONTEN, J.. A role for sunlight skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA***. 88: 10124-8, 1991.

BROGGER, A.; HAGMAR, L.; HANSTEEN, I. L.; HEIM, S.; HOGSTEDT, B; KNUDSEN, L.; LAMBERT, B.; LINNAINAMAA, K.; MILTEMAN, F.; NORDENSON, I.. An interNordic prospective study on cytogenetic endpoints and cancer risk. Nordic study group on the health risk of chromosome damage. ***Cancer Genet. Cytogenet***. 45: 85-92, 1990.

CARRANO, A. V. & NATARAJAN, A. T.. International commission for protection against environmental mutagens and carcinogens. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. ***Mutat. Res.***204: 379-406, 1988.

CASTELAIN, P.; VAN-HUMMELEN, P.; DELEENER, A.; KISHER-VOLDERS, M.. Automated detection of citochalasin-B blocked binucleated lymphocytes for scoring micronuclei. ***Mutagenesis***, 8(3): 285-93, 1993.

CATENA, C.; CONTI, D.; DEL NERO, A. AND RIGHI, E. Inter-individual differences in radiation response shown by an *in vitro* micronucleus assay: effects of 3-aminobenzamide on X-ray treatment. ***Int. J. Radiat. Biol.***. 62 (6):687-94, 1992.

CHAGANTI, R. S. K. & HOULDSWORTH, J.. Fanconi anemia: a pleotropic mutation with multiple cellular and developmental abnormalities. ***Ann. Génetique***. 34 (3-4): 206-11, 1991.

CHERRY, L. M.; HSU, T. C.. Bleomycin-induces chromosome damage in lymphocytes of medullary thyroid carcinoma patients and their family members. ***Anticancer Res.***. 3: 361-72, 1983.

COUNTRYMAN, P. J. & HEDLLE, J. A.. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. ***Mutat. Res.***. 41: 321-32, 1976.

COOGLE, J. E. Radiation carcinogenesis. In: FARMER, P. B.; WALKER, J. M., eds.. ***The molecular basis of cancer***. Croon Helm, 1985.

CRUZ, A. D. da, McArthur, A. G.: Silva, C. C.; Curado, M. P.; Glickman, B. W. Human micronucleus counts are correlated with age, smoking, and cesium-137 dose in Goiânia (Brazil) radiological accident. ***Mutat. Res.***. 313: 57-68, 1994.

DEARFIELD, K. L.; HARRINGTON, B. K.; DOERN, C. L.; PARKER, L.; MOORE, M. M.. Genotoxicity of three pyridine compounds to L5178Y mouse lymphoma cells. ***Mutat. Res.***. 301: 57-63, 1993.

DOLOY, M. T.; MABARBET, J. L.; GUEDENEY, G.; BOURGUIGNONM, M.; LEROY, A.; RILLADOW, M. AND MASSE, R.. Use of unstable chromosome aberrations for biological dosimetry after the first postirradiation mitosis. ***Radiat. Res.***. 125: 141-51, 1991.

DUMAZ, N. DROUGARD, C.; SARASIN, A.; DAYA-GROSJEAN, L.. Specific UV-induced spectrum in the p53 gene of skin tumors from DNA-repair-deficient xeroderma pigmentosum patients. ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA***. 90: 10529-33, 1993.

EISELE, G.; BUR, W.; HUBNER, K. AND WACHOLTZ, B.. Current status of biological indicator to detedt and quantify previous exposures to radiation. ***Health Phys.***. 60: 103-9, 1991.

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP IPEN

73

ELLER, M. S.; YAAR, M. AND GILCHREST, B. A.. DNA damage and melanogenesis. ***Nature***. 372: 413-4, 1994.

EREXSON, G. L. KLINGERMAN, A. D.; HALPERIN, E. C.; HONORE, C. M.; ALLEN, J. W.. Micronuclei in binucleated lymphocytes of mice following exposure to gamma radiation. ***Envirom. Molec Mutagen***. 13: 128-32, 1989.

EVANS, H. J. Cytogenetic damage: thereshold effects and sensitivities. ***Radiat. Health.*** 179-89, 1987.

EVANS, H. J.; NEARY, G. J. AND WILLIAMSON, F. S.. The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxigen. Part II. Chromosome damage: the production of micronuclei. ***Int. J. Radiat. Biol.***. 3: 216-29, 1959.

FENECH, M & MORLEY, A.A.. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in vivo* ageing and low dose X-irradiation. ***Mutat. Res.***. 161: 193-8, 1986.

FENECH, M. & MORLEY, A. A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. ***Mutat. Res.*** 147:29-36, 1985 a.

FENECH, M. & MORLEY, A. A. The effect of donnor age on spontaneous and induced micronuclei. ***Mutat. Res..*** 148:99-105, 1985 b.

FENECH, M. & NEVILLE, S. Conversion of excision-reparaible DNA lesion to micronuclei within one cell cycle in human lymphocytes. ***Environ. Mol. Mutag.***. 19(1):27-36, 1992.

FENECH, M. Optimisation of micronucleus assay for biological dosimetry. ***Prog Clin Biol. Res.***. 372: 373-86, 1991.

FENECH, M.; DENHAM, J.; FRANCIS, W.; MORLEY, A.. Micronucley in cytokinesis-blocked lymphocytes of cancer patients following frationated partial-body radiotherapy. ***Int. J. Radiat. Biol.***. 57: 373-83, 1990.

FLIEDNER, T. M.; ANDREWS, G, A,M CRONKITE, E. D. AND BOND, V. P.. Early and late cytogenetic effect of whole body irradiation of human marrow. ***Blood***. 23: 471-87, 1964.

FRANCO,E. L.. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. ***Int. J. Cancer***. 43: 992-1000, 1989.

FRIEDMAN, R.J.; RIGEL, D.S.; KOPF, A.W.. Early detection of malignant melanoma: the role of physician examination and self-examination of the skin. ***Co-A Cancer J. Clinic.***. 35: 130-51, 1985.

FUCIC, A.; HORVAT, D. AND DIMITROVIC, B.. Mutagenicity of vinyl chloride in man: comparison of chromosome aberrations with micronucleus and sister-chromatid exchange frequencies. ***Mutat. Res.***. 240: 265-70, 1990.

FUHRMANN, C.; STREFFER, C.; MULLER, W., -U. BENDER, U.. Micronucleus assay prediction and application optimized by cytochalasin-B- induced binucleated tumor cells. ***Strahlenther Onkol.***. 168: 603-09, 1992.

GADELHA, M. J. P.. Tabagismo e câncer. ***J. Bras. Med.*** 59: 24-38, 1990.

GANTEMBERG, H.W.; WUTTKE, K.; STREFFER, C. AND MULLER, W. U. Micronuclei in human lymphocytes irradiated *in vitro* or *in vivo*. ***Radiati. Res.***. 128: 276-81, 1991.

GAO, Z. Q. Study on the effect of micronucleus with drinking water in the risk area of stomach cancer. ***Chung. Hua. Yu. Fang. I. Hsueg. Tsa. Chih.*** 23: 308-10, 1989.

GARAJ-VHROVAK, V. ; FUCIC, A. ; HORVAT, D. The correlation betwee the frequency of micronuclei and specific chromosome aberrations in human lymphocytes exposed to microwave radiation *in vitro*. ***Mutat. Res.***. 281(3):181-6, 1992.

GAREWALL, H.; MEYSKENS, F. JR.; FRIEDMAN, S.; ALBERTS, D.; RAMSEY, L.. Oral Cancer prevention: the case for carotenoids and anti-oxidant nutrients. ***Prev. Med.***. 22: 701-11, 1993.

GOLDBERG, M. T. & SCHOP, R. N. Assessment of 1,2-dimethylhydrazine in bone marrow micronucleus assay: variation in protocol and response. ***Environ. Mol. Mutag.***. 17(3):155-162, 1991.

GREENBERG, P. H.. Tumor Immunology. In:. Stiles, D. P.; Stobo, J. D.; Wells, J. V. Eds.. ***Basic and Clinical Immunology***. Appleton and Lange Norwale, Connecticut; Los Altos, California. 1987, pp 186-192.

HAENSEN, S.; TIMMERMANS, M.; KIRSCH-VOLDERS, M,, Induction of micronuclei and kariotype aberrrations during *in vivo* mouse skin carcinogenesis. ***Carcinogenesis***. 14: 2319-27, 1993.

HAKODA, M.; AKIYAMA, M.; KYOIZUMI, S.;AWA, A.A.; YAMAKIDO, M.; OTAKE M.. Increased somatic cell mutant frequency in atomic bomb survivors. ***Mutat. Res.***, 201: 39-48, 1988.

HALL, S.C. AND WELLS, J.. Micronuclei in human lymphocytes as a biological dosemeter: preliminary data following beta irradiation "*in vitro*". ***J. Radiol. Prot.***. 8(2): 97-102, 1988.

HAUSEN, H.. Viruseis in human cancers. ***Science***, 254:1168-72, 1991.

HANDO, J. C.; NATH, J. AND TUCKER, J. D.. Sex chromosomes, micronuclei and aging in women. ***Chromosoma***. 103: 186-92, 1994.

HEDDLE, J. A.; CIMINO, M. C.; HAYASHI, M.; ROMAGDA, F.; SHELBY, M. D.; TUCKER, J. D.; VAMPARYS, Ph; MACGREGOR, J. T.. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. ***Environ. Mol. Mutag***. 23: 128-31, 1991.

75

HENDEE, W. R.. Management of individuals accidentally exposed to radiation of radioative materials. ***Semin. Nucl. Med..*** 16: 203-10, 1986.

HENDERSON, B. E.; ROSS, R. K..; PIKE, M. C.. Toward the primary prevention of cancer. ***Science***, 254: 1131-37, 1991.

HERRERA, L. A.; OSTROSKY-WEGMAN, P.; SCHIFFMANN, D.; CHEN, Q. Y.; ZIEGLER-SKYLAKAKIS, K.; ANDRAE, U.. The inseticide buprofezin induces morphological transformation and kinetochore-positive micronuclei in cultured Syrian Hamster embryo cells in the absence of detectable DNA damage. ***Mutat. Res..*** 303:121-5, 1993.

HOGSTEDT, B.. Micronuclei in lymphocytes with preserved cytoplasm. A method for assessmentof cytogenetic damage in man. ***Mutat. Res..*** 130: 63-72, 1984.

HOLLSTEIN, M.; SIDRANSKY, D.; VOGELSTEIN, B.L; HARRIS, C. C.. p53 mutations in human cancers. ***Science***. 253: 49-53, 1991.

HSU, T. C..Genetic predisposition to cancer with spetial reference to mutagen sensitivity. ***IN VITRO***, 23: 591-603, 1987.

HSU, T. C.; CHERRY, L. M.; SAMAAN, N. A.. Differential mutagen susceptibility in cultured lymphocytes of normal individuals and cancer patients. ***Cancer, Genetic. Cytogenetic..*** 17: 307-13, 1985

HSU, T. C.; JOHNSTON , D. A.; CHERRY, L. M.; RAMKISSOON, D.; SCHANTZ, S. P.; JESSUP, J. M.; WINN, R. J.; SHIRLEY, L.; FURLONG, C.. Sensitivity to genotoxic effects of bleomycin in humans: possible relationship to environmental carcinogenesis. ***Int. J. Cancer***. 43: 403-09, 1989.

HUBER, R.; BRASELMANN, H. AND BAUCHINGER, M.. Screening for individual differences in radosensitivity by means of the micronucleus assay in human lymphocytes. ***Radiat. Environ. Biophys..*** 28: 113-20, 1989.

HUBER, R.; STRENG, S. & BAUCHINGER, M.. The suitability of the human lymphocytes micronucleus assay system for biological dosimetry. ***Mutat. Res..*** 111: 185-93, 1983.

IKUSHIMA, T.. SCE enigma: Methodology, mechanism and meaning of sister chromatid exchange. ***Annu. Rep. Res. Reactor Inst. Kyoto Univ..*** 22: 57-77, 1989.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Biological Dosimetry: chromosomal aberration analysis for dose assessment. ***IAEA***, Vienna, 1986.

ISHII, A.; MATSUOKA, H.; AJI, T.; OHTA, N.; ARIMOTO, S.; WATAYA, Y.; HAYATSU, H.. Parasite infection and cancer: with special emphasis on *Schistosoma japonicum* infections (Trematoda). A reviw. ***Mutat. Res..*** 305: 273-81, 1994.

JAGETIA, G. C. & GANOPATHI, N. G.. Radiation-induced micronucleus formation in mouse bone morrow after low dose exposures. ***Mutat. Res.***. 304: 235-42, 1994.

JONG, J. DE; SITTERT, N. J. VAN AND NATARAJAN, A. T. Cytogenetic monitoring of industrial populations potencilly exposed to genotoxic chemicals and of control population. ***Mutatation Research.*** 204: 451-64, 1988.

KAMB, A.. Sun protection factor p53. ***Nature***. 372:730-1, 1994.

KHADZIDEKOVA, V. Frequency of micronucleus in lymphocytes from *in vitro* gamma irradiated human peripheral blood. ***Radiobiology and Radiotherapy***.30: 157-61, 1989.

KIHLMAN, B. A.; HANSON, K.; PALITTI, F.; ANDERSON, H. C.; HARTLEY, Asp. B.. Potentiation of induced chromatid-type aberrations by hydroxyurea and caffeine in G2. In: NATARAJAN, A. T.; OBE, G. ; ALTMANN, H. (eds). ***Progress in Mutation Research***. 4. Amsterdam Elsevier Biomedical. 1982, pp 11-24.

KONDO, S.. Mutation and cancer in relation to the atomic-bomb radiation effects. ***Jpn. J. Cancer Res. (Gann)***. 79: 785-99, 1988.

KORMOS, C. & KOTELES, G. J.. Various chromosome aberrrations in lymphocytes for dose assessments in radiation accidents. ***Radiat. Prot.***. Paper presented at International Symposium Dubrovnik, 2-6 October, 1989.

KORMOS, C. & KOTELES, G.J.. Micronuclei in X-irradiated human lymphocytes. ***Mutat. Res.***. 199: 31-5, 1988.

KRAMER, J. ; SCHAICH-WALCH, G. & NUSSE, M. DNA synthesis in radiation-induced micronucleus studied by bromodeoxyuridine (BrdUrd) labelling and anti BrdUrd antibodies. ***Mutagenesis***. 5(5):491-95, 1990.

KRATOCHVIL, M.; RUMMELEIN, B.; REIMERS, U.; EHLERT, U.; WEICHENTHAL, M.; MENSING, H.; BREITBART, E. W AND RUDGER, H. W.. Constitutively increase micronuclei are predominantly caused by acentric fragments. ***Mutat. Res.***. 249: 223-6, 1991.

KRISCHNAN, K. & BRODEUR, J.. Toxic interactions among environmental pollutants: corroborating laboratory observations with human experience. ***Environ. Health Persp***. 102: 11-7, 1994.

LANE, D. P.. A death in the life of p53. ***Nature***. 362: 786-7, 1993.

LITTLEFIELD, L. G.; SAYER, A. M.; FROME, E. L.. Comparison of dose-response parameters for radiation-induced acentric fragments and micronuclei observed in cytokinesis-arrested lymphocytes. ***Mutagenesis***. 4: 265-70, 1989.

LLOYD, D. C. & EDWARDS, A. A.. Biological dosimetry after irradiation accidents. ***Chromosome Aberration - basic and applies aspects***. 21: 213-24, 1990.

77

LLOYD, D. C.; PURROT, R. J.; DOLPHIN, G. W. & EDWARDS, A. A.. Chromosome aberrations induced in human lymphocytes by neutron irradiation. ***Int. J. Radiat. Biol.***. 29: 169-82, 1986.

LOHMAN, P. H. M.; JANSEN , J. D.; BAAN, R. A.. Comparison of various methodologies with respect to specificity and sensitivity in biomonitoring occupational exposure to mutagens and carcinogens. In: International Agency Research on Cancer. Monitoring human exposure to carcinogenic and mutagenic agents. Berli, A.; Draper, M.; Hemminki, K., Vanio, H..1984. Lyon. IARC Scientific Publications, 59.

LOOMIS, D. P.; SHY, C. M.; ALLEN, J. W.; SACCOMANNO, G.. Micronuclei in epithelial cells from sputum of uranium works. ***Scan. J. Work Environ. Health***. 16: 355-62, 1990.

LOPES, E.R.; MENDONÇA, G.A. E S.;GOLDFARB, L. M. DA C. E S.; AGUINAGA, S.; SILVA, V.L. DA C. E; MATTOS, I. E.; CURADO, M. P.; SAKAMOTO, L.H.; FONSECA, L. A. M.; TABAK, D.; SIQUEIRA M. DO S. N. DE; RUMJANEK, V.M.; ROSEMBERG, J.; MORAES, M.DO S. A. DE; BORGES, N. F.; CARDOSO, V. M. E ETGES, V.E.. ***Revista Brasileira de Cancerologia.*** 38(1): 35-64, 1992. (*Apud* Mendonça *et al*, 1992)

LOPEZ, I.; HILALI, A.; VERCHAEVE, L.; LAURENT, CH.; BUGUENO, C.; LEONARD, E. D.; MAES, A.; JADOT, P.; GOENS, G.; SANHUEZA, S.; SUAREZ, J.; GERBER, G. B. AND LEONARD, A.. Influence of blood storage afterr *in vitro* exposure on the yield of micronuclei observed in human lymphocytes. ***Strahlenther. Onkol.***. 169: 258-62, 1993.

MADRUGA, M. R.; PEREIRA, C. A. DE B. & RABELLO-GAY, M. N..Bayesian dosimetry: radiation dose versus frequencies of cells with aberrations. ***Environmetrics***. 5: 47-56, 1994.

MAVOURNIN, K. H.; BLAKEY, D. H.; CIMINO, M. C.; SALAMONE, M. F. & HEDDLE, J. A.. The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. ***Mutat. Res.***. 239: 29-80, 1990.

MCFEE, A. F.; COOK, S. B. & ABBOTT, M. G.. Negative dose-response relationship for radiation induced micronuclei in polychomatic reythrocytes of mice. ***Environ. Mol. Mutat.***. 23: 128-31, 1994.

MENDONÇA, G. A. E S.; PINHEIRO, L. R.; DA SILVA, M. G. C.; GADELHA, M. I. P. E TEIXEIRA, M. T. B.. ***O problema do Câncer no Brasil. Ministério da Saúde***, Instituto Nacional de Câncer, Coordenação de Programa de Controle de Câncer (Pro-Onco): 1-43, 1992.

MIGLIORE, L.; PARRINI, M.; SBRANA, I.; BRAGINI, C.; BATAGLIA, A.; LOPRIENO, N.. Micronucleated lymphocytes in people occupationally exposed to potential environmental contaminants: the age effect. ***Mutat. Res.***. 256: 13-20, 1991.

MILANACHE, D.; STEFANESCU, D. T.; MOTORI, I.; CONSTANTINIU, L.; COSTACHE, A.; DUMITRESCU, A.. Micronucleus test applied in patients with acute leukemia, before and at different intervals during the cytostatic treatment. Morphol. Embryol. Bucur. 35: 209-15, 1989.

MILLER, A. C.; GAFNER, J.; CLARK, E. P. AND SAMID, D.. Differences in radiation-induced micronuclei yields of human cells: influence of ras-gene expression protein localization. ***Int. J. Radiat. Biol.***. 64: 547-54, 1993.

MIRKOVA, E. T.& LALCHEV, S. G. The genetic toxicity of the human carcinogens benzidine and benzidine-based dyes: chromosomal analysis in exposed workers. ***Prog. Clinic. Biol. Res.***. 304: 397-405, 1990.

MITCHELL, J.C. & NORMAN, A.. The induction of micronuclei in human lymphocytes by low doses of radiation. ***Int. J. Radiat. Biol.***, 52: 527-35, 1987.

MOLLS, M.; BEUNINGEN, D. VAN & STREFFER, C. The micronuclei assay in biological dosimetry. ***bga-Schriffen***. 2:248-52,1986.

MONAKHOV, A. S.. The mutagenic and carcinogenic effects of Sulfur-35. ***Radiobiologiia***. 31: 139-42, 1991.

MULLER, W. U. & STREFFER, R. C.. Biological indicators for radiation damage. ***Int. J. Radiat. Biol.***. 59: 863-73, 1991.

NATARAJAN, A. T.. Origin and significance of chromosome alterations. In:. Ed Obe, G.. ***Mutation in Man***. 1984, Springer-Verlag. Berlin Heidelberg.

NATARAJAN, A. T.; DARROUDI, F.; MULLENDERS, L. H. F. AND MEYERS, M.. The nature and repair of DNA lesions that lead to chromosome meal aberrations induced by ionizing radiation. ***Mutation Research***. 160: 231-236, 1986.

NATH, C. J. AND ONG, T. Micronuclei assay in cytokinesis-blocked binucleated and conventional mononucleated methods in human peripheral lymphocytes. ***Teratog. Carcinog. Mutag.***. 10:273-9, 1990.

NUSSE, M.; KRAMER, J. & MILLER, B. M.. Factors influencing the DNA content of radiation-induced micronuclei. ***Int.l J. Radiat. Biol.***. 62: 587-602, 1992.

OLDINI , C., MALUSARDI, G.; GROSSI, L.; CHIARELLI, G.. Role of beta-carotene in the prevention of genotoxic damage in patients undergoing radiotherapy monitoring by the micronucleus test in exfoliated cells of the oral cavity. ***Acta Otorhinolaryngol. Italiana***. 12: 435-41, 1992

PELTOMÄKI, P. AALTONEN, L. A.; SISTONEN, P.; PYLKKÄNEN, L.; MECKLIN, J. -P.; JÄRVINEN, H.; GREEN, J. S.; JASS, J. R.; WEBER, J. L.; LEACH, F. S.; PETERSEN, G. M.; HAMILTON, S. R.; DE LA CHAPELLE, A.; VOGELSTEIN, B.. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. ***Science***. 260: 810-2, 1993.

79

PIETRZAK-FLIS, Z; ROSTEK, J.; LADA, W.. Estimation of ^{137}Cs and ^{134} Cs body burden in Warsaw after the Chernobil accident. ***Radiat. Prot. Dosim.***. 25: 101-5, 1988.

PURROT, R. J.; VULPIS, N.; LLOYD, D. C.. The use of harlequin staining to measure delay in the human lymphocytes cell cycle induced by *in vitro* X-irradiation. ***Mutat. Res.*** 69: 275-82, 1980.

PRESTON, D.S. & STERN, R.S.. Nonmelanoma cancers of the skin. ***New England J. Med.***. 327: 1649-62, 1992.

PROSSER J. S.; MOQUET, J. E.; LLOYD, D. C.; EDWARD, A. A.. Radiation induction of micronuclei in human lymphocytes. ***Mutat. Res.***. 199: 37-45, 1988.

RAMALHO, A. T.; NASCIMENTO, A. C. E.; PAIVA, S. L. C..Casos de superexposição à radiação ionizantes ocorridos no Brasil e investigados por análise de aberrações cromossômicas no período de 1984-1990. ***Rad. Bras.***. 24: 199-202, 1991.

RAMALHO, A.; SUNJEVARIC, I. AND NATARAJAN, A.T. Use of the frequencies of micronuclei as quantitative indicators of X-ray-induced chromosomal aberrations in human peripheral blood lymphocytes: comparison of two methods. ***Mutat. Res.***. 207:141-6, 1988.

REALI, D.; MARINO, F. DI; BAHRAMANDPOUR, S.; CARDUCCI, A.; BARALE, R.; LOPRIENO, N.. Micronuclei in exfoliated urothelial cell and urine mutagenicity in smokers. Mutat. Res. 192: 145-9, 1987.

REN, L.; YANG, J.; ZHANG, H. Use of citokinesis-block micronucleus method in mouse splenocytes. ***Mutat. Res.***. 262:119-24, 1991.

RIBEIRO, L- R.; CERQUEIRA, E. M.; SALVADORI, D. M.; BARBOSA, H. S.; WHORTON, E. B. JR.. Biomonitoring of individuals occupationally exposed to aromatic amines. ***Prog. Clinic. Biol. Res.***. 340: 387-96, 1990.

ROSER, M; FRENZER, S.;SCHIMIDT-PREUSS, U.; REIMERS, U.; WEINCHENTHAL, M.; BREITBART, E. W. AND RUDGER, H. W.. Chromosome instability in patients with malignant melanoma of the skin. ***Onkologie***. 12:286-90, 1989.

ROSER, M.; BOHM, A.; OLDIGS, M.; WEICHENTHAL, M.; REIMERS, U.; SCHIMIDT-PREUSS, U.; BREITBART, E. W.; RUDGER, H.W.. Ultraviolt-induced formation of micronuclei and sister chromatid exchage in cultured fibroblasts of patients with cutaneous malignant melanoma. ***Cancer Genet. Cytogenet.***. 41: 129-37, 1989b.

ROSIN, M. P.; ANWAR, W. A.; WARD, A. J.. Inflamation, chromosomal instability and cancer: the Schistosomosis model. ***Cancer Res.***. 1929-33, 1994.

ROSIN, M. P.. Genetic alterartion in carcinogenesis and chemotherapy. ***Environ. Health Presp***. 101: 253-6, 1993.

ROSIN, M. P.; RAGAB, N. F.; ANWAR, N. AND SALAMA, S. I.. Localized induction of micronuclei in the oral mucosa of xeroderma pigmentosum patients. ***Cancer Lett.***. 81: 39-44, 1994.

ROSIN, M.P. AND GILBERT, A. M.. Modulation of genotoxic effects in humans. In: Mendelson, M. L. and Albertini, R. J. (eds), Modulation and the Environment, part E: ***Environmental Genotoxicity, Risk and Modulation***, Wiley-Liss, New York. , 1990 pp: 351-60.

RUMELL, D.. Razões de mortalidade frente ao efeito desigualdade em estudos de mortalidade associada a categorias ocupacionais e níveis sociais. ***Rev. Saúde Públ.***. 22: 335-40, 1988.

RUSSELL, L. B.. Death and chromosome damage from irradiation of preimplantation stages. In: Wolstenhome GEW, O´Connor, M. (Eds.): ***"Preimplantation Stages of Pregnancy".*** London: J & A Churchill Ltd.. 1965. pp 217,.

SAFAI, B & KOZINER, B.. Malignant neoplasm in AIDS. In: De Vita Jr., V.T.. ***AIDS: etiology, diagnosis, treatment and prevention***. Philadelphia, J.B. Lippincott, 1985, pp. 213-222.

SAKAHARA, H.; ONO, K.; SAGA, T.;AKUTA, K.; ENDO, K.; KONISHI, J AND ABE, M.. Hepatocyte response to continuous low dose-rate radiation in radioimmunotherapy assessed by micronucleus assay. ***Int. J. Radiat. Biol.***, 62:443-8, 1992.

SALIKHOVA, R. A.; UMNOVA, N. V.; FOMINA, M. M.; POROSHENKO, G. G.. An antmutagenicity study of bioginseng. ***Izv.Akad.Nauk.Serv.Biol.***. 1: 48-55, 1994.

SAN, R. H. C.; ROSIN, M. A.; SEE, R. H., DUNN, D. P. AND STICH, H. F.. Use of urine for monitoring human exposure to genotoxic agents. In: Wang, R. G. M., Franklin, C. A., Honeycutt, R. C. & Reinert, J. C. (eds). ***Biological Monitoring for Pesticid Exposure Measurement, Estimation and Risk Reduction.*** Americam Chemical Society, Washington, D.C., 1989. pp: 98-116.

SARTO, F.; TOMANIN, R.; GIACOMELLI, L.; IANNINI, G.; CUPIRAGGI, A. R.. The micronucleus assay in human exfoliater cells of the nose and mouth: application to occupational exposures to chronic aci and ethilene oxid. ***Mutat. Res.***. 224: 345-51, 1990.

SASAKI, M. S.. Cytogenetic aspects of cance-predisposing genes. ***Japan J. Hum. Genet.*** 34:1-16, 1989.

SAVAGE, J. R. K.. A comment on the quantitative relationship between micronuclei and chromosomal aberrations. ***Mutat. Res.***. 207: 33-6, 1988.

81

SCHANTZ, S. P.; HSU, T. C.. Mutagen-induced chromosome fragility within peripheral blood lymphocytes of head and neck cancer patients. ***Head & Neck*** VII: 337-42, 1989.

SCHANTZ, S. P.; HSU, T. C.; AINSLIE, N.; MOSER, R. P.. Young adults with head and neck cancers express uncreased susceoptibility to mutagen-inducd chromosome damage. ***JAMA***. 262: 3313-5, 1989.

SCHANTZ, S. P.; SPITZ, R.; HSU, T. C.. Mutagen sensitivity in patients with head and neck cancer: a biological marker for risk of multiple primary malignancies. ***J. Natl. Cancer Inst***. 82: 1773-5, 1990.

SCHIMID, E. & BAUCHINGER, M.. Analysis of primary process in the formation of acentric fragments. ***Radiat. Environ. Biophys***. 17: 143-9, 1980.

SETLOW, R.B. Repair deficient human disorders and cancer. ***Nature*** 271: 713-7, 1978.

SEVAN´KAEV, A. V.. Current status of the problem of quantitative estimation of cytogenetic effects of low doses of radiatio. ***Radiobiologiia***. 31(4): 600-5, 1991.

SHELBY, M. D.; EREXSON, G. L.; HOOK, G. J. AND TICE, R. R.. Evaluaton of a three-exposure mouse bone marrow micronucleus protocol: results with 49 chemicals . ***Environ. Mol. Mutag.***. 21: 160-79, 1993.

SINUÉS, B.; NUNEZ, E.; BERNAL, M.L.; ALCALA, A. SAENZ, M. A.; CONDE, B.. Micronucleus assay in biomonitoring of patients undergoing excretory urography with diatrizoate and ioxalate. ***Mutat. Res.***. 260: 337-42, 1991.

SRIVASTAVA, S.; ZOU, Z.; PIROLLO, K.; BLATTNER, W.; CHANG, E. H.. Germ-line transmission of a mutate p53 gene in a cancer prone family with Li-Fraumeni syndrome. ***Nature***. 348: 747-9, 1990.

STELLMAN, J. M & DAUN, S. M.. Trabalho e saúde na indústria; riscos físicos e químicos e prevenção de acidentes. São Paulo, EPU, 1975.

STERLING, T. D.; ROSENBAUM, W. L.; WEINKAN, J. J.. Risk attribution and tobacco-related death- reply. ***Am. J. Epidem***. 140: 1053-4, 1994.

STICH, H. F. & ROSIN, M. P.. Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consuption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. ***Int. J. Cancer***. 31: 305-8, 1983

STICH, H. F. The beneficial and hazardous effects of simple phenolic compounds. ***Mutat. Res.***. 259 (3-4): 307-24, 1991.

STICH, H. F.; CURTIS, J. R.; PARIDA, B. B.. Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups : tobacco chewers. ***Int. j. Cancer***. 30: 553-9, 1982.

STREFFER, C.. Is the micronucleus assay predictive foe cellular radiosensitivity? ***Br. J. Radiol.***. 66 (suppl. 24): 70-3, 1993.

SUGIMURA, T. Multistep carcinogenesis: a 1992 perspective. ***Science***,258:603-07, 1992.

SPITZ, M. R.; FUEGER, J. J.; BEDDINGFIELD, N. A.; ANNEGERS, J. F.; HSU, T. C.; NEWELL, G. R.; SCHANTZ, S. P.. Chromosome sensitivity to bleomycin-induced mutagenesis, an independent risk factor for upper aerodigedtive tract cancer. Cancer Res. 49: 4626-8, 1989.

STICH, H. F. & ROSIN, M. P. Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consuption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. ***Int. J. Cancer***. 31: 305-8, 1983.

SUGIMURA, T.. Multistep Carcinogenesis: a 1992 prespective. ***Science***. 258: 603-7, 1992.

TAYLOR, A. M. R.. The effect of radiation on the chromosomes of patients with an unusual cancer susceptibility. In: TAKAOKI ISHIHARA & MASAO S. SASAKI. ***Radiation-induced chromosome damage in man***. Alan R. Liss, Inc., New York, 1983, 636 p.

THIERENS, H.; VRAL, A.; DE RIDDER, L. Biological dosimetry using the micronucleus assay for lymphocytes: interindividual differences in dose response. ***Health Phys.***. 61(5): 623-30, 1991.

TOLBERT, P. E.; SHY, C. M.; ALLEN, J. W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears:a field test in snuff user. ***Am. J. Epidem.*** .134(8): 840-50, 1991.

TOMANIN, R.; BALLARIN, C; NARDINI, B.; MASTRANGELO, G.; SARTO, F.. Influence of smoking habit on frequency of micronuclei in human lymphocytes by the cytokinesis-block method. ***Mutagenesis***. 6(2): 123-6, 1991.

VALE, J. C. DO. AIDS e câncer. In: Corrêa Lima, M. B.. ***AIDS-SIDA Síndrome da imunodeficiência adquirida***. Rio de Janeiro. Médica e Científica, 1986, pp 95-108.

VICTORA, C. G. Hot beverages and oesophageal cancer in Southern Brazil: a case-control study. ***Int. J. Cancer***. 39: 710-6, 1987.

VITA, JR. V. T. DE. ***Cancer: principles and practice of oncology***. Philadelphia, J. B. Lippincott Co. 1985, 2v., 2344 p. (2a Ed.)/ 1989 1v., 2490 p. (3a. Ed).

WAGNER, R.F.; LAWITZ, B.B.; CASCIATO, D.A. Skin Cancers. In: Casciato, D.A., Lowitz, B.B., Eds.: ***Manual of Clinical Oncology***, Boston: Little, Brown and Company, 2nd ed., pp 250-259, 1988

WINN, D. M.. Diet and nutrition in the etiology of oral cancer. ***Am. J. Clinic Nut***. 61: 437-45, 1995.

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP

83

WINN, R. J. & HONG, W. K.. Reduction on oral mucosa micronuclei frequency following alpha-tocopherol treatment of oral leucoplakia. ***Cancer Epidem. Biol. Prev.***.3: 73-6, 1991.

WOLF, S..Biological dosimetry with cytogenetic endpoints. ***Prog. Clinic Biol. Res.***. 372: 351-62, 1991.

XUE, K.X.; SHEN, Z. L.; MA, G. J.. Comparative studies of cytokinesis-block and conventional micronucleus test in human lymphocytes cultured in vitro.II genotoxical effects of mitomicin C. ***I. Chuan. Hsueh. Pao.***. 18: 401-6, 1991.

XUE, K.X.; WANG, S.; MA, G.J.; ZHOW, P.; WU, P.Q.; ZHANG, R.F.; XU, Z.; CHEN, W. S. AND WANG, Y.Q.. Micronucleus formation in peripheral blood lymphocytes from smokers and the influence alcohol and tea drinking habits. ***Int. J. Cancer.*** 50(5): 702-5,1992.

ZETTEMBERG, G. & GRAWE, J.. Flow cytometric analysis of micronucleus induction in mouse erythocytes by gamma irradiation at very low dose rates. ***Int.I J. Radiat. Biol.***. 64(5): 555-64, 1993.

ZHANG, L. F.; HEMMINKI, K.; SZYFTER, W.; SORDEKVIST, P.. p53 mutations in larynx cancer. ***Carcinogenesis.*** 15: 2949-51, 1994.

ZIEGLER, A.; JONASON, A. S.; LEFFELL, D. J.; SIMON, J. A.; SHARMA, H. W.; KIMMELMAN, J.; REMINGTON, L.; JACKS, T.; BRASH, D.. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. ***Nature.*** 372: 773-6, 1994.