



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA**  
**CELULAR**

**LUIZ RAIMUNDO CAMPOS DA SILVA E CUNHA JÚNIOR**

**INVESTIGAÇÃO DE EFEITOS MUTAGÊNICOS EM TRABALHADORES**  
**EXPOSTOS À RADIAÇÃO IONIZANTE NO BRASIL**

**BELÉM-PA**

**2015**

LUIZ RAIMUNDO CAMPOS DA SILVA E CUNHA JÚNIOR

**INVESTIGAÇÃO DE EFEITOS MUTAGÊNICOS EM TRABALHADORES  
EXPOSTOS À RADIAÇÃO IONIZANTE NO BRASIL**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Rommel Mario Rodriguez Burbano

BELÉM-PA

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA  
CELULAR

INVESTIGAÇÃO DE EFEITOS MUTAGÊNICOS EM TRABALHADORES  
EXPOSTOS À RADIAÇÃO IONIZANTE NO BRASIL

Tese de doutorado submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação de Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

Orientador:

---

Prof. Dr. Rommel Mario Rodriguez Burbano  
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA.

Banca examinadora:

---

Prof. Dra. Maria Helena Tomas Maia  
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA.

---

Profa. Dra. Danielle Feio da Costa  
Universidade do Estado do Pará, UEPA

---

Prof. Dr. André Salim Khayat  
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

BELÉM-PA

2015

“Lute com determinação,  
abraça a vida com paixão,  
perca com classe e vença  
com ousadia, porque o  
mundo pertence a quem se  
atreve e a vida é muito bela  
para ser insignificante.”

–Charles Chaplin

“O impossível é uma questão  
de opinião e disso, só os  
loucos sabem”

-Charlie B. Jr

## AGRADECIMENTOS

Ao nascer, o ser-humano é totalmente dependente... precisa de ajuda até mesmo para dar o primeiro suspiro. Para aprender a falar, caminhar e até a se alimentar, precisa de orientação durante anos. Por isso, antes de mais nada, agradeço aos meus pais pelos primeiros passos e passos posteriores, quando, sem saber ainda, ao me encher de boa música e incentivar a sempre buscar saber e ler mais, estavam me preparando a chegar a este dia. Valeu Mae! Valeu Pai!

Ao meu orientador, o professor e amigo, Dr. Rommel Burbano, que não só me cedeu o espaço e as condições para concluir esta louca ideia, como, muitas vezes sem saber, me fez perceber que, para ser bom em algo, pode ser silenciosa e humildemente, através da forma mais difícil: através de exemplos.

Nos últimos anos, eu tive o prazer e o privilegio de fazer parte do Laboratório de Citogenética Humana (ao qual eu espero continuar fazendo parte ainda por um tempo) e construí muitas das mais valorosas amizades, e foi onde aprendi que um ambiente de trabalho produtivo não precisa de competitividade interna, mas de apoio, confiança e boas risadas. Valeu GDP!

Minhas queridas alunas de IC Adryan (agora mestranda) e Camila, que até algum tempo atrás não sabiam sequer a fazer uma pesagem e agora, até ensinam! Foram muitas horas de bancada e microscópio e sem vocês, com certeza, não só teria menos graça, como seria bem mais difícil cumprir esta tarefa. Tenho orgulho de vocês!

Ao CONEP, por me fazer provar a mim mesmo que minha paciência pode ser testada quase que infinitamente e por me provar de forma estatisticamente significativa que fazer e trabalhar com ciência no Brasil requer perseverança.

Aos quase cem trabalhadores da área da radiologia nos Estados em que estive presente, em especial ao grupo de Ribeirão Preto e Porto Alegre, que me mostraram que hospitais públicos podem ser bons e me fizeram perguntar o por que de dar certo lá e não aqui.

À professora Lusania da USP Ribeirão e ao professor Bacelar e sua equipe em Porto Alegre pelo acolhimento, incentivo e suporte.

Ao bar do Jorge, por vender cerveja barata e me fazer lembrar que o ambiente universitário não se limita as salas ou laboratórios.

Aos amigos do Yvon Costa, por me fazer lembrar que amigos vão e vem, mas os melhores, sempre ficam e nem tempo nem distância (ou até mesmo opinião política) rompem o elo de amizade.

Ao Bob Marley

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

### **INSTITUIÇÕES**

- Universidade Federal do Pará (UFPA) – Laboratório de Citogenética Humana e Genética Toxicológica, Instituto de Ciências Biológicas.
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, SP.
- Hospital Risoleta Tolentino Neves, Belo Horizonte, MG.
- Hospital Universitário João de Barros Barreto, UFPA, PA
- Hospital de Clínicas de Porto Alegre, UFRG, RS

### **FONTES FINANCIADORAS**

- Comissão Nacional de Energia Nuclear, (CNEN) – bolsa de doutorado.
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## SUMÁRIO

<b>INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS.....</b>	<b>iii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS .....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>ix</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>x</b>
<b>I. CONSIDERAÇÕES GERAIS .....</b>	<b>1</b>
1. HISTÓRICO e CONCEITOS.....	2
2. RADIOLOGIA COMPUTADORIZADA (CR) E RADIOLOGIA DIGITAL (DR)	7
3. EVOLUÇÃO DOSE/EFEITO .....	10
4 BIOMONITORAMENTO .....	13
4.1 MICRONÚCLEO COMO FERRAMENTA DE BIOMONITORAMENTO.....	15
4.2 ENSAIO DO COMETA COMO FERRAMENTA DE BIOMONITORAMENTO.....	18
4.3 FREQUÊNCIA DE ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS.....	20
<b>II. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>22</b>
<b>III. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
1 OBJETIVO GERAL.....	23
2. OBJETIVO ESPECÍFICO .....	23
<b>IV. METODOLOGIA .....</b>	<b>23</b>
1. AMOSTRAS .....	24
2 SELEÇÃO DE VOLUNTÁRIOS .....	25
3. OBTENÇÃO DE SANGUE.....	25
4 TÉCNICA DE CULTURA TEMPORÁRIA DE LINFÓCITOS.....	26
5. ENSAIO COMETA (VERSÃO ALCALINA).....	27
5.1 PREPARAÇÕES DAS LÂMINAS.....	27
5.2 ELETROFORESE.....	28
5.3 COLORAÇÃO .....	28
5.4 ANÁLISE DE LÂMINAS.....	28
6 TESTE DO MICRONÚCLEO .....	29
6.1 CRITÉRIOS PARA ANÁLISE DAS CÉLULAS (FENECH, 2000) .....	30
6.2. ANÁLISE DAS PONTES NUCLEOPLASMÁTICAS .....	31
6.3. ANÁLISE DO ÍNDICE DE DIVISÃO NUCLEAR (IDN) .....	30

7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
<b>V. RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
1. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
<b>VI. DISCUSSÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>VII. CONCLUSÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>45</b>
<b>ANEXO I – Termo de Aceite para co-participação do Hospital Barros Barreto.....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXO II – Termo de Aceite para co-participação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre .....</b>	<b>57</b>
<b>ANEXO III - Termo de Aceite para co-participação do Hospital Risoleta Neves.....</b>	<b>58</b>
<b>ANEXO IV - Termo de Aceite para co-participação do Hospital de Clínicas de Ribeirão Preto .....</b>	<b>59</b>
<b>ANEXO V - Termo de Aceite para co-participação do Hospital Betina Ferro .....</b>	<b>60</b>
<b>ANEXO VI- Parecer do CONEP .....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXO VIII – Questionário de pesquisa aos participantes .....</b>	<b>62</b>
<b>ANEXO IX - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....</b>	<b>63</b>
<b>ANEXO X – Artigo Publicado em conjunto com o grupo do Departamento de Análises Clínicas, toxicológicas e bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto .....</b>	<b>64</b>
<b>ANEXO XI – Artigo Publicado em It. J. of Env. Research and Public Health .....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXO XII – Capítulo de Livro, convidado, com revisão da técnica de cultura de linfócitos para análise de genotoxicidade .....</b>	<b>66</b>

**LISTAS DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

µl	Microlitro
µSv	Micro Sievert
AC	Aberrações Cromossômicas
CBMNT	Teste do Micronúcleo por Citocinese
CEP	Comissão de Ética em Pesquisa
CIT-B	Citocalasina B
CN	Grupo Controle Negativo
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CNS	Conselho Nacional de Saúde
dL	Decilitro
DEL	Dose Efetiva Limite
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNL	Dose Não Limite
EC	Ensaio do Cometa
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FISH	Hibridização in situ Fluorescente
g	grama
Gy	Grey
h	Horas
Iarc	International Agency for Research on Cancer
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
ICRP	International Comition of Radiological Protection
INCA	Instituto nacional do Câncer
kg	Kilograma
LSP	Linfócitos de Sangue Periférico
m <sup>2</sup>	metro quadrado
Max	Máximo
mg	Miligrama
Min	Mínimo
ml	Mililitro
mm <sup>3</sup>	Milímetro cúbico

MN	Micronúcleo
MNT	Teste do Micronúcleo
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PR	Proteção Radiológica
P&D	Pesquisa e desenvolvimento
QDF	Quebra de Dupla Fita
RI	Radiação Ionizante
rpm	Rotações por minuto
SUS	Sistema Único de Saúde
UFPA	Universidade Federal do Pará
USP	Universidade de São Paulo

**LISTA DE FIGURAS, TABELAS E QUADROS**

Figura 1 – Ampola de Crookes adaptada .....	2
Figura 2 – Imagem de Aparelho de Fluoroscopia .....	3
Quadro 1 – Níveis de dose de RI para trabalhadores e publico .....	6
Figura 3 – : Amostra do conjunto de monitor, acoplado ao aparelho de CR.....	8
Figura 4 – Representação da célula com três núcleos e presença de MN .....	17
Figura 5 – Presença de ponte binucleada .....	18
Quadro 2 – Potencial carcinogênico de elementos estudados pelo teste MN e EC.....	19
Figura 5 – Esquema sugerido para uso de EC e MN em testes de genotoxicidade .....	23
Figura 6 – Fotomicrografia mostrando os níveis de dano analisados pelo EC.....	28
Tabela 3 – Caracterização de indivíduos participantes .....	30
Tabela 1 – características dos indivíduos participantes em Ribeirão Preto.....	31
Tabela 2 – características dos indivíduos participantes em Porto Alegre.....	32
Tabela 3 – características dos indivíduos participantes em Belém.....	32
Tabela 4 – características dos indivíduos participantes em Belo Horizonte .....	33
Quadro 3: Frequência média de MN, AC e EC (por índice de dano).....	34
Quadro 4 – Diferenças das amostras com controle e indivíduos expostos .....	35
Histograma de amostras para MN.....	37

## RESUMO

As radiações ionizantes (RI) estão presentes na maioria dos diagnósticos precoces de uma infinidade de doenças, muitos tipos de câncer estão inclusos, e têm a característica de um diagnóstico rápido e preciso e, muitas das vezes, mais barato. A utilização deste tipo de energia no entanto, requer de cuidados de proteção específicos, uma vez que as RI tem a característica de alterar o material genético, através de mutações.

Os operadores da área da radiologia em hospitais são a classe de trabalhadores que está exposta de forma mais direta e, portanto, são alvos de investigações que podem auxiliar no entendimento da interação das RI com o material biológico, além de auxiliar a estes profissionais no requisito de proteção radiológica.

Foram coletadas 75 amostras de indivíduos que trabalham em vários departamentos da radiologia em 5 hospitais de 4 Estados diferentes no Brasil (São Paulo, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Pará). Os critérios de seleção para a participação foram: ter ao menos 18 anos de idade e 2 anos de profissão, não ser etilista ou tabagista, não estar tomando medicamentos. Para análise citogenética, foram realizados os testes do cometa e Micronúcleo, assim como estudo de aberrações cromossômicas. Este estudo foi avaliado e aprovado por comitê de ética.

Todas as amostras foram comparadas com indivíduos do mesmo gênero e idade que não tenham passado por qualquer tipo de exame radiológico nos últimos 6 meses. Quando comparados com o controle, os testes de MN e AC demonstraram uma totalidade de danos, usando o teste T, o banco de dados SPSS e bioestat. O teste do cometa mostrou um nível de danos maior se comparado aos controles ( $0,84 \pm 0,47$ ).

Foi estabelecida a média de idade e feita relação entre gênero e idade dos participantes, sendo os níveis de danos maiores para o gênero feminino em relação ao masculino. Indivíduos com idades acima dos 45 anos também demonstraram um nível de dano maior quando comparados com idades inferiores. Um fator a ser levado em consideração é de que a população de Porto Alegre apresentar um nível de dano menor se comparado aos outros grupos, sendo muito provável este evento por conta da utilização de equipamentos DR de conversão direta. Os equipamentos de Belo Horizonte e Ribeirão Preto utilizam CR e os de Belém, convencionais

**Palavras-chaves:** Raios-X. Radiação Ionizante. Mutagênese. Carcinogênese

## ABSTRACT

Ionizing radiation (IR) are present in most of the early diagnosis of a multitude of diseases, many cancers are included, and have the characteristic of a quick and accurate diagnosis, and often cheaper. The use of this type of energy but requires specific care protection, since the IR has a characteristic of altering the genetic material through mutations.

The radiology area operators in hospitals are the class of workers who are exposed more directly and thus are targets of investigations that may assist in understanding the interaction of IR with the biological material, in addition to assisting these professionals in requirement radiological protection

We collected 73 samples of individuals working in various radiology departments in five hospitals in four different states in Brazil (São Paulo, Minas Gerais, Rio Grande do Sul and Pará). The selection criteria for participation were: at least 18 years old and 2 years in the profession, not alcoholic or smoker, not taking drugs. For cytogenetic analysis were performed the comet test and micronucleus, and chromosome aberration study. This study was approved by ethics committee

All the samples were compared to individuals of the same age and gender who have not gone through any kind of radiological examination in the last 6 meses. Quando compared with the control, MN tests and AC showed a total damage, using the t test, the database and SPSS BioEstat. The comet assay showed a higher level of damage compared to controls ( $0.84 \mp 0,47$ ).

the average age was established and made relationship between gender and age of the participants, the more damage levels in females compared to males. Individuals aged over 45 years also showed a higher level of damage when compared with the age. A factor to be taken into consideration is that the population of Porto Alegre present a lower level of damage compared to other groups, and most likely this event due to the use of DR equipment Direct conversion. The Belo Horizonte and Ribeirão Preto equipment using CR and Belém, conventional

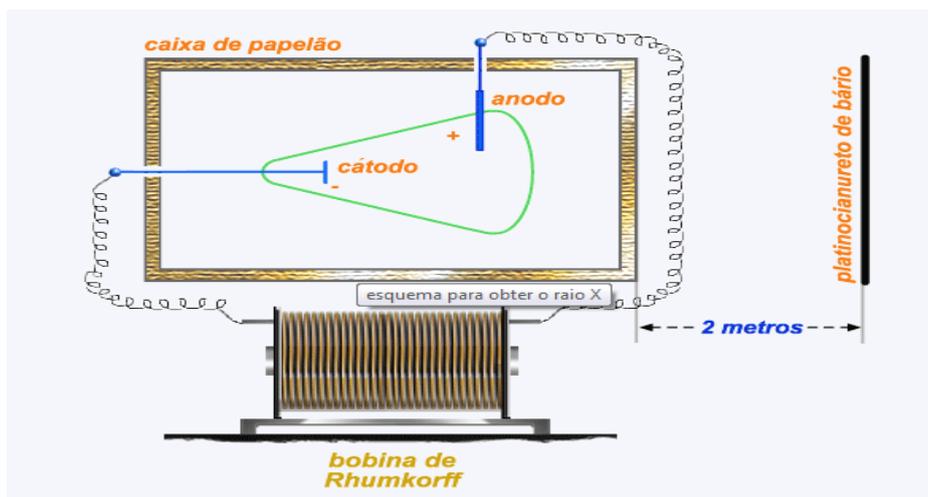
**Keywords:** X-rays. Ionizing radiation. Mutagenesis. Carcicnogenesis.

## I - Considerações Gerais

### 1. Histórico e Conceitos

Descobertos em Novembro de 1895, pelo pesquisador alemão Wilhelm Conrad Roentgen, os raios-x (RX) hoje vão muito além do diagnóstico médico e odontológico, passando pela esterilização de instrumentos médicos, sanitização de esgotos, estudos arqueológicos, em obras de arte, aplicações agrônômicas, recursos hídricos, produção de energia elétrica, indústria, portos, aeroportos e fronteiras, e na conservação de alimentos (CICT/FIOCRUZ, 2006).

Roentgen desenvolveu a primeira máquina produtora raios-x através de uma adaptação da ampola de Crookes. Esta descoberta foi o marco inicial para a radiologia (MAZZILLI, 2002). A figura 1 (abaixo) demonstra o esquema adaptado de Roentgen para a ampola



**Figura 1:** ampola de Crookes adaptada. Fonte:

<http://efisica.if.usp.br/moderna/raios-x/raios-x/>

Produzidos por dispositivos chamados “tubos de RX”, que são constituídos basicamente, em um filamento que produz elétrons por emissão termoiônica (aumento do fluxo de elétrons que saem de um metal, devido ao aumento de temperatura), pelo polo positivo (catodo) sendo acelerados fortemente por uma diferença de potencia (DDP) até o anodo, onde colidem e são convertidos em ondas eletromagnéticas (OEM) (IAEA, 1991).

Existem hoje dois tipos básicos de ampolas de RX em uso: as com tubos de gás, que usam aproximadamente 0,001 mm Hg, e as com tubos Coolidge (que usam

vácuo), emitindo uma quantidade maior de elétrons e, conseqüentemente, uma quantidade maior de RX (CALDAS et al., 2002).

Fisicamente, os RX característicos são Radiações Eletromagnéticas (RE) de alta energia originadas em transições eletrônicas do átomo que sofreu excitação (elevação a um nível energético maior) ou ionização (íon gerado após a movimentação de elétrons a camadas diferentes de sua origem), após interação (OKUNO, 1998). Elétrons de camadas externas fazem transições para ocupar lacunas produzidas pelas radiações nas camadas internas, próximas ao núcleo, emitindo o excesso de energia sob a forma de RX (TURAI, 2000).

Devido à disposição geométrica, ao número, à carga e ao movimento, a probabilidade de colisão com os elétrons é muitas vezes superior à probabilidade de colisão com o núcleo. No choque, a radiação transfere parcial ou totalmente a sua energia que, se for superior à energia de ligação, provocará uma ionização (TAUHATA, 2002). Esta característica é a principal responsável pela interação e conseqüente dano a moléculas como o DNA.

É fato, de que detalhes físicos como o descrito acima, não eram do conhecimento geral e, como resultado, inesperados e numerosos danos a trabalhadores, pacientes e cientistas.

O primeiro caso de câncer associado à radiação utilizada pelos RX foi publicado em 1902, juntamente com a apresentação da primeira dose limite considerada segura para utilização desta fonte de radiação ionizante (WILLIAM, 1995).

Um número crescente de danos relacionados à Radiação-X, como dermatites, ulceração de pele, irritação ocular (considerando doses agudas) e catarata, carcinomas de pele, assim como outros tipos de câncer (considerando doses crônicas), foram observadas após as primeiras publicações de associação ao câncer (VON JAGIC, 1911, APUD, LINET et al., 2010).

O desenvolvimento de experimentos clínicos e tecnológicos notáveis na radiologia e imagem continuaram a transformar a medicina. Dentre eles, o fluoroscópio, que permitiu a visualização de imagem em tempo real e sem necessidade de um filme radiográfico. Este aparelho, no entanto, usa uma quantidade consideravelmente maior de Radiação Ionizante (RI) (Miller et al., 2008), (figura 2).



**Figura 2:** Imagem de aparelho de Fluoroscopia, com imagem radiográfica em tempo real (fonte: ZHANG et al., 2014).

O uso da fluoroscopia durante as duas guerras mundiais, juntamente com os intensificadores de imagem para detecção da tuberculose, foram o marco inicial para a chamada “radiologia intervencionista”, que é definida como “procedimentos manipulativos controlados e guiados por fluoroscopia”(WEIMAR et al., 1999).

Neste período, a dose efetiva anual de RI para trabalhadores na área já tinha decaído bastante, sendo menor que 50 mSv por ano (NRPB, 1993). Já na década de 1960, a estimativa de dose efetiva era de 5 mSv por ano para o corpo todo (ICRP, 1980).

No sistema internacional de unidades, a unidade de dose absorvida é  $J\ kg^{-1}$ , sendo o nome da unidade Gray (Gy), (ICRP, 1991). Numa tentativa de regular a exposição de trabalhadores e público, duas formas de quantidade de dose foram sugeridas pela Comissão Internacional de Proteção Radiológica (ICRP): doses efetivas e equivalentes, ambas expressas em Sievert (Sv) para distinguir das doses absorvidas em Gy (ICRP, 1991).

A dose efetiva leva em conta a radiosensibilidade de órgãos e tecidos humanos (STREFFER et al., 2007) e foi introduzida para representar os riscos a longo prazo da exposição à RI, particularmente o câncer.

Em 1906, dois cientistas franceses, Bergonié e Tribondeau, observaram que a radiosensibilidade era uma função do estado metabólico do tecido que está sendo irradiado. Este conceito tornou-se conhecido como a "Lei de Bergonié e Tribondeau", e estabelece que a radiosensibilidade dos tecidos vivos pode variar da seguinte maneira: (i) quanto mais diferenciada for a célula, maior é a sua resistência à radiação; (ii) quanto mais jovem for o tecido ou órgão, mais radiosensível ele será; (iii) quanto maior a atividade metabólica, maior a radiosensibilidade;

(iv) quando a taxa de proliferação celular e a taxa de crescimento tecidual aumentam, a radiosensibilidade também aumenta (FERNANDES, 2005).

Estimativas de excessos de risco associadas com exposição à RI são geralmente apresentadas em termos de risco relativo excessivo e risco absoluto excessivo por Gy (SADETZKI e MANDELZWEIG, 2009). Existem evidências de aumento de risco ao câncer associado a exposições na ordem de 10 mGy, assim como o risco de mortalidade e morbidade de todos os cânceres sólidos combinados em uma dose proporcional de radiação de 100 mGy (ICRP, 2004).

Por aproximadamente sete décadas, a utilização de RI na medicina foi limitada aos radiologistas, oncologistas e associadas aos técnicos. No entanto, o advento dos cateteres elevou exponencialmente o uso da RI nos procedimentos efetuados por cardiologistas e aumentou o número de outros físicos especialistas em adição aos radiologistas expostos (LINET et al. 2010).

Atualmente, cardiologistas tem uma missão especial de evitar o uso da radiação não otimizada, uma vez que estes são responsáveis por 45% da dose efetiva acumulada de 3.0 mSV ao mês (algo similar ao risco de 150 raios-x do tórax) por indivíduo por ano nos EUA, sem considerar a radioterapia (PICANO e VANO, 2011), havendo uma estimativa recente de que a dose equivalente na Europa seja de 15 mSV, o que equivale a 750 raios-x do tórax, no mesmo período de um ano (PICANO et al., 2014).

A Tomografia Computadorizada (TC), provê cerca de 34% da dose coletiva anual de exposição aos RX, chegando a 70% em países desenvolvidos, sendo considerada aos profissionais da área, a maior fonte emissora de RI (SUWANPRADIT et al., 2008)

A estimativa atual é de que, por conta do advento da tomografia nuclear, a radiação absorvida hoje pela população geral seja de 600 a 700% maior do que nos anos 1980 (METTLER, 2008).

Para a população em geral, as maiores fontes de RI são provenientes de fontes naturais (i.e radiação doméstica aleatória, raios cósmicos), tendo em vista a expectativa de que cerca de 82% dos humanos absorvem algum nível de radiação natural (SHAHBAZI et al.,2013).

Em termos comparativos, os primeiros aparelhos de TC realizavam uma imagem a cada 5 minutos e, os mais modernos na atualidade, realizam 160 imagens

por segundo, embora haja uma diferença considerável nos níveis de exposição, os dados de tempo x dose x efeito ainda são obscuros na literatura (HASEGAWA et al., 2015).

Muitos estudos epidemiológicos relativos ao câncer usam de dados físicos referentes aos radiologistas, especialmente nas décadas de 60 e 70 do século passado, visto o fato da taxa de mortalidade destes profissionais nesse período ser maior do que qualquer outra especialidade médica (JARTTI et al., 2006).

Hoje em dia, as populações expostas profissionalmente à RI continuam sendo particularmente importantes para o estudo do risco de câncer por exposição à radiação, quer seja fracionada ou em baixos níveis, sendo as categorias de trabalhadores da indústria nuclear ou medicina radiológica as mais afetadas (KIM et al., 2008, YOSHINAGA et al., 2004).

Profissionais que trabalham manipulando aparelhos que produzem radiação X, como ampolas de RX, TC, cintilógrafos e mamógrafos, pertencem a estas populações expostas à RI (BERRINGTON et al., 2001).

Vários estudos em diferentes países dão suporte à associação da convivência da RI à carcinogênese, principalmente à leucemia. Em dois destes estudos, oito diferentes coortes foram associadas a este risco no Canadá (ZIELINSKI et al., 2009) e nos EUA (YOSHINAGA et al. 2004), embora alguns associem também ao câncer de pele (BERRINGTON et al., 2001) na Inglaterra e câncer de mama nos EUA (MOHAN et al. 2002).

No caso da radiologia médica, vale ressaltar que existem diferentes níveis de exposição, considerando que os aparelhos em diferentes áreas, como a fluoroscopia, que excede os níveis de radiação, quando comparadas com a tomografia e esta, por sua vez, excede os níveis da radiologia geral (JONES et al., 2014).

No caso da TC, existe um consenso de que não há ainda informação suficiente sobre os perigos, relacionados especificamente à genética, de trabalhadores expostos cronicamente à RI por este aparelhos assim como em aceleradores lineares, usados na radioterapia (SABERI et al., 2013).

Quando se trata de pacientes, o intervalo de doses efetivas de uma tomografia realizada é de 2 a 15 mSv. A estimativa é que cerca de 30% dos pacientes que se submetem a uma tomografia passam por pelo menos 3 scans, 7% pelo menos 5 scans e 4% pelo menos 9 scans (METTER et al., 2000).

Apesar dos indicativos clínicos, os dados de dosimetria física associada diretamente à carcinogênese, dentre os trabalhadores da área da física médica, ainda são relativamente pequenos (VENNERI et al., 2009).

A despeito da implementação de regras de otimização para proteção destes trabalhadores ser uma cultura importante em seu cotidiano (VERMEERSCH, 2005), nos últimos anos, estudos apontam que pacientes submetidos a exames simples e, juntamente com trabalhadores da área da radiologia, demonstraram altos níveis de radiação absorvida, proveniente de exames comuns de RX (BRENNAN, 2004).

Este fato ocorre muito provavelmente por conta das variáveis associadas ao fenômeno da carcinogênese juntamente com as variações de equipamentos e técnicas de medida física realizadas na dosimetria. A implementação de equipamentos ditos “digitais”, trouxe também uma mudança nos padrões de técnicas usadas pelos trabalhadores e, conseqüentemente, ao pacientes (NCRP, 2004).

A tabela 1, abaixo, mostra os limites aceitos de dose efetiva e equivalente para profissionais e o público, não considerando a fonte.

Exposição	Profissionais expostos			Público
	16-18 Anos	>18 Anos	Grávida	
<b>Dose</b>				
<b>Dose efectiva</b>	6 mSv/ano	20 mSv/ano <sup>b</sup>	1 mSv/ano	1 mSv/ano <sup>c</sup>
<b>Dose equivalente</b>				
- Cristalino	50 mSv/ano	150 mSv/ano	15 mSv/ano	15 mSv/ano
- Pele, mão e pés (1 cm <sup>2</sup> )	150 mSv/ano	500 mSv/ano	50 mSv/ano	50 mSv/ano

**Tabela 1:** doses limites recomendadas aos profissionais e público em geral.

Fonte: CNEN, 2011

O fato de não existir um método internacional padrão para a dosimetria física dos operadores dificulta uma perspectiva para um melhor entendimento do efeito dose e carcinogênese. Apesar da existência de testes em fase inicial para a adoção do Modelo de Monte Carlo, adotado como técnica padrão de estudo de dose a ser recebido por pacientes em radioterapia, para trabalhadores na área da Radiologia Médica (JABBARI, 2011)

Estes pontos foram abordados por esta tese, uma vez que as amostras coletadas foram de vários setores de diferentes hospitais no Brasil.

## 2 - Radiologia Computadorizada (CR) e Radiologia Digital (DR)

Historicamente, o diagnóstico em radiologia se baseava na aquisição e arquivamento de imagens radiográficas em filmes, tipicamente usando intensificadores de imagem para captura da imagem formada pelos raios-x primários (COWEN et al., 2007)

Nos dias de hoje, existem diferentes sistemas de detecção de imagem dentro da radiologia. É de senso comum, no entanto, que os sistemas digitais substituam os sistemas analógicos de filmes (SAF) (YAFFE et al., 1999). Esta transição é considerada um processo complexo, por conta dos fatores técnicos relacionados à aquisição de imagem, tais como manejo do paciente, dose e qualidade da imagem para diagnóstico (ORAVA et al., 1999). Neste processo de transição, a dose de radiação para o paciente pode aumentar de 40 a 103%, uma vez que cada equipamento, assim como operador, podem variar a dose usada para gerar uma imagem viável a diagnóstico (VAÑO et al., 2007).

Fatores econômicos e administrativos são levados em consideração na aquisição de equipamentos digitais, sendo a estimativa de que em países desenvolvidos como a Escandinávia quase todos os hospitais tenham adotado este tipo de equipamento, diferente de países em desenvolvimento, onde o SAF ainda é muito comum (NEITZEL, 2005).

As vantagens da radiologia digital estão associadas não somente à qualidade de imagem, mas também ao fato do possível armazenamento digital das mesmas, assim como recuperação e transmissão mesmo a longas distâncias (SCHAETZING et al., 2002). Os formatos digitais também permitem a leitura em monitores (monitorscopia), que diminui potencialmente os custos de um departamento de armazenamento de raios-x quando comparada com o SAF (SAMEI et al., 2002). (Figura 3)



**Figura 3:** Amostra do conjunto de monitor, acoplado ao aparelho de CR. Fonte: COWEN et al., 2007

No que se refere a qualidade de imagem, muitos estudos comparam a imagem clínica de radiografias dos diferentes sistemas (WILSON et al., 1991, SWEE et al., 1997) além de avaliar uma possível dose de radiação usando painéis de detecção amorfos de silicone (VÖLK et al., 2003), tendo havido otimização considerável em imagens cardíacas, usando estes painéis (GISLASON et al., 2013) e abdome e pelve usando CR (BROSI et al., 2011).

No entanto, é do conhecimento dos profissionais que existem diferentes quantidades de radiação aplicadas para cada exame, onde se leva em consideração não somente o sistema adotado (CR, DR ou SAF), como biótipo do paciente, e o órgão estudado. Dessa forma, a Comissão Internacional de Proteção Radiológica (CIPR), identifica a necessidade de otimização e desenvolvimento de protocolos consistentes em DR, com participação ativa de profissionais de várias áreas (ICPR, 2013).

No que se refere especificamente à CR, a questão de otimização de doses necessária para a formação de uma imagem considerada de padrão clínico (que apresente de maneira satisfatória as estruturas anatômicas necessárias ao laudo médico) tem sido objeto de debate por anos (COWEN et al., 2007). Existem especulações entre muitos usuários que adotaram este sistema de que o mesmo leva à redução de dose em pacientes e, conseqüentemente, aos trabalhadores, admitindo que em casos gerais, essa redução seja significativamente maior se comparada à usada em SAF (PEER et al., 2001).

No entanto, quando se refere a doses individuais para pacientes, estas suposições são equivocadas. Para ajudar os trabalhadores a monitorar os níveis de doses empregados durante o uso clínico, fabricantes fornecem um indicador quantitativo da dose liberada para a placa de aquisição de imagem, não ao paciente. A natureza dos indicadores varia entre fabricantes e requer de interpretações individuais (WILLIS, 2004).

Para alguns exames, a redução de dose é algo realmente praticável no sistema CR. Em radiografias das extremidades (mãos e pés), por exemplo, uma diminuição de dose de 50% pode ser posta em prática sem a perda de qualidade de imagem (BRAGG et al., 1997), chegando a diminuir entre 30 a 60%, dependendo do tipo de exame, em radiologia pediátrica, fazendo estudo clínico de extremidades também (HUFTON et al., 1998).

De forma recíproca, alguns trabalhadores informam uma quantidade aumentada no ruído radiológico quando usada uma dose menor na aquisição da imagem (WEATHERBURN et al. 2002). Entende-se como ruído radiológico a quantidade de informação indesejável presente em uma imagem, que não é útil ao diagnóstico clínico (FURQUIM, 2009).

Muitos autores concordam com a ideia de aumento na dose efetiva no sistema CR quando comparada à utilização do SAF (Neitzel et al., 2005, Arakawa et al., 1999, Monnin et al., 2006 e Riccardi et al., 2007). É de se considerar então, que, como consequência do aumento de dose, haja uma possibilidade maior de interação biológica com a RI, tanto para pacientes, como para trabalhadores da área.

No caso de DR, existem diferenças fundamentais nos quesitos de dose e manipulação de imagem (VÖLK et al., 2003). Muitos estudos comparam a qualidade de imagem entre CR e DR (SWEE et al., 1997, KLEIMAN et al., 2008, REHANI, 2008)), de forma a tentar reduzir a dose utilizada nos sistemas usando painéis detectores de silicose amorfo (GISLASON et al., 2010), contudo, existem poucos estudos que indiquem que os protocolos usados em DR realmente façam uso de uma quantidade menor de dose (LAWINSKI et al., 2005).

Alguns dos equipamentos já se apresentam calibrados para protocolos de otimização de dose de fábrica, sendo estes protocolos referenciados pelos próprios fabricantes através de seus aparelhos de CR (BORASI et al., 2003), no entanto, em um estudo conduzido na comunidade europeia, as doses aplicadas de fábrica não são apropriadas para exames pediátricos (MOORE et al., 2012).

Existe uma concordância juntos aos profissionais da área que um protocolo otimizado para doses em DR só seria possível através da colaboração de trabalhadores de varias áreas, desde a clinica, passando pela física e radiobiologia (HALEY et al., 2011).

Na atualidade, Níveis de Referência Diagnóstica (NDD) são sugeridos para padronização de doses na União Européia (TOLGA et al. 2014). Procedimento padrões em radiologia (RX DR, CR ou SAF), correspondem a cerca de 48% de todos os exames em diagnóstico por imagem e contribuem com cerca de 41% da dose coletiva (AROUA, et al., 1998).

Uma das principais razões para introduzir o conceito de NDD, é investigar situações onde as doses para pacientes são consideraras altas, e as taxas de doses de DR, CR e SAF podem chegar a ter variações de dezenas Kilovolts (Kv) para o mesmo exame (ALDRICH et al., 2006).

O exame de radiografia do tórax é, provavelmente, o mais comum dentro da radiologia e, tomando este como exemplo, as doses empregadas de 64.5 a 87 Kv em equipamentos CR/DR e 125 Kv para equipamentos SAF (VAÑÓ et al., 2007).

Obviamente, essas variações têm interferência direta na relação dose/efeito tanto para pacientes como para trabalhadores.

### **3. Evolução de dose/efeito em radiobiologia**

O fator dose/efeito para os operadores da área da radiologia médica e industrial também varia muito de acordo com os procedimentos realizados e, conseqüentemente, com a dose recebida pelos pacientes e/ou equipamentos (VAÑÓ et al., 2009).

Níveis de dose de RI estão diretamente relacionados com o aumento significativo ao risco de câncer. Ainda que em baixas doses, dados derivados de estudo epidemiológicos onde baixas doses de RI, mesmo dentro do espectro de segurança, estão associadas ao risco de câncer (RONCKERS et al., 2008, EISENBERG et al., 2011).

Existem hoje grupos internacionais, multidisciplinares de cientistas especializados que concluíram que doses consideradas baixas de radiação X e gamma (aproximadamente de 10 a 50 mSv para exposições agudas e 50 a 100 mSv

para exposições crônicas) estão associadas ao risco de carcinogênese, embora haja o reconhecimento de que existe uma dificuldade considerável na precisão de dose-resposta quando se leva em consideração uma doença complexa como o câncer (BRENNER et al., 2003).

Esta dificuldade é demonstrada quando em modelos de cultura celular, a dose resposta para morte celular é tipicamente descrita pelo decréscimo de sobrevivência logarítmica da dose de RI. Essa relação, no entanto, é alterada quando as doses usadas encontram-se abaixo de 0.5 Gy, havendo uma hipersensibilidade a baixas doses, seguida por um aumento à resistência das RI, (JOINER et al., 2001).

Uma hipótese para tal efeito é de que a resposta à RI esteja relacionada à fase do ciclo celular, demonstrada em células tumorais, que são mais resistentes aos efeitos das RI (MARPLES et al., 2003). Outros trabalhos sugerem que exista uma relação inversamente proporcional ao efeito bystander (MOTHERSILL et al., 2002)

Falando designadamente de recomendação de doses, em 1928, as indicações à proteção radiológica (PR), eram limitadas aos danos aos tecidos superficiais, rearranjos de órgãos internos e mudanças no sangue, listadas como “os efeitos conhecidos para se resguardar contra” (BOLCH et al., 2012).

Em 1950, as recomendações se referiam a danos superficiais, efeitos gerais no corpo (particularmente sangue e órgãos formadores de sangue), tumores malignos e outros efeitos deletérios (catarata, obesidade, infertilidade, e redução da expectativa de vida) e os efeitos genéticos eram listados como “efeitos a serem considerados” (CLARCK, 2008).

Em 1963 Alper (ALPER, 1963) propôs que não só o núcleo da célula era alvo das RI, como a membrana celular, especialmente em células bem oxigenadas. Tal ideia ganhou força nos anos 70, quando foi demonstrado que vitaminas lipo-solúveis respondem à presença de RI (BRABY, 1992).

Na década de 90, foram realizados esforços para o estabelecimento de uma dose segura, tendo a Comissão Européia de Proteção Radiológica apresentado um documento de orientação em 1995, havendo orientações para diferentes áreas da radiologia, como mamografia, radioscopia e TC (REHANI, 2008).

Em 2010, foi descrito no ICRP-1 (ICRP,2010), a proteção radiológica deveria considerar e minimizar os possíveis danos de “efeito somático” que ocorreriam em um indivíduo exposto (i.e catarata, leucemia e outras doenças malignas, infertilidade e

encurtamento de vida) e prevenir os “efeitos genéticos” que ocorressem na prole dos indivíduos expostos.

Ainda em 2010, com a intenção de prevenir os “efeitos agudos”, que ocorreriam dentro de uma semana após a exposição, em uma tentativa de limitar os efeitos tardios, com um período latente de décadas a um nível aceitável, a ICRP definiu três formas de relação dose-resposta: sem limites de dose, com um limite bem definido de dose e com um limite quase definido (ICPR, 2010).

No entanto, as definições usadas pela ICRP aos efeitos citados acima, já não acomodam os achados mais recentes de doenças, que não o câncer, e os efeitos de instabilidade genômica além do efeito bystander, criando assim incertezas a respeito da controversa área de dose/resposta (BAVERSTOK e KAROTKI, 2011).

O efeito bystander ocorre quando uma célula irradiada comunica-se com uma célula não irradiada induzindo reações em ambas as células (MORGAN et al. 2003). Embora este efeito seja conhecido em experimentos in vivo e in vitro, o processo como um todo não está totalmente claro (MITCHEL et al., 2004).

Existem ao menos dois mecanismos envolvidos no sinal de células irradiadas à células não irradiadas: um, dependente da junção de gaps na comunicação intercelular e outro, a evidência de moléculas secretadas por células irradiadas ao redor do meio extracelular, como espécies de oxigênio reativo (MATSUMOTO et al., 2001)

A instabilidade genômica é considerada uma resposta adaptativa (AMUDSON et al., 2001) relacionada diretamente ao rearranjo de estrutura de cromátides, que resultam em alterações cromossômicas (AC), que são classificadas de acordo com seu mecanismo de formação. Tais alterações estão relacionadas ao stress químico, sendo as alterações cromossômicas mais específicas à RI (BONASSI e AU, 2002)

Em um tratado mais atual, em 2012, o ICRP publicou no Tratado de Seul (ICRP, 2012), uma taxa limite para efeitos biológicos em cristalino e retina de 0.5 Gy e a dose limite ocupacional de 20 mSv/ano (com uma média final em um período de 5 anos que não exceda 50 mSv) recomendando também 0.5 Gy para doenças cardiovasculares e doenças cerebrovasculares, para coração e cérebro, respectivamente.

Esta recomendação é interessante, uma vez que as RI tem efeitos diferentes em diferentes tecidos, sendo o tecido neuronal o segundo mais susceptível a alterações e o tecido hematopoiético o mais susceptível (SHULTE, 2006).

Estes novos limites para catarata e doenças circulatórias vêm em parte de evidências epidemiológicas demonstradas no uso de dose-resposta de doses não limites (DNL), sendo a DNL usada como parâmetro para dose efetiva limite (DEL), um cálculo que leva em consideração a dose considerada como risco para efeitos estocásticos (i.e câncer) (SHIMIZU et al, 2010, ICRP, 2012).

Efeitos estocásticos, incluindo câncer e efeitos hereditários, são causados por uma mutação ou outra troca permanente, onde a célula permanece viável (i.e alterações cromossômicas). A probabilidade de efeito estocástico aumenta com a dose, mas sua severidade não está relacionada à mesma (HALL et al., 2006)

Alguns tipos de câncer (tumores sólidos em geral) não levam em consideração a dose não linear de resposta (ZIELINSKI et al., 2009), sendo esta, a capacidade das radiações extrapolar seus efeitos a uma geração de células ou à célula diretamente afetada.

Existe também o fato de que os diferentes procedimentos e, conseqüentemente, as variações de dose para pacientes, apresentam uma média numérica muito variada. As estimativas são de que para olhos a dose recebida seja de 100  $\mu$ Sv, de 1.2 – 580  $\mu$ Sv tireoide e para tronco 0.4 – 790  $\mu$ Sv (KIM et al., 2008).

O conceito de “dose segura” foi primeiramente usado em 1934, numa tentativa de por em prática o conceito de que supostamente existiria uma dose padrão que um operador poderia trabalhar sem sofrer nenhum dano (HAMADA e FUJIMICHI, 2014). Hoje em dia no entanto, este conceito foi abandonado, uma vez que se tem o conhecimento de que toda dose de RI pode oferecer algum risco ao individuo que a recebe.

Outro fator que aumenta a dificuldade de uma conclusiva “dose segura” é a falta de um sistema simples de reposição de filmes de dosimetria e, algumas vezes a carência de orientação aos operadores sobre a utilização dos filmes, o que em muitos casos traz uma discrepância dos dados apresentados pela dosimetria biológica em relação à física (MONTORO et al., 2005).

Normalmente, a dosimetria física, através de filmes adesivos, cristais termoluminescentes e semicondutores, faz uso destes acessórios para monitoramento

peçoal de dose absorvida em hospitais e instalações que usem de fontes radioativas, de forma a manter as exposiões tão baixas quanto razoavelmente possíveis (princípio ALARA), seguindo as recomendações da ICRP e da Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA) (LEMOS PINTO et al., 2010).

O fato de que muitos operadores da área de RI não terem o hábito de usar os aparelhos dosímetros, obviamente prejudica a aquisição de dados, retardando uma resposta médica em caso de acidentes em larga escala (LLOYDE et al., 2005).

Em alternativa ou em conjunto à dosimetria física, a dosimetria biológica tende a ser uma interessante proposta ao necessário monitoramento biológico de operadores na área da RI. Avaliações dosimétricas baseadas em biomarcadores parecem ser uma ótima opção para este caso (PRASANNA et al., 2005)

#### **4. Biomonitoramento**

A dosimetria biológica vem ganhando notoriedade no que diz respeito ao estudo das RI, uma vez que a dosimetria física não fornece informações detalhadas sobre as consequências biológicas dos operadores da área da radiologia geral (FUČÍČ et al., 2007).

Resumidamente, a dosimetria biológica pode ser definida como acesso à informação da dose individual absorvida e avaliação dos possíveis efeitos dessa dose de RI sobre o indivíduo (LEMOS PINTO et al., 2010). É considerada uma ferramenta essencial para estimativa de dose de radiação recebida para indivíduos quando a dosimetria física não está disponível ou adequada (WIKINS, et al., 2011).

Para estudos mais refinados em dosimetria biológica, as interações das RI com o metabolismo são divididos em duas categorias: (i) moléculas alvo que já se tem o entendimento da resposta biológica às RI e (ii) a biodosimetria que é focada em quantificar o danos induzido por RI, identificando possíveis marcadores através de fluidos biológicos (e. g. urina, saliva e soro) (PATTERSON et al., 2008, lanz et al.2009)

O primeiro método empregado que relaciona os parâmetros biológicos humanos com dose absorvida foi baseado na observação de intensidade, frequência e duração de alguns sintomas observados depois de superexposição à RI (IAEA e WHO, 2000)

Na atualidade, os métodos analíticos usados para identificação de moléculas biomarcadoras assim como a extensão de danos causados por RI, passam por Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massa (KHAN et al. 2011).

Exemplos de biomarcadores provenientes de estudos em primatas não humanos incluem timidina, xantina e xantosina (JOHNSON et al., 2011), além dos estudos de algumas proteínas, como AMP, através de técnicas de proteômica e microarray (HU et al., 2012).

Apesar dos avanços e da utilização de técnicas elaboradas, nos casos de exposição acidental, existe a urgência de uma resposta rápida e determinante, tendo em vista os perigos conhecidos das exposições agudas à RI, como a Síndrome Aguda a Radiação (SAR) (WEINSTOCK et al., 2008).

As células mais comuns para o estudo de biomonitoramento são os fibroblastos e linfócitos. Quando a RI interage com estas células, que se apresentam em fase de quiescência, induz lesões ao DNA que podem permanecer latentes e persistirem mesmo depois do processo de replicação (YUSUF e FRUMAN 2003).

Na área de biomonitoramento em radiologia atualmente, as técnicas mais comuns em humanos fazem uso de sangue periférico, com destaque ao uso da técnica do Micronúcleo (MN) (ROPOLO et al., 2012) e o estudo de cromossomos dicêntricos (VOISIN et al., 2002).

O aspecto mais importante para este teste é que ele permite identificar um aumento eventual na frequência de mutações, em células expostas a uma gama variada de agentes genotóxicos, e, dessa forma, fornecendo uma medida de confiança nas possíveis alterações cromossômicas envolvidas na ação de agentes clasteogênicos e aneugênicos, in vivo (BONASSI et al., 2007)

De forma a prevenir a ocorrência de mudanças significativas no genoma de uma população inteira, a proposta de biomonitoramento para trabalhadores expostos cronicamente à RI por muitos anos, através das ferramentas apresentadas neste projeto, pode trazer uma significativa melhora na condição de vida desta população.

#### **4.1 Micronúcleo como ferramenta de biomonitoramento**

Uma consequência citológica da indução de alterações cromossômicas é a formação de micronúcleos (MINODIER et al, 2007). O micronúcleo (MN) deriva de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros em anáfase tardia, e o Teste do MN (MNT) pode ser usado para demonstrar efeitos clastogênicos e aneugênicos (NORPA e FALCK, 2003).

O teste do micronúcleo por citocinese (CBMNT), desenvolvido por Fenech e Morley em 1985 é um método confiável para quantificar quebras cromossômicas e perda em células nucleadas (FENECH M, 2000).

Sabe-se hoje que vários agentes clastogênicos, que produzem a quebra de fita simples ou dupla (i.e raios-x), durante sua exposição são responsáveis pela formação de MN (THIERENS e VRAL, 2009). Por conta disso, este teste é um dos ensaios mais amplamente usados para testar novos componentes, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, para regulamentação de elementos ao uso geral (OECD TG 487, 2009).

O fato das RI serem um agente clastogênico conhecido, e assim, um potente indutor de MN, faz deste procedimento um teste confiável, validado e padronizado no campo da radiobiologia pelos seguintes motivos: (i) para avaliar exposições à radiação ocupacional, médica e acidental individualmente *in vivo* (ii) avaliar suscetibilidade ao câncer ou radiosensibilidade individualmente *in vitro* (IARMARCOVAI et al., 2008).

Apesar do conhecimento das consequências biológicas das RI, existem vários outros fatores a serem levados em consideração quem podem interferir na interpretação de resultados apresentados na técnica de MN, como exemplo, as diferenças geradas por danos causados por baixa Energia de Transferência Linear (low LET) e alta Energia de Transferência Linear (high LET).

Quando a radiação ionizante atravessa um meio, ela promove o efeito de ionização ao longo de sua trajetória e ao longo da trajetória dos elétrons secundários que foram gerados. A densidade linear de ionização, ou seja, o número de íons gerados por unidade de comprimento, é uma função da LET (FERNANDES, 2005). Em outras palavras, quando o LET da radiação aumenta, a habilidade da radiação em produzir um dano biológico também aumenta (DOWD & TILSON, 1999)

LET é definida dentro da radiobiologia e proteção radiológica como sendo uma característica qualitativa das RI, que varia de acordo com a densidade do raio produzido, onde low LET, tem característica escassa e high LET tem característica densa (PODGORSAK, 2010).

Em termos numéricos, doses acima de 5 Gy devem ser tratadas de forma diferenciada, uma vez que as variações de resposta tornam o uso da técnica menos confiável (THIERENS et al., 2002).

É recomendado que se levem em conta fatores que influenciam na frequência de MN, além da exposição a agentes ambientais, como idade, gênero e dieta. Estudos

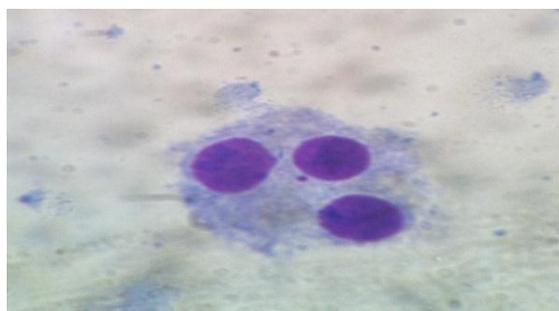
de biomonitoramento em larga escala tem mostrado que MN espontâneos aumentam sistematicamente com a idade. Valores entre 0.24 e 0.44 MN/célula BN/ ano foram obtidos em populações saudáveis (WILLEMS et al., 2010)

Em um estudo feito por Fenech e colaboradores (FENECH et al., 1999), foi medido um aumento de 0.31 MN/ 1000 células BN/ células/ por ano em uma população de homens e em mulheres, os MN espontâneos tem maior frequência se comparados aos homens e aumentam com a idade, num aumento de 0.58 MN/ 1000 células BN / células/ano.

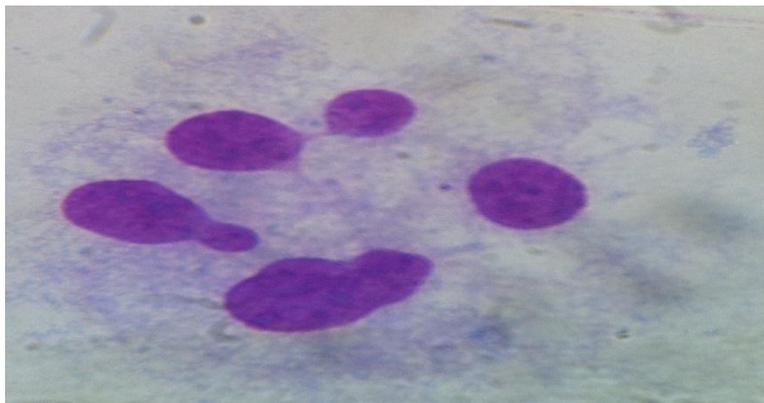
Tomadas as devidas precauções, a técnica é padronizada e validada para biodosimetria. A contagem de micronúcleos permite uma aplicação em larga escala, como em caso de acidentes radioativos ou mau uso das fontes radioativas. (FENECH M, 2006).

A associação da técnica de MN com técnicas de FISH torna não só a biodosimetria mais elegante como mais eficaz (WEIMAN et al.,2012), uma vez que a identificação da origem dos MN está diretamente relacionada com o dano causado por RI e a maior parte do MN originalmente induzido por RI provem de fragmentos acêntricos enquanto que os outros MN são originados de cromossomos inteiros (THIERENS et al., 2005).

No que se refere à análise propriamente dita, podem ser encontradas três tipos de ocorrências: (i) a ocorrência de MN (fragmentos acêntricos ou cromossomos inteiros que não atingiram o fuso mitótico durante a divisão celular), visto na figura 3, (ii) as pontes nucleoplasmáticas, que ocorrem quando os centrômeros de cromossomos dicêntricos são transferidos para os polos opostos das células em anáfase e (iii) os BUDs nucleares que correspondem a ampliações de DNA encontrados na periferia nuclear (FREITAS, 2012).



**Figura 4:** Representação de célula com três núcleos e presença de MN. Fonte: arquivos pessoais.



**Figura 5:** presença de ponte binucleada. Fonte: arquivos pessoais

A presença de pontes binucleadas é um critério importante no ensaio MN, uma vez que a taxa MN/NPB pode fornecer uma impressão digital específica para exposição genotóxica (VRAL et al. 1997). Pontes binucleadas em linfócitos têm uma relação sobre a dose com a exposição a RI e bem correlacionadas com a frequência de dicêntricos e anéis em cromossomos em metáfases de culturas destas células (PALA et al., 2008) além do fato de que a frequência de pontes binucleadas não tem interferência no gênero dos indivíduos estudados (BERTHO et al., 2008).

Existem dois fatores negativos na técnica de MN mesmo quando levada em consideração, primeiro a contagem da frequência de MN deve ser realizada com o menor tempo possível após a exposição, uma vez que a diminuição dessa frequência chega a aproximadamente 60% após tratamento para a exposição (FENECH et al., 1990) e, em segundo lugar, a estimativa de dose está relacionada ao corpo inteiro, limitando o uso desta técnica quando a ocorrência da exposição está limitada a uma parte do corpo (LEONARD et al, 2005).

#### **4.2 Ensaio Cometa como ferramenta de biomonitoramento**

A biodosimetria clássica inclui os estudos de alterações cromossômicas (AC) e micronúcleos (MN), sendo que o estudo de AC introduzido por Bender e Gooch, permanece como o “padrão ouro” para muitos especialistas na área da biodosimetria (WASLENKO et al., 2004), embora atualmente existam restrições para este método que tornam questionáveis em situações de estudo de exposição parcial (MULLER et al., 2005).

Danos de DNA também são comumente considerados como marcadores de risco de carcinogênese, sendo claramente relevante desde que este dano seja o

evento inicial da carcinogênese (DUSINSKA et al, 2008), elegendo dessa forma o Ensaio do Cometa (EC) uma técnica prática e eficaz para o estudo das interações das RI com células humanas (KUMARAVEL et al, 2006), e até mesmo na análise de danos induzidos por alimentos (FARAH MARIA et al., 2014)

Para uma proposta de resposta rápida, no entanto, a análise de AC não é considerada a mais ideal, uma vez que o processo de cultura leva aproximadamente de 48 a 72 horas (WANG et al., 2013).

O ensaio do cometa (EC) pode detectar danos no DNA e na cinética de reparo, sendo amplamente utilizado no estudo radiação biológica, toxicologia, oncologia e epidemiologia molecular (Haines et al., 2002). O EC é uma técnica rápida e sensível que pode ser usada para monitoramento biológico *in vivo*, especialmente em casos de exposição accidental à RI (GUERCI et al., 2011).

Linfócitos de sangue periférico (LSP) são conhecidos por serem radiosensíveis e entram facilmente no processo de apoptose, com algumas células sendo afetadas 24 horas após a radiação (CORREA et al., 2010), o que potencialmente traria impacto aos resultados do teste.

O acesso rápido ao material biológico dos indivíduos expostos à RI em acidentes é fundamental para uma resposta rápida e eficaz e o EC tem a característica prática de detectar os danos gerados nestas situações (GARCIA, et al., 2005), através da mensura de lesões no DNA pela migração de fragmentos, detectando, principalmente quebras simples (BETTI et al., 1994).

Baseando-se nos testes padrões de genotoxicidade e/ou carcinogênese (como teste do MN e EC), a agência de pesquisa para o câncer (International Agency for Research on Cancer – IARC) publicou uma tabela com estudos *in vivo* para o teste do MN e EC (tabela 2), demonstrando a importância de ambos os ensaios (KANG et al., 2013).

Elemento Estudado	Tecido Usado	Resultado	Fonte
1,2-DMH · 2HC	Fígado	Positivo em 5,4 e 5 dias de tratamento (MN)	Fahmy et al., 2000
1,4-Dioxane	Fígado	Positivo em 2,500, 3,500 mg/kg (MN)	Çelik et al., 2005
1,4-Dioxane	Fígado	Positivo em	Morita et al., 1997

		2000mg/kg (MN)	
2-Acetylaminofluorene	Medula, Sangue	Positivo em duas doses (MN)	Wakata et al., 1998
2-Acetylaminofluorene	Fígado, rim, pulmão, medula, baço	Positivo em fígado e rins (EC)	Wakata et al., 1998
2,4-Diaminotoluene	Fígado, rim, pulmão, medula, baço	Positivo em rins e pulmão (EC)	Saaki et al., 1997
2,4-dinitrotoluene	Fígado	Positivo (MN)	Fahmy et at., 2000
2,4-dinitrotoluene	Fígado	Positivo (MN)	Wakata et al., 1998
2,4-dinitrotoluene	Fígado	Positivo (MN)P	Wakata et al., 1998
Solução ácido arcênico	Medula	Positivo (MN)	Wakata et al., 1998
Atrazina	Fígado, sangue	Positivo (MN)	Singh et al., 2008
Auramina	Fígado, rim, pulmão, medula, baço	Positivo (EC)	Saaki et al., 1997
Benzeno	Sangue, medula	Positivo (EC)	Tuo et al., 1996
Cádmio Clorido	Medula	Positivo (MN)	Fahmy et at., 2000
Clorofórmio	Rim	Positivo (MN)	Tuo et al., 1996
Dimetilnitrosamina	Fígado	Positivo (MN)	Fahmy et at., 2000

**Tabela 2:** Potencial carcinogênico de elementos estudados pelo teste MN e EC (adaptado), fonte: Kang et al., 2013

### 4.3 Frequência de Alterações Cromossômicas

O trabalho pioneiro de Muller em *Drosophila*, demonstrou a capacidade de RI induzir a Alterações Cromossômicas (AC), em 1926 (SNUSTAD & SIMONS, 2001), no entanto, somente em meados da década de 1970 foi que pesquisadores identificaram os diferentes tipos de lesões induzidas por RI (BENDER et al., 1962, apud HAMADA et al, 2010).

As ACs produzidas por RI (HANDE et al., 2005), que podem ser classificados quanto a sua estrutura (deleções, duplicações, em anel ou inversões) de acordo com a dose ou período em que a célula for irradiada (MONTORO, 2005), ou ainda, de acordo com o tempo de manifestação (efeito agudo ou tardio), o tipo de célula mutada (efeito

hereditário ou somático) e a quantidade de energia depositada (efeito estocástico e determinístico) (REISLAND, 1981).

A manutenção da integridade genômica e homeostase celular em células humanas são reguladas por uma rede intrincada de vias que incluem checkpoints no ciclo celular, reparo e recombinação do DNA. Sob condições normais, a exposição a agente genotóxicos resulta em rápida ativação dessas vias que servem como promotoras para a sobrevivência celular, através da eliminação do dano ao genoma (ZHIVOTOVSKY e KROEMER, 2004).

Aberrações instáveis (dicêntricas, acêntricas e anéis) e estáveis (translocações) são as classes mais conhecidas de ACs induzidas por RI em células em G0 e G1 (HANDE et al., 2005), e desde a década 1960 cromossomos dicêntricos provenientes de metáfases sólidas são usados como marcadores biológicos confiáveis para biodosimetria não somente em casos de doses agudas, como também na avaliação de doses prolongadas recebidas de forma profissional (MONTORO et al., 2005).

As quebras de dupla-fita de DNA (QDF), no entanto, são as mais deletérias e intensamente estudadas lesões induzidas por RI (LAVIN e KOZLOV, 2007), uma vez que está bem estabelecida a relação entre RI e QDF (VOISIN et al. 2002).

A maioria das QDF são rapidamente reparadas. Um pequeno número de quebras, no entanto, permanece e torna-se visível em subseqüentes metáfases cromossômicas (SHRIVASTAV et al., 2008). Em 2013 foi feita a análise citogenética, relacionando a frequência de alterações cromossômicas (AC) em linfócitos de sangue periférico de indivíduos expostos acidentalmente, ambientalmente ou ocupacionalmente a baixos níveis de dose acumulada de RI (SABERI et al., 2013).

Muitas ACs têm relações direta com alterações genéticas e instabilidade genômicas que, por sua vez, podem ter relações com o desenvolvimento de câncer. A proposta de biomonitoramento utilizando análise de alterações cromossômicas pode estimar o risco à carcinogênese (IAEA, 2001), prevenindo dessa forma o desenvolvimento da doença.

Assim como a técnica de MN, o estudo de ACs em células alteradas por RI pode estimar danos em corpo inteiro com doses que vão de radiação low LET a 10 cGy, fazendo uso de 1000 (BERAL et al., 2004), no entanto, o estudo de ACs pode ter acesso ao danos de algumas semanas a vários meses após a exposição (HAYATA et al., 2001).

A utilização de estudos de ACs para acesso a dose/resposta em acidentes foi demonstrada em Chernobyl (PYATKIN et al., 1989), Goiania, Brasil (RAMALHO et al., 1991), e Tokaimura, Japão (KANDA et al., 2001) e, mais recentemente, em Fukushima (LEE et al., 2012).

## **II – JUSTIFICATIVA**

O biomonitoramento através de experimentos citogenéticos e moleculares pode servir de referência ao conhecimento do impacto desta energia na vida e no bem estar de trabalhadores e pacientes expostos a baixas doses de RI.

A possível incorporação destas ferramentas à análise cotidiana dos impactos sofridos por estes profissionais ao longo dos anos de profissão, pode gerar a possibilidade de melhoras na condição de vida, saúde e bem estar destes, bem como uma possível melhora em seu método de proteção diária,

A implementação cotidiana destas técnicas de monitoramento junto à esta classe de trabalhadores, é um procedimento adotado em outros países, e tem a intenção de prevenir possíveis eventos carcinogênicos, oriundos da exposição crônica à RI. Este procedimento, quando utilizado junto a profissionais em começo de carreira, traria à luz um conhecimento mais amplo das consequências da interação das RI, com os seus efeitos biológicos já conhecidos e serviria de referência a estes indivíduos durante todo o tempo de serviço e exposição.

### **III - OBJETIVOS**

#### **1 - OBJETIVO GERAL**

Utilizar de estudos citogenéticos como uma ferramenta de avaliação das condições de trabalho de indivíduos expostos a baixos níveis de RI, associando estas ferramentas ao monitoramento com intenção de prevenção a danos de exposição crônica deste tipo de energia.

#### **2 - OBJETIVO ESPECÍFICO**

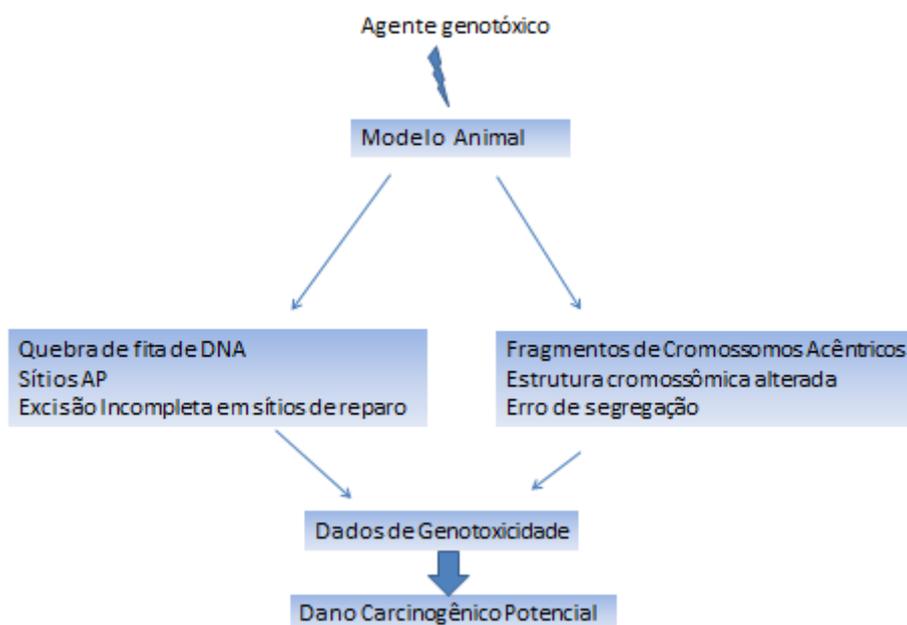
Avaliar danos possíveis genéticos gerados pela exposição à RI em trabalhadores utilizando o ensaio de cometa assim como o teste MN.

Analisar as frequências de alterações cromossômicas de linfócitos isolados no grupo de estudo através de técnicas citogenéticas convencionais.

### **IV – METODOLOGIA**

Testes de genotoxicidade *in vivo* (i.e EC e MN), podem ser usados quando obtidos resultados positivos de testes *in vitro*, que podem refletir a absorção, excreção, distribuição e metabolismo, característica essa que não se apresenta em testes *in vitro* (SASAKI et al., 2008).

Dessa forma, a recomendação da Organização para Cooperação Econômica e de Desenvolvimento (Organization for Economic Co-operation and Development - OECD), preconiza a utilização destes testes seguindo o esquema da figura 6, abaixo.



**Figura 6:** esquema sugerido para uso de EC e MN em testes de genotoxicidade.  
Fonte: SEUNG et al., 2013. (adaptado)

## 1. AMOSTRAS

As amostras de sangue periférico foram colhidas através de venopunção em diferentes clínicas, hospitais de quatro diferentes Estados no Brasil, onde os próprios trabalhadores exercem seu ofício.

Foram coletadas 68 amostras de trabalhadores dos Estados e Hospitais participantes, com um período de trabalho de 4 a 10 horas diárias, e um período de profissão de 2 anos no mínimo no período de três anos.

O estudo consta de dois grupos distintos:

- **Grupo 1, Controle negativo:** Constituído por indivíduos pareados por idade e gênero com os profissionais dos serviços de radiologia, proveniente do banco de dados do Laboratório de Citogenética Humana da UFPA
- **Grupo 2,** constituído por profissionais voluntários provenientes de vários serviços de radiologia das cidades de Belém (PA), Porto Alegre (RS), Ribeirão Preto (SP) e Belo Horizonte (MG).

## **2. Seleção de voluntários**

Para o estudo com os linfócitos humanos, foi utilizado sangue periférico de doadores voluntários, obedecendo aos seguintes critérios:

### **A. Critérios de Inclusão:**

- Ter entre 20 e 50 anos;
- Trabalhar em serviços de radiologia por mais de um ano;

### **B. Critérios de Exclusão:**

- Ser etilista ou tabagista;
- Estar fazendo uso de algum medicamento.
- Apresentar quadro de infecção (virótica ou bacteriana)
- Ter feito tratamento quimioterápico ou radioterápico em algum momento da vida.

## **3. OBTENÇÃO DO SANGUE**

Foram coletados 10 ml de sangue periférico de cada indivíduo por punção venosa utilizando agulhas e seringas descartáveis previamente heparinizadas com Lique mine (Lab. Roche 5.000 UI/ml).

Após a coleta, o sangue foi transferido para tubos de ensaio estéreis, sendo mantidos em repouso à temperatura ambiente, para a sedimentação das hemácias e separação do plasma.

No caso das coletas nos Estados participantes, o sangue foi coletado dentro dos hospitais co-participantes e transportado ao laboratório de Citogenética Humana da UFPA, num período aproximado de 24 horas. Para as amostras que seriam usadas para a o EC, foi adicionado 200 µl de DMSO a 4% para evitar a ação de agentes durante o período de coleta e processamento das amostras.

Linfócitos de sangue periféricos humanos estão predominantemente dentro fase de G<sub>0</sub> (pre-DNA sintético). A maioria dos linfócitos circulantes são celas de T (derivadas do timo), que pode ser estimulado para se desenvolver in vitro por um agente mitogênico como fitohemaglutinina (PHA). Isto faz dos linfócitos células ideais para procurar alterações induzidas.

No presente estudo, amostras de sangue foram coletadas durante o intervalo de trabalho e o efeito do EC pode refletir no período atual de exposição.

#### **4. TÉCNICAS DE CULTURA TEMPORÁRIA DE LINFÓCITO**

A análise de AC induzidas por radiação requer indução artificial da proliferação celular e, subsequentemente, o processo de síntese de DNA ocorrido na fase S e então, com a chegada da célula em mitose, para análise dos cromossomos propriamente ditos (LEMOS PINTO et al., 2010)

Foi adicionada 0,5 ml de plasma com linfócitos ressuspendidos, em frascos de cultura contendo um volume de 4,5 ml de meio de cultura completo. Os frascos foram mantidos na estufa à 37°C até o fim do tempo de cultivo, neste caso, 72 horas.

A cada frasco de cultura foram adicionados 200 µl do antimitogênico colchicina (0,0016% Sigma), 120 minutos antes da fixação.

Após o tempo de cultivo os frascos foram agitados para homogeneização. O material foi transferido para tubos de centrifuga e centrifugado por 8 minutos a 1000 rotações por minuto (rpm).

O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspendidas em 5 ml de solução hipotônica (KC1 0,075M) à 37°C por 20 minutos. O material foi centrifugado por 8 minutos a 1000 rpm.

O sobrenadante foi desprezado e 5 ml de fixador Carnoy recém preparado (metanol e ácido acético na proporção de 3:1) foi adicionados. Trocas do fixador foram feitos mais duas vezes (lavagem do material para retirar os restos celulares), centrifugando e deixando apenas o material suficiente para a confecção das lâminas.

Usando lâminas bem limpas e mantidas em etanol 70% gelado, o material fixado foi gotejado, inclinando as lâminas para espalhar melhor o material, passando-as em seguida na chama, com o cuidado de não aquecer demais.

A coloração foi processada com o corante Giemsa diluído em uma solução tampão (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,06 M e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,06 M - pH 6.8), na proporção de 1 ml do corante para 30 ml do tampão, por um período de 8 minutos.

## 5. ENSAIO COMETA (VERSÃO ALCALINA)

Desenvolvido por Singh *et al.*, (1988) e, posteriormente, modificado por Anderson *et al.*, (1994), é um ensaio muito versátil e sensível para a detecção de quebras de fita simples e dupla no DNA. Ele tem sido amplamente utilizado como uma ferramenta para a avaliação das respostas celulares aos danos no DNA, podendo ser aplicado em estudos de genotoxicidade, biomonitoramento, ecotoxicológicos e ainda alguns estudos que envolvem saúde humana.

Uma das maiores vantagens do Ensaio Cometa é a possibilidade de sua aplicação em diferentes tipos celulares que não necessariamente estejam em proliferação, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Basicamente o método consiste em isolar células individualizadas em uma matriz de agarose NMP (baixo ponto de fusão) e submetê-las a uma etapa de lise onde restará apenas o conteúdo de DNA nuclear aderido a essa matriz.

Posteriormente, esses núcleos (nucleóides) são submetidos a uma eletroforese de baixa voltagem onde as quebras do DNA migram em direção ao ânodo. Na etapa seguinte as lâminas são coradas e analisadas (ANGELIS *et al.*, 1999).

### 5.1 Preparação das lâminas

As lâminas foram previamente cobertas por solução de agarose de ponto de fusão normal a 1,5%. Posteriormente, foram mantidas em temperatura ambiente até a solidificação da agarose de um dia para o outro. Esta camada foi utilizada para promover a adesão na segunda camada de agarose (baixo ponto de fusão - 0,8 %), na qual a amostra foi diluída.

Foram separados 450 µL de amostra de cada grupo e em seguida feita uma centrifugação a 1000 rpm por 5 min. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado deixando 30 µL para a ressuspensão. Deste conteúdo, 15 µL foram acrescentados em 300 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,8 %), sendo em seguida homogeneizado.

Subseqüentemente, 100 µL deste conteúdo foram aplicados rapidamente sobre cada lâmina contendo agarose e, em seguida, cada lâmina foi coberta com uma lamínula (24 x 60 mm). As lâminas foram mantidas a 4 °C por 5 min até a solidificação

da agarose. Após este período, as lamínulas foram removidas cuidadosamente, mergulhadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA , 10 mM Tris, 1 % Triton X-100 e 10 % DMSO; pH: 10) e mantidas a 4 °C protegidas da luz.

Em seguida, a suspensão de células foi aplicada rapidamente sobre a primeira camada de agarose, sendo a lâmina, então, coberta com a lamínula (24x60mm) e mantida em baixa temperatura por 5min até solidificar a agarose. Depois, a lamínula foi retirada e a lâmina mergulhada na posição vertical em solução de lise (2,5M NaCl, 100mM EDTA , 10mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO e 1% N-Lauroyl sarcosine; pH 10) a 4°C e protegida da luz.

## **5.2 Eletroforese**

Ao serem removidas da solução de lise, as lâminas foram colocadas na posição horizontal na cuba de eletroforese. Esta deve estar em um “banho de gelo”, para manter a temperatura da eletroforese constante em torno dos 4°C. A cuba foi, então, preenchida com a solução de eletroforese (1mM EDTA, 300mM NaOH; pH>13) recém-preparada, a um nível superior (0,25cm, em média) às lâminas. Estas ficarão em repouso por 20min para permitir o desenrolamento do DNA, o afrouxamento de suas ligações e a exposição dos sítios alcali-lábeis.

A eletroforese foi conduzida usando 35V e 300mA por 20min. Todos esses passos foram realizados na presença de baixa luminosidade. Após a eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba e mergulhadas na solução de neutralização por 5 minutos.

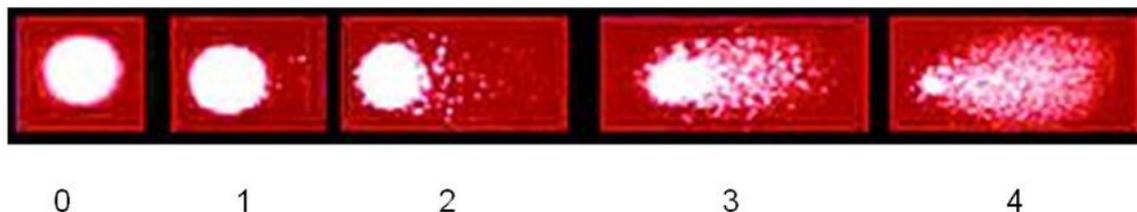
## **5.3 Coloração**

As lâminas foram fixadas com etanol a 70%. Posteriormente, foram coradas com 50µl de solução de Brometo de Etídio (20µg/ml) e, em seguida, cobertas com lamínula para serem analisadas.

## **5.4 Análise das lâminas**

As lâminas foram visualizadas em microscópio de fluorescência. A análise foi feita pelo padrão de escores, onde, de acordo com o tamanho e intensidade da cauda do cometa, os mesmos foram divididos em cinco categorias (0-4) de acordo com a

percentagem de DNA na cauda do cometa, que indicam o grau de lesão sofrido pela célula:



**Figura 5:** Fotomicrografia mostrando os níveis de dano analisados pelo EC (<http://images.google.com.br>)

0 = sem danos (<5%)

1 = baixo nível de danos (5-20%)

2 = médio nível de danos (20-40%)

3 = alto nível de danos (40-95%)

4 = dano total (95%)

**Figura: Índice de dano avaliado pelo Ensaio Cometa.**

## 6. O TESTE DO MICRONÚCLEO (MN)

O micronúcleo é uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal, formado durante a telófase da mitose quando o envelope nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos das células filhas. Tal estrutura é resultante de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal, representando perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural (fragmento) ou dano no aparelho mitótico (Fenech, 2000).

Os danos no DNA causados pela exposição a agentes mutagênicos, somente são expressos em MN após um ciclo de divisão celular, porém com interrupção da citocinese, que pode ser feito com uso de citocalasina B que atua

inibindo a polimerização da proteína actina que participa na formação do anel de microfilamentos que contrai o citoplasma e cliva a célula em duas (FENECH, 2000).

Após o tratamento as células foram tripsinizadas e incubadas em frascos de 5ml a 37°C por mais 24 horas em presença de citocalasina-B (Cyt-B) (inibidor de citocinese) (3µg/ml).

Ao final do tratamento com citocalasina-B, as células foram transferidas para um tubo de centrifuga e centrifugadas a 800 rpm, por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi levemente agitado. As células foram tratadas com 5ml de solução hipotônica gelada (KCl 0,075M), ressuspensas e centrifugadas a 800rpm por mais 5min.

O sobrenadante foi, em seguida, descartado e o sedimento foi fixado com 5ml de fixador (metanol/ácido acético 5:1) fresco. Três gotas de formaldeído foram acrescentadas para preservar a integridade do citoplasma e resuspensa. O procedimento foi repetido por mais 2 vezes utilizando-se fixador 3:1, porém sem utilizar formaldeído. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e descartado até restar um volume de duas vezes em relação ao pellet.

As células foram cuidadosamente ressuspensas para preparação de lâminas que secarão a temperatura ambiente. As lâminas foram coradas com Giemsa a 3% por 10min, lavadas com água destilada, para remoção do corante excedente e secas ao ar livre. A frequência de micronúcleos foi estimada em 1000 células binucleadas analisadas segundo critérios de Fenech (2000).

#### **6.1 CRITÉRIOS PARA A ANÁLISE DAS CÉLULAS (Fenech, 2000)**

Para a seleção das células a serem analisadas foram utilizados os critérios de Fenech, 2000

- Mil (1000) células binucleadas com membrana intacta;
- Núcleos intactos, com tamanhos aproximadamente iguais, mesmo padrão de coloração e dentro do limite citoplasmático;
- Células claramente distinguíveis das células adjacentes.

## **6.2 Análise dos Micronúcleos (MN)**

A análise foi realizada em 1000 células binucleadas para cada um dos diferentes grupos avaliados (controles e expostos), com os micronúcleos obedecendo aos seguintes critérios: apresentar morfologia idêntica a dos núcleos principais; possuir diâmetro entre 1/16 até no máximo 1/3 dos núcleos principais; apresentar mesma coloração dos núcleos principais, mas ocasionalmente com maior intensidade; não apresentar refringências; não estar ligado ou conectado a um dos núcleos principais; e por fim, não se sobrepor aos núcleos principais (FENECH, 2000)

## **Análise das Pontes Nucleoplasmáticas (PNP)**

A frequência de pontes nucleoplasmáticas foi avaliada em 1000 células binucleadas. As PNP correspondem a biomarcadores de instabilidade genômica que se expressam como ligações contínuas entre os núcleos das células binucleadas e que parecem ser resultantes de rearranjos cromossômicos envolvendo mais de um centrômero ou de cromátides que migram para pólos opostos da célula durante a anáfase

## **Análise do Índice de Divisão Nuclear (IDN)**

O índice de divisão nuclear foi analisado em 500 células a partir da seguinte fórmula:  $IDN = [M1 + 2 (M2) + 3 (M3) + 4 (M4)] / N$ , em que M1 à M4 = número de células com 1, 2, 3 e 4 núcleos, respectivamente e N = número total de células (FENECH, 2000),

## **7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Para os dados enquadrados nas premissas de normalidade, foi utilizado para análise estatística o teste de análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey. Porém, para os dados que se enquadrarão fora da curva de normalidade, foi utilizado um teste não-paramétrico, denominado Kruskal-Wallis. O nível de significância considerado foi de 5%. O banco de dados utilizados foi o SPSS e comparado com o Bioestat versão 5.4 (Ayres *et al.*, 2012).

## V. RESULTADOS

Todos os participantes passaram por questionamento verbal e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, para participar da pesquisa. O projeto foi aprovado por comitê de ética (CAAE: 36572614.5.0000.0018), sendo revalidado por cada comitê co-participante (anexos)

As tabelas abaixo mostra a caracterização dos indivíduos participantes sendo descrita e divididas por Estado, com o gênero, tempo de serviço, quantidade de horas por de serviço por dia e os setores aos quais trabalham.

Gênero	Tempo de Serviço (anos)	Área de Trabalho	Horas de Trabalho/dia	Idade
Feminino	25	CT, RX	8 a 9	46
Masculino	8	RX	8	30
Feminino	3	RX, mamografia	6	43
Masculino	20	RX	6	43
Masculino	11	RX	12	34
Masculino	10	RX, mamografia, CT	5	50
Feminino	30	RX, mamografia	4	55
Feminino	2,5	Mamografia, CT, RX	5	32
Feminino	10	RX, mamografia, CT	8	31
Feminino	15	RX, CT	5	45
Feminino	27	RX	6	58
Masculino	5	Ressonancia, rx	5	26
Feminino	25	Radioterapia, RX, CT	10	51
Feminino	21	RX	10	41
Masculino	7	Densitometria, RX	6	29
Feminino	15	RX	6	61
Masculino	13	RX, HD	10	35
Masculino	7	RX, CT	6	54
Masculino	18	CT	6	72
Masculino	35	RX	8	52
Masculino	4	RX	6	26
Masculino	14	RX, CT	8	38
Masculino	25	RX	8 a 9	46

**Tabela 1:** Características dos indivíduos participantes em Ribeirão Preto

Gênero	Tempo de Serviço (anos)	Área de Trabalho	Horas de Trabalho/dia	Idade
Feminino	12	NM	10	37
Masculino	34	RX	5	54
Masculino	30	CT e RX	6	54
Masculino	37	RX	8	59
Masculino	36	RX	4	56

Feminino	28	RX e mamografia	13	57
Feminino	9	NM	10	35
Feminino	9	NM	10	31
Feminino	14	NM	10	39
Feminino	8	NM	10	31
Feminino	15	NM	10	43
Feminino	4	NM	10	27
Masculino	11	CT e RX	11	38
Feminino	3	enfermagem	6	41
Feminino	15	CT,RX e RM	12	29
Masculino	11	RX e mamografia	8	61
Feminino	24	RX	8	35
Masculino	22	RX	8	54
Masculino	16	RX	5	72
Masculino	28	RX	5	52
Feminino	13	CT e RX	5	26
Masculino	19	RX e CT	8	46
Feminino	19	RX e CT	7	42
Feminino	8	CT	6	41
Feminino	5	Enfermagem	6	36
Feminino	15	RX	5	34

**Tabela 2:** Características dos indivíduos participantes em Porto Alegre

**Tabela 3:** Características dos indivíduos participantes em Belém

Gênero	Tempo de Serviço (em anos)	Área de Trabalho	Horas de Trabalho/dia	Idade
Masculino	19	RX	4	42
Feminino	28	RX e Mamografia	4	56
Feminino	18	RX e Mamografia	4	58
Masculino	12	RX e CT	4	36
Masculino	22	RX e CT	4	37
Masculino	30	RX e CT	4	64
Feminino	14	RX, Mamografia	4	40
Masculino	30	RX	4	63
Masculino	14	RX	4	35
Masculino	14	RX	4	35

Gênero	Tempo de Serviço	Área de Trabalho	Horas de Trabalho	Idade
Masculino	4	RX, CT	7	25
Feminino	9	RX	6	32
Feminino	7	RX, CT Mamo	8	26
Masculino	7	RX	12	33
Masculino	8	RX	6	49
Masculino	8	RX, CT	10	38
Masculino	7	RX	6	49
Masculino	21	RX	9	38
Masculino	8	RX	6	28
Masculino	4	RX, CT	7	25

**Tabela 6:** Características dos indivíduos participantes em Belo Horizonte

As entrevistas foram feitas nos locais de trabalho dos indivíduos participantes, seguindo o modelo de questionários (anexo 4), onde foram perguntados sobre o tempo de serviço, a sub-área em que trabalham, seus hábitos alimentares, horas de sono por dia, ingestão de bebidas alcoólicas, hábitos tabagistas, utilização de medicamentos, assim como o histórico familiar para doenças.

Como característica geral, a população estudada foi de 68 participantes, sendo todos trabalhadores do setor de radiologia dos Hospitais Risoleta Tolentino, em Belo Horizonte – MG, Hospital de Clínicas de Ribeirão Preto –SP, Hospital de Clínicas de Porto Alegre – RS, e Hospitais Barros Barretos e Betina Ferro em Belém – PA.

A média de idade foi de 35,33 para Indivíduos de Belo Horizonte, 48 anos para Belém, 43,27 para Ribeirão Preto e 42,03 para Porto Alegre e comparativamente, quantidade de homens e mulheres participantes foi equivalente (33\35)

Apenas os indivíduos de Belém trabalham exclusivamente em um local com uma média de 24 horas por semana de jornada de trabalho, seguindo a legislação dos profissionais da área. Os outros indivíduos exercem funções em outros locais, além dos citados de onde foram feitas a entrevistas.

Os controles usados foram pareados por gênero e idade, todos provenientes do banco de dados pertencente ao Laboratório de Citogenética Humana da Universidade Federal do Pará.

Todos os indivíduos participantes informaram fazer uso de Equipamentos de proteção tanto individual quanto coletivos. No entanto, os critérios de comportamento de segurança (i.e como distancia objeto – imagem, tempo de exposição) raramente foram mencionados.

Todos os locais apresentam condições de mensura e blindagem de salas e equipamentos adequados e padronizados pela CNEN. Existe uma diferença na utilização dos equipamentos, onde apenas o Hospital de Clínicas de Porto Alegre faz uso de DR de detecção direta, e ainda estes, nunca fizeram a utilização de CR, fazendo a transição de SAF diretamente para DR a cerca de 3 anos.

27 dos indivíduos (38%) trabalha direta e exclusivamente com Radiologia Geral (somente RX), sendo 17 indivíduos trabalhando com CT e RX (23%), enquanto que 9 com mamografia (12%) e 7 com Medicina Nuclear (NM) (10%). Todos os indivíduos que trabalham com mamografia e NM são do gênero feminino e, no caso da NM, todas as participantes trabalham exclusivamente com este setor e em mais de um local.

Na análise de dados de frequência, de MN e AC, observou-se uma diferença estatisticamente significativa em todos os Estados. Foi feita uma comparação intra grupo com os resultados de MN e EC, para determinar se houve diferença significativa nestes resultados, como um indicativo para averiguar parâmetros diferenciados de dano.

A diferença na utilização dos equipamentos usados nos diferentes Estados pode ser um fator a ser levado em consideração, tendo em vista a diferença de carga usada nestes equipamentos, concordando com a literatura (BORASI et al., 2003, BROSI et al., 2011, HUFTON et al., 1998).

<b>Grupo</b>	<b>Frequência (média) de MN</b>
Ribeirão Preto	1.96
Belo Horizonte	1.85
Belém	1.96
Porto Alegre	1.74
Controle	0.9

<b>Grupo</b>	<b>Frequência (média) de AC</b>	<b>Ensaio Cometa (média de ID)</b>
Ribeirão Preto	1.16	0.68
Belo Horizonte	1.97	0.58
Belém	1.14	0.84
Porto Alegre	1.12	0.55
Controle	0.87	0.48

**Quadro 3:** Frequência média de MN, AC e EC (por índice de dano)

Os dados de frequência de MN e EC dos indivíduos que trabalham exclusivamente com Medicina Nuclear foram estatisticamente significativos em relação aos outros participantes de outros setores da radiologia.

Durante as entrevistas realizadas para coleta, nenhum considerou a utilização de dosímetros como fator de proteção. Nenhum dos indivíduos relatou conhecimento sobre a média de dosimetria, fornecida mensalmente ao departamento de física médica. Todos os dados apresentados são referentes à utilização de equipamento DR, CR e SAF.

**Testes da Amostras Pareadas**

		Diferenças das Amostras Tratamentos e Controles					t	Gl	Sig. (2-lados)
		Média	Desvio padrão	Erro padrão	Intervalo de Confiança				
					Inferior	Superior			
Par 1	Micro	-.76100	.26202	.08286	-.94844	-.57356	-9.184	9	.000
Par 2	Micro	-.68778	.37844	.12615	-.97868	-.39688	-5.452	8	.001
Pair 3	Micro	-.41545	.38907	.08295	-.58796	-.24295	-5.008	21	.000
Par 4	Micro	-.15929	.26400	.04989	-.26165	-.05692	-3.193	27	.004
Par 5	Cometa	-.35700	.20205	.06389	-.50154	-.21246	-5.587	9	.000
Par 6	Cometa	-.16444	.22372	.07457	-.33641	.00753	-2.205	8	.059
Par 7	Cometa	-.24318	.29317	.06250	-.37316	-.11320	-3.891	21	.001
Par 8	Cometa	-.06607	.16636	.03144	-.13058	-.00156	-2.102	27	.045

**Quadro 2:** Diferença das amostras com controle e indivíduos expostos.

A análise estatística indicou que entre os grupos a variação de 0,223 explica que há uma diferença significativa entre as amostras. A variância por dentro dos grupos (0,054) por sua vez, indicou que as chances das diferenças serem decorrentes de erro amostral são pequenas.

O resultado do teste da estatística F da ANOVA (significância = 0,010), nos levar a concluir que há evidência de que os danos encontrados nas amostras são diferentes no ponto de vista da Estatística, indicando que outras variáveis atuam no processo de construção dos danos nos indivíduos.

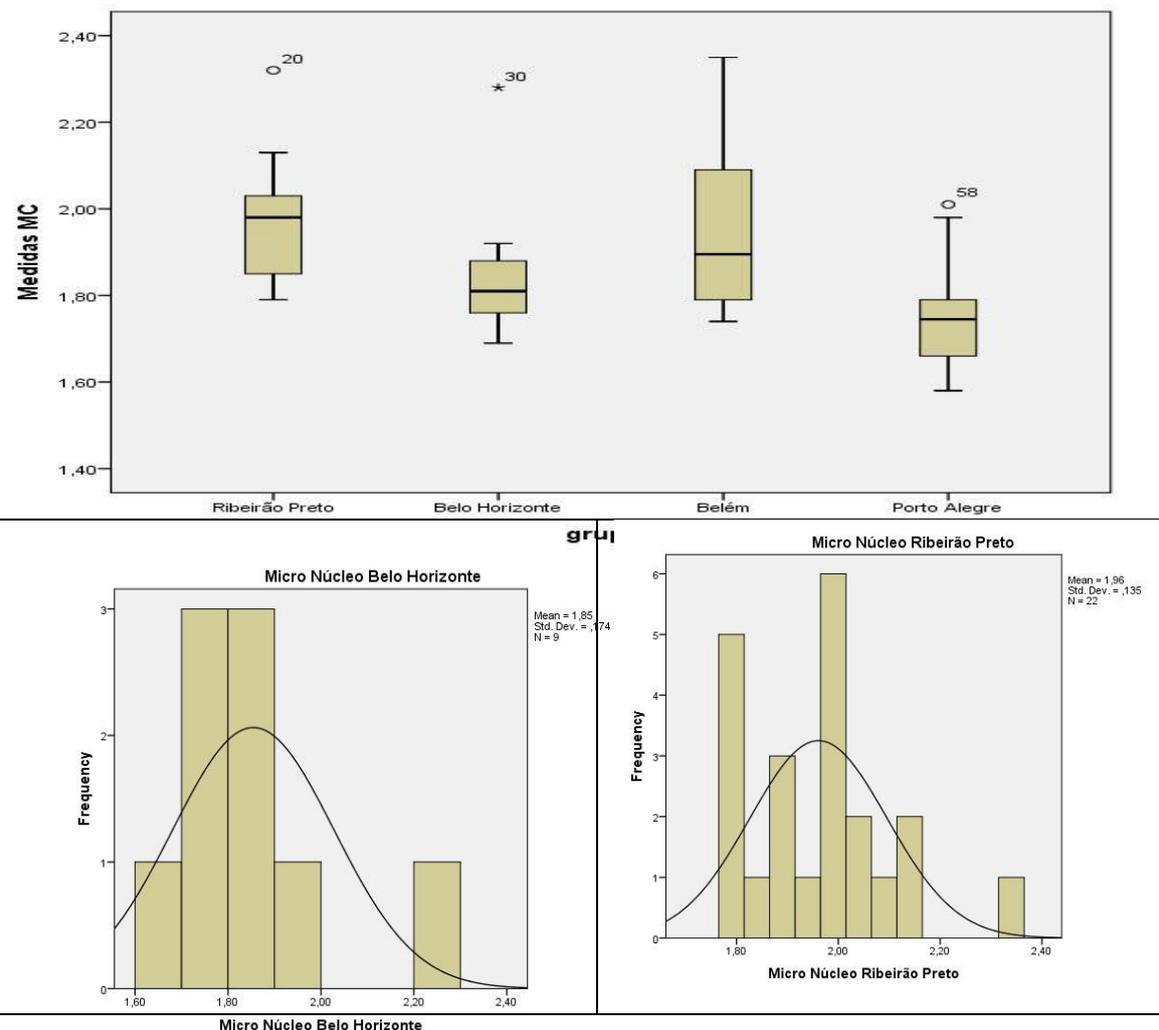
### 1. Análise Estatística

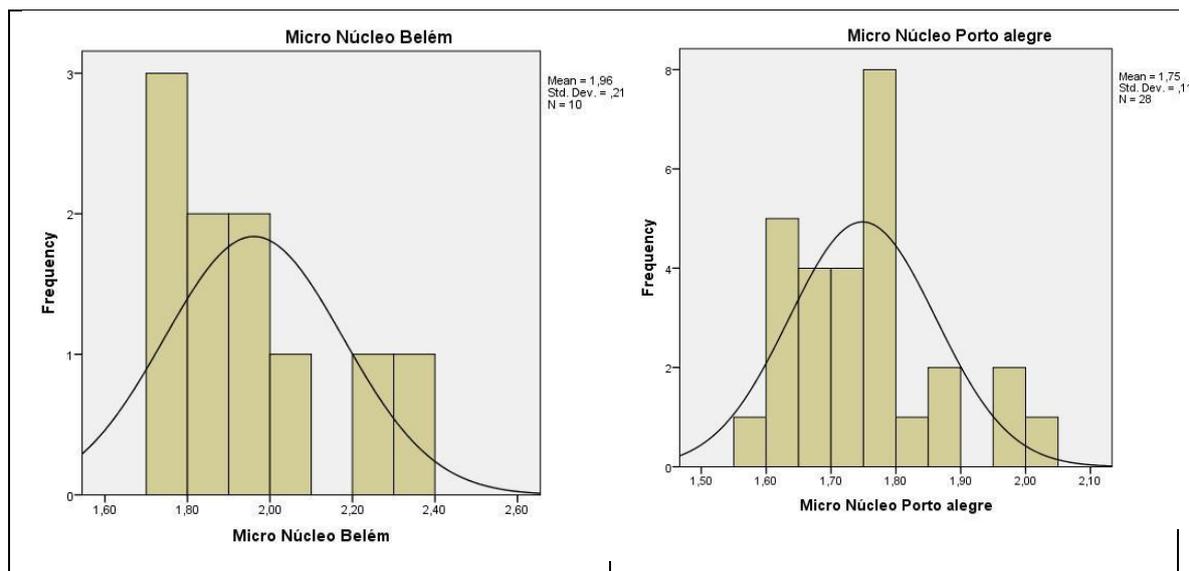
O teste paramétrico escolhido foi o Teste T para variáveis emparelhadas (dependente) com significância de alfa (5%) para fazer a comparação entre cada amostra, recomendada porque cada amostra é independente entre si.

A comparação utilizando o teste T foi feita de forma exclusiva entre os expostos e os controles. O teste ANOVA foi usado para comparações entre os grupos, numa tentativa de observar se existem diferentes níveis de danos entre os indivíduos expostos nos Estados coletados.

Em todos os experimentos, foi constatada uma diferença significativa de danos quando comparadas aos controles. No caso da comparação entre os grupos, houve diferença nos níveis de danos, evidenciando um dano considerado fraco entre os indivíduos de POA, moderado entre os indivíduos de Belém e Ribeirão Preto e alto entre os indivíduos de Belo Horizonte.

Segundo dados de dosimetria fornecidos pelos hospitais participantes, a média foi de 0 a 2 mSv em Belém, 0 a 4.5 mSv em Belo Horizonte, 0 a 6.2 mSv em Ribeirão Preto e 0 a 9.6 mSv em Porto Alegre na medida de 11 meses. Estes dados são mensurados e repassados aos profissionais mensalmente.





### Histogramas das Amostras

Em duas situações, onde as amostras têm maiores tamanhos, o uso do gráfico do histograma referenciado por Dancey (2006, p. 229) sendo fundamental a decisão de considerá-las, pois confirmam visualmente como sendo normais, pois seu espectro se aproxima quase que perfeitamente a figura de uma curva normal

Na análise de dados de frequência, de MN e AC, observou-se uma diferença estatisticamente significativa em todos os Estados. Usando estes dois marcadores, foi feita uma comparação intra-grupo. O índice de dano do EC também se mostrou significativo em relação aos controles.

## VI. DISCUSSÃO

Os resultados encontrados nesse trabalho, fazendo uso de ferramentas citogenética do teste do MN e AC, além do EC, fornecem informações claras de que, apesar de apresentarem resultados de dosimetria física considerados seguros, os danos em nível celular podem ser constatados, ainda que os indivíduos participantes façam uso de EPIs e EPCs.

Fatores como a idade e o gênero, relacionados ao tempo de exposição (tempo de serviço) e as diferentes áreas dentro da radiologia (tomografia, mamografia e radiologia geral), estão diretamente relacionados com os possíveis danos que as RI vem a produzir. É de conhecimento geral que as RI induzem alterações celulares e nossos dados estão em concordância com este fato.

A diferença de sensibilidade entre o EC e o MN, deve-se ao fato de seus diferentes estágios de detecção. O EC pode detectar quebras de fita simples e o MN detecta somente micronúcleos provenientes de fragmentos cromossômicos. A baixas doses, as RI induzem, de maneira geral, quebras de fita simples, que podem não resultar em MN.

Assim sendo, uma associação destes testes pode ser recomendada para entender melhor os mecanismos de ação mutagênica associados às interações de RI e das células, em células que recebam baixas doses de RI.

Muitos estudos (VERSCHAEVE et al., 2007, BINKOVA et al., 1996, NAVASUMRIT et al., 2005, SRENSEN et al., 2003) recomendam a adoção do EC como ferramenta para biomonitoramento ocupacional para detecção de danos ao DNA. A utilização de controles adequados no entanto, é crucial para este tipo de ensaio. Fatores como fumo e etilismo devem ser levados em consideração na prática deste ensaio, uma vez que existe a comprovação destes hábitos nos resultados de estudos de danos obtidos com o EC.

No caso do MN, é de conhecimento geral que diferentes fatores influenciam na frequência de MN em linfócitos de sangue periféricos, como gênero, idade, estilo de vida e até mesmo hábitos de sono. Dessa forma, há a necessidade de uma padronização para os protocolos de análise de frequências de MN, ao analisar indivíduos expostos a RI, de forma a minimizar ou eliminar as variáveis metodológicas. A automação dos procedimentos pode ser um meio para superar estas dificuldades.

Estudos de Françõis, 2014, descrevem a viabilidade de adoção da automação no teste do MN, diminuindo a possibilidade de erros de contagem, assim como uma melhora considerável no tempo de aplicação e análise do teste. Esta poderia ser uma proposta adotada em laboratórios no Brasil para facilitar e agilizar a resposta em casos de exposições acidentais, ou até mesmo, práticas de biomonitoramento.

Uma outra proposta para o estudo de centrômeros juntamente ao MN, é a marcação por sondas, revelando a origem dos MN e, considerando que os MN provenientes de quebras por RI são diferenciados, esta análise pode trazer à luz de forma mais sensível a estimativa de dose/resposta sobre RI em indivíduos expostos.

Os dados de comparação entre os locais que utilizam máquinas DR, CR e SAF, mostram que, além de trazerem uma qualidade no diagnóstico em termos de imagem, a quantidade de dose usada e recebida com equipamentos DR é menor e, portanto, a possibilidade de efeitos deletérios, tende a diminuir

A dose recebida por profissionais expostos à RI no Brasil é um dado praticamente ignorado pelos trabalhadores. Através de entrevistas diretas aos mesmos, mais de 90% destes indivíduos, foi constatado que os mesmos têm mais de um emprego em locais diferentes e, por conta desse fato, a número correspondente aos dados de dosimetria física pessoal pode não traduzir a realidade.

A legislação atual (lei 7394/85), preconiza a carga horaria de trabalho a estes indivíduos de 24 horas por semana, sendo o quesito férias vetado, e, conseqüentemente, aberto, sendo em alguns casos, o fato de trabalhadores gozarem de 20 dias de férias a cada 6 meses, fazendo uso do primeiro texto referente a estes trabalhadores de 1954. Este fato faz com que muitos dos indivíduos que atuam na área acabem trabalhando em mais de um local.

Todos os participantes de Belém trabalham em apenas um local, diferente dos Estados de MG, SP e RS. Apesar deste fato, os resultados de frequência de MN e EC ainda são superiores encontrados em Belém, Belo Horizonte e Ribeirão Preto, quando comparados com os resultados de Rio Grande do Sul.

Nossos resultados estão de acordo com vários estudos (LINET et al., 2005, HAMADA et al., 2009, 2010, BONASSI et al., 2004), apresentando uma frequência aumentada de ACs dos indivíduos participantes, também para a frequência de MN, concordando com vários outros estudos (BONASSI et al., 2007, IARMARCOVAI et al., 2008, PALANIKUMAR et al., 2011), em que ambas os teste podem ser usados como ferramenta de biomonitoramento.

Fenech (FENECH et al., 2001) analisou a performance de MN como uma dosimetria biológica em um estudo com pacientes com câncer, demonstrando uma relação entre o aumento MN e o aumento de dose de radiação.

A interação das RI com o DNA produz uma serie de interações físico-químicas, que passam por QDF, QFT, além das ja mencionadas lesões em nível de citoplasmas e, como o EC pode produzir uma resposta rápida e sensível no caso de exposições acidentais, este se torna um teste elegível para complementação ao biomonitoramento de indivíduos expostos a agentes mutagênicos como as RI. Os resultados apresentados neste trabalho estão de acordo com esta hipótese, concordando com vários autores (VALVERDE e ROJAS, 2009, SEIDEL et al., 2012, WANG et al., 2013)

Os valores aumentados de índice de dano no EC no sangue de linfócitos periféricos de trabalhadores expostos a RI encontrado no presente estudo indicam um nível primário maior de dano induzido por radiação ao DNA. A avaliação de MN está

limitada a linfócitos, o ensaio do cometa detecta danos em todos os leucócitos que constituem a mistura heterogênea de células, dando uma margem maior à utilização de ambas as técnicas para estudos na área de biomonitoramento.

Segundo Maluf (MALUF et al., 2001), frequências aumentadas de ACs e MN são bem conhecidas entre indivíduos expostos ocupacionalmente à RI. A qualidade da RI a qual as populações são expostas diferem na maioria dos estudos e frequentemente existe mais de um tipo de radiação envolvida, o que dificulta uma análise apropriada das consequências de exposição crônica de RI a populações em grande escala. Algo que, no caso de nossas amostras, não deve ter influência, uma vez que os critérios de exclusão e o fato de as coletas terem sido realizadas dentro do ambiente de trabalho, no intervalo de folga dos trabalhadores.

Os exames hematológicos de contagem de células sanguíneas são estabelecidos dentro de todos os hospitais participantes para indivíduos que excedam a quantidade de 5 mSv num período de um mês, uma recomendação da própria ICRP. Essa estimativa, segundo Berg (BERGER et al., 2006), embora não seja precisa em relação aos danos potenciais de uma exposição aguda de RI, pode ser usada como referência inicial a indivíduos expostos e facilitar uma tomada de decisões no caso de acidentes radioativos.

Estes exames são o único ensaio de investigação clínica ao qual os trabalhadores expostos têm como referência no Brasil até o momento. Países desenvolvidos já adotam os testes de MN e ACs como monitoramento biológico para esta classe de trabalhadores, o que reforça a ideia deste tipo de monitoramento no Brasil.

A exemplo de medidas preventivas sobre os indicadores clínicos de SAR, a contagem de linfócitos provê dados importantes relativos ao potencial danoso das exposições à RI. Apesar da gama de variáveis (i.e tempo de aparição de efeitos, falta de dados sobre dose recebida), a contagem de linfócitos com, com referência a doses efetivas, já é estabelecida, onde se tem a fase pré clínica de 0.1–1.0 Gy e 1.5–2.5x10<sup>9</sup> GL, e considerada severa com uma carga de 6 – 8 Gy e 0.1 – 0.3 x 10<sup>9</sup> GL.

Sobre a questão das ACs, existe uma grande discussão no meio acadêmico a respeito da relação dose/efeito. Segundo Bonassi (BONASSI et al., 2002), as aberrações relacionadas à cromátide estão associadas a stress químico, enquanto que aberrações cromossômicas tem relação mais específica à RI. A informação

quantitativa de dose/efeito foi primeiramente testada na década de 1960 e manteve-se como referência por muito tempo.

Atualmente, vários fatores precisam ser levados em consideração quando se trata de avaliação de ACs em exposições crônicas à RI. Primeiramente, a IAEA (IEA, 2001) preconiza que, em caso de exposições menores que 1 Gy, a contagem seja de 500 células e no caso de estudos com doses maiores que 1 Gy, a contagem seja de 100 células. Loyde (LLOYDE et al., 2006) estabelece que, em casos de acidentes radioativos, 50 metáfases sejam contadas.

Apesar de ser uma prática de laboratório já estabelecida a algum tempo, o estudo de ACs relacionadas à exposições crônicas de RI apresenta muitas outras variáveis além das já mencionadas. Segundo IEA, 2001, a diferenciação no modo de exposição (se fracionada, como no caso de pacientes recorrentes no setor de radiologia), pode apresentar resultados duvidosos, uma vez que a quebra primária de cromossomos expostos à RI, na primeira dose, pode ser corrigida por mecanismos de reparo, antes da exposição a doses sequenciais.

Em exposições tardias, Belloni, 2008, defende que a maior parte das células aberrantes sofre morte celular programada (apoptose), como uma espécie de mecanismo de defesa, na tentativa de prevenir efeitos biológicos como a leucemia, já que, como mencionado anteriormente, as células hematopoiéticas têm uma sensibilidade considerável à exposições de RI.

Existe uma recomendação (FERNANDES et al., 2008) de que a prática no estudo de ACs produzidas por RI só possam ser validadas por estudos de incorporação de FISH e bandeamento C, eliminando dessa forma, variáveis como temperatura, tempo de cultura e meios de cultura celular, que eventualmente poderiam apresentar resultados controversos.

Por conta destes eventos, embora considerada como “padrão ouro” para estudos das interações das RI com a biologia celular, o estudo de ACs atualmente, não é recomendado como técnica solo, sendo mais confiável quando apresentada juntamente com técnicas mais atuais e elaboradas.

A utilização do MN como ferramenta de biomonitoramento também requer de estudos bem definidos. Como já mencionado, o MN pode ter muitas variáveis, como o fato ser um evento espontâneo e ter variações de frequências diferenciadas em diferentes populações e gênero. Isto suscitou a iniciativa ao “Projeto Micronúcleo”, sugerido por Fenech, 2006, numa tentativa de estabelecer padrões de frequência em

diferentes populações e assim, tentar eliminar ou diminuir o quão possível, variáveis como as mencionadas.

Este projeto já é adotado por muitos laboratórios na Europa e Austrália e conta com a cooperação de vários laboratórios numa tentativa de estabelecer parâmetros como viabilidade, status mitótico na avaliação de exposição a vários agentes genotóxicos, fazendo uso também de sondas, para determinar a origem dos MN e assim, viabilizar de forma mais coerente a utilização desta técnica, uma vez que já se tem conhecimento das diferentes origens dos MN (quando espontâneos ou produzidos por agentes).

Com base nos resultados apresentados neste trabalho, onde foram realizados três experimentos para avaliar a possibilidade de danos celulares à indivíduos expostos à RI cronicamente por conta de seu ofício, em quatro Estados do Brasil, podemos inferir que a exposição deste agente genotóxico pode gerar danos, mesmo em condições consideradas física e legalmente seguras.

Dessa forma, os dados de interação biológica das RI sobre os participantes deste trabalho, tentam trazer a luz as consequências da convivência com um agente mutagênico conhecido, mas que traz inúmeros benefícios à sociedade como um todo e, por conta disso, requer de estudos mais aprofundados, de avanços no gerenciamento e manejo desta forma de energia

## **VII. CONCLUSÃO**

A utilização de RI na medicina, quer seja para diagnóstico, quer seja para terapia, é inevitável nos dias atuais. Evidentemente, este fato gera algum grau de exposição deste tipo de energia e vem se tornando claro através dos anos que equipamentos menos sofisticados na proteção e manipulação radiológica tem relação direta com o grau de exposição, em concordância com o estudo de Wakeford (WAKEFORD, 2009).

Sendo assim, concluímos que, apesar da utilização de RI em baixas doses, consideradas seguras, a exposição crônica por longos período, pode apresentar frequências elevadas de ACs, MN, bem como um índice de danos para EC.

A utilização de máquinas DR na radiologia geral pode diminuir os danos biológicos a longo prazo e, como consequência, pode fornecer um novo padrão de

segurança à trabalhadores na área de radiologia, diminuindo a possibilidade de doenças relacionadas como o câncer.

Existe a necessidade de adoção de um banco de dados para referências futuras como proposta de monitoramento biológico para trabalhadores da área da radiologia no Brasil, fazendo uso de ferramentas como estudo de frequência de ACs, MN e índices de danos do EC.

A conscientização por parte dos trabalhadores desta área da medicina, assim como setores forenses e industriais, onde os mesmos podem atuar, através de palestras, visando uma formação mais adequada nos quesitos de segurança como tempo de exposição, estilo de vida e a associação ao tabagismo e etilismo, pode resultar numa melhora nos índices de dano apresentados neste trabalho.

Estudos mais elaborados para uma tentativa de traçar uma relação mais adequada entre os fatores de gênero, idade e tempo de exposição, além dos tipos de equipamentos usados, onde estes parâmetros podem vir a trazer uma visão melhorada das influências da convivência crônica com RI em ambientes hospitalares, principalmente para os trabalhadores da área.

Para reforçar esta estatística, um estudo mais aprofundado enquadrando estes fatores pode fazer uma leitura mais atual da legislação que cobre indivíduos expostos à RI no Brasil atualmente.

Lembrando que, dentre os relatórios de dosimetria física fornecidos pelos hospitais participantes, cerca de 90% dos indivíduos não ultrapassaram 5 mSv de acúmulo de dose em 11 meses e nenhum ultrapassou 10 mSv.

A adoção de técnicas de monitoramento biológico usadas neste trabalho, mostram-se adequadas e validadas na literatura. A utilização destas técnicas, além de trazer uma perspectiva melhorada nas condições de trabalho de uma classe de indivíduos expostos cronicamente a um agente genotóxico conhecido e amplamente utilizado na medicina, poderia fornecer dados para um melhor entendimento das interações de RI e eventos biológicos e prevenir eventos como o câncer.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALPER, T. Lethal mutations and cell death. **Phys Med Biol** 1963; 66: 365–85
- ARAKAWA, S.; ITO, W.; KOHDA, K.; Novel computed radiography system with improved image quality by detection of emissions from both sides of an imaging plate. **SPIE Proc Phys Med Imaging** 1999; 3659:572.
- AROUA A, BIZE R, BUCHILER-DECKA I, VADER JP, VALLEY JF, SCHNYDER F. X-ray imaging of the chest in Switzerland in 1998: a nationwide survey. **Eur Radiol.** ;13:1250–1259, 2003
- BAVERSTOCK K., KAROTKI V., Towards a unifying theory of late stochastic effects of ionizing radiation. **Mutat Res.** 2011 Jan 10;718(1-2):1-9.
- BELLONI P., MESCHINI R., LEWINSKA D., PALITTI F. Apoptosis preferentially eliminates irradiated G0 human lymphocytes bearing dicentric chromosomes. **Rad Res** 169:181–187, 2008.
- BENJAMIN, H.; QIONG, W.; BEAU W.; STEFAN. V.; LYDIA, F.; PING, L. Y.; TATJANA, P.; GAYLE, W.; Past and Future Work on Radiobiology Mega Studies: A Case Study at Argonne National Laboratory. **Health Phys.** 2011 Jun; 100(6): 613–621.
- BERAL, E.S.; GILBERT, K.; MABUCHI, W.K.; SINCLAIR, E Z. TAO.; ICRP Releases Draft Low-Dose Report The International Commission on Radiological Protection (ICRP), Low-Dose Extrapolation of Radiation-Related Cancer Risk. 2004.
- BELLONI P, MESCHINI R, LEWINSKA D, PALITTI F Apoptosis preferentially eliminates irradiated G0 human lymphocytes bearing dicentric chromosomes. **Rad Res** 169:181–187, (2008).
- BERGER M.E., CHRISTENSEN D.M., LOWRY P.C., JONES O.W., WILEY A.L. Medical management of radiation injuries: current approaches. **Occup Med** 56:162–172 (2006)
- BERRINGTON, A.; DARBY, S.C.; WEISS, H.A.; DOLL, R; 100 years of observation on British radiologists:mortality from cancer and other causes 1897–1997. **Br J Radiol.** 2001; 74:507–19.
- BERTHO, J. M.; ROY, L.; SOUIDI, M.; New biological Indicators to evaluate and Monitor radiation-induced damage: an accident case Report. **Radiat. Res.**, 169, 543–550, 2008
- BETTI. C.; DAVINI. T.; GIANNESI, N.; LORIPENO, B.; Microgel electrophoresis assay (Comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. **Mutation Research.**; 307:323 – 333, 1994.
- BINKOVA´ B., LEWTAS J., MISKOVA´ I., ROSSNER P., CERNA´ M., MRA´ CKOVA´ G., PETERKOVA´ K., MUMFORD J., MEYER S., SRA´ R.J., Biomarker studies in northern Bohemia, Environ. **Health Perspect.** 104 (1996) 591–597.
- BITHELL, J.F.; STEWART, A. M.; Pre-natal irradiation and childhood malignancy: a review of British data from the Oxford Survey. **Br J Cancer.** 1975; 31:271–287.

BOLCH, W. E.; HURTADO, J. L.; LEE, C.; MANGE, R.; DICKERSON, W.; Guidance on the Use of Hand-Held Survey Meters for Radiological Triage: Time-Dependent Detector Count Rates Corresponding to 50, 250, and 500 mSv Effective Dose for Adult Males and Adult Females., **Health Phys.** 2012 March ; 102(3): 305–325.

BONASSI, S.; AU, W.W.; Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. **Mutat Res** 511:73–86 (2002).

BONASSI, S.; ZNAOR, A.; CEPPI, M.; LANDO, C.; CHANG, W.P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; BAN, S.; BARALE, R.; BIGATTI, M.P.; BOLOGNESI, C.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; FABIANOVA, E.; FUCIC, A.; HAGMAR, L.; JOKSIC, G.; MARTELLI, A.; MIGLIORE, L.; MIRKOVA, E.; SCARFI, M.R.; ZIJNO, A.; NORPPA, A.; FENECH, M.; An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinog** 28(3):625–631, 2007

BORASI, G.; NITROSI, A.; FERRARI, P.; TASSONI, D.; An onsite evaluation of three flat panel detectors for digital radiography. **Med Phys** 2003; 30(7):1719-31.

BRABY, L.A.; Microbeam studies of the sensitivity of structures within living cells. **Scanning Microsc** 1992; 6: 164–74.

BRAGG, D.G.; MURRAY, K.A.; TRIPP, D.; Experiences with computed radiography: can we afford the cost? **AJR Am J Roentgenol** 1997; 169:935.

BRENNER, D.J.; DOLL, R.; GOODHEAD, D.T.; Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: assessing what we really know. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2003; 100:13761–13766.

BROSI, P.; STUESSI, A.; VERDUN F.R.; VOCK, P.; WOLF, R.; Copper filtration in pediatric digital X-ray imaging: its impact on image quality and dose. **Radiol Phys Technol** 2011; 4:148-155.

CALDAS, M. J.; RUINI, A. ; BUSSI, G. ; FERRETTI, A. ; SILVA, B. M. ; GOLDONI, G. ; MOLINARI, E. . Optical properties of organic materials: from single molecules to solid state. In: Eds Andreani; Benedek; Molinari. (Org). "**Radiation-Matter Interaction in Confined Systems**", 2002, v, p. 155-.

CORREA, C.R. ; BERTOLLO, C. M. ; ZOUAIN, C.S.; GOES, A.M.; Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a surface associated antigen on human breast cancer cell lines MACL-1 and MGSO-3. **Oncology Reports** v. 24, p. 677-685, 2010.

COWEN, A.R.; DAVIES, A.G.; KENGYELICS, S.M.; Advances in computed radiography systems and their physical imaging characteristics, **Clinical Radiology** (2007) 62, 1132 e 1141.

DUSINSKA M., COLLINS A.R., The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. **Mutagenesis.** 2008 May;23(3):191-205. doi: 10.1093/mutage/gen007. Epub 2008 Mar 7.

EISENBERG, M.J.; AFILALO, J.; LAWLER, P.R.; ABRAHAMOWICZ, M.; RICHARD, H.; PILOTE, L.; Cancer risk related to low-dose ionizing radiation from cardiac imaging in patients after acute myocardial infarction. **CMAJ**. 2011; 183:430–436.

FARAH MARIA, D. C.; VENÂNCIO, V. DE P., PRADO, M. R. DE S.; L. R. C. DA S. E CUNHA JUNIOR; R. R. BURBANO.; M. L. P. BIANCHI.; L. M. G. ANTUNES.; The food dye quinoline yellow causes DNA damage and genomic instability in metabolic competent HepG2 cells

FENECH M.; Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutat Res** 2006;600:58-66

FENECH M.; The *in vitro* micronucleus technique. **Mutat Res** 2000;455:81-95.

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

FRANÇOIS M., HOCHSTENBACH K, LEIFERT W, FENECH M.F. Automation of the cytokinesis-block micronucleus cytome assay by laser scanning cytometry and its potential application in radiation biodosimetry. **Biotechniques**. 2014 Dec 1;57(6):309-12.

FREITAS, T.; Avaliação dos índices de DNA danificado em usuários de crack. UFRGS, 2012.

FUČIĆ, A.; ŽELJEŽIĆ, D.; KAŠUBA, V.; KOPJAR, N.; ROZGAJ, R.; LASAN, R.; MIJIĆ, A.; HITREC, V.; LUCAS, J. N.; Stable and Unstable Chromosome Aberrations Measured after Occupational Exposure to Ionizing Radiation and UltrasoundCroat **Med J**. 2007;48:371 7.

FURQUIM, T. A. C.; COSTA, P. R. Garantia de Qualidade em radiologia diagnóstica. **Revista Brasileira de Física Médica** (Impresso), v. 3, p. 91-99, 2009.

GAHROUEI, D. S.; GHOLAMI, M.; SETAYANDEH, S.; A review on natural background radiation. **Adv Biomed Res**. 2013 Jul 30;2:65.

GISLASON A.J.; DAVIES A.G.; COWEN, A.R.; Do imaging. **Med Phys** 2010; 37(10):5258-69.

GISLASON, A. J.; DAVIES, A.G.; Cowen AR. Dose optimization in pediatric cardiac X-ray imaging. **Med Phys** 2010; 37(10):5258-69.

GÜERCI, A.; ZÚIGA, L.; MARCOS, R.; Construction and validation of a dose-response curve using the comet assay to determine human radiosensitivity to ionizing radiation. **J. Toxicol. Environ. Health A**, 74, 1087–1093, 2011

HAINES, G..A.; HENDRY, J.H.; DANIEL, C.P.; Morris, I.D. Germ cell and dose-dependent DNA damage measured by the comet assay in murine spermatozoa after testicular X irradiation. **Biol. Reprod**. 2002, 67, 854–861

HALL, E.; GIACCIA, A.J.; Radiobiology for the Radiologist. 6th ed. Lippincott Williams and Wilkins; Philadelphia: 2006. **Milestones in the radiation sciences**; p. 1-4.

HAMADA N, IMAOKA T, MASUNAGA S.; Recent advances in the biology of heavy-ion cancer therapy. **J Radiat Res** 2010; 51:365–83

HAMADA N. & YUKI F.; Classification of radiation effects for dose limitation purposes: history, current situation and future prospects **J Radiat Res**. Jul 2014;55 (4) 629 – 640.

HANDE P. M., AZIZOVA T. V., BURAK L. E., VALENTIN F. K., GEARD C. R., and BRENNER D. J. Complex Chromosome Aberrations Persist in Individuals Many Years After Occupational Exposure to Densely Ionizing Radiation: An mFISH Study. **Genes, Chromosomes and Cancer** (2005).

HASEGAWA H., SATO M., TANAKA H. Evaluation of an X-Ray Dose Profile Derived from an Optically Stimulated Luminescent Dosimeter during Computed Tomographic Fluoroscopy **PLOS ONE** July 7, 2015.

HAYATA I, KANDA R, MINAMIHISAMATSU M, FURUKAWA M, SASAKI MS. Cytogenetical dose estimation for 3 severely exposed patients in the JCO criticality accident in Tokaimura. **J Radiat Res** (Tokyo) 2001;42:S149–55.

HU, Z.-P.; KIM, Y.-M.; SOWA, M.B.; ROBINSON, R.J.; GAO, X.; METZ, T.O.; MORGAN, W.F.; E ZHANG, Q.; Metabolomic response of human skin tissue to low dose ionizing radiation. **Mol Biosyst** 8: 1979–1986, 2012.

HUFTON, A.P.. DOYLE, S.M.; CARTY H.M.L.; Digital radiography in paediatrics: radiation dose considerations and magnitude of possible dose reduction. **Br J Radiol** 1998; 71 :186.

IARMARCOVAI, G.; CEPPI, M.; BOTTA, A.; Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: A meta-analysis. **Mutat Res** 2008;659:274-83.

ICRP. Statement and recommendations of the International Commission on Radiological Protection from its 1980 meeting. **Br J Radiol** 1980;53:816–8.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA), Cytogenetic analysis for radiation dose assessment: a manual, Technical report series no. 405, IAEA, Vienna, 2001.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA)and World Health Organization (2000) How to recognize and initially respond to an accidental radiation injury, Vienna: IAEA 2000.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, (IAEA); Safety Culture, No. 75-INSAG-4, (1991).

INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION (ICRP). Radiological protection in pediatric diagnostic and interventional radiology. **ICRP Publication** 121. Elsevier, MD: ICRP, 2013.

INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION (ICRP) Recommendations of the international commission on radiological protection, ICRP-60. Pergamon Press, Oxford, 1991

JABBARI K.; Review of Fast Monte Carlo Codes for Dose Calculation in Radiation Therapy Treatment Planning, **J Med Signals Sens**. 2011 Jan-Apr; 1(1): 73–86.

JARTTI, P.; PUKKALA, E.; UITTI, J.; AUVINEN, A.; Cancer incidence among physicians occupationally exposed to ionizing radiation in Finland. **Scand J Work Environ Health**. 2006; 32:368–73.

JOHN B. L.; Radiation Carcinogenesis. **Carcinogenesis** vol. 21 no. 3 pp. 397 – 404, 2000.

JOHNSON, C.; PATTERSON, A.; KRAUSZ, K.; LANZ, C.; KANG, D.; LUECKE, H.; GONZALEZ, F.; E IDLE, J.; Radiation metabolomics. 4. UPLC-ESI-QTOF MS-Based metabolomics for urinary biomarker discovery in gamma-irradiated rats. **Radiat Res** 175: 473–484, 2011.

JOINER, M.C.; MARPLES, B.; LAMBIN, P.; Low-dose hypersensitivity: current status and possible mechanisms. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2001; 49: 379–89.

JONES, A. K.; ENSOR, J. E.; PASCIAK, A. S.; How accurately can the peak skin dose in fluoroscopy be determined using indirect dosimetry? **Med Phys**. 2014 Jul;41(7):071913.

KHAN, A.,; RANA, P.; DEVI, M.; CHATURVEDI, S.; JAVED, S.; TRIPATHI, R., e KHUSHU S. Nuclear magnetic resonance spectroscopy-based metabolomic investigation of biochemical effects in serum of c-irradiated mice. **Int J Radiat Biol** 87: 91–97, 2011.

KIM, K.P.; MILLER, D.L.; BALTER, S.; Occupational radiation doses to operators performing cardiac catheterization procedures. **Health Phys**. 2008; 94:211–27.

KOBAYASHI, J.; IWABUCHI, K.; MIAGAWA, K.; SONODA, E.; SUZUK, K.; TAKATA, M.; TAUCHI, H.; Current topics in DNA double-strand break repair, **J. Radiat. Res.** 49 (2) 93–103. (2008)

KUMARAVEL and JHA (2006). Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. **Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis** Volume 605, Issues 1–2, 2006.

LANZ, C.; PATTERSON, A.; SLAVIK, J.; KRAUSZ, K.; LEDERMANN, M.; GONZALEZ, F.; E IDLE, J.; Radiation metabolomics. 3. Biomarker discovery in the urine of gamma-irradiated rats using a simplified metabolomics protocol of gas chromatography-mass spectrometry combined with random forests machine learning algorithm. **Radiat Res** 172: 198– 212, 2009.

LAVIN, M. F. KOZLOV S. DNA damage-induced signalling in ataxia-telangiectasia and related syndromes. **Radiother Oncol**. 2007 Jun;83(3):231-7.

LAWINSKI, C.; MACKENZIE, A.; COLE, H.; BLAKE, P.; HONEY, I.D.; Digital detectors for general radiography. A comparative technical report. Centre for Evidence-Based Purchasing, **Evaluation Report** 05078. 2005.

LEE, J.K.; HAN E.A.; LEE S.S.; HA W.H; BARQUINERO J.F.; LEE H.R.; CHO M.S.; Cytogenetic biodosimetry for Fukushima travelers after the nuclear power plant accident: no evidence of enhanced yield of dicentrics. **J Radiat Res**. 2012 Nov 1;53(6):876-81

LEMOS PINTO M. M. P.; GONÇALVES, N. F.; AMARAL, S. A.; Current status of biodosimetry based on standard cytogenetic methods., **Radiat Environ Biophys** (2010) 49:567–581.

LEONARD, A., RUEFF, J., GERBER, G. B. AND LEONARD, E. D.; Usefulness and limits of biological dosimetry based on cytogenetic methods. **Radiat. Prot. Dosimetry**, 115, Special Issue: Part 1 Sp. Iss. SI, 448–454 (2005).

LINETA M. S., KIMB K. P., MILLER D. L., KLEINERMANA R. A., SIMONA S., B. A. DE GONZALEZ. Historical Review of Cancer Risks in Medical Radiation Workers **Radiat Res**. 2010 December ; 174(6): 793–808.

LLOYD D.C., Cytogenetics studies of populations exposed to Chernobyl fallout. **Int Congr Ser** (2005) 1276:33–36.

LLOYD D.C., EDWARDS A.A., MOQUET J.E., GUERRERO-CARBAJAL Y.C. The role of cytogenetics in early triage of radiation casualties. **Appl Rad Isot** 52:1107–1112 (2000).

MALUF S. W., PASSOS D. F., BACELAR A., SPEIT G., ERDTMANN B., Assessment of DNA Damage in Lymphocytes of Workers Exposed to X-radiation Using the Micronucleus Test and the Comet Assay. **Environmental and Molecular Mutagenesis** 38:311–315 (2001)

MARPLES B., WOUTERS B.G.; JOINER, M.C.; An association between the radiation-induced arrest of G2-phase cells and low-dose hyperradiosensitivity: a plausible underlying mechanism? **Radiat Res** 2003; 160: 38–45.

MAZZILLI B. P., ROMERO FILHO C. R. KODAMA Y., SUZUKI F. F., J. C. DELLAMANO MARUMO J. T., M. P. SANCHES R. VICENTE S. A. BELLINTANI. Noções Básicas de Proteção Radiológica. **Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares** (IPEN), 2002.

METTLER, F.A.; JR, THOMADSEN, B.R.; BHARGAVAN, M.; Medical radiation exposure in the U.S. in 2006: preliminary results. **Health Phys**. 2008; 95:502–7.

METTLER, F.A.; JR, WIEST, P.W.; LOCKEN, J.A.; KELSEY, C.A.; CT scanning: patterns of use and dose. **J RadiolProt**. 2000; 20:353–359.

MILLER D.L.; Overview of contemporary interventional fluoroscopy procedures. **Health Phys**. 2008;95:638–44.

MOHAN, A.K.; HAUPTMANN, M.; LINET, M.S.; Breast cancer mortality among female radiologic technologists in the United States. **J Natl Cancer Inst**. 2002; 94:943–8.

MONNIN, P.; HOLZER, Z, WOLF R, An image quality comparison of standard and dual side read CR systems for pediatric radiology. **Med Phys** 2006; 33:411.

MONTORO A., P. RODRÍGUEZ, M. ALMONACID J. I. VILLAESCUSA, G. VERDU, M. R. CABALLI'N, L. BARRIOS AND J. F. BARQUINERO; Biological Dosimetry in a Group of Radiologists by the Analysis of Dicentric and Translocations. **Radiation Research** 164, 612–617 (2005).

MONTORO A., RODRIGUEZ P., ALMONACID M. Biological dosimetry in a group of radiologists by the analysis of dicentric and translocations. **Radiat Res.** 2005; 164:612–7.

MOORE Q.T.; DON S.; GOSKE, M.J.; STRAUSS, K.J.; COHEN, M, HERRMANN T.; Image gently: using exposure indicators to improve pediatric digital radiography. **Radiologic Technology** 2012; 84(1): 93-99.

MORGAN W.F.; Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: I. Radiation-induced genomic instability and bystander effects in vitro. **Radiat Res** 159:567–580 2003

MOTHERSILL C, SEYMOUR C.B, JOINER M.C.; Relationship between radiation-induced low dose hypersensitivity and the bystander effect. **Radiat Res** 2002; 157: 526–32.

NAVASUMRIT P., CHANVAIVIT S., INTARASUNANONT P., ARAYASIRI M., LAUHAREUNGpanya N., PARNLOB V., SETTACHAN D., RUCHIRAWAT M., Environmental and occupational exposure to benzene in Thailand, **Chem. Biol. Interact.** 153–154 (2005) 75–8

NEITZEL U.; Status and prospects of digital detector technology for CR and DR. **Radiat Prot Dosimetry** 2005; 114:32.

NORPPA H, FALCK GC., What do human micronuclei contain? **Mutagenesis.** 2003 May;18(3):221-33.

NRPB. (National Radiological Protection Board). Radiation exposure of the UK population -1993 review. Chilton, UK: 1993.

OKUNO, E. **Radiação: Efeitos, riscos e benefícios.** São Paulo. Harbra, 1998. 96 p.

ORAVA, R. New detectors for radiology. **Phys. Med.** 15, 295–300 (1999).

PALA, F. S., ALKAYA, F., TABAKCIOGLU, K.; The effects of micronuclei with whole chromosomes on biological dose estimation. **Turk. J. Biol.**, 32, 283–290, 2008

PALANIKUMAR L, PANNEERSELVAM N., Micronuclei assay: A potential biomonitoring protocol in occupational exposure studies. **Genetika.** 2011 Sep;47(9):1169-74.

PATTERSON A. T. J, K, SLAVIK J. K., FORNACE A. J., GONZALEZ F, AND IDLE J. Radiation metabolomics. Identification of minimally invasive urine biomarkers for gamma-radiation exposure in mice. **Radiat Res** 170: 1–14, 2008.

PEER S, PEER R, GIACOMUZZI S.M.; Comparative reject analysis in conventional film-screen and digital storage phosphor radiography. **Radiat Prot Dosimetry** 2001; 94:69

PICANO E. E VANO E., The Radiation Issue in Cardiology: the time for action is now. **Cardiovascular Ultrasound** 2011, 9:35.

PICANO E., VAÑOS E., REHANI MM., CUOCOLO A., MONT L., BODI V., BAR O., MAGCIA C., PIERARD L., SICARI R., PLEIN S., MAHRHOLDT H., LANCELLOTTI P.,

KNUUTI J., HEIDBUCHEL H., DIMARIO C., BADANO LP., The appropriate and justified use of medical radiation in cardiovascular imaging: a position document of the ESC Association of Cardiovascular Imaging, Percutaneous Cardiovascular Interventions and Electrophysiology., **Eur Heart J.** 2014 Mar, 35 (10): 665 – 72.

PIERCE, D., SHIMIZU, Y., PRESTON, D., VAETH, M., MAUBUCHI, K.; Studies of the mortality of atomic bomb survivors., **Radiation Res.**, Academic Press, Nova York, Vol. 13, pp. 31 – 90. 2008

PODGORSKAK, E. B. Radiation Physics for Medical Physicists Biological and Medical Physics, **Biomedical Engineering**, 2010.

PRASANNA P.G.S., MARTIN P.R., SUBRAMANIAN U., BERDYCHEVSKI R., KRASNOPOLSKY K., DUFFY K.L., MANGLAPUS G.L., LANDAUER M.R., SRINIVASAN V., BOREHAM D., HAGAN M.P., JINARATANA V., BLAKELY W.F. Cytogenetic Biodosimetry for radiation disasters: recente advances. Published in the proceedings of the NATO Human Factors and Medicine (HFM) Panel Research Task Group (RTG) 099 **Meeting**, “**Radiation Bioeffects and Countermeasures**”. Bethesda, USA, (2005).

PYATKIN, E.K.; NUGIS V.Y; CHRNIKOV A.A.; Absorbed dose estimation according to the results of cytogenetic investigations of lymphocyte cultures of persons who suffered in the accident at Chernobyl atomic power station. **Radiat Med.** 1989;4:52.

RAMALHO, A.T.; NASCIMENTO, A.C.; The fate of chromosomal aberrations in <sup>137</sup>Cs exposed individuals in the Goiânia radiation accident. **Health Phys.** 1991;60:67–70.

RICCARDI L, CAUZZO MC, FABBRIS R.; Comparison between built-in “dual-side” chest imaging device with a standard “single side” CR. **Med Phys** 2007; 34:119

SABERI A., SALARI E., LATIFI S. M.; Cytogenetic analysis in lymphocytes from radiation workers exposed to low level of ionizing radiation in radiotherapy, CT-scan and angiocardiology units. **Mutation Research** 750 (2013) 92–95.

SAMEI, E. AND FLYNN, M. J.; An experimental comparison of detector performance for computed radiography systems. **Med. Phys.** 29, 447–459 (2002).

SCHAETZING, R., FASBENDER, R. AND KERSTEN, P.; New high-speed scanning technique for computed radiography. **Proc. SPIE** 4682, 511–520 (2002).

SEIBERT J.A.; One hundred years of medical diagnostic imaging technology. **Health Phys.** 1995; 69:695–720.

SHIMIZU Y, KODAMA K, NISHI N.; Radiation exposure and circulatory disease risk: Hiroshima and Nagasaki atomic bomb survivor data, 1950–2003. **BMJ** 2010;340:b5349.

SHRIVASTAV M., DE HARO L.P., NICKOLOFF J.A.; Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice, **Cell Res.** 18 (2008) 134–147.

SØRENSEN M., AUTRUP H., HERTEL O., WALLIN H., KNUDSEN L.E., LOFT S., Personal exposure to PM<sub>2.5</sub> and biomarkers of DNA damage, **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.** 12 (2003) 191–196

SNUSTAD & SIMONS, **Fundamentos de Genética**, 2001. Ed. Guanabara.

STREFFER C.; The ICRP 2007 recommendations. **Rad Prot Dosim** 127(1-4):2-7 (2007).

SUWANPRADIT, P., KRISANACHINDA, A., ARJHANSIRI, K. AND KITSUKJIT, W. The effect of the implementation of the quality control program of the computed radiography system. **ASEAN J. Radiol.** 14(1), (2008).

SWEE R.G., GRAY J.E., BEABOUT J.W., MCLEOD R.A., COOPER K.L., BOND J.R.; Screen-film versus computed radiography imaging of the hand: a direct comparison. **Am J Roentgenol** 1997; 168:539-542.

THIERENS H.; E VRAL A.; The micronucleus assay in radiation accidents, **Ann Ist Super Sanità** 2009 | Vol. 45, No. 3: 260-264

THIERENS, H., DE RUYCK, K., VRAL, A., DE GELDER, V., WHITEHOUSE, C. A., TAWN, E. J. AND BOESMAN, I. Cytogenetic biodosimetry of an accidental exposure of a radiological worker using multiple assays. **Radiat. Prot. Dosimetry**, 113, 408-414 (2005)

TOLGA İ. & GÖKÇE A.; Dose audit for patients undergoing two common radiography examinations with digital radiology systems. **Diagn Interv Radiol.** 2014 Jan-Feb; 20(1): 100-104.

TURAI. The IAEA's co-ordinated research project on biodosimetry, 1998-2000. **Appl Radiat Isot.** 2000 May;52(5):1113-6.

UPTON, A. C., ALBERT, R. E., BURNS, F. J., SHORE, R. E., Historical perspectives on radiation carcinogenesis. **Radiation Carcinogenesis.** Elsevier, Nova York, pp 1 - 10, 1986.

VANO E, FERNANDEZ JM, TEN JI.; Transition from screen-film to digital radiography: evolution of patient radiation doses at projection radiography. **Radiology.** 2007;243:461-466.

VAÑÓ E., UBEDA C., LEYTON F.; Staff radiation doses in interventional cardiology: correlation with patient exposure. **Pediatr Cardiol.** 2009; 30:409-13.

VENNERI L., ROSSI F., BOTTO N., Cancer risk from professional exposure in staff working in cardiac catheterization laboratory: insights from the National Research Council's Biological Effects of Ionizing Radiation VII Report. **Am Heart J.** 2009; 157:118-24.

VERSCHAEVE L., KOPPEN G., VAN GORP U., SCHOETERS G., JACOBS G., ZWIJZEN C., Seasonal variations in spontaneous levels of DNA damage; implication in the risk assessment of environmental chemicals, **J. Appl. Toxicol.** 27 (2007) 612-620.

VOISIN P, BARQUINERO F, BLAKELY B, LINDHOLM C, LLOYD D, LUCCIONI C, MILLER S, PALITTI F, PRASANNA P.G, STEPHAN G, THIERENS H, TURAI I, WILKINSON D, WOJCIK A.; Towards a standardization of biological dosimetry by cytogenetics. **Cell Mol. Biol.** 2002; 48:501-504.

VOISIN, P.; BARQUINERO, F.; BLAKELY B, LINDHOLM C, LLOYD D, LUCCIONI C, et al. Towards a standardization of biological dosimetry by cytogenetics. **Cell Mol Biol.** 2002;48:501-4.

VÖLK M, PAETZEL C, ANGELE P, SEITZ J, FÜCHTMEIER B, HENTE R Routine skeleton radiography using a flat-panel detector: image quality and clinical acceptance at 50% dose reduction. **Investigative Radiology** 2003; 38(4):230-235

WANG Y., XU C., DU L. Q., CAO J., LIU J. X., SU X., ZHAO H., FAN F.-Y., WANG B., KATSUBE T., FAN S. J., LIU Q. Evaluation of the Comet Assay for Assessing the Dose-Response Relationship of DNA Damage Induced by Ionizing Radiation., **Int. J. Mol. Sci.** 2013, 14, 22449-22461.

WAKEFORD R., Radiation in the workplace—a review of studies of the risks of occupational exposure to ionising radiation, **J. Radiol. Prot.** 29 (2009) A61–A79

WASELENKO, J.K.; MACVITTIE, T.J.; BLAKELY, W.F.; PESIK, N.; WILEY, A.L.; DICKERSON, W.E.; TSU, H.; CONFER, D.L.; COLEMAN, C.N.; Seed, T.; Medical management of the acute radiation syndrome: Recommendations of the strategic national stockpile radiation working group. **Ann. Intern. Med.** 2004, 140, 1037–1051.

WEATHERBURN G.C, STIRLING B, DAVIES JG. Comparison of doses for bedside examinations of the chest with conventional screen-film and computed radiography: results of a randomized trial. **Radiology** 2000; 217:707.

WEIMANN A, BROEDBAEK K, HENRIKSEN T, STOVGAARD ES, e POULSEN HE. Assays for urinary biomarkers of oxidatively damaged nucleic acids. **Free Radic Res** 46: 531– 540, 2012.

WEIMAR B, RAUBER K, BRENDEL MD.; Percutaneous transhepatic catheterization of the portal vein: A combined CT- and fluoroscopy-guided technique. **Cardiovasc Intervent Radiol.** 1999; 22:342–4.

WEINSTOCK D.M.; CASE C JR. BADER J.L.; CHAO N.J; COLEMAN C.N, HATCHETT R.J, WEISDORF D.J, CONFER D.L. Radiological and nuclear events: contingency planning for hematologist/oncologists. **Blood.** 2008; 111:5440–5445.

WILKINSA R. C., ROMMB H., OESTREICHERB U., MARROA L., YOSHIDAC M. A., SUTOC Y., AND. PRASANNA P. G. S, Biological Dosimetry by the Triage Dicentric Chromosome Assay – Further validation of International Networking, **Radiat Meas.** 2011 September 1; 46(9): 923–928.

WILLEMS, P., AUGUST, L., SLABBERT, P; Automated micronucleus (MN) scoring for population triage in case of large radiation events. **Int. J. Radiat. Biol.**, 86, 2–11. (2010)

WILLIS C.E.; Strategies for dose reduction in ordinary radiographic examinations during CR and DR. **Pediatr Radiol** 2004; 34:196

WILSON A.J.; MANN F.A.; MURPHY JR. W.A, MONSEES B.S., LINN M.R.; Photostimulable phosphor radiography of the extremities: diagnostic accuracy compared with conventional radiography. **Am J Roentgenol** 1991; 157:533-53.

YAFFE, M. J. AND ROWLANDS, J. A.; X-ray detectors for digital radiography. **Phys. Med. Biol.** 42, 1–39 (1997).

YOSHINAGA S., MABUCHI K., SIGURDSON A.J., DOODY M.M., RON E.; Cancer risks among radiologists and radiologic technologists: review of epidemiologic studies **Radiology.** 2004 Nov;233(2):313-21.

YUSUF I., FRUMAN D.A. Regulation of quiescence in lymphocytes. **Trends Immunol** 24(7):380–386. (2003)

ZHANG Y., YU C.-FAN , JIN S.-HUA , LI N.-CHEN , NA Y.-QUN , Validation of a novel non-biological bench model for the training of percutaneous renal access, **Int. braz j urol.** vol.40 no.1 Rio de Janeiro Jan./Feb. 2014.

ZHIVOTOVSKY, B.; KROEMER, G.; Apoptosis and genomic instability. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.** 2004, 5, 752–762.

ZIELINSKI J.M., GARNER M.J., BAND P.R., I.; Health outcomes of low-dose ionizing radiation exposure among medical workers: a cohort study of the Canadian national dose registry of radiation workers. **Int J Occup Med Environ Health.** 2009; 22:149–56.

## ANEXO I



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JOÃO DE BARROS BARRETO

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SÉRIES HUMANOS - CEP/HUJBB/UFGA

*Declaro ter conhecimento do projeto intitulado "MUTAGÊNESE E CARCINOGENESE DE TRABALHADORES EXPOSTOS À RADIAÇÃO IONIZANTE NO BRASIL" de responsabilidade do pesquisador LUIZ RAIMUNDO C. DA S. E CUNHA JR, dos (as) alunos (as) que tem como finalidade CAMILA ALBUQUERQUE PINTO e ter conhecimento de que o mesmo tem como instituição proponente a UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ e de que o referido protocolo deverá ser apreciado também pelo CEP da instituição co-participante. Declaro conhecer e cumprir as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 466/12. Esta instituição está ciente de su co-responsabilidades como instituição co-participante do presente projeto de pesquisa, e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos participantes de pesquisa nela recrutados, dispondo de infra-estrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar."*

Assinatura e carimbo do responsável institucional



## ANEXO II



HOSPITAL DE  
CLÍNICAS  
PORTO ALEGRE RS



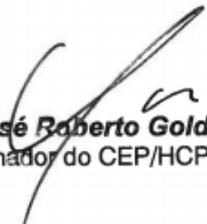
**GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

**Declaração de Participação como Instituição Coparticipante**

Declaramos, para os devidos fins, que temos ciência da inclusão do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) como Instituição Coparticipante no projeto de pesquisa "Mutagênese e cacinogênese de trabalhadores expostos à radiação ionizante no Brasil.", que tem como pesquisador responsável o Biol. Luiz Raimundo Cunha Jr, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.

O Hospital de Clínicas de Porto Alegre somente autoriza a realização de projetos de pesquisa após a sua avaliação e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP – HCPA) e a sua comprovada adequação às Resoluções do Conselho Nacional de Saúde e demais documentos regulatórios.

Porto Alegre, 15 de setembro de 2014.

  
**Prof. José Roberto Goldim**  
Coordenador do CEP/HCPA

**ANEXO III****HOSPITAL UNIVERSITÁRIO**

RISOLETA TOLENTINO NEVES

**Núcleo de Ensino e Pesquisa**

Belo Horizonte, 06 de Março de 2013

**TÍTULO:****Mutagênese e Carcinogênese de Trabalhadores Expostos à  
Radiação Ionizante no Brasil****Parecer:**

O Colegiado do Núcleo de Ensino e Pesquisa do HTRN aprovou o projeto de pesquisa proposto pelo Dr. Luiz Raimundo Campos da Silva e Cunha Jr, como coparticipante, com a ressalva de que sejam anexados ao processo cópia da aprovação pelo COEP e modelo do termo de consentimento a ser preenchido pelos voluntários.

Atenciosamente,

Membro do Colegiado do Núcleo de Ensino e Pesquisa

---

Hospital Risoleta Tolentino Neves  
Rua das Gabirobas, 01 Laranjeiras CEP 31775-530  
Belo Horizonte - MG Telefone: (31) 3459-3207 Fax: 3459-3266

## ANEXO III



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA  
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Ribeirão Preto, 14 de janeiro de 2013

**Projeto de Pesquisa:** "Mutagênese e Carcinogênese de Trabalhadores  
Expostos à Radiação Ionizante no Brasil

**Pesquisadora responsável:** Luiz Raimundo Campos da Silva e Cunha Junior

**Instituição Proponente:** Universidade Federal do Pará

"O CEP do HC e da FMRP-USP concorda com o parecer ético emitido pelo CEP da Instituição Proponente, que cumpre as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 196/96. Diante disso, o HCFMRP-USP, como instituição co-participante do referido projeto de pesquisa, está ciente de suas co-responsabilidades e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos desta pesquisa, dispondo de infra-estrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar.

*Ciente e de acordo:*

Dr.<sup>a</sup> Marcia Guimarães Villanova  
Coordenadora do Comitê de Ética  
em Pesquisa - HCFMRP-USP

Prof. Dr. José Alexandre de Souza Crippa  
Coordenador Técnico Científico da Unidade  
de Pesquisa Clínica - HCFMRP-USP

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marisa M. M. Pinhato  
Vice-Coordenadora da Unidade  
de Pesquisa Clínica HCFMRP-USP

## ANEXO IV



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO BETINA FERRO

*Declaro ter conhecimento do projeto intitulado “MUTAGÊNESE E CARCINOGENÊSE DE TRABALHADORES EXPOSTOS À RADIAÇÃO IONIZANTE NO BRASIL” de responsabilidade do pesquisador LUIZ RAIMUNDO C. DA S. E CUNHA JR, dos (as) alunos (as) que tem como finalidade CAMILA ALBUQUERQUE PINTO e ter conhecimento de que o mesmo tem como instituição proponente a UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ. Declaro conhecer e cumprir as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 466/12. Esta instituição está ciente de suas co-responsabilidades como instituição co-participante do presente projeto de pesquisa, e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos participantes de pesquisa nela recrutados, dispondo de infraestrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar.”*

## ANEXO V

INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA  
SAÚDE DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO PARÁ - ICS/



Continuação do Parecer: 839.788

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O protocolo apresentado dispõe de metodologia e critérios definidos conforme resolução 466/12 do CNS/MS.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os termos apresentados contemplam os sugeridos pelo Sistema CEP/CONEP.

**Recomendações:****Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Diante do exposto somos pela aprovação do protocolo. Este é nosso parecer, SMJ.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

BELEM, 21 de Outubro de 2014

---

**Assinado por:**  
**Wallace Raimundo Araujo dos Santos**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Augusto Corrêa nº 01-SI do ICS 13 - 2º and.  
**Bairro:** Campus Universitário do Guamá **CEP:** 66.075-110  
**UF:** PA **Município:** BELEM  
**Telefone:** (91)3201-7735 **Fax:** (91)3201-8028 **E-mail:** cepccs@ufpa.br

## ANEXO VI

INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA  
SAÚDE DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO PARÁ - ICS/



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Mutagênese e carcinogênese de trabalhadores expostos à radiação ionizante no Brasil

**Pesquisador:** Luiz Raimundo Campos da Silva e Cunha Júnior

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

**Versão:** 3

**CAAE:** 36572614.5.0000.0018

**Instituição Proponente:** Instituto de Ciências Biológicas

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 839.788

**Data da Relatoria:** 28/10/2014

**Apresentação do Projeto:**

com o intuito de investigar os efeitos biológicos da exposição a baixas doses de radiação ionizante e ter um melhor entendimento do efeito da dose respostas o que inclui possíveis alterações mutagênicas e/ou carcinogênicas, o projeto proposto por este pesquisador tem o objetivo de analisar, através do uso três técnicas de biologia molecular (teste do micronúcleo, teste do cometa, análise de aberrações cromossômicas e estudo de

Fluorescência In Situ) tais interações, em 4 (quatro) Estados do Brasil. A coleta de material biológico (sangue venoso) será feita pelo próprio pesquisador, após o uso dos critérios de exclusão, feito por entrevistas verbais pelo pesquisador aos participantes. Para os dados que se enquadrarão nas premissas de normalidade, será utilizado para análise estatística o teste de análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey.

O nível de significância considerado será de 5%. Será utilizado o programa BioEstat versão 5.0, para as análises estatísticas.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Utilizar de estudos citogenéticos como uma ferramenta de monitoramento a trabalhadores

**Endereço:** Rua Augusto Corrêa nº 01-SI do ICS 13 - 2º and.

**Bairro:** Campus Universitário do Guamá

**CEP:** 66.075-110

**UF:** PA

**Município:** BELEM

**Telefone:** (91)3201-7735

**Fax:** (91)3201-8028

**E-mail:** cepccs@ufpa.br

**ANEXO VII****Mutagênese e Carcinogênese de Trabalhadores expostos à Radiação Ionizante no Brasil**

Proponentes: Dr. Rommel Burbano, Mcs. Luiz Raimundo C. da S. e Cunha Jr

Questionário para pesquisa em Técnicos em Radiologia

- 1) Nome:
- 2) Idade:
- 3) Trabalha como técnico a quantos anos?
- 4) Quantas horas por dia?
- 5) Costuma usar E.P.I? Quais? Em que situações?
- 6) Já apresentou algum sintoma que possa ser relacionada com a exposição à radiação?
- 7) Existem casos de doença congênita na família? Quais?
- 8) Quais?
- 9) Fumante?
- 10) Costuma ingerir bebidas alcólicas?
- 11) Quais equipamentos costuma manipular na área da radiologia que emitam radiação ionizante?
- 12) Como você descreveria sua alimentação?
- 13) Dorme em média quantas horas por dia?

**ANEXO VIII****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Prezado (a) senhor (a),

O sr.(a), está sendo convidado a participar de um estudo intitulado **“Mutagênese e Carcinogênese de Trabalhadores Expostos à Radiação Ionizante no Brasil”**. Este estudo está sendo realizado em âmbito nacional e em parceria da Universidade Federal do Pará, juntamente com o Hospital de Clínicas de Porto Alegre, além de outras instituições convidadas.

Esta pesquisa tem como objetivo avaliar os possíveis impactos, em nível genético, da convivência com radiação ionizante para trabalhadores em hospitais que lidam diretamente com este tipo de energia, e, conseqüentemente, tende a trazer benefícios a esta classe de trabalhadores, trazendo uma possível melhora nos padrões de proteção radiológica.

Caso aceite participar do estudo, o/a sr.(a) deverá responder a um questionário simples para a seleção de voluntários participantes da pesquisa., A partir do questionário, alguns participantes foram selecionados para realizar coleta de sangue. No caso de ser selecionado, haverá a coleta de 5 ml de sangue periférico. O procedimento de coleta de sangue foi realizado no local de trabalho dos participantes, pelo próprio pesquisador. As amostras sanguíneas foram transportadas ao Laboratório de Citogenética Humana na Universidade Federal do Pará para a realização de testes, de acordo com os objetivos do projeto. Não são conhecidos riscos pela participação no estudo. Poderá haver desconforto no momento da coleta, tais como dor leve e aparecimento de mancha escura no local. Os resultados foram analisados em conjunto, e não terão qualquer repercussão direta no vínculo dos participantes com a instituição. Tais resultados poderão ser utilizados para auxiliar na decisão sobre medidas de melhora na proteção radiológica dos trabalhadores.

Sua participação é totalmente voluntária e a não participação ou desistência após o início do estudo não trará nenhum prejuízo ao seu vínculo com a instituição. Qualquer dúvida ou informação poderá ser fornecida pelo pesquisador responsável pelo estudo no HCPA, Fis. Alexandre Bacelar, no

serviço de Física Médica, telefone 33598514, ou com o Biol. Luiz Raimundo Campos da Silva e Cunha Jr, através do telefone (91) 932468781 / (91)981356598, ou e-mail [luizraymond@hotmail.com](mailto:luizraymond@hotmail.com).

Em caso de dúvidas também poderá ser contatado o Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA, no 2º andar, sala 2227, ou pelo telefone 33597640, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Os dados coletados foram mantidos confidenciais sendo manipulados apenas pelos pesquisadores durante a realização da pesquisa e mantidos sob guarda do pesquisador responsável. No momento da publicação dos resultados, estes foram divulgados em conjunto, sendo, sua privacidade assegurada, uma vez que seu nome foi omitido. O resultado da pesquisa foi apresentado posteriormente em evento científico e, caso seja de interesse do participante, os resultados lhes foram fornecidos.

O (a) Sr(a) receberá uma via deste termo onde consta o contato do pesquisador responsável, e demais membros da equipe, podendo esclarecer as suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

Este projeto foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa e aprovado segundo normas vigentes.

Ciente dos objetivos e metodologia da pesquisa, através das informações transmitidas, eu, \_\_\_\_\_, concordo em participar do presente estudo, permitindo coleta do meu sangue para análise única exclusivamente para fins desta pesquisa específica.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

Assinatura do Participante

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nome e Assinatura do  
Pesquisador que obteve o Termo.

## ANEXO IX

Mutation Research 777 (2015) 54–61



Contents lists available at ScienceDirect

## Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/genetox](http://www.elsevier.com/locate/genetox)  
Community address: [www.elsevier.com/locate/mutres](http://www.elsevier.com/locate/mutres)

## The cosmetic dye quinoline yellow causes DNA damage in vitro



Farah Maria Drumond Chequer<sup>a,b,\*</sup>, Vinícius de Paula Venâncio<sup>a</sup>,  
Maíra Rocha de Souza Prado<sup>a</sup>, Luiz Raimundo Campos da Silva e Cunha Junior<sup>c</sup>,  
Thiago Mescoloto Lizier<sup>d</sup>, Maria Valnice Boldrin Zanoni<sup>d</sup>, Rommel Rodríguez Burbano<sup>c</sup>,  
Maria Lourdes Pires Bianchi<sup>a</sup>, Lusânia Maria Greggi Antunes<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, USP, Ribeirão Preto, SP 14040-903, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Citogenética Humana, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brazil

<sup>d</sup> Instituto de Química, Departamento de Química Analítica, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Quitandinha 14800-900, Araraquara/SP, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 29 June 2014

Received in revised form 6 November 2014

Accepted 11 November 2014

Available online 18 November 2014

## Keywords:

Genotoxicity

Cosmetic dye

Micronucleus

Comet assay

Oxidation

## ABSTRACT

Quinoline yellow (QY) is a chinophthalon derivative used in cosmetic compositions for application to the skin, lips, and/or body surface. However, regulatory data about the genotoxicity and/or mutagenicity of this compound are still controversial. Therefore, this work evaluated the genotoxicity of QY using the comet assay and the cytokinesis-block micronucleus cytome assay (CBMN-Cyt) in the metabolically competent cell line HepG2, which closely mimics phase I metabolism. This research also identified the products formed after electrochemical oxidation of the QY dye, which simulates hepatic biotransformation. The primary products generated after the oxidation process were analyzed by High Performance Liquid Chromatography coupled with a Diode Array Detector (HPLC/DAD), which detected the production of 4,4'-diaminodiphenylmethane, 2-methoxy-5-methylaniline and 4,4'-oxydianiline. The results demonstrated that low (from 0.5 to 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) QY concentrations were genotoxic in HepG2 cells on both assays and those harmful compounds were detected after the oxidation process. Our findings suggest that this colorant could cause harmful effects to humans if it is metabolized or absorbed through the skin.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Synthetic dyes are used extensively in many industries, including the cosmetics, textile, pharmaceutical, food, plastics, photography and paper industries [1–4]. It is estimated that over 10,000 different dyes and pigments are used industrially and that over  $7 \times 10^5$  tons of synthetic dyes are produced annually worldwide [4–6]. However, there is insufficient information about their potential health risks for humans and the environment [7,8]. The available toxicological data about cosmetics dyes have shown effects that range from contact allergies to different types of genetic damages, including genotoxicity, mutagenicity and early age leukemia [9–13].

The dye quinoline yellow (QY) is a chinophthalon derivative used in cosmetic compositions for application to the skin, lips, and/or body surface [14]. This dye (also known as D&C Yellow no. 11) was found to induce allergic contact dermatitis; in a human maximization test, 15 of 20 subjects became sensitized [15,16]. The regulatory data regarding QY genotoxicity and/or mutagenicity are still controversial [14,17]. Therefore, we studied the dye QY in this research. The aim of this investigation was to evaluate the genotoxicity of QY using the alkaline comet assay and the cytokinesis-block micronucleus cytome assay (CBMN-Cyt) in the metabolically competent cell line HepG2, which closely mimics phase I metabolism. Micronuclei (MN) were also analyzed using the fluorescence in situ hybridization (FISH) technique for further hazard characterization.

In addition, it is known that aromatic amines can be produced during oxidative and/or reductive processes [3,18], and the formation of these aromatic amine byproducts could be important for understanding the chemical transformation of dyes. Therefore, the present work also aimed to determine if 16 aromatic amines used as standard models of amines classified by IARC [19] could be produced during the oxidative and/or reductive conditions. In addition,

\* Corresponding author at: Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, USP, Ribeirão Preto, SP 14040-903, Brazil. Tel.: +55 16 3602 4186; fax: +55 16 3602 4725.

E-mail address: [farahchequer@gmail.com](mailto:farahchequer@gmail.com) (F.M.D. Chequer).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.11.003>  
1383-5718/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

## ANEXO X

*Int. J. Environ. Res. Public Health* **2014**, *11*, 9822-9834; doi:10.3390/ijerph110909822

OPEN ACCESS

International Journal of  
**Environmental Research and  
Public Health**  
ISSN 1660-4601  
www.mdpi.com/journal/ijerph

Article

## Protective Effect of Prolactin against Methylmercury-Induced Mutagenicity and Cytotoxicity on Human Lymphocytes

Liz Carmem Silva-Pereira <sup>1,2</sup>, Carlos Alberto Machado da Rocha <sup>3</sup>,  
Luiz Raimundo Campos da Silva e Cunha, Jr. <sup>2</sup>, Edmar Tavares da Costa <sup>2</sup>,  
Ana Paula Araújo Guimarães <sup>4</sup>, Thais Brilhante Pontes <sup>2</sup>,  
Domingos Luiz Wanderley Picanço Diniz <sup>5</sup>, Mariana Ferreira Leal <sup>6</sup>,  
Caroline Aquino Moreira-Nunes <sup>2</sup> and Rommel Rodríguez Burbano <sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Federal Institute of Education, Science and Technology of Para, Itaituba Campus, IFPA Itaituba, Para 68180000, Brazil; E-Mail: lizcarne@hotmail.com

<sup>2</sup> Biological Science Institute, Federal University of Para, Belem, Para 66075110, Brazil; E-Mails: luizraymond@hotmail.com (L.R.C.S.C.Jr); etcosta@ufpa.br (E.T.C.); thaisbrilhante@yahoo.com.br (T.B.P.); carolfam@gmail.com (C.A.M.N.)

<sup>3</sup> Education Federal Institute, Science and Technologie of Para, Belem Campus, IFPA. Belem, Para 66645240, Brazil; E-Mail: camrocha@hotmail.com

<sup>4</sup> Center of Biological and Health Sciences, University of Para, Belem Campus UEPA, Belem, Para 66050540, Brazil; E-Mail: guimaferraz338@gmail.com

<sup>5</sup> Federal University of Western Para, Oriximiná Campus, UFOPA, Santarém, Para 68040470, Brazil; E-Mail: domingos.diniz@ufopa.edu.br

<sup>6</sup> Department of Morphology and Genetics, Federal University of São Paulo, São Paulo 04021001 Brazil; E-Mail: lealmf@gmail.com

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: rommel@ufpa.br; Tel: +55-91-3201-7102; Fax: +55-91-3201-7568.

*Received: 3 June 2014; in revised form: 4 September 2014 / Accepted: 10 September 2014 /*

*Published: 22 September 2014*

---

**Abstract:** Mercury exhibits cytotoxic and mutagenic properties as a result of its effect on tubulin. This toxicity mechanism is related to the production of free radicals that can cause DNA damage. Methylmercury (MeHg) is one of the most toxic of the mercury compounds. It accumulates in the aquatic food chain, eventually reaching the human diet. Several studies have demonstrated that prolactin (PRL) may be differently affected by inorganic

## Chapter 7

### Chromosomal Aberration Test Utilities In Vitro and In Vivo

Ana Paula A. Guimarães, Adriana C. Guimarães, Diego Á. Alcântara, Luiz Raimundo Cunha, Patrícia L. Lima, Marne C. Vasconcellos, Raquel C. Montenegro, Bruno M. Soares, Marucia M. Amorim, and Rommel R. Burbano

#### Abstract

Human populations are frequently exposed to several mutagenic agents that have the potential to damage the DNA, and this, in many cases, may result in the formation of chromosomal aberrations (CAs). CAs are recognized as an important biomarker of human exposure, being a very important tool for environmental biomonitoring. Although there are several types, little is known about the mechanisms involved in the processing of induced lesions in DNA and how these could result in CAs. Thus, cytogenetics and molecular cytogenetics are tools of great importance for identifying these agents, the conditions that can exercise their mutagenic potential, and their action mechanism. This chapter discusses the history of CA formation and some cytogenetic protocols that may be used to perform the chromosomal aberration test in in vivo and in vitro studies.

Key words Biomonitoring, Chromosomal aberrations, DNA damage, Cytotoxicity, Mutagenesis

---

#### 1 Introduction

##### 1.1 Origin of Chromosomal Aberrations: Uses In Vitro and In Vivo

DNA damage, formed spontaneously or induced by various chemical and physical agents, can be repaired or processed, but many of them can lead to the formation of numerical and structural chromosomal aberrations (CAs). Although there are several studies and technological advances, little is known about the mechanisms involved in the processing of induced lesions in DNA and how these could result in chromosomal aberrations. However, it is known that such changes may indicate changes in cellular homeostasis, which are important in genomic instability and crucial to understanding the processes of mutagenesis and carcinogenesis [1].

In general, there are numerical and structural chromosomal aberrations, which are both associated with human health, such as congenital anomalies in newborns and cancer [2].