

**BIBLIOTECA DIGITAL DE TESES E DISSERTAÇÕES
UNESP**

RESSALVA

Alertamos para ausência das Figuras 3 e 4,
não incluídas pelo(a) autor(a) no arquivo original.

Eliana Maria Minicucci

**Avaliação dos efeitos citogenéticos e citopatológicos
da radioterapia em pacientes com tumores malignos
de cabeça e pescoço**

Orientadora: Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori

Dissertação apresentada ao Curso
de Pós-Graduação em Patologia
para obtenção do título de Mestre

Faculdade de Medicina
Universidade Estadual Paulista – UNESP
Botucatu – SP
2001

Apoio e Suporte Financeiro

Este projeto foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

TOXICAN – Núcleo de Avaliação Toxicogenética e Cancerígena

“Precisamos acreditar em nós mesmos, é este o segredo. Mesmo quando eu estava no orfanato, quando perambulava pelas ruas tentando arranjar o suficiente para comer, até quando me considerava o maior ator do mundo, eu precisava sentir a exaltação que advém de uma confiança em mim mesmo. Sem ela a gente descamba para o fracasso”.

Charlie Chaplin

Querida Édera,

À quem dedico mais esta etapa vencida, minha mãe, com a mais profunda admiração e respeito. À ela que em muitos momentos precisou da minha atenção e que não pude estar presente, mas que sempre soube compreender.

É difícil, pela grande emoção, expressar toda a minha gratidão.

Ao meu irmão *"Dú"*, pela preocupação; ao meu sobrinho *Luciano*, pelas vezes que não pude lhe dar atenção e carinho!

À Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori

Sem mesmo me conhecer, e apesar de trabalharmos em áreas diferentes, depositou em mim sua confiança, transmitindo com dedicação e carinho sua experiência profissional e pessoal, sempre visando a ética e a idoneidade científica.

Por toda a sua incansável dedicação, incentivo, paciência e amizade, proporcionando as melhores condições para a realização deste projeto. Meu muito obrigado !

“Paciência e senso de oportunidade..., tudo vem na sua hora. Não se pode apressar a vida, ela não funciona em horários fixos... É preciso aceitar o que nos chega no momento sem pedir mais. Porém, a vida é eterna. Não há fim. O ser humano tem várias dimensões. Mas o tempo não é como vemos e sim medido por lições que devemos aprender.”

Brian L Weiss – Muitas Vidas Muitos Mestres

Agradecimentos

À *Deus*, que se faz presente em nossas vidas, a cada momento e a cada passo, iluminando nossas mentes, compreendendo os nossos anseios e nos dando a necessária coragem para atingirmos nosso objetivos.

Aos Mestres *Prof. Dr. José Humberto Damante* da Faculdade de Odontologia de Bauru -USP e da *Profa Dra Maria Regina Sposto* da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, pelo incentivo e confiança durante a minha caminhada até o Curso de Pós Graduação.

Aos colaboradores *Dr. Luiz Paulo Kowalski, Dra Maria Aparecida Conte Maia, Profa. Dra Maria Luiza Cotrim Sartor, Dra Lúcia Regina Ribeiro*, que transmitiram seus conhecimentos e experiências profissionais com dedicação, sempre se preocupando com a formação científica-profissional.

Ao *Prof.Dr.João Lauro Viana de Camargo*, coordenador do Núcleo de Avaliação Toxicogenética e Cancerígena - TOXICAN, pelas sugestões e apoio na realização deste trabalho.

Aos pacientes e familiares, que apesar da dor e dificuldades causadas pela doença, não mediram esforços para que este projeto fosse realizado.

Hospital A.C.Camargo

Centro de referência na pesquisa e tratamento do câncer humano, por mais uma vez ter aberto suas portas fornecendo todos os recursos necessários para a realização deste projeto.

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA DE CABEÇA E PESCOÇO *Drs José Magrim e Mauro Kasuo Ukeda* pela atenção e incentivo, *Dr André Lopes Carvalho* juntamente com os residentes *Fábio Ulbrich, Gustavo Guimarães, Olímpio Daniel de Campos e Rodrigo Ribas Dias dos Reis* pelo auxílio na coleta de material biológico; as secretárias *Flavia Carlos Dias, Benedita Aparecida de Moura (Benê), Adriana Pretti Barbosa, Rita de Cássia Rodrigues*, pela dedicação e amizade;

DEPARTAMENTO DE RADIOTERAPIA: *Paulo Luis Vertomi* pela seleção e agendamento dos pacientes, *Dr Adelino Jose Pereira e Gisele Pereira Haddad* pela orientação relacionada a área da física;

LABORATÓRIO CLÍNICO *Antônio Marinho Araújo, Antônio José Queiroz* pela coleta de material., SAME representado pela *Sra Hirde Contesini*, BIBLIOTECA *Rosinéia Aguiar Carneiro (Rose) e Suely Francisco.*

Instituto de Biociências

LABORATÓRIO DE GENÉTICA à *Rosana Aparecida Bicudo da Silva* pelo auxílio no início do projeto, para a padronização das técnicas.

Faculdade de Medicina de Botucatu

Aos funcionários do TOXICAN: *Tony Fernando Grassi* (já colocou Cytocalasina hoje?), *Elaine Aparecida de Camargo, Paulo Roberto Cardoso, Cristina Aparecida Alquati Dorico, Marco Aurélio Silva, Paulo Roberto Gasparini Pavão* e, em especial, *a Maria Luíza F. Ardanaz (Mara)* que esteve presente em todas as fases deste trabalho e que não mediu esforços com a sua amizade, dedicação e profissionalismo, para que tudo saísse a contento; LABORATÓRIO CLÍNICO *Carlos Martins (Carlinhos), Maria Pedrina Ribeiro, Marcos Rogério Dionísio,*

Maria de Fátima Biazon Rodrigues, Maria José Conti, pela atenção e simpatia na coleta de material do grupo controle; IMAGEM *Carlos Roberto Rodrigues (Carlinhos)* pelas figuras e slides; SETOR DE PÓS GRADUAÇÃO: *Vera Lúcia Mengue e Regina Maria Spadim*; SETOR BIBLIOTECÁRIO, SETOR GRÁFICO

Aos colegas e amigos *Noeme Souza Rocha* (você está desocupada?), sempre esteve presente, *Ana Paula Bazo, Patrícia Lepage Alves de Lima* (Flor do Pântano) e *Carla A.S. Franchi* pela amizade e apoio, *Roberta Denadai Delmanto* com a sua dedicação foi quem me ajudou no início com os procedimentos de laboratório e sempre esteve presente com a amizade e incentivo, *Deilson Elgui de Oliveira*, pelo auxílio nas questões de informática e *Rodrigo Otávio Alves de Lima*

Prof *Luis Fernando Barbisan e Ana Lúcia Spinardi Barbisan*, pelo auxílio na análise estatística.

“Dos amigos, nunca nos despedimos, apenas nos afastamos para darmos ao destino o prazer de nos reencontrarmos..”.

À **Diretoria do Fundo Social dos Servidores (FUSS)**, por ter me permitido a reposição dos dias dedicados à Pós-graduação; à *Rosa Maria Jacinto* pela esterilização do material e incentivo, *Valéria Aparecida Trindade e Ana Maria Melo Santos* pelo apoio e amizade, *Rosana Aparecida Corvino* que participou de todos os momentos com o seu bom humor, me auxiliando com o seu trabalho e principalmente com a sua amizade.

Em especial a *Dra Patricia Gianette Cancian*, que apesar de todos os seus problemas pessoais me substituiu todas as vezes que precisei. Muito obrigada!

À Profa. *Anita Aparecida Rodrigues Torres Modenese*, pela atenção, amizade e pelas correções idiomáticas.

À *Cooperativa Evidente* pela amizade e “socorro” nos momentos de falha com o equipamento de informática.

Ao sempre amigo *Pedro Eugênio Frederico* por toda a sua paciência, incentivo e companheirismo.

À *Yara Chaves* pela grande e eterna amizade.

Enfim, a *todos* aqueles que de alguma forma colaboraram para a realização deste projeto.

Meus sinceros agradecimentos e gratidão!

ÍNDICE

Resumo	i
Abstract	ii
1. Introdução	1
1.1 Carcinogênese e conseqüências genéticas das terapias	1
1.2 Radiações ionizantes e seus efeitos biológicos	3
1.3 Radioterapia	8
1.4 Tumores de cabeça e pescoço	12
1.5 Micronúcleo	14
2. Objetivos	19
3. Materiais e Métodos	20
3.1 Casuística	20
3.1.1 Grupo de estudo	20
3.1.2 Grupo controle	22
3.2 Radioterapia	23
3.3 Material biológico	24
3.3.1. Cultura de linfócitos de sangue periférico	24
3.3.2. Células da mucosa bucal	25
3.4 Micronúcleo	26
3.5 Citologia da mucosa bucal	28
3.6 Análise Estatística	28
4. Resultados	30
5. Discussão	48
6. Conclusões	59
7. Referências Bibliográficas	60
8. Apêndice	72
9. Anexos	75

ÍNDICE DE TABELAS

Já imprimir

Tabela I.	Classificação dos tumores de cabeça e pescoço por estádios e forma de tratamento.....	14
Tabela II.	Caracterização dos pacientes sob radioterapia para tumores malignos de cabeça e pescoço.....	21
Tabela III.	Caracterização dos indivíduos do grupo controle.....	22
Tabela IV.	Frequência de células micronucleadas (MN) no sangue periférico e na mucosa bucal de indivíduos sem neoplasia (grupo controle) e de pacientes com câncer de cabeça e pescoço, distribuídos de acordo com o estágio do tumor (antes da radioterapia).....	31
Tabela V.	Frequência de células micronucleadas (MN) em sangue periférico e mucosa bucal de pacientes com neoplasia de cabeça e pescoço, antes, durante e após a radioterapia.....	32
Tabela VI.	Frequência de células micronucleadas (MN) em sangue periférico e mucosa bucal de pacientes com câncer de cabeça e pescoço distribuídos de acordo com o tempo de coleta do material biológico após o término da radioterapia.....	33
Tabela VII.	Frequência de células com micronúcleo (MN) em sangue periférico e mucosa bucal de pacientes com neoplasia de cabeça e pescoço, distribuídos de acordo com a dose de radiação recebida durante o tratamento.....	35
Tabela VIII.	Frequência de células micronucleadas (MN) em sangue e mucosa bucal de pacientes com neoplasia de cabeça e pescoço após a radioterapia com diferentes doses totais de radiação.....	36
Tabela IX	Distribuição e frequência de micronúcleos (MN) por linfócitos micronucleados em pacientes com neoplasia de cabeça e pescoço, antes, durante e após a radioterapia.....	37
Tabela X.	Frequência de células micronucleadas (MN) em sangue periférico e mucosa bucal de pacientes com neoplasia de cabeça e pescoço, distribuídos de acordo com o sexo, antes, durante e após a radioterapia.....	38

Tabela XI.	Frequência de células micronucleadas (MN) em sangue periférico e mucosa bucal de pacientes com neoplasia de cabeça e pescoço, de acordo com o consumo de cigarros/dia.....	39
Tabela XII.	Frequência de células micronucleadas (MN) em sangue periférico e mucosa bucal de pacientes com neoplasia de cabeça e pescoço, subdivididos em duas faixas etárias (<60 e > 60 anos), durante e após a radioterapia.....	40
Tabela XIII.	Frequência de células micronucleadas (MN) em sangue periférico e mucosa bucal de pacientes com neoplasia de cabeça e pescoço, distribuídos de acordo com o estágio do tumor, durante e após a radioterapia.....	42
Tabela XIV.	Frequência de células micronucleadas (MN) em sangue periférico e mucosa bucal de indivíduos sem neoplasia (grupo controle) e de pacientes com câncer de cabeça e pescoço, de acordo com o tamanho do tumor, antes, durante e após a radioterapia.	44
Tabela XV.	Frequência de células micronucleadas (MN) em sangue periférico e mucosa bucal de indivíduos sem neoplasia (grupo controle) e de pacientes com câncer de cabeça e pescoço, com e sem metástase em linfonodos regionais, antes, durante e após a radioterapia.....	45
Tabela XVI.	Resultado da análise citopatológica da mucosa bucal de pacientes com neoplasia maligna de cabeça e pescoço durante e após a radioterapia.....	46
Tabela XVII.	Resumo dos resultados das análises estatísticas nas diferentes variáveis consideradas para a avaliação dos efeitos mutagênicos (indução de micronúcleo) da radioterapia em linfócitos e células da mucosa bucal	47
Tabela XVIII	Resultados individuais referentes a citopatologia da mucosa bucal, índice mitótico de linfócitos e frequência de células micronucleadas em pacientes com tumor maligno de cabeça e pescoço.....	72
Tabela XIX	Doses de radiação recebidas por pacientes com neoplasia maligna de cabeça e pescoço, de acordo com o estágio clínico do tumor.....	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Comprimento de ondas de diferentes tipos de radiações.....	4
Figura 2.	Campos de radiações para tumores de cabeça e pescoço.....	23
Figura 3.	Fotomicrografia mostrando linfócitos binucleados.....	27
Figura 4.	Fotomicrografia mostrando células da mucosa bucal.....	27
Figura 5.	Frequência de células micronucleadas em pacientes com câncer de cabeça e pescoço,antes, durante e após o tratamento com três níveis de dose de radiação.....	34
Figura 6.	Frequência de células micronucleadas em pacientes com câncer de cabeça e pescoço,antes, durante e após o tratamento com dois níveis de dose de radiação ionizante.....	35
Figura 7.	Frequência de células micronucleadas em pacientes com tumor de cabeça e pescoço, de diferentes estádios, antes, durante e após a radioterapia	41
Figura 8.	Frequências de células micronucleadas em sangue e mucosa bucal dos pacientes com neoplasia, divididos de acordo com o tamanho do tumor (T ₁ , T ₂ , T ₃ e T ₄), antes, durante e após a radioterapia	43

1. INTRODUÇÃO

1.1 Carcinogênese e conseqüências genéticas das terapias

Foi testando agentes químicos em animais de laboratório, que se postulou que a carcinogênese é um processo de múltiplas etapas denominadas iniciação, promoção, progressão e manifestação. A etapa de iniciação é caracterizada por lesão irreversível no DNA (mutação), induzida por agentes genotóxicos; a promoção é um processo mais lento, reversível e que está associado à proliferação focal de células iniciadas. Os agentes promotores, em geral, não são genotóxicos e atuam por mecanismos epigenéticos, principalmente alterando os sinais moleculares envolvidos no controle da proliferação celular (PITOT, 1991; 1993). No entanto, agentes genotóxicos podem, também, agir como promotores modificando, quantitativamente, o processo carcinogênico iniciado por outros agentes (DE CAMARGO et al., 1994). A etapa da progressão é caracterizada, morfológicamente, por anaplasia e, biologicamente, por crescimento autônomo. Quando as células adquirem capacidade para invadir e metastizar, podendo as alterações serem evidenciadas clinicamente, estar-se-a diante da última etapa, a manifestação (PITOT, 1989; NOWELL, 1994). Assim, todos os fatores que atuem em uma ou mais etapas do desenvolvimento neoplásico devem ser considerados para a estimativa de risco para carcinogênese (BARRET, 1993; PERERA & BOFETA, 1998).

Existe, atualmente, o conceito de que câncer é uma doença genética. Tanto alterações cromossômicas numéricas quanto estruturais têm sido observadas em células cancerosas *in vitro* e *in vivo* (SOLOMON et al., 1991). Desta forma, entre os principais

fatores de riscos relacionados à origem e desenvolvimento do processo carcinogênico estão a predisposição genética, os fatores ambientais e a interação entre ambos (ZAKRZEWSKI, 1991).

Por outro lado, embora o controle do câncer dependa de um conjunto de medidas, em geral, é a terapêutica especializada, com o emprego de tecnologia e medicamentos de alto custo, o que é mais utilizado. No entanto, sabe-se hoje que os efeitos dos tratamentos antineoplásicos são também deletérios para o organismo, além de causar danos em células somáticas, podem causar mutações em células germinativas, tornando-se fatores de risco para os descendentes (BYRNE, 1999).

Vários autores têm postulado que novos tumores podem se desenvolver logo após, ou algum tempo depois do tratamento do tumor primário, podendo ser reflexo de um dano genético ou imunológico relacionado ao tratamento ou à exposição a carcinógenos ambientais (KAISER et al., 1998). TRAVIS et al. (1995) verificaram aumento de 4,5 vezes no risco de desenvolvimento de câncer de bexiga em pacientes com linfoma não-Hodgkin tratados com ciclofosfamida, sendo este risco dependente da dose acumulada. KOISHI et al. (1998) verificaram aumento na frequência de mutações no gene *hprt* em pacientes com leucemia linfoblástica aguda após o término da quimioterapia e sugeriram que os danos causados pelos antineoplásicos podem persistir por longo período.

A utilização da radioterapia associada à quimioterapia na preparação do paciente para transplante de medula óssea, para os casos de tumores avançados, tem resultado em severos efeitos ao paciente, com prejuízo à função de vários órgãos e indução de segundas neoplasias que podem ocorrer vários anos após o tratamento (RICH et al.,

1997; MOSHER & McCARTHY, 1998; NIETHAMMER & MAYER, 1998). Com isso, pode concluir-se que, de um modo geral, as alterações genéticas induzidas por agentes antineoplásicos podem afetar os pacientes predispondo-os ao desenvolvimento de uma segunda neoplasia maligna (RICH et al., 1997).

1.2 Radiações ionizantes e seus efeitos biológicos

A radiação é a propagação de energia através do espaço, matéria ou vácuo podendo ser corpuscular ou eletromagnética. As radiações corpusculares são aquelas sob a forma de partículas, e as eletromagnéticas, a combinação de um campo elétrico e um magnético, que variam em função do tempo e espaço, não havendo participação de massa.

A característica mais simples que varia nas diferentes radiações é o seu poder de penetração. Os raios X, com comprimento de onda abaixo de 1Å , são capazes de atravessar muitos centímetros de matéria condensada, sendo chamados de *penetrantes ou duros*; os raios X de comprimento de onda maiores e que são freados por pequenos extratos de matéria, poucos milímetros de metal ou poucos centímetros de ar, são chamados de *moles*. Os raios de comprimento entre $0,01$ a $0,1\text{Å}$, são utilizados para a radioterapia profunda e os de $0,1$ a 1Å para diagnóstico e radioterapia superficial. (Figura 1).

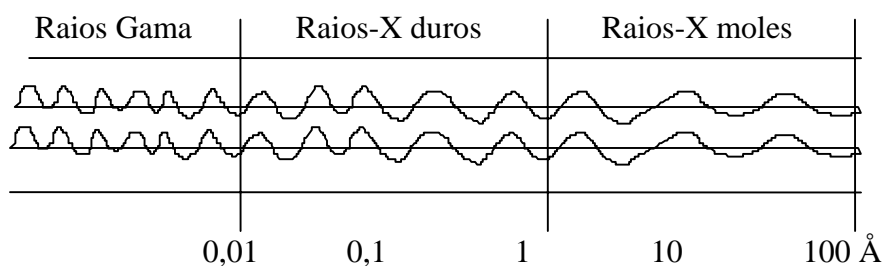


Figura 1- Comprimento de onda de diferentes tipos de radiações

A expressão científica que descreve a quantidade relativa de energia liberada ao longo do caminho de um fóton ou partícula carregada é a “transferência linear de energia” ou LET. Os tipos de radiações ionizantes que depositam quantidades relativamente pequenas de energia ao longo de seu percurso, mas têm energia cinética suficiente para atravessar distâncias consideráveis nos tecido, são classificados como radiação de baixo LET, como os raios X e os raios gama. As radiações de alto LET, como os neutrons e as partículas alfas, atravessam pequenas distâncias e depositam grande quantidade de energia (GOODHEAD et al., 1993).

Segundo MAHESH (1985), há 2 tipos de efeitos das radiações ionizantes: os agudos, que surgem logo após a irradiação, e os crônicos, manifestados algum tempo depois da exposição. HENDEE, em 1993, classificou os efeitos das radiações ionizantes em determinísticos e estocásticos. Os efeitos determinísticos são tanto mais severos quanto maior for a dose de radiação, podendo ocorrer poucas horas, dias, meses ou anos após a radiação, levando a perda de células parenquimais, fibrose, atrofia de órgãos, diminuição da fertilidade e esterilidade. Os efeitos estocásticos são aqueles em que a probabilidade de ocorrência cresce com o aumento da exposição do indivíduo à radiação. Estes efeitos exibem variações nas respostas do organismo, dependendo, por exemplo, da idade e do estado de saúde, podendo alcançar uma única célula ou um

componente celular, como o gene. A mutagênese e a carcinogênese são exemplos de efeitos estocásticos que manifestam-se até vários anos após a exposição à radiação.

Os danos provocados pelas radiações ionizantes são causados ou por uma interação direta com moléculas alvo ou indiretamente, pela formação de elementos químicos ativos e altamente reativos, os radicais livres (RON, 1998), que possuem uma alta afinidade por elétrons e pontes de hidrogênio de moléculas orgânicas, sendo o DNA o alvo principal (BIAGLOW, 1987).

As alterações genéticas causadas pela radiação dependem do tipo de radiação, da dose, da velocidade de exposição, da capacidade de reparo do DNA, da fase do ciclo celular no momento da radiação, entre outros fatores. Se as células estiverem nas fases G0 ou G1 e portanto com os cromossomos não duplicados, podem ocorrer alterações do tipo cromossômica ou isocromatídica (envolvendo as duas cromátides do cromossomo), enquanto as lesões induzidas em cromossomos já duplicados (fases S e G2), levam a aberrações do tipo cromatídica (envolvendo uma das cromátides). Quando um tecido é continuamente exposto à radiação ionizante, poderão ocorrer tanto aberrações cromossômicas como cromatídicas, sendo que a quantidade relativa dessas aberrações depende do tempo de exposição e da sensibilidade dos vários estágios do ciclo celular (DOLPHIN & LLOYD, 1974).

As aberrações cromossômicas induzidas pelas radiações ionizantes podem ser estáveis (translocações balanceadas, inversões, rearranjos simétricos), isto é, podem ser transmitidas às células filhas após a divisão celular, ou instáveis (cromossomos dicêntricos, anéis cêntricos, fragmentos e outros rearranjos simétricos), que podem levar à morte celular (CARRANO & NATARAJAN, 1988).

Embora as radiações ionizantes induzam, mais freqüentemente, quebras de fita simples de DNA, as quebras de dupla fita são as principais responsáveis pela indução de aberrações cromossômicas, como as aneuploidias observadas nas desordens hereditárias e nos tumores malignos (TOUIL et al., 2000). Além das alterações cromossômicas estruturais detectadas por microscopia óptica de luz, as mutações gênicas podem também levar à instabilidade genômica e ao câncer. O gene TP53, por exemplo, é um gene supressor de tumor que atua como “guardião do genoma”, impedindo a proliferação de células geneticamente alteradas, pela indução de apoptose. Quando esse gene é mutado, por ação de agentes mutagênicos, perde sua atividade e, conseqüentemente, as células alteradas continuarão a se dividir podendo levar a um processo neoplásico (LANE, 1992; ÜNDEGER, et al., 1999; TOUIL, et al., 2000).

Alguns estudos mostram que baixas doses de radiação ionizante, assim como ocorre para os agentes químicos citotóxicos, podem levar a uma adaptação do organismo (WOLFF, et al., 1991; BOOTHMAN, et al., 1996; WOLFF 1998). Esses estudos mostram, ainda, que esta resposta adaptativa requer uma dose mínima do agente genotóxico cujo efeito dependerá da constituição genética do organismo exposto, podendo, alguns, não apresentarem tal resposta. A adaptação induzida por baixas doses de radiação é atribuída à indução de mecanismos eficientes de reparo de lesões no DNA os quais, quando ativados por altas doses, reduzem os níveis de danos (WOLFF, 1998). Assim, a morte celular e as mutações gênicas ou cromossômicas, podem ser resultado da deficiência de mecanismos de reparo ou mesmo do reparo impreciso das lesões no DNA (LITTLE, 1998).

PLAPPERT et al. (1995), com o propósito de avaliar alterações no sistema de reparo do DNA em células sanguíneas, irradiaram, *in vitro*, amostras de sangue de indivíduos saudáveis, de pacientes sob terapia com I^{131} e de indivíduos que haviam sido expostos à radiação no acidente de Chernobyl. Os autores observaram que a radiação atuou sobre o sistema de reparo, resultando em menor eficiência deste após a segunda radiação. Assim, os indivíduos da região de Chernobyl e os pacientes que fizeram uso de I^{131} , apresentaram prejuízo na capacidade de reparo das lesões no DNA.

Há uma variação na susceptibilidade das células e tecidos aos danos induzidos pelas radiações ionizantes. Em geral, as células que se dividem rapidamente e as células não diferenciadas são as mais sensíveis. Assim, os linfócitos, seguidos pelas células vermelhas e células epiteliais são mais sensíveis que as células musculares e as nervosas (WHITMYER et al., 1997).

Algumas evidências dos efeitos das radiações ionizantes em seres humanos foram detectadas por estudos epidemiológicos realizados com os sobreviventes de Hiroshima e Nagasaki. Estes estudos mostraram uma relação linear entre a indução de câncer e uma única dose extremamente alta da radiação (POLLYCOVE, 1998). FENECH et al. (1997), avaliando amostras de sangue de crianças expostas à radiação liberada no acidente de Chernobyl, observaram aumento de 2 a 4 vezes na frequência de micronúcleo quando comparadas àquelas em indivíduos não expostos. Mais recentemente, aumento na frequência de micronúcleo (DA CRUZ et al., 1994), de aberrações cromossômicas (dicêntricos e anéis) (RAMALHO et al., 1995; 1998) e aumento na frequência de mutação no gene *hprt* (SADDI, et al., 1996; SKANDALIS, et

al.,1997) foram observados após o acidente radioativo de Goiânia, no qual centenas de pessoas foram expostas ao césio 137, proveniente de um equipamento de radioterapia.

1.3 Radioterapia

A radioterapia (Rxt) é uma modalidade terapêutica que utiliza as radiações ionizantes em pacientes com neoplasias malignas (e ocasionalmente benígnas), sendo, hoje, uma realidade terapêutica para aproximadamente 50% dos tumores diagnosticados precocemente. O primeiro caso documentado de tratamento com radiação foi em 1896, aproximadamente 3 meses após a descoberta dos raios-X por Wilhelm Conrad Röntgen (WHITMYER et al., 1997). Do ponto de vista técnico há 2 tipos de radioterapia, a teleterapia e a braquiterapia. Na teleterapia as fontes radioativas (aceleradores lineares e cobalto 60) são colocadas distantes do tecido alvo, enquanto na braquiterapia, as fontes ficam em contato com o tecido alvo

A Rxt loco-regional é uma forma alternativa ou coadjuvante à cirurgia e quimioterapia para tumores malignos. Apesar de sua finalidade ser liberar uma dose de radiação que diminua o volume do tumor, com mínimo dano aos tecidos vizinhos, pode, também, ser indutora de alterações que levam a novo processo carcinogênico (ELKING, 1984; ALVARES et al., 1987; ENGELS & WAMBERSIE, 1998).

A radiosensibilidade dos órgãos saudáveis é um dos limites da Rxt, assim, utiliza-se o fracionamento da dose total requerida, a fim de diminuir os efeitos tardios no tecido normal (CROMPTON, 1998). Este fracionamento pode ser do tipo convencional, com doses de 180 a 200 cGy/dia; hipofracionamento, uma dose maior que 250 cGy/dia, podendo chegar a 1000 cGy/dia; hiperfracionamento, 220 cGy/dia,

dividido em duas doses de 110 cGy, irradiadas duas vezes ao dia; hiperfracionamento acelerado, com dose diária maior que 250 cGy/dia, irradiando-se duas vezes ao dia e intervalo de 6 horas entre elas.

Modernas técnicas radioterapêuticas têm levado a um aumento da cura e controle regional de tumores mas, efeitos potencialmente severos e debilitantes não têm sido eliminados (CURRAN, 1998).

PEREL et al. (1998) relataram o aparecimento de carcinoma de tireóide em duas crianças após radioterapia cranial com Co^{60} (18 Gy), como profilática de SNC para tratamento de leucemia linfóide aguda. Segundo os autores, uma predisposição genética ou o próprio tratamento poderia ter atuado na gênese deste segundo tumor. Resultado semelhante já havia sido reportado por RON et al. (1995), quando observaram o aparecimento do câncer de tireóide, 15 a 19 anos após a radiação do SNC. KLEINERMAN et al. (1995), avaliando 86395 pacientes submetidos a radioterapia para câncer cervical, observaram que 7543 apresentaram uma segunda neoplasia. Os autores concluíram que o risco de um segundo tumor radioinduzido para os órgãos que receberam mais que 1 Gy, incluindo reto, vagina, vulva, bexiga e ovário, pode persistir por 30 anos ou mais, após o tratamento.

Além dos danos genéticos, a Rxt pode também causar distúrbios no desenvolvimento ósseo, fraturas patológicas (MITCHELL & LOGAN, 1998), câncer de mama (GYNES et al., 1996) e complicações cardíacas após meses ou anos devido a irradiação do coração durante o tratamento de neoplasias torácicas (STEWART et al., 1995, DEMOS et al., 1996). Déficits neurológicos, disfunções endócrinas e falta de habilidade intelectual são seqüelas tardias causadas pela radiação em crianças

portadoras de tumores cerebrais (SYNDIKUS et al., 1994) e também nas portadoras de leucemia linfóide aguda, que foram submetidas à radioterapia profilática de SNC (MOHNIKE et al., 1997, WABER & TARBELL 1997). Toxicidade gastrointestinal e urinária (LIEVENS et al., 1996, LUI et al., 1997, FRANSSON & WIDMARK 1999), e problemas na função sexual (FRANKLIN et al., 1998, FRANSSON & WIDMARK 1999), foram também associadas à radioterapia para câncer de próstata.

A cavidade oral, por apresentar um epitélio com alto *turn over*, é um dos principais locais em que se manifestam os efeitos secundários da Rxt na região da cabeça e pescoço. A maior parte dessas complicações é causada por mudanças teciduais locais, por efeito direto da radiação ou indireto pela radiação secundária. Os principais efeitos colaterais são a fibrose de glândulas salivares, que provoca a diminuição do fluxo salivar (xerostomia), mucosites, alteração na sensibilidade gustativa, atrofia de musculatura e ligamentos ocasionando trismo (SONIS, 1989; MAXYMIW & WOOD, 1989). A diminuição do pH e fluxo salivar e o aumento da viscosidade e mucosidade da saliva impedem o mecanismo natural de limpeza e lubrificação da mucosa e dos dentes, tornando-os mais suscetível às chamadas cáries de irradiação (SONIS, 1989).

A radioterapia para tumores malignos de cabeça e pescoço das regiões nasais e paranasais podem ocasionar retinopatias e glaucoma como efeitos mais severos, além de cataratas (TAKEDA et al., 1999). Além disso, a irradiação nos olhos pode ser um fator crítico para aparecimento de rubeosis e glaucoma neovascular (MIDENA et al., 1996).

1.4 Tumores de Cabeça e Pescoço

O câncer de cabeça e pescoço, representa 10% dos casos diagnosticados de neoplasia maligna, sendo 40% desses localizados na cavidade oral. A incidência de câncer de boca no Brasil vem aumentando consideravelmente, sendo o Estado de São Paulo o que apresentou maior estimativa para o ano 2000, com 3960 novos casos, seguido pelo Rio de Janeiro, com 1860 e Minas Gerais, com 1080 (BRASIL, 2000). Aproximadamente 90-95% das neoplasias diagnosticadas de boca são classificadas como carcinoma espinocelular (CEC), sendo o tabaco e o álcool os fatores etiológicos mais importantes (PUERTO et al., 2000), seguidos por vírus, alimentação, radiações solares, irritação mecânica crônica e exposições ocupacionais a agentes potencialmente cancerígenos.

As neoplasias de cabeça e pescoço apresentam alta taxa de mortalidade devido, entre outros fatores, ao estágio avançado no momento do diagnóstico, o que leva a tratamentos cada vez mais agressivos (Tabela I). O estadiamento do tumor, que determina o tipo de tratamento, é baseado no sistema TNM (no qual T representa o tamanho do tumor; N, presença ou ausência de metástase em linfonodos regionais; M, presença ou ausência de metástase a distância), desenvolvido por Pierre Denoix, entre os anos de 1943 e 1951. Na verdade, o estágio da doença por ocasião do diagnóstico pode ser um reflexo não só da taxa de crescimento e extensão da neoplasia mas, também, do tipo e da relação tumor-hospedeiro (SORBIN, 1998).

Estádios I e II (tumores iniciais, ou seja, menores que 2 cm e entre 2 e 4 cm, respectivamente) são curáveis pela cirurgia ou Rxt, sendo a escolha do tratamento feita pelo resultado funcional e estético e, em especial, pela experiência do cirurgião e do radioterapeuta em cada caso em particular. A presença de margens comprometidas ou

tumor com profundidade maior que 5 mm implica em aumento no risco de recorrência local e sugere a combinação das duas formas terapêuticas para melhor resultado. Estádios III e IV (tumores avançados, ou seja, maiores que 4 cm e os que invadem estruturas adjacentes, respectivamente) são os grandes desafios para os cirurgiões e radioterapeutas. Nesses casos, o tratamento recomendado é cirurgia ou Rxt, ou a associação de ambas, uma vez que para esses grupos de tumores é comum a recorrência local e/ou metástase à distância (HOSPITAL DO CÂNCER, 1999). Atualmente, para tumores avançados tem-se utilizado, também, a quimioterapia associada a radioterapia e se necessário, a cirurgia de resgate.

O tipo de radioterapia utilizada para os tumores de cabeça e pescoço geralmente é a teleterapia com fracionamento convencional, com dose total de 50-60 Gy para os tumores com margens cirúrgicas livres (iniciais), e dose de 65 a 70 Gy para aqueles com margens cirúrgicas comprometidas (avançados), sendo essas divididas em doses diárias de 180 a 200 cGy (HOSPITAL DO CÂNCER, 1999). As fontes de radiações mais utilizadas são o Cobalto 60 ou o Acelerador Linear (AL) de 4 ou 6 Mv, dependendo da profundidade do tumor.

Tabela I - Classificação dos tumores de cabeça e pescoço por estádios e formas de tratamento.

Estádio do Tumor	Tamanho do tumor	Metástase em linfonodos	Metástase a distância	Formas de tratamento
I	T ₁	N ₀	M ₀	Cirurgia ou radioterapia
II	T ₂	N ₀	M ₀	Cirurgia ou radioterapia
III	T ₃ T ₁ T ₂ T ₃	N ₀ N ₁ N ₁ N ₁	M ₀ M ₀ M ₀ M ₀	Ressecáveis: cirurgia + radioterapia Irressecáveis: radioterapia se necessário cirurgia de resgate; radioterapia + quimioterapia, se necessário cirurgia de resgate.
IV	T ₄ Qualquer	N ₀ , N ₁ N _{2a,b,c} , N ₃	M ₀ M ₀	Idem estágio III

	T Qualquer T	Qualquer N	M ₁	
--	--------------------	------------	----------------	--

T₁ - tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão; T₂ - tumor com mais de 2 cm até 4 cm; T₃ - tumor com mais de 4 cm; T₄ - tumor invade as estruturas adjacentes. N₀ - ausência de metástase em linfonodos regionais; N₁- linfonodo homo-lateral, único ≤ 3 cm; N_{2a} - linfonodo homo-lateral, único > 3-6 cm; N_{2b}- linfonodo homo-lateral, múltiplo ≤ 6 cm; N_{2c} - linfonodo bilateral, contra-lateral, ≤ 6 cm; N₃- linfonodo > 6 cm. M₀ ausência de metástase a distância; M₁ presença de metástase a distância.

1.5 Micronúcleo

Os micronúcleos (MN) são corpúsculos de cromatina envolvidos por uma membrana nuclear, localizados próximos ao núcleo principal e morfológicamente indistinguíveis deste, exceto pelo seu menor tamanho. São originados de cromossomos inteiros ou fragmentos cromossômicos que não foram incorporados ao núcleo das células filhas durante a mitose (SCHIMID, 1975; TOLBERT et al., 1992), sendo, portanto, somente visualizados em células que sofreram danos no DNA e completaram pelo menos um ciclo de divisão. Assim, a frequência de MN é dependente da proporção de células em divisão e diminui após as células passarem por mais de uma divisão após a indução da lesão no DNA (FENECH & MORLEY, 1985 a,b).

A formação de MN em células eucarióticas, é um parâmetro importante para a avaliação de danos cromossômicos ou erros de segregação (GEARD & CHEN, 1990). As análises de MN em células esfoliadas de tecido epitelial e em células sanguíneas, podem ser utilizadas para avaliar os danos citogenéticos induzidos por agentes potencialmente cancerígenos aos quais as populações humanas estão usualmente expostas (CAIRNS, 1981; STICH et al., 1982 a,b; LAND et al., 1983; BISHOP, 1987).

Inúmeros estudos têm relacionado o aumento na frequência de MN à exposição a agentes quimioterápicos (SARTO et al., 1990; TATES et al., 1994), à ingestão de

álcool (STICH & ROSIN, 1983), à exposição a agentes xenobióticos (STICH et al., 1982 a,b; 1984; SARTO et al., 1987; LIVINGSTROM et al., 1990) e a radiações ionizantes (FENECH et al., 1990; 1997).

A avaliação da frequência de MN em células esfoliadas do tecido epitelial pode ser utilizada como um “dosímetro endógeno” em tecidos que são alvos específicos de agentes genotóxicos e cancerígenos (STICH et al., 1985; ARLETT et al., 1989). Assim, como 90% dos cânceres são de origem epitelial (CAIRNS, 1975), este tipo de análise é de grande relevância para estudos epidemiológicos (TOLBERT et al., 1992).

Os vários tipos de epitélio são classificados com base no número de camadas e morfologia das células de superfície. A cavidade oral, por exemplo, é revestida por epitélio escamoso estratificado, composto de camada basal, intermediária e superficial, sendo que na basal estão as células capazes de se dividir para produzir células filhas que, por um processo de maturação, migram para a superfície com a finalidade de repor as células perdidas. O tempo requerido para divisão, maturação e migração para a camada superficial varia de acordo com o tipo de tecido, sendo que as células da mucosa oral, que se renovam a cada 7–14 dias, levam, aproximadamente, três semanas para atingirem a superfície podendo, no entanto, morrer antes de se esfoliarem (TOLBERT et al., 1992). Irritações físicas, químicas ou agentes infecciosos podem afetar essa dinâmica (ROSSIN, 1992).

Embora os MN observados nas células esfoliadas da superfície epitelial tenham origem nas populações basais, em divisão, sua frequência pode não refletir a frequência gerada nesta camada, visto que, como novas células são continuamente produzida e gradualmente movem-se para a superfície onde são esfoliadas, a frequência de MN pode

ser diluída devido ao aumento da população de células, ou por serem degradados por nucleases (CASANTELI, 1997).

A técnica para coleta de células esfoliadas é extremamente simples e utilizada, principalmente, para avaliação de danos nas cavidades oral e nasal, brônquios, esôfago, cérvix, bexiga e trato urinário (STICH & ROSSIN, 1983). O teste do MN em células epiteliais apresenta, no entanto, algumas limitações, uma vez que essas células sofrem processos degenerativos que podem produzir alterações que se confundem com os MN (STICH et al., 1985; SARTO et al., 1987), como por exemplo, células binucleadas, picnose (em células de tecidos necróticos que foram expostos a doses tóxicas de agentes mutagênicos e carcinogênicos) e cariorrex (TOLBERT et al., 1992). Embora possam ser relacionadas à carcinogênese, essas alterações devem ser estudadas separadamente, pois diferem quanto a natureza em relação ao câncer.

A análise de MN em linfócitos de sangue periférico, realizada pela técnica de bloqueio da divisão citoplasmática pela citocalasina B, tem, também, se mostrado sensível para a quantificação de quebras cromossômicas, sendo bastante utilizada no biomonitoramento genotóxico de populações expostas a agentes potencialmente mutagênicos (FENECH et al., 1990). A citocalasina empregada nesse teste, é um composto que interfere com os microfilamentos que formam o citoesqueleto, impedindo a citocinese e produzindo uma célula filha com dois núcleos (célula binucleada). É importante destacar que a frequência de micronúcleo em célula binucleada é duas vezes a observada nas células filhas mononucleadas (FENECH & MORLEY, 1986)

Estudos *in vivo* e *in vitro*, têm mostrado que as células com MN desaparecem da população de células em divisão. Muito pouco se sabe sobre esse mecanismo, no

entanto, isto pode ocorrer devido a perda de material genético (micronúcleo), quando então as células deixam de possuir produtos gênicos essenciais (CARRANO & HEDDLE, 1973), ou pela toxicidade que reduz a viabilidade da célula danificada (DAHL et al., 1976; BRADLAW & CRISTIAN, 1985; DULOUT & OLIVERA, 1984). Células com micronúcleos grandes ou múltiplos podem ser eliminadas mais rapidamente devido grande quantidade de danos no material genético (CHANNARAYAPPA & NATH, 1992).

FENECH & MORLEY (1986), avaliando a frequência de MN espontâneos em linfócitos de indivíduos saudáveis entre 20 e 85 anos de idade, encontraram um aumento de 4,3 % por ano de vida, indicando que há influência da idade na indução de MN, com um aumento considerável em indivíduos acima de 40 anos. A frequência de MN varia, também, com relação ao gênero, sendo 1,2 a 1,6 vezes maior nas mulheres (FENECH, 1993; 1998; BARALE et al., 1998).

A frequência espontânea de MN em culturas de linfócitos humanos, provém de mutações acumuladas nas *stem cells*, das quais os linfócitos maduros se originam, ou de danos genéticos acumulados durante o período de vida dos linfócitos circulantes (3-4 anos), podendo estar relacionada ao estilo de vida, uso de medicamentos e mudanças climáticas (aumento da radiação UV) (FENECH, 1993).

COUNTRYMAN & HEDDLE (1976), foram os primeiros pesquisadores a reportarem a indução de MN em linfócitos de sangue periférico irradiados antes da estimulação com fitohemaglutinina A. A partir daí, o teste do MN tem sido amplamente utilizado como alternativo ao teste de aberrações cromossômicas e como dosímetro biológico para a quantificação de danos clastogênicos ou aneugênicos (HEDDLE et al.,

1983; FENECH & MORLEY, 1985; ALMASSY et al., 1987; FENECH, 1991; GEARD & CHEN,1990).

1.6 Objetivos

Com base nas informações apresentadas, o presente estudo teve por objetivos:

- avaliar os danos genéticos induzidos pela radioterapia em indivíduos portadores de tumores malignos de cabeça e pescoço, utilizando o teste do micronúcleo em linfócitos de sangue periférico e em células esfoliadas da mucosa oral;
- avaliar alterações citológicas em células esfoliadas mucosa oral dos pacientes submetidos a radioterapia;
- relacionar os danos citogenéticos e citológicos com possíveis efeitos secundários da radioterapia.

2. OBJETIVOS

Com base nas informações apresentadas, o presente estudo teve por objetivos:

- avaliar os danos genéticos induzidos pela radioterapia em indivíduos portadores de tumores malignos de cabeça e pescoço, utilizando o teste do micronúcleo em linfócitos de sangue periférico e em células esfoliadas da mucosa oral;
 - avaliar alterações citológicas em células esfoliadas mucosa oral dos pacientes submetidos a radioterapia;
 - relacionar os danos citogenéticos e citológicos com possíveis efeitos secundários da radioterapia.
-

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

3.1.1 Grupo de estudo

Foram avaliados 32 indivíduos (26 homens e 6 mulheres), com neoplasia maligna de cabeça e pescoço, na faixa etária de 37 a 78 anos e que foram submetidos à radioterapia, no Serviço de Radioterapia do Hospital A.C. Camargo - São Paulo - SP. Foi aplicado a cada paciente um questionário do qual constavam dados pessoais (idade, sexo, raça), informações gerais (hábitos de fumar, contato com agentes químicos potencialmente mutagênicos, exposição a radiações), história médica (tipo de medicamentos de uso habitual) e dados clínicos (tipo, localização e estadiamento do tumor e formas de tratamento) (Anexo 1). Como critério de seleção para inclusão no estudo foram considerados voluntários aqueles pacientes com tumores malignos de cabeça e pescoço submetidos a cirurgia associada à radioterapia ou radioterapia exclusiva. As informações sobre diagnóstico, estadiamento dos tumores e protocolos de tratamento foram obtidas a partir dos prontuários de cada paciente após autorização do médico responsável.

Os dados referentes a idade e sexo do paciente, tipo, localização e estadiamento do tumor são apresentados na Tabela II.

Tabela II - Caracterização dos pacientes sob radioterapia para tumores malignos de cabeça e pescoço.

Código paciente	Idade (anos)	Sexo	N ^o cigarros (dia)	Tipo de tumor	Localização	Estádio	Dose Rxt (cGy)	
							Durante	Total
201	76	M	20	CEC	Orofaringe	III (T ₃ N ₀ M ₀)	5000	5500
203	50	M	40	CEC	Língua	III (T ₂ N ₁ M ₀)	4860	6040
210	51	M	20	CEC	Mucosa jugal E	III (T ₃ N ₁ M ₀)	2160	6840
214	37	F	3	Carcinoma indiferenciado	Rinofaringe	III (T ₃ N ₁ M ₀)	5240	7040
216	67	M	2	CEC	Laringe	III (T ₃ N ₀ M ₀)	3420	Não retornou
221	72	M	20	CEC	Retromolar E	I (T ₁ N ₀ M ₀)	3240	Não retornou
222	72	M	20	CEC	Seio piriforme	III (T ₃ N ₁ M ₀)	3780	Não retornou
225	43	F	6	Carcinoma adenóide cístico	Palato duro	IV (T ₄ N ₀ M ₀)	2340	4500
227	69	M	20	CEC	Seio piriforme	III (T ₂ N ₁ M ₀)	2700	5940
229	63	M	40	CEC	Laringe	II (T ₂ N ₀ M ₀)	3600	6040
230	51	F	10	CEC	Amígdala	IV (T ₄ N ₃ M ₀)	4000	7800
233	57	M	0	CEC	Laringe	IV (T ₄ N ₀ M ₀)	2520	6040
238	69	M	30	CEC	Assoalho	IV (T ₃ N ₂ M ₀)	2700	6480
242	66	M	20	Carcinoma adenóide cístico	Fossa nasal	IV (T ₄ N ₀ M ₀)	3400	Não retornou
244	59	M	20	CEC	Língua	I (T ₁ N ₀ M ₀)	4140	6000
245	44	M	30	CEC	Assoalho	IV (T ₄ N ₀ M ₀)	1140	6040
250	76	M	0	CEC	Rebordo gengival	III (T ₂ N ₁ M ₀)	1620	Não retornou
251	65	F	0	Melanma	Metástase cervical	-	2800	5600
252	61	M	60	CEC	laringe	I (T ₁ N ₀ M ₀)	5200	6600
257	58	M	80	CEC	laringe	IV (T ₄ N ₀ M ₀)	3600	6700
264	65	F	20	Carcinoma adenóide cístico	Palato duro	IV (T ₄ N ₀ M ₀)	2340	6640
268	54	M	20	Carcinoma basalóide	Hipofaringe	IV (T ₄ N ₀ M ₀)	1980	5400
273	78	M	40	CEC	Supra glótico	II (T ₂ N ₀ M ₀)	2700	7040
276	55	M	40	CEC	Assoalho	IV (T ₂ N _{2b} M ₀)	4500	6440
281	52	M	30	CEC	Glote	III (T ₃ N ₀ M ₀)	3240	6120
284	47	M	40	CEC	Amígdala E	III (T ₃ N ₁ M ₀)	4860	6040
287	56	M	80	CEC	Retromolar	II (T ₂ N ₀ M ₀)	4680	6040
288	57	M	20	CEC	Palato mole	IV (T ₄ N ₀ M ₀)	3060	5980
290	68	M	20	CEC	Assoalho	IV (T ₄ N _{2b} M ₀)	2700	6040
292	44	F	40	CEC	Orofaringe	III (T ₃ N ₁ M ₀)	1980	6040
298	54	M	30	CEC	Laringe	IV (T ₄ N _{2a} M ₀)	3960	6480
299	73	M	40	CEC	Língua	IV (T ₄ N ₁ M ₀)	1980	6040
Média	59,66± 10,81		26,9±20,15				3295±1118	6202± 619

CEC- Carcinoma Espino Celular; **T- Tumor Primário**, T₁ ≤ 2 cm em sua maior dimensão, T₂ - tumor > 2 cm até 4 cm em sua maior dimensão, T₃ - tumor > 4 cm em sua maior dimensão, T₄ - tumor invade as estruturas adjacentes; **N - Linfonodos Regionais**, N₀ - ausência de metástases em linfonodos regionais, N₁ - metástase em um único linfonodo homolateral, com ≤ 3 cm em sua maior dimensão, N₂ - metástase em um único linfonodo homolateral, > 3cm até 6 cm em sua maior dimensão, ou em linfonodos múltiplos homolaterais, bilaterais ou contralaterais < 6 cm em sua maior dimensão, N_{2a} metástase em um único linfonodo homolateral, > 3cm até 6 cm em sua maior dimensão, N_{2b} metástase em linfonodos múltiplos homolaterais, < 6 cm em sua maior dimensão, N_{2c} metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, < 6 cm em sua maior dimensão, N₃ - metástase em linfonodos > 6 cm em sua maior dimensão; **M - Metástase à Distância**, M_x- a presença de metástase à distância não pode ser avaliada, M₀ - ausência de metástase à distância, M₁ - presença de metástase à distância.

3.1.2 Grupo controle

Foram avaliados 17 indivíduos “saudáveis”, **todos** fumantes, não expostos a agentes com reconhecido potencial mutagênico e pareados por sexo e idade ao grupo de estudo. O mesmo questionário aplicado aos pacientes foi respondido pelos indivíduos deste grupo. A caracterização desta amostra é apresentada na Tabela III.

De acordo com recomendação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), antes da aplicação do questionário e coleta das amostras de material biológico foi apresentado e assinado por todos os indivíduos que fizeram parte do estudo o Termo de Consentimento Livre e Informado (Anexo 2).

Tabela III - Caracterização dos indivíduos do grupo controle (sem neoplasia)

Código do controle	Sexo	Idade (anos)	Número cigarros/dia
401	M	46	10
405	M	75	10
408	F	34	20
412	F	46	20
416	M	76	10
427	M	55	30
430	M	42	30
432	M	46	20
435	M	55	20
444	M	58	40
449	M	48	20
465	M	40	20
471	M	49	10
477	F	45	10
483	M	55	20
488	M	73	40
490	M	53	20
Média		50,23 ± 16,91	20,6 ± 9,67

3.2 Radioterapia (Rxt)

As doses diárias, quantidade de sessões e campos de radiação (Figura 2) foram determinados de acordo com o estadiamento e tipo do tumor. Foram utilizadas radiações gama e raios-X emitidos por equipamentos Gammatron S Siemens - 4MeV e Varian - 6MeV, respectivamente.

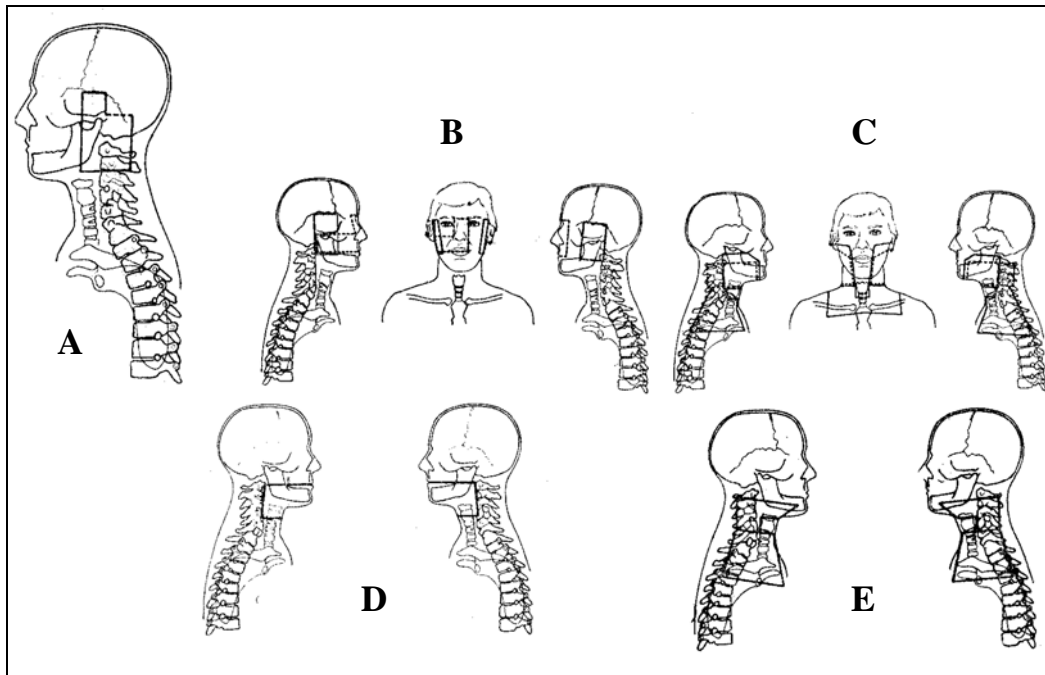


Figura 2 - Campos de radiação para tumores de cabeça e pescoço (A) parótida, (B) antro maxilar, (C) orofaringe, (D) assoalho de boca, e (E) linfonodos cervicais (ENGELMEIER & KING, 1983)

3.3 Material Biológico

3.3.1 Cultura de linfócitos de sangue periférico

Dos 32 pacientes com neoplasia foram coletadas amostras de sangue periférico antes do início da Rxt, entre a 3^a e a 4^a semana do tratamento e, em média, 9 semanas após o término da terapia. Para o grupo controle foi coletada apenas uma amostra de sangue de cada um dos indivíduos.

As amostras de sangue periférico (5 ml) para cultura de linfócitos foram coletadas por punção venosa, utilizando-se seringas descartáveis contendo anti-coagulante (Liquemine - Roche, 5.000 UI/ml). Após a coleta, o sangue foi armazenado em caixa de “Isopor®” com gelo para ser transportado até o laboratório para processamento das células.

As culturas para obtenção de linfócitos binucleados para análise de micronúcleo foram realizadas com base na metodologia proposta por FENECH (1993). Aproximadamente 1 ml de soro e 0,5 ml de sangue total foram transferidos para um frasco de cultura contendo 6 ml de meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab) suplementado com 2 ml de soro fetal bovino (Cultilab) e 0,25 ml de fitohemaglutinina A (Cultilab). Após homogeneização, as culturas foram incubadas a 37°C, por 44 h, momento em que foi adicionado 4,5 ug/ml de citocalasina B (Sigma) para bloquear a divisão citoplasmática. Após novo período de 28 h a 37°C, procedeu-se a hipotonização (KCl 0,075M, gelado) e fixação das células (três lavagens sucessivas em solução de metanol/ácido acético, 5:1). A suspensão resultante foi gotejada em lâminas limpas e

deixadas secar a temperatura ambiente para serem coradas com solução de Giemsa 5%, por 7 minutos.

3.3.2 Células da mucosa bucal

As células da mucosa bucal dos pacientes foram igualmente coletadas em 3 períodos: antes do início da Rxt, entre a 3^a e a 4^a semana do tratamento e, em média, 9 semanas após o término da terapia. De cada paciente foram coletadas, separadamente, amostras de células da mucosa jugal direita e esquerda, utilizando-se espátula de madeira (abaixador de língua) umedecida em soro fisiológico. A raspagem da mucosa foi realizada de modo a obter células da camada intermediária. O material coletado foi transferido para tubos de centrífuga, devidamente rotulados e contendo 5 ml de soro fisiológico, mantidos em caixa de “Isopor®” com gelo e transportado para o laboratório para processamento das células de acordo com a técnica descrita por SARTO et al. (1987) e modificada por BERLIËN et al. (1995), para avaliação de micronúcleo. A suspensão de células resultante foi gotejada em lâminas limpas, e deixada secar à temperatura ambiente para ser corada pelo método de Feulgen.

Para o grupo controle foi coletada apenas uma amostra fazendo-se um *pool* de células esfoliadas da mucosa bucal direita e esquerda, diferentemente do grupo de estudo, em que as células obtidas de cada um dos lados foram analisadas separadamente.

3.4 Análise de micronúcleo

Para avaliação da frequência de micronúcleo foram analisados 1000 linfócitos binucleados por coleta/indivíduo. Para células esfoliadas da mucosa bucal, na primeira e terceira coletas foram analisadas 2000 células (1000 para cada lado), na segunda, que correspondeu ao período durante o tratamento com a radiação, foram analisadas 4000 células (2000 para cada lado) com o objetivo de detectar possíveis diferenças nas frequências de micronúcleo dependentes do local de maior incidência da radiação. Todas as lâminas foram analisadas em teste cego em microscópio de luz, com aumento de 400 vezes.

De acordo com EASTMOND & TUCKER (1989), o índice mitótico foi calculado pela fórmula:

$$\text{NDI} = \frac{\text{M1} + (2 \times \text{M2}) + (3 \times \text{M3}) + (4 \times \text{M4})}{\text{N}}$$

Em que:

M1, M2, M3 e M4 = número de células com 1, 2, 3, 4 núcleos, respectivamente;

N = número total de células

As Figuras 3 e 4 mostram, respectivamente, linfócitos binucleados e células da mucosa bucal, ambos apresentando micronúcleo.

Figura 3 – Fotomicrografia mostrando linfócitos binucleados. Nos destaques linfócitos com micronúcleo. Aumento 400 X.

Figura 4 – Fotomicrografia mostrando células da mucosa bucal; a seta indica a presença de micronúcleo. Aumento de 400 X.

3.5 Citologia da mucosa bucal

Para avaliação citológica da mucosa bucal foram utilizadas as mesmas lâminas da análise de micronúcleo, considerando para diagnóstico a morfologia celular, relação núcleo/citoplasma, atipias nucleares, mitoses atípicas e padrão de cromatina. O diagnóstico foi dado como normal (sem alteração), inflamatório (presença de células inflamatórias, polimorfonucleares), atípico-suspeito para neoplasia e atípico-neoplásico; estes dois últimos baseados no aumento da relação núcleo/citoplasma, mitoses atípicas, irregularidade nuclear e padrão grosseiro da cromatina nuclear.

3.6 Análise estatística

Os testes estatísticos para comparação das frequências de micronúcleo entre as coletas e entre os grupos de estudo e o controle foram o de Wilcoxon e Friedman quando se tratavam de amostras dependentes, Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney para amostras independentes (CURI, 1997). O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

A fim de avaliar o efeito das diferentes doses de radiação utilizadas para os diferentes tipos de neoplasias, foi necessário agrupar os pacientes por faixa de dose recebida durante ou no período total do tratamento. Isto foi feito para tornar possível a análise estatística dos dados uma vez que o tamanho da amostra de indivíduos com uma única dose não seria suficiente para que os testes pudessem ser aplicados. Assim, os pacientes foram divididos em três grupos para a avaliação do efeito da radiação durante o tratamento, a saber: 1) os que receberam doses < 2600 cGy; 2) aqueles tratados com

doses entre 2700 até 3500 cGy; 3) e aqueles que receberam doses > 3500 cGy. Para o efeito após o término da radioterapia os pacientes foram distribuídos em dois grupos: 1) com doses < 6100 cGy; 2) com doses > 6100 cGy.

Mesmo procedimento foi adotado nas avaliações referentes ao efeito do cigarro (números de cigarros/dia), idade e tempo de coleta das amostras celulares após o término da radioterapia.

A assessoria estatística foi prestada pelo Prof. Dr. Paulo Roberto Curi, professor aposentado da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia UNESP, Campus de Botucatu.

4. RESULTADOS

Serão descritos os parâmetros que mostraram diferenças estatisticamente significativas ou biologicamente relevantes entre os grupos estudados. Os resultados individuais dos pacientes com neoplasia maligna de cabeça e pescoço estão apresentados na Tabela XVIII (APÊNDICE).

Com relação a frequência de células micronucleadas na mucosa bucal, como não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o lado direito e o esquerdo, isto é, entre o local de maior incidência de radiação e o lado oposto, os dados foram agrupados.

A Tabela IV apresenta as frequências de células micronucleadas no sangue periférico e na mucosa bucal de indivíduos sem neoplasias (grupo controle) e de pacientes com câncer de cabeça e pescoço, antes da radioterapia. Os resultados mostraram que não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos, mesmo quando os pacientes são distribuídos de acordo com o estágio do tumor.

Tabela IV – Frequência de células micronucleadas (MN) no sangue periférico e na mucosa bucal de indivíduos sem neoplasia (grupo controle) e de pacientes com câncer de cabeça e pescoço, distribuídos de acordo com o estágio do tumor (antes da radioterapia).

GRUPOS	SANGUE			MUCOSA BUCAL		
	Nº células analisadas	MN		Nº células analisadas	MN	
Nº		%	Nº		%	
Controle	13490 (n=15)	46	0,34	33727 (n=17)	15	0,04
Pacientes antes do tratamento	30000 (n=30)	67	0,22	62000 (n=31)	49	0,08
Estádio I e II ^a	6000 (n=6)	12	0,20	12000 (n=6)	5	0,04
Estádio III	10000 (n=10)	24	0,24	22000 (n=11)	17	0,08
Estádio IV	14000 (n=14)	31	0,22	28000 (n=14)	27	0,10

^a – Devido ao pequeno tamanho das amostras, os dados dos estádios I e II foram agrupados. Teste de Mann-Whitney para duas amostras independentes: não há diferença significativa entre os grupos (controle x pacientes antes do tratamento); $p > 0,10$. Teste de Kruskal Wallis para amostras independentes: não há diferença significativa entre os grupos (controle x estádios I e II x estágio III x estágio IV); $p > 0,10$.

Na Tabela V são apresentadas as frequências de células micronucleadas, antes, durante (na 3^a ou 4^a semana do tratamento) e após (30 a 322 dias) a radioterapia, em pacientes agrupados independentemente do estágio da neoplasia. Os resultados mostram que há aumento na frequência de células com MN, tanto em sangue periférico como em mucosa bucal, durante o tratamento, indicando efeito mutagênico da radiação ionizante nas doses utilizadas. Os dados mostram, também, que a frequência de

micronúcleo manteve-se elevada após o término de exposição à radiação, somente em linfócitos.

Tabela V – Frequência de células micronucleadas (MN) em sangue periférico e mucosa bucal de pacientes com neoplasia de cabeça e pescoço, antes, durante e após a radioterapia.

GRUPOS	SANGUE			MUCOSA BUCAL		
	Nº células analisadas	MN		Nº células analisadas	MN	
Nº		%	Nº		%	
Antes	23000 (n=23)	43	0,19 ^a	52000 (n=26)	44	0,08 ^a
Durante	23000 (n=23)	699	3,04 ^{b**}	103304 (n=26)	238	0,23 ^{b*}
Após	14143 (n=23)	709	3,08 ^{b**}	52000 (n=26)	86	0,16 ^a

Teste de Friedman para amostras dependentes; ^{a,b} letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Quando se considerou o tempo de coleta das amostras celulares após o término da radioterapia (≤ 60 dias e > 60 dias), os resultados mostraram que, em linfócitos o aumento da frequência de células com micronúcleos persistiu até 9 semanas após o tratamento (> 60 dias) (Tabela VI).

Tabela VI– Frequência de células micronucleadas (MN) em sangue periférico e mucosa bucal de pacientes com câncer de cabeça e pescoço distribuídos de acordo com o tempo de coleta do material biológico após o término da radioterapia.

GRUPOS	SANGUE			MUCOSA BUCAL		
	N ^o células analisadas	MN		N ^o células analisadas	MN	
N ^o		%	N ^o		%	
≤60 dias (48 ± 8)						
Antes	16000 (n=16)	28	0,18	34000 (n=17)	35	0,10
Durante	16000 (n=16)	543	3,39**	67304 (n=17)	174	0,26*
Após	15136 (n=16)	624	4,12 **	33607 (n=17)	57	0,17
> 60 dias (122 ± 79)						
Antes	9000 (n=9)	19	0,21	20000 (n=10)	12	0,06
Durante	9000 (n=9)	179	1,99**	40000 (n=10)	66	0,16
Após	8000 (n=9)	146	1,82**	20000 (n=10)	29	0,14

Teste de Friedman para amostras dependentes; * p<0,05; ** p<0,01.

A Figura 5 apresenta as frequências de células micronucleadas em grupos de pacientes distribuídos de acordo com as faixas de dose de radiação recebidas (< 2600 cGy, 2600 - 3500 cGy e > 3500 cGy). Observa-se que todas as doses induziram aumento na frequência de células micronucleadas no sangue periférico, mas não na mucosa bucal onde as doses mais altas não apresentaram tal efeito. No entanto, quando os três níveis de dose foram comparados entre si, não foram observadas diferenças significativas na indução de micronúcleo, tanto em linfócitos como em células da

mucosa bucal (Tabela VII). Resultado semelhante foi observado para as duas faixas de dose de radiação recebidas até o final do tratamento (< 6100 cGy e > 6100 cGy). Embora ambas tenham induzido aumento de células micronucleadas no sangue, mas não na mucosa bucal (Figura 6), não houve diferença estatisticamente significativa entre os efeitos induzidos pelos dois níveis de dose. Neste caso, no entanto, foi observado um decréscimo significativo no índice mitótico de linfócitos para a faixa de dose mais alta (Tabela VIII).

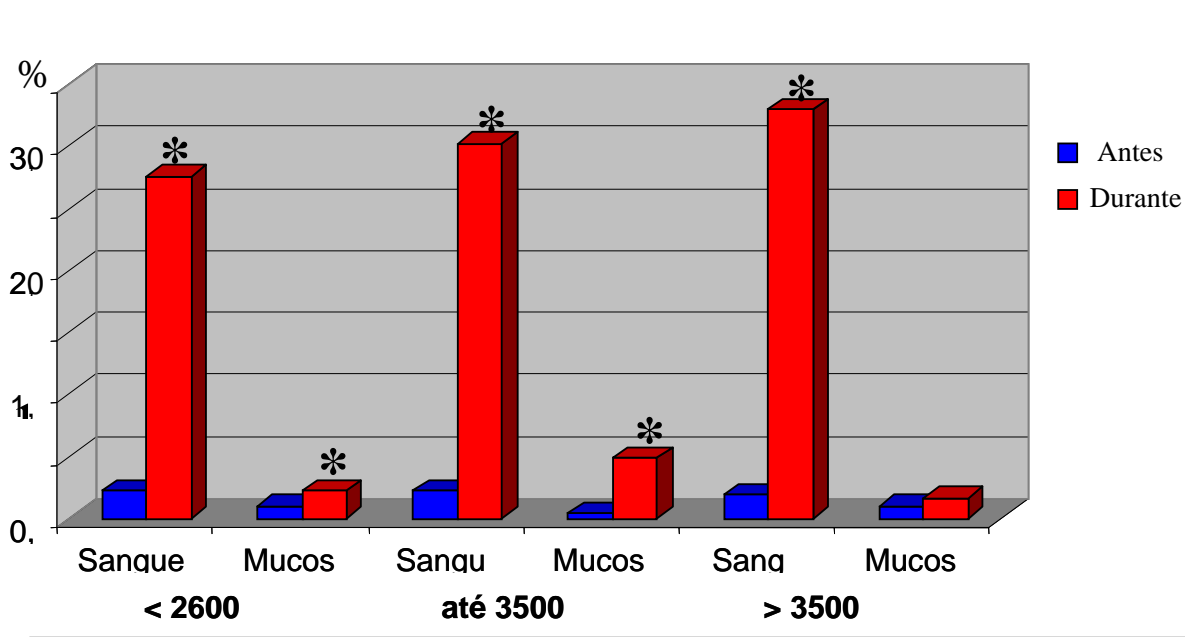


Figura 5– Frequência de células micronucleadas em pacientes com câncer de cabeça e pescoço, antes e durante o tratamento com três níveis de dose de radiação ionizante; * $p < 0,05$.

Tabela VII - Frequência de células com micronúcleo (MN) em sangue periférico e mucosa bucal de pacientes com neoplasia de cabeça e pescoço, distribuídos de acordo com a dose de radiação recebida durante o tratamento.

GRUPOS	Nº células analisadas	SANGUE MN			MUCOSA BUCAL MN		
		Nº	%	Índice mitótico	Nº células analisadas	Nº	%
< 2600 cGy (2007 ± 420)	9000 (n=9)	248	2,76	1,53	35304 (n=9)	77	0,22
2600 - 3500 cGy (2996 ± 308)	10000 (n=10)	302	3,02	1,35	21526 (n=10)	106	0,49
> 3500 cGy (4518 ± 630)	10000 (n=10)	329	3,29	1,44	52000 (n=13)	90	0,17

Teste paramétrico de Kruskal Wallis para amostras independentes: não há diferença significativa entre os grupos; $p > 0,10$

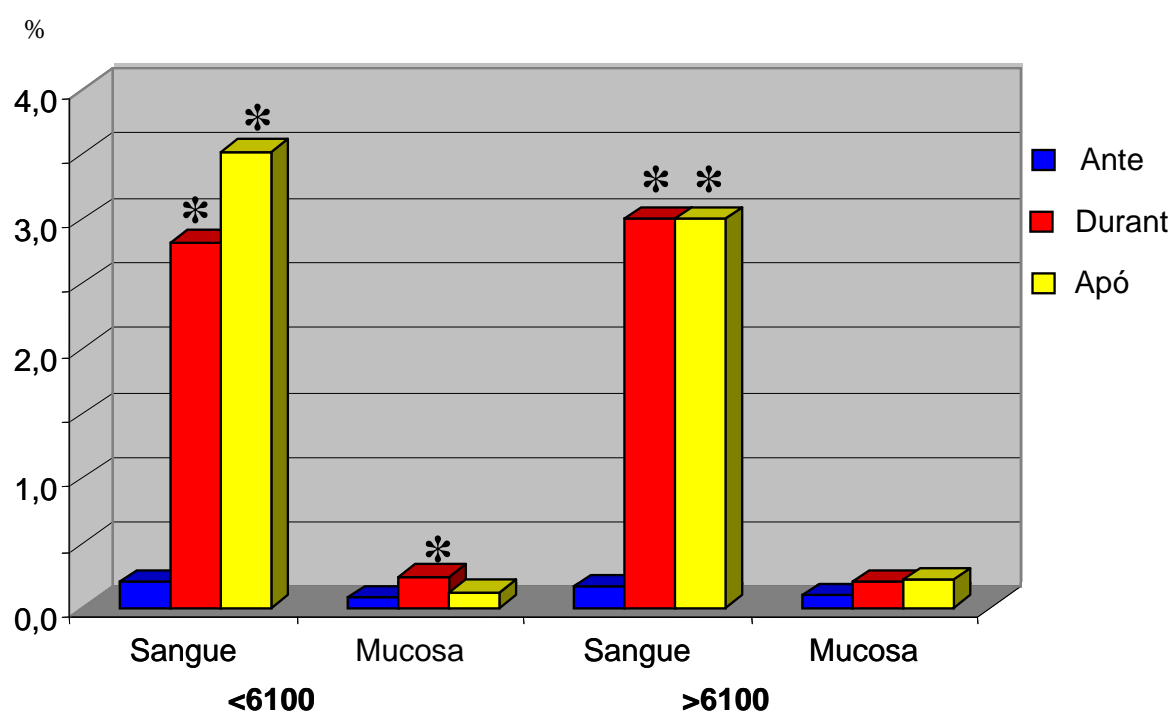


Figura 6 – Frequência de células micronucleadas em pacientes com câncer de cabeça e pescoço, antes, durante e após o tratamento com dois níveis de dose de radiação ionizante; * $p < 0,01$.

Tabela VIII – Frequência de células micronucleadas (MN) em sangue e mucosa bucal de pacientes com neoplasia de cabeça e pescoço após a radioterapia com diferentes doses totais de radiação.

GRUPOS	Nº células analisadas	SANGUE MN			MUCOSA BUCAL MN		
		Nº	%	Índice mitótico	Nº células analisadas	Nº	%
<6100 cGy (5830 ± 414)	14636 (n=16)	515	3,52	1,43 ^a	32000 (n=16)	39	0,12
> 6100 cGy (6744 ± 442)	10500 (n=11)	318	3,02	1,19 ^{b*}	11607 (n=11)	47	0,40

Teste de Mann-Whitney para duas amostras independentes: não há diferença significativa entre os grupos, com relação à frequência de células micronucleadas; $p > 0,10$. ^{a,b} letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos; * $p < 0,05$.

Além da frequência de células com micronúcleo, foi avaliado em, sangue periférico, o número de micronúcleos por célula, antes, durante e após a terapia com diferentes doses de radiação. O resultado mostrou que, antes do tratamento, todas as células apresentavam apenas um micronúcleo (razão MN/célula = 1,0) e que, durante e após a radioterapia, embora tivessem sido detectadas células com 2, 3 e 4 micronúcleos, as frequências não foram estatisticamente diferentes entre as doses de radiação (Tabela IX).

Tabela IX- Distribuição e frequência de micronúcleos (MN) por linfócitos micronucleados em pacientes com neoplasia de cabeça e pescoço, antes, durante e após a radioterapia.

Período de terapia/ Dose de radiação	Células analisadas	Células com MN	% de células com				Razão MN/ Célula
			1 MN	2 MN	3 MN	4 MN	
Antes	30000 (n=30)	67	0,22	0	0	0	1,0
Durante							
< 2600 cGy (2007 ± 420)	5500 (n=9)	171	89,5	7,6	2,3	0,6	1,14
2600 - 3500 cGy (2996 ± 308)	5500 (n=10)	192	87,0	11,5	0,5	1,0	1,16
> 3500 cGy (4518 ± 630)	5500 (n=10)	232	87,1	12,5	0,4	0	1,13
Após							
<6100 cGy (5830 ± 414)	8000 (n=16)	353	79,0	17,6	2	1,4	1,26
>6100 cGy (6744 ± 442)	5500 (n=11)	203	83,2	11,8	4	1	1,23

Com relação ao sexo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as frequências de células com micronúcleo para os três momentos de coleta do material biológico (antes, durante e após a radioterapia), o que permitiu que os resultados dos pacientes masculinos e femininos fossem agrupados para todas as análises (Tabela X).

Tabela X - Frequência de células micronucleadas (MN) em sangue periférico e mucosa bucal de pacientes com neoplasia de cabeça e pescoço, distribuídos de acordo com o sexo, antes, durante e após a radioterapia.

COLETAS	SEXO	SANGUE			MUCOSA ORAL		
		Nº células analisadas	MN		Nº células analisadas	MN	
	Nº		%			Nº	%
ANTES	Masculino	25000 (n=25)	56	0,22	52000 (n=26)	33	0,06
	Feminino	6000 (n=6)	11	0,18	12000 (n=6)	17	0,14
DURANTE	Masculino	24000 (n=24)	777	3,24	102830 (n=26)	244	0,24
	Feminino	6000 (n=6)	144	2,40	24000 (n=6)	29	0,12
APÓS	Masculino	19636 (n=21)	707	3,60	41607 (n=21)	65	0,16
	Feminino	6000 (n=6)	126	2,10	12000 (n=6)	21	0,18

Teste de Mann-Whitney para duas amostras independentes: masculino x feminino (nas coletas antes, durante e após a radioterapia); não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos; $p > 0,10$.

Quando foi avaliada a frequência de células com micronúcleo nos grupos, controle, de pacientes fumantes e não fumantes, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre eles, muito embora, o número de indivíduos no último grupo tenha sido muito pequeno. Além disso, não foram também observadas alterações nas frequências de células micronucleadas, durante e após o tratamento, considerando a quantidade de cigarros fumados por dia, isto é, não houve efeito

potencializador dependente do número de cigarros/dia, sobre os danos induzidos pela radiação ionizante nos pacientes com câncer de cabeça e pescoço (Tabela XI).

Tabela XI - Frequência de células micronucleadas (MN) em sangue periférico e mucosa bucal de pacientes com neoplasia de cabeça e pescoço, de acordo com o consumo de cigarro/dia.

GRUPOS/ COLETAS	Número de cigarros/dia	N ^o células analisadas	SANGUE MN		N ^o células analisadas	MUCOSA ORAL MN	
			N ^o	%		N ^o	%
Controle ¹	10 a 40	13490 (n=15)	46	0,34	33727 (n=17)	15	0,04
Pacientes não fumantes ¹	0	3000 (n=3)	5	0,17	6000 (n=3)	2	0,03
Pacientes fumantes Antes ^{1,2}	≤ 20	14000 (n=14)	35	0,25	30000 (n=15)	25	0,08
	≥ 30	14000 (n=14)	27	0,19	28000 (n=14)	23	0,08
Durante ²	≤ 20	15000 (n=15)	558	3,72	58830 (n=15)	126	0,21
	≥ 30	12000 (n=12)	293	2,44	56000 (n=14)	131	0,23
Após ²	≤ 20	9959 (n=11)	403	4,04	22000 (n=11)	37	0,17
	≥ 30	13793 (n=14)	377	2,73	27607 (n=14)	48	0,17

¹ Teste paramétrico de Kruskal Wallis para amostras independentes: não há diferença significativa entre os grupos (controle x pacientes não fumantes x pacientes fumantes, antes do tratamento); $p > 0,10$. ² Teste de Mann-Whitney para duas amostras independentes: ≤ 20 X ≥ 30 cigarros/dia, antes, durante e após o tratamento; não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos; $p > 0,10$.

A Tabela XII apresenta as frequências de células com micronúcleo antes, durante e após o tratamento nos pacientes distribuídos de acordo com a idade no momento do diagnóstico (< 60 e > 60 anos). Pode-se observar que em todos os momentos da avaliação a idade não interferiu na quantidade de células micronucleadas.

Tabela XII – Frequência de células micronucleadas (MN) em sangue periférico e mucosa bucal, antes, durante e após a radioterapia, em pacientes com neoplasia de cabeça e pescoço, distribuídos em duas faixas etárias (< 60 e > 60 anos).

GRUPOS	SANGUE			MUCOSA BUCAL		
	N ^o células analisadas	MN		N ^o células analisadas	MN	
N ^o		%	N ^o		%	
Antes						
< 60 anos	14000 (n=14)	28	0,20	34000 (n=17)	39	0,11
> 60 anos	11000 (n=11)	19	0,17	20000 (n=10)	8	0,04
Durante						
< 60 anos	14000 (n=14)	427	3,05	67304 (n=17)	158	0,24
> 60 anos	11000 (n=11)	295	2,68	40000 (n=10)	82	0,20
Após						
< 60 anos	13293 (n=14)	396	2,98	33607 (n=17)	47	0,14
> 60 anos	9843 (n=11)	374	3,80	20000 (n=10)	39	0,19

Teste de Mann-Whitney para duas amostras independentes: não há diferença significativa entre os grupos; $p > 0,10$.

A Figura 7 mostra a frequência de células micronucleadas em pacientes agrupados de acordo com o estágio clínico do tumor, antes, durante e após a radioterapia. Em todos os grupos foram observados aumentos significativos nas

freqüências de linfócitos micronucleados durante e após o tratamento. Contudo, quando foram comparadas as freqüências de células com micronúcleo entre os diferentes grupos, observou-se que durante o tratamento, os pacientes com tumor estágio III apresentaram freqüência levemente aumentada de linfócitos micronucleados com relação aos pacientes com tumor estágio IV. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada na mucosa bucal e em relação ao índice mitótico em linfócitos (Tabela XIII).

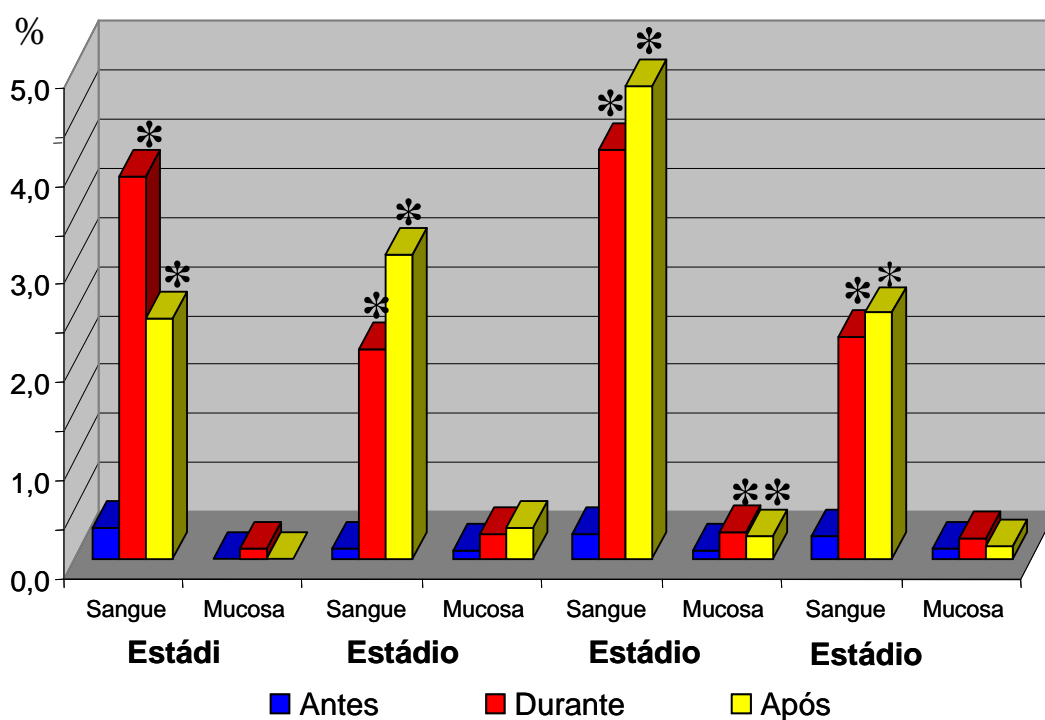


Figura 7 – Freqüência de células micronucleadas em pacientes com tumor de cabeça e pescoço, em diferentes estádios clínicos, antes, durante e após a radioterapia; * $p < 0,01$.

Tabela XIII - Frequência de células micronucleadas (MN) em sangue periférico e mucosa bucal de pacientes com neoplasia de cabeça e pescoço, distribuídos de acordo com o estágio do tumor, durante e após a radioterapia.

GRUPOS (dose média de radiação)	SANGUE				MUCOSA BUCAL		
	N ^o células analisadas	MN		índice mitótico	N ^o células analisadas	MN	
N ^o		%	N ^o			%	
Estádio I e II ^a (3927 ± 929)	6000 (n=6)	181	3,02 ^{a,b}	1,32	24000 (n=6)	41	0,17
Estádio III (3533 ± 1319)	11000 (n=11)	459	4,17 ^{b*}	1,50	43526 (n=11)	116	0,27
Estádio IV (2693 ± 852)	12000 (n=12)	270	2,25 ^a	1,38	55304 (n=14)	114	0,20
Estádio I e II (6344 ± 462)	5000 (n=5)	142	2,84	1,42	10000 (n=5)	18	0,18
Estádio III (6195 ± 501)	7793 (n=8)	375	4,81	1,40	16000 (n=8)	37	0,23
Estádio IV (6198 ± 758)	11343 (n=13)	284	2,50	1,32	25607 (n=13)	31	0,12

^a – Devido ao pequeno tamanho das amostras, os dados dos estádios I e II foram agrupados. Teste paramétrico de Kruskal Wallis para amostras independentes, ^{a,b}- letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos; * p<0,05.

A Figura 8 mostra as frequências de células micronucleadas em sangue e mucosa bucal de pacientes distribuídos de acordo com o tamanho do tumor (T₁+ T₂, T₃ e T₄), antes, durante e após a radioterapia. Os resultados mostraram aumentos nas frequências de linfócitos micronucleados nos 3 grupos de pacientes, durante e após o tratamento, muito embora, em mucosa bucal, tenha sido observada apenas uma tendência de aumento nos pacientes T₃, durante a terapia. No entanto, quando foram

comparados os resultados dos 3 grupos, observou-se que, com exceção dos pacientes T₃ que antes do início do tratamento apresentavam freqüência aumentada de células micronucleadas na mucosa bucal, não houve diferença significativa na indução de micronúcleo pela radiação, dependente do tamanho do tumor (Tabela XIV).

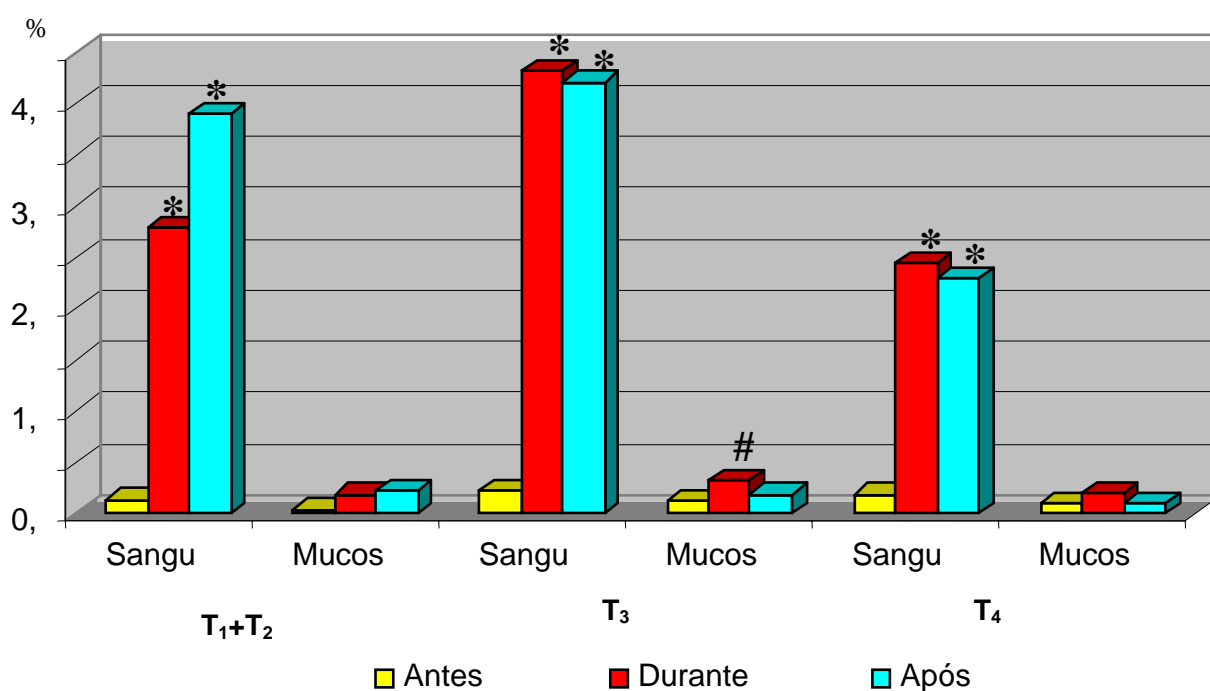


Figura 8 - Frequências de células micronucleadas em sangue e mucosa bucal dos pacientes com neoplasia, divididos de acordo com o tamanho do tumor (T₁, T₂, T₃ e T₄), antes, durante e após a radioterapia; *p<0,01, #0,05<p<0,10.

Tabela XIV – Frequência de células micronucleadas (MN) em sangue periférico e mucosa bucal de indivíduos sem neoplasia (grupo controle) e de pacientes com câncer de cabeça e pescoço, distribuídos de acordo com o tamanho do tumor, antes, durante e após a radioterapia.

GRUPOS	N ^o células analisadas	SANGUE MN		MUCOSA BUCAL MN		
		N ^o	%	N ^o células Analisadas	N ^o	%
Controle	13490 (n=15)	46	0,34	33727 (n=17)	15	0,04
T ₁ + T ₂ ^a	10000 (n=10)	21	0,21	20000 (n=10)	7	0,04 ^a
T ₃	7000 (n=7)	18	0,25	16000 (n=8)	17	0,12 ^{b*}
T ₄	12000 (n=12)	24	0,20	24000 (n=12)	25	0,11 ^{a,b}
T ₁ + T ₂ ^a (3983 ± 1016)	7000 (n=7)	196	2,80 ^a	32000 (n=8)	61	0,19
T ₃ (3747 ± 1478)	6000 (n=6)	259	4,32 ^{a#}	24000 (n=6)	76	0,32
T ₄ (2566 ± 830)	10000 (n=10)	244	2,44 ^a	43304 (n=11)	89	0,21
T ₁ + T ₂ ^a (6243 ± 416)	7000 (n=7)	273	3,90	15607 (n=8)	6	0,23
T ₃ (6263 ± 572)	5793 (n=6)	244	4,21	12000 (n=6)	23	0,19
T ₄ (6118 ± 857)	8343 (n=10)	192	2,30	22000 (n=11)	24	0,11

^a – Devido ao pequeno tamanho das amostras, os dados de T₁ e T₂ foram agrupados. T₁- tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão; T₂- tumor com mais de 2 cm até 4 cm ;T₃- tumor com mais de 4 cm ; T₄ tumor que invade estruturas adjacentes. Teste não paramétrico de Kruskal Wallis para amostras independentes, ^{a, b}- letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos; * p<0,05; # 0,05<p<0,10.

Na Tabela XV são apresentadas as frequências de células micronucleadas em sangue periférico e mucosa bucal dos pacientes distribuídos de acordo com a presença ou não de metástase em linfonodos regionais, antes, durante e após a radioterapia. Os resultados mostram que não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos, tanto em linfócitos como em células da mucosa bucal, em todos os momentos de análise.

Tabela XV – Frequência de células micronucleadas (MN) em sangue periférico e mucosa bucal de indivíduos sem neoplasia (grupo controle) e de pacientes com câncer de cabeça e pescoço, com e sem metástase em linfonodos regionais, antes, durante e após a radioterapia.

GRUPOS	SANGUE			MUCOSA BUCAL		
	N ^o células analisadas	MN		N ^o células analisadas	MN	
N ^o		%	N ^o		%	
Controle	13490 (n=15)	46	0,34	33727 (n=17)	15	0,04
Antes						
Pacientes N ₀	17000 (n=17)	37	0,22	34000 (n=17)	24	0,07
Pacientes N*	13000 (n=13)	30	0,23	28000 (n=14)	15	0,05
Pacientes N ₀	14000 (n=14)	394	2,80	55304 (n=14)	109	0,20
Pacientes N*	10000 (n=10)	317	3,17	48000 (n=12)	129	0,27
Pacientes N ₀	12500 (n=14)	407	3,26	28000 (n=14)	36	0,13
Pacientes N*	9636 (n=10)	331	3,44	23607 (n=12)	50	0,21

N_0 e N^* respectivamente, ausência de metástase e presença de metástase em linfonodos regionais. Teste não paramétrico de Kruskal Wallis para amostras independentes: não há diferença significativa entre os grupos: $p > 0,10$.

A análise citopatológica da mucosa bucal mostrou apenas a presença de processos inflamatórios nucleofílicos, observados em 53% dos pacientes durante e 18 % após o término do tratamento (Tabela XVI). Antes da terapia nenhuma alteração foi observada.

Tabela XVI – Resultado da análise citopatológica da mucosa bucal de pacientes com neoplasia maligna de cabeça e pescoço, durante e após a radioterapia.

	Presença de Neutrófilos					
	0		+		++	
Pacientes	N ^o	%	N ^o	%	N ^o	%
Durante (n=32)	15	46,9	12	37,5	5	15,6
Após (n=27)	22	81,5	5	18,5	0	0

0, +, ++ : ausente, poucos e muitos neutrófilos, respectivamente.

Todos os resultados do estudo estão apresentados de forma resumida na Tabela XVII.

Tabela XVII – Resumo dos resultados das análises estatísticas nas diferentes variáveis consideradas para a avaliação dos efeitos mutagênicos (indução de micronúcleo) da radioterapia em linfócitos e células da mucosa bucal.

Variáveis	Grupos	Número de indivíduos	Nível de significância (p) ^a	Observação
Neoplasia	Não	15	p > 0,10	
	Sim	30		
Radioterapia	Antes	23	p < 0,05* p < 0,01**	* mucosa bucal (durante) ** sangue (durante e após)
	Durante	23		
	Após	23		
Dose parcial (durante tratamento)	<2600 cGy	9	p > 0,10	
	2600 a 3500 cGy	10		
	>3500 cGy	13		
Dose total (final tratamento)	do <6100 cGy	16	p > 0,10	
	>6100 cGy	11		
Sexo	Masculino	26	p > 0,10	
	Feminino	6		
Tabagismo (cigarros/dia)	Não tabagista	3	p > 0,10	
	Tabagista	29		
	(≤20)	15		
	(≥30)	14		
Idade	< 60 anos	17	p > 0,10	
	> 60 anos	15		
Estádio tumor do	I + II	6	p > 0,10	
	III	11		
	IV	14		
Tamanho tumor do	T ₁ + T ₂	10	p < 0,05*	* T ₃ > T ₁ +T ₂ em mucosa bucal, antes do tratamento
	T ₃	7	p > 0,10	
	T ₄	12		
Metástase	Não	17		

Sim 13 $p > 0,10$

^a – $p < 0,05$ e $p < 0,01$ indicam diferença significativa; $p > 0,10$ indica diferença não significativa.

5. DISCUSSÃO

Os avanços científicos e tecnológicos, particularmente no campo da oncologia médica, têm permitido aos profissionais buscar novas técnicas terapêuticas, com efeitos colaterais reduzidos e, portanto, com menor risco para o desenvolvimento de anomalias secundárias, relacionadas ao tratamento.

Nesse contexto, este estudo foi delineado visando obter informações que pudessem contribuir para o conhecimento dos efeitos secundários da radioterapia. Desta forma, e considerando que as alterações genéticas estão intimamente relacionadas ao desenvolvimento do câncer e que a quantificação de lesões no DNA pode servir como um indicador para o risco carcinogênico, o objetivo principal do estudo foi avaliar o efeito mutagênico (clastogênico) das doses de radiação ionizante utilizadas na terapia de neoplasias malignas de cabeça e pescoço.

Uma das dificuldades encontradas para a realização deste trabalho, foi o retorno dos pacientes para a coleta do material biológico, principalmente após o término do tratamento, quando seria avaliada a persistência ou não das alterações genéticas induzidas pela radioterapia.

O teste do micronúcleo em linfócitos de sangue periférico, após o bloqueio da citocinese com a citocalasina B, tem mostrado ser uma técnica sensível para quantificar alterações cromossômicas induzidas por agentes mutagênicos (FENECH et al., 1990). Desta forma, o teste vem sendo utilizado como um biomarcador para pacientes com câncer, com potencial para prever a radiosensibilidade individual e identificar aqueles indivíduos com maior risco de desenvolver efeitos radioinduzidos (FENECH et al., 1990; FENECH, 1993; THIERENS et al., 1996; CATENA et al., 1996).

Do mesmo modo, o teste do micronúcleo em células esfoliadas de tecidos epiteliais é bastante utilizado, pois apresenta a vantagem de não necessitar de estímulos proliferativos para manifestação dos danos e por refletir eventos genotóxicos que ocorreram diretamente nas células da camada basal, em divisão (TOLBERT et al., 1991). No entanto, o teste em células e

lamatórios. Antes do início do tratamento, nenhuma alteração citológica foi observada nos pacientes com neoplasia de cabeça e pescoço. Quando a avaliação foi realizada durante e após a radioterapia, 53% e 18% dos pacientes, respectivamente, apresentaram processos inflamatórios. Este resultado está de acordo com o esperado, pois o estímulo de células inflamatórias faz parte dos efeitos orais causados pela radioterapia (SONIS, 1989).

A maior parte das complicações orais provocadas pela radioterapia de tumores de cabeça e pescoço é causada por mudanças teciduais locais. Devido a alta capacidade de multiplicação, as células do epitélio bucal sofrem intensamente os efeitos diretos e indiretos da radiação. A mucosite, por exemplo, que eventualmente pode levar a atrofia da mucosa, é ocasionada pela diminuição da renovação celular a qual dá origem a uma intensa resposta inflamatória, que rapidamente leva à exposição do córion subjacente da mucosa, causando intensa sintomatologia dolorosa e predispondo os tecidos bucais a infecções secundárias oportunistas, como *Candida albicans*. A severidade da mucosite depende da dose, duração e campo da irradiação, e inicia-se com eritema, seguido de uma diminuição da coloração da mucosa e descamação. Em aproximadamente três semanas a mucosa torna-se fina, vermelha e friável devido a um desequilíbrio entre morte celular e capacidade de proliferação. Sua incidência é maior na porção não queratinizada da mucosa como bochechas, lábios, palato mole, superfície ventral da língua e assoalho da boca (SONIS, 1989; WHITMYER et al., 1997).

No que diz respeito a lesões citogenéticas, a literatura tem mostrado um aumento na incidência de alterações em pacientes com neoplasias malignas, sem que tenham se submetido a qualquer forma de tratamento. Além disso, frequências aumentadas de aberrações cromossômicas estruturais têm sido identificadas em famílias com alta incidência de câncer (VENOLE et al., 1988).

No presente estudo, antes da radioterapia, não foram observadas diferenças significativas nas frequências de células micronucleadas na mucosa bucal e em sangue periférico de indivíduos com tumores malignos de cabeça e pescoço, quando comparados a um grupo controle (sem neoplasia). Alguns autores relataram resultados

semelhantes, não observando nenhum aumento na frequência de cromossomos dicêntricos em sangue periférico de pacientes com linfoma de Hodgkin ou câncer cervical (DIENER et al., 1988; KLEINERMAN et al., 1989).

Por outro lado, VENKATACHALAM et al. (1999) avaliando 25 pacientes com diferentes tipos de neoplasias e que não haviam se submetido a nenhum tipo de terapia, observaram aumento de 13 vezes na frequência de cromossomos dicêntricos e de 5 vezes na de cromossomos acêntricos e micronúcleos, quando comparadas à de um grupo controle. Os autores atribuíram este aumento à instabilidade cromossômica, a agentes virais e/ou a combinação de ambos. ANTONIE et al. (1981) também observaram aumento na frequência de cromossomos dicêntricos em linfócitos de sangue periférico de pacientes com câncer cervical.

Resultado semelhante foi relatado por DUFFAUD et al. (1999) quando compararam a frequência de micronúcleo em linfócitos de pacientes com neoplasia maligna de cabeça e pescoço, e que não fumavam, com a frequência observada em indivíduos saudáveis, também não fumantes. Os autores relacionaram o aumento de micronúcleo nos pacientes às lesões celulares e danos genéticos associados à neoplasia e ao *stress* oxidativo resultante das inflamações crônicas envolvidas no desenvolvimento do câncer. Contudo, os mesmos autores observaram que entre pacientes fumantes e indivíduos saudáveis, também fumantes, não havia diferença na frequência de micronúcleo, e que o número de cigarros fumados por dia não apresentava relação com a frequência de danos nos pacientes com câncer. Esses últimos resultados concordam com os obtidos no presente estudo, no qual 90,6% dos pacientes e 100% do indivíduos controle eram fumantes. Desta forma, as alterações genéticas que poderiam estar mais presentes nos pacientes com neoplasia, diferindo-os dos indivíduos controle, podem ter sido mascaradas pelo efeito mutagênico do cigarro, que também afetou o grupo controle. É bastante conhecida e documentada a ação genotóxica do cigarro em indivíduos saudáveis (AU et al., 1991; TOMANINI et al., 1991; XUE, 1992).

No que diz respeito a relação entre a quantidade de cigarros fumados por dia e a frequência de micronúcleo, antes, durante ou após a radioterapia, também não foi

identificado efeito potencializador dependente do número de cigarros fumados por dia (Tabela XI).

ZWINGMANN et al. (1999), avaliando danos oxidativos no DNA e as frequências de micronúcleo e mutação no gene *hprt*, em 23 pacientes (17 homens e 6 mulheres) com câncer em vários órgãos, antes e uma semana após o tratamento radioterápico, observaram que o hábito de fumar não interferia nos níveis de danos oxidativos antes do tratamento, embora, após a irradiação os níveis de 8-oxo-dG tenham sido significativamente maiores em fumantes que em não fumantes. Por outro lado, o cigarro não teve efeito sobre as frequências de mutações no gene *hprt* e de micronúcleos tanto antes como após a radioterapia. No entanto, os autores discutem que este resultado pode ter sido prejudicado pelo pequeno número de indivíduos avaliados.

A literatura tem mostrado correlação entre tabagismo e a frequência de micronúcleo em células esfoliadas da mucosa bucal. STICH & ROSSIN (1983) observaram aumento de micronúcleos em mucosa apenas de indivíduos nos quais o hábito de fumar estava associado à ingestão de bebidas alcoólicas. Em indivíduos que somente fumavam ou que apenas ingeriam bebidas alcoólicas, a frequência de micronúcleo foi semelhante a de um grupo controle (que não fumava nem bebia).

Quando se considerou apenas o efeito da radioterapia, sem agrupar os pacientes de acordo com alguma variável, observou-se que, independente da dose, ocorria um aumento na frequência de células micronucleadas no sangue e na mucosa bucal durante o tratamento, e que este aumento persistia por 9 semanas após o término da terapia apenas nos linfócitos (Tabela VI e VII).

A diferença de resposta entre os linfócitos e as células da mucosa bucal pode ser atribuída a alguns fatores: 1) como na maioria dos tratamentos o campo de radiação era localizado na região da face, as células da camada basal da mucosa bucal estavam mais diretamente expostas à ação citotóxica do agente e, assim, poderiam morrer antes de atingir a camada superficial e se esfoliarem; 2) o rápido *turn-over* do epitélio da cavidade oral, com novas células sendo continuamente produzidas e migrando para a superfície pode ter diluído a frequência de células micronucleadas após o término da exposição; 3) a meia-vida mais longa dos linfócitos na corrente sanguínea (em média

10 anos) e a possibilidade da radiação ter atingido tecido hematopoiético, poderiam, também, explicar a maior frequência de danos observada nessas células.

O acompanhamento de pacientes com espongilite anquilosante 30 anos após a radiação, levou BUCKTON et al. (1967) a estimar o tempo de vida dos linfócitos em aproximadamente 1600 dias (meia vida de 3 anos). Foi também documentado, que alguns linfócitos que contém alterações genéticas podem manter-se na circulação periférica por aproximadamente 6 anos (AWA, 1990). RAMALHO et al. (1995) em estudo realizado com indivíduos expostos ao ^{137}Cs no acidente de Goiânia, verificaram que para doses de radiação acima de 1Gy a meia vida dos linfócitos contendo aberrações cromossômicas instáveis era de 110 dias.

Os linfócitos T de indivíduos expostos a radiação apresentam mutações permanentes, mas que não prejudicam a viabilidade celular. A existência de alterações cromossômicas associadas à história de exposição a radiações ionizantes, é um fato bem documentado. FENECH et al. (1997) avaliaram amostras de sangue de crianças, 5 a 9 anos após o acidente nuclear de Chernobyl, e observaram aumento de 2 a 4 vezes na frequência de MN em linfócitos quando comparada à de um grupo controle. Aumento na frequência de mutação no gene *hprt*, foi também observada em indivíduos expostos ao ^{137}Cs , 6 a 14 anos após o acidente radioativo de Goiânia (DA CRUZ et al., 1996; SADDAI et al., 1996; DA CRUZ & GLICKMAN, 1997; SKANDALIS et al., 1997).

GIL et al. (2000), avaliando 19 pacientes com câncer de tireóide, submetidos a tratamento com ^{131}I (2590 MBq), observaram aumento de 1,9 vezes na frequência de micronúcleos e de 3 vezes na de cromossomos dicêntricos em linfócitos, logo após a exposição e que persistiu até 6 meses após o término do tratamento. FENECH (1993) avaliando o efeito da radioterapia em pacientes com vários tipos de câncer observou um declínio de 90%, 72% e 57% na frequência de micronúcleos, respectivamente, 3, 6 e 12 meses após o tratamento. Resultados semelhantes foram reportados por RAMIREZ et al. (1997).

Um aspecto importante a ser considerado na avaliação dos efeitos genéticos relacionados à radiação diz respeito à dose. Quando se considerou as doses recebidas durante o tratamento, nossos resultados mostraram que, em linfócitos, houve aumento

na frequência de danos, nas 3 faixas de doses administradas. No entanto, em células da mucosa bucal esse aumento ocorreu somente nas duas faixas mais baixas (<2600 cGy e de 2600 a 3500 cGy) (Figura 5). Resultado semelhante foi observado quando se avaliou a persistência dos danos após a terapia. Neste caso, após a irradiação com doses totais menores ou maiores que 6100 cGy houve aumento na frequência de linfócitos com micronúcleo até 9 semanas após o término da radioterapia. Em mucosa bucal, no entanto, após o tratamento com as doses mais altas (> 6100 cGy) a frequência de células micronucleadas foi semelhante à observada antes do tratamento (Figuras 6). Além disso, não foi detectado, nos dois tipos celulares, tanto durante como após o tratamento, relação dose-resposta na frequência de células micronucleadas (Tabela VIII e IX) e nem aumento na razão micronúcleo por célula (Tabela X).

SARTO et al, (1987), avaliaram a frequência de células micronucleadas em mucosa bucal de dois pacientes com câncer oral submetidos a radioterapia. Os autores verificaram que a radiação gama em doses terapêuticas induziu micronúcleos e que, embora a frequência de células micronucleadas aumentasse linearmente com a dose de radiação acumulada, havia uma diminuição quando a dose excedia 2000 rad. Os autores sugeriram que esse resultado seria devido ao efeito citotóxico da radiação sobre as células da camada basal em divisão, onde teria havido severa redução do número de células lesadas com o aumento da dose. Deve ser ressaltado que o valor máximo de células micronucleadas variou nos dois pacientes, sendo maior naquele que sofria de mucosite, muito embora, após 7 a 12 dias do final da radioterapia, a frequência de células micronucleadas atingisse praticamente o nível inicial em ambos os indivíduos.

No presente trabalho, a ausência de relação dose/resposta tanto para a frequência de células com micronúcleo como de micronúcleos por célula, em linfócitos, talvez pudesse ser explicada com base em um limiar de danos que teria sido atingido pelas doses próximas a 2600 cGy. Estudos têm demonstrado que baixas doses de radiação ionizante, podem levar a uma adaptação das células com aumento da eficácia dos mecanismos de reparo do DNA (WOLFF, 1998).

As respostas adaptativas são observadas quando as células tornam-se resistentes após exposições prévias a baixas doses do mesmo ou de diferentes agentes citotóxicos

(ODEGAARD et al., 1998). Alguns estudos mostram que a resposta adaptativa requer uma dose mínima que estará na dependência da constituição genética do indivíduo. A adaptação induzida por baixas doses de radiação é, portanto, atribuída à indução de um eficiente mecanismo de reparo, o qual, quando ativado por altas doses, poderá reduzir o nível de danos (WOLFF, 1998).

A curva de sobrevivência celular é usada para demonstrar a relação entre dose, tipo de radiação e a fração de células que sobrevivem aos efeitos. Para as radiações de baixo LET, como os raios - X e gama, as respostas não são lineares podendo ser consideradas como um modelo linear quadrático. O gráfico de resposta para esse tipo de radiação apresenta três fases: a inicial reta, seguida de uma curva e novamente outra reta. A implicação da reta inicial seria que as células com acúmulo de danos dirigem-se para um efeito letal (BRENNER et al, 1996).

STIMSON et al. (1989) mostraram que pacientes com câncer de cabeça e pescoço expressam fragilidade cromossômica quando suas células são expostas, *in vitro*, a agentes clastogênicos como a bleomicina. Segundo os autores, 72% dos pacientes expressaram aumentos de quebras cromossômicas, contra apenas 28% dos indivíduos do grupo controle. Este fato, foi explicado como reflexo de deficiência no sistema de reparo do DNA nos indivíduos com câncer.

RAMALHO et al. (1988) irradiaram amostras de sangue de indivíduos saudáveis, com doses de 1 Gy/min, fracionadas em intervalos de 60, 90 e 180 minutos. Os autores verificaram aumento na frequência de micronúcleo com uma tendência de resposta não linear para doses acima de 200 rad. Para doses de 400 rad, a frequência de micronúcleo diminuiu de 38% a 45%. Esta queda foi também observada para as doses de 600 rad e 800 rad. A incidência de cromossomos dicêntricos e micronúcleos não aumentou linearmente ou de forma quadrática após a exposição a 600 rad, mas alcançou um efeito próximo a saturação. De acordo com os autores, esse efeito pode ser devido às células altamente afetadas que não entraram em mitose ou à fusão de mais de um fragmento para formar um único micronúcleo.

Em contra partida, DA CRUZ et al. (1996) ao avaliarem a frequência de mutação no gene *hprt* em 11 indivíduos expostos a doses de ^{137}Cs que variaram de 1 a 7 Gy,

mostraram que 3,3 anos após a exposição mantinha-se, ainda, uma discreta relação dose-resposta. TOIUL et al. (2000) irradiando, *in vitro*, linfócitos de cinco doadores com doses de ^{60}Co que variaram de 0,1 a 2 Gy, também observaram efeito clastogênico claramente dose-dependente.

Por outro lado, em 1994, DA CRUZ et al., avaliando amostras de sangue periférico de indivíduos expostos direta ou indiretamente ao ^{137}Cs no acidente de Goiânia, e comparando as frequências de micronúcleo com as observadas em um grupo controle (que não havia tido contato com a radiação), além de observarem um aumento significativo na frequência de linfócitos micronucleados nos indivíduos diretamente expostos ao ^{137}Cs observaram que as células com um micronúcleo eram as mais frequentes, seguidas daquelas com dois e três micronúcleos. Segundo os autores, a prevalência relativa de células com um único micronúcleo poderia ser resultado da perda de células com mais de um micronúcleo, que teria ocorrido no período entre a exposição e a coleta das amostras de sangue. Em outras palavras, se os indivíduos expostos apresentaram células com um único micronúcleo, seria provável que tivessem, por ocasião do acidente, células com múltiplos micronúcleos. O aumento na proporção de células com mais de um micronúcleo pode ser considerado como um indicador de instabilidade genética (FENECH et al., 1997).

Um parâmetro auxiliar importante avaliado no presente estudo foi o índice mitótico em linfócitos. Embora não tenha sido detectada diferença estatisticamente significativa entre as três faixas de dose de radiação durante o tratamento, não pode ser desconsiderado o decréscimo observado principalmente na faixa intermediária. Este resultado poderia ser indicativo de efeito citotóxico que teria levado a morte celular ou se manifestado por atraso no ciclo e, assim, mascarado uma possível relação dose-resposta na incidência de células micronucleadas. Esse efeito, contudo, ficou mais claro após o término do tratamento quando, então, houve redução significativa no índice mitótico 9 semanas após a irradiação com doses mais altas que 6100 cGy (Tabelas VII e VIII). Além disso, a ausência de relação dose-resposta para a frequência de linfócitos com 2, 3 ou 4 micronúcleos também sugere que um limiar de danos teria sido atingido já na dose mais baixa.

De acordo com FENECH (1998), a idade e o sexo são as variáveis mais importantes que influenciam na frequência de micronúcleo. Nas mulheres, a frequência é 1,2 a 1,6 vezes maior, dependendo da idade (valores máximos e mínimos na frequência de micronúcleo em relação a idade podem diferir entre 4,7 a 12,5 vezes com as maiores diferenças ocorrendo na faixa etária de 40 a 59 anos). O aumento relacionado à idade é atribuído à perda da integridade do material genético com o passar dos anos, a defeito no fuso mitótico e “encaixe” fuso-centrômero, e a um aumento na razão de quebras cromossômicas espontâneas durante a divisão celular (FENECH & MORLEY, 1986).

RAMIREZ et al. (1997) mostraram que mulheres idosas com câncer de tireóide eram 2,3 vezes mais sensíveis à indução de quebras cromossômicas pelo ^{131}I . Resultados semelhantes foram reportados por GIL et al. (2000).

Ao contrário da literatura, os aumentos na frequência de linfócitos com micronúcleo, durante e após a radioterapia, observados no presente estudo, foram independentes do sexo e da faixa etária (maior ou menor 60 anos) dos pacientes. No entanto, com relação ao sexo, talvez o pequeno número de mulheres avaliadas tivesse interferido nos resultados, levando a aparente ausência de diferença na frequência de células micronucleadas. No que diz respeito a faixa etária, talvez o fato da quase totalidade dos pacientes serem fumantes, também tivesse mascarado o efeito idade.

Outra variável considerada para a avaliação dos efeitos genéticos da radioterapia foi o estadiamento do tumor, por ser um dos fatores que determina o tipo e as doses dos agentes antineoplásicos a serem utilizados nos tratamentos. Assim sendo, os pacientes foram divididos de acordo com o estágio clínico do tumor no momento do diagnóstico.

Conforme observado na Tabela IV, o estágio do tumor não foi um fator que afetou a frequência de células micronucleadas no sangue e mucosa bucal de pacientes com neoplasia de cabeça e pescoço antes do tratamento. Mesmo resultado foi observado por DUFFAUD et al. (1999) em amostras de sangue de pacientes também com tumor de cabeça e pescoço, antes do tratamento. Os autores relataram que estágios avançados do tumor, assim como a idade, sexo, tabagismo, etilismo, história familiar de câncer e a presença de metástase não eram fatores determinantes na frequência de micronúcleos.

NOWELL, em 1986, tinha verificado aumento significativo na frequência de quebras cromossômicas em estádios avançados da doença, mas no tecido tumoral, sugerindo que a instabilidade genética no tumor seria determinante para sua progressão. Assim, os pacientes com maior incidência de lesões genéticas podem ter uma progressão mais rápida da doença.

Quando foi considerada a possibilidade de pacientes com tumores em diferentes estádios apresentarem, durante e após a radioterapia, frequências diferentes de danos, os resultados mostraram que, embora a quantidade de células micronucleadas estivesse aumentada em todos os pacientes como consequência do tratamento, aqueles com tumor estágio III apresentaram maior frequência de linfócitos com micronúcleo, durante o tratamento (Tabela XIV; Figura 7).

No entanto, é difícil, com base nos parâmetros analisados neste estudo, uma explicação para esse achado, uma vez que não foram observadas interferências isoladas, de cada uma das variáveis que determinam o estadiamento do tumor, sobre a frequência de células micronucleadas, ou seja, tanto o tamanho do tumor como a presença ou não de metástase em linfonodos regionais não mostraram efeito sobre a indução de danos no DNA causados pela radiação. (Tabelas XIII e XV). Além disso, as doses de radiação administradas aos pacientes com tumores em cada um dos estádios também não foram diferentes (Tabela XIX – APÊNDICE). Desta forma, pode-se apenas sugerir que o conjunto de fatores que determinam o estadiamento do tumor teria contribuído para o aumento na frequência de linfócitos micronucleados nos pacientes com tumor estágio III, durante o tratamento.

Finalizando, embora as dificuldades encontradas para a realização deste estudo tivessem impedido a coleta de alguns dados, de maneira geral os resultados alcançados poderão contribuir para o entendimento dos efeitos da radioterapia em pacientes com neoplasia de cabeça e pescoço e, com isso, auxiliar na busca de terapias com menores riscos para os pacientes.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados da avaliação dos efeitos da radioterapia em pacientes com tumores malignos de cabeça e pescoço pode-se concluir que:

1. não há diferença significativa na frequência de células micronucleadas em sangue e mucosa bucal, entre indivíduos saudáveis e aqueles com neoplasia;
2. a radioterapia, com doses que variaram de 1140 a 7040 cGy, induz aumento na frequência de células micronucleadas tanto em sangue como em mucosa bucal;
3. os danos induzidos pela radioterapia são detectados em linfócitos, mas não nas células da mucosa bucal, pelo menos até 9 semanas após o término da exposição;
4. não há diferença de efeito da radioterapia entre pacientes masculinos e femininos;
5. não há efeito do cigarro sobre a frequência de células micronucleadas em pacientes com neoplasia, antes de qualquer tratamento;
6. pacientes com tumores estágio III apresentam maior frequência de linfócitos micronucleados;
7. o tamanho do tumor e a presença ou não de metástases não têm efeito sobre a frequência de células micronucleadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIORÁFICAS

- ALMASSY, Z., KREPINSKY, A.B., BIANCO, A. et al. The present status and perspectives of micronucleus assay in radiation protection. A review. **Appl. Radiat. Istop.**, v.38, p. 241-249, 1987.
- ALVARES, L.C., FREITAS, J.A.S., TAVANO, O. Considerações gerais: fundamentos da radiologia. In: Alvares, L.C., Tavano, O. **Curso de Radiologia em Odontologia**. São Paulo: Santos, 1987. p.1-16.
- ANTONIE, J.L., GERBER, G.B., LEONARD, A. et al. Chromosome aberration in patient treated with telecobalt therapy for mammary carcinoma. **Radiat. Res.**, v.86, p.171-7, 1981.
- ARLETT, C., ASHBY, J., FIELDER, R.S. et al. Micronuclei: origins, applications and methodologies – a workshop respnsored by the health and safety executive held in Manchester, 23-25 May, 1989. **Mutagenesis**, v.4, p.182-5, 1989.
- ARONSON, M.M., MILLER, R.C., HILL, B.B. et al. Acute and long term cytogenetic effects of treatment in childhood cancer. Sister chromatid exchanges and chromosome aberrations. **Mutat. Res.**, v.92, p. 291-307, 1982.
- AU, W.W., WALKER, D.M., WARD, E. et al. Factors contributing to chromosome damage in lymphocytes of cigarette smokers. **Mutat. Res.**, v.260, p.123-6, 1991.
- AWA, A.A. Chromosome aberrations in A-bomb survivors, Hiroshima and Nagasaki. In. Obe, G., Natarajan, A.T. **Basic and Applied Aspects**. Springer-Verlag. Heildelberg, 1990. p.180-190.
- BARALE, R., MARRAZZINI, A., BACCI, E. et al. Sister chromatid exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1,650 subjects in an Italian population: I. Contribution of methodological factors. **Environ. Mol. Mutagen.**, v.31, p.218-27, 1998
- BARRET, J.C. Mechanisms of multistep carcinogenesis and risk assessment. **Environ. Health Perspect.**, v.100, p. 9-20, 1993.

* UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. **Normas para publicações da UNESP**. São Paulo: Editora UNESP, 1994. v.2: Referências Bibliográficas.

* NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **List of journals indexed in Index Medicus**. Washington, 1997. 240p.

- BERLIËN, J.A.M., COPPER, M.P., BRAAKHUIS, B.J.M. et al. Standardization of counting micronuclei: definition of a protocol to measure genotoxic damage in human exfoliated cells. **Carcinogenesis**, v.16, p.2395-2400, 1995.
- BIAGLOW, J.E. The effects of ionizing radiation on mammalian cells. In: FARHATAZIZ, ROGERS, M.A.J., (Eds.) **Radiation Chemistry: principles and applications**. Weinheim: VHC, 1987. p.527-63.
- BISHOP, J. The molecular genetics of cancer. **Science**, v.235, p.305-11, 1987.
- BOOTHMAN, D.A., MEYERS, M., ODEGAARD, E. et al. Altered G₁ checkpoint control determines adaptive survival responses to ionizing radiation. **Mutat. Res.**, v.358, p.143-153, 1996.
- BRADLAW, J.A., CHRISTIAN, R.T. Methods for measurement of the cytotoxic response. A short review. **J. Tissue Cult. Methods**, v. 9, p.1, 1985.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2000.
- BRENNER, D.J., HALL, E.J., PERHRSON, G.R. et al. Quantitative comparisons of continuous and pulsed low dose rate regimens in a model late-effect system **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v. 34, p.905-10, 1996.
- BUCKTON, K.E.; BROWN, W.M.C.; SMITH, P.G. Lymphocyte survival in men treated with X-rays for ankylosing spondylitis. **Nature**, v.214, p. 470-3, 1967.
- BYRNE, J. Long-term genetic and reproductive effects of ionizing radiation and chemotherapeutic agents on cancer patients and their offspring. **Teratology**, v.59, p. 210-15, 1999.
- CAIRNS, J. Mutational selection and the natural history of cancer. **Nature**, v.225, p.197-200, 1975.
- CAIRNS, J. The origin of human cancers. **Nature**, v.289, p.353-57, 1981.
- CARRANO, A.V., HEDDLE, J.A. The fate of chromosome aberrations. **J. Theor. Biol.**, v. 38, p.289-304, 1973.
- CARRANO, A.V., NATARAJAN, A. T. Consideration for population monitoring using cytogenetic techniques. **Mutat. Res.**, v.204, p.379-406, 1988.

-
- CASARTELLI, G., MONTEGHIRFO, S., DE FERRARI, M. et al. Staining of micronuclei in squamous epithelial cells of human oral mucosa. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, v.19, p.475-81, 1997.
- CATENA, C., CONTI, D., PARASACCHI, P., et al. Micronuclei in cytokinesis blocked lymphocytes may predict patient response to radiotherapy. **Int. J. Radiat. Biol.**, v.70, p.301-8, 1996.
- CHANNARAYAPPA., ONG, T., NATH, J. Cytogenetic effects of vincristine sulfate and ethylene dibromide in human peripheral lymphocytes: micronucleus analysis. **Environ. Mol. Mutagen.**, v.20, p.117-26, 1992.
- COUNTRYMAN, P.I., HEDDLE, J.A. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. **Mutat. Res.**, v.41, p. 321-32, 1976.
- CROMPTON, N.E.A. Programmed cellular response to ionizing radiation damage. **Acta Oncol.**, v.37, p.129-42, 1998.
- CURI, P.R. **Metodologia e análise da pesquisa em ciências biológicas**. Botucatu: Tipomic, 1997. 263p.
- CURRAN, W.J. Radiation-induced toxicities: the role of radioprotectants. **Semin. Radiat. Oncol.**, v.8, suppl.4, p.2-4, 1998.
- DA CRUZ, A.D., CURRY, J., CURADO, M.P. et al. Monitoring *hprt* mutant frequency over time in T-lymphocytes of people accidentally exposed to high doses of ionizing radiation. **Environ. Mol. Mutagen.**, v.27, p.165-75, 1996.
- DA CRUZ, A.D., GLICKMAN, B.W. Nature of mutation in the Human *hprt* gene following in vivo exposure to ionizing radiation of Cesium-137. **Environ. Mol. Mutagen.**, v.30, p.385-95, 1997.
- DA CRUZ, A.D., McARTHUR, A.G., SILVA, C.C. et al. Human micronucleus counts are correlated with age, smoking, and cesium-137 dose in Goiania (Brazil) radiological accident. **Mutat. Res.**, v.313, p. 57-68, 1994.
- DAHL, W.N., OFTEBRO, R., BRUSTAD, T. Inhibitory and cytotoxic effects of oncovin (vincristine sulfate) on cells of human line NHIK 3025. **Cancer Res.**, v.36, p.3101-5, 1976.
- DE CAMARGO, J.L.V., DE OLIVEIRA, M.L.C., ROCHA, N.S., ITO, N. A

- detecção de substâncias cancerígenas em estudos experimentais. **Ver. Bras. Cancerol.**, v.44, p.21-30, 1994.
- DIENER, A., STEPHEN, G., VOGL, Th., et al. The induction of chromosome aberrations during the course of radiation therapy for Morbus Hodgkin. **Radiat. Res.**, v.114, p.528-36, 1988.
- DOLPHIN, G.W., LLOYD, D.C. The significance of radiation induced chromosome abnormalities in radiological protection. **J. Med. Genet.**, v.11, p.181-9, 1974.
- DUFFAUD, F., ORSIÈRE, T., DIGUE, L. et al. Micronucleated lymphocyte rates from head-and-neck cancer patients. **Mutat. Res.**, v.439, p.259-66, 1999.
- DULOUT, F.N., OLIVERO, O.A. Anaphase-telophase analysis of chromosomal damage induced by chemicals. **Environ. Mutagen.**, v.6, p.3299-310, 1984.
- EASTMOND, D, TUCKER, J.D. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis blocked human lymphocytes and na antikinetochore antibody. **Environ. Mol. Mutagen.**, v.13, p.34-43, 1989.
- ELKING, M.M. Repair processes in radiation biology. **Radiat. Res.**, v.100, p.425-49, 1984.
- ENGELMEIER, R.L., KING, G.E. Complications of head and neck radiation therapy and their management. **Maxillofacial Prosthetics**, v. 49, p.514-22, 1983.
- ENGELS, H, WAMBERSIE, A. Relative biological effectiveness of neutrons for cancer induction and other late effects: a review of biological data recent. Recent Results. **Cancer Res.**, v.150, p. 54-87,1998.
- FENECH, M. Optimisation of micronucleus assays for biological dosimetry. **Prog. Clin. Biol. Res.**, v.372, p.373-86, 1991.
- FENECH, M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. **Mutat. Res.**, v.285, p.35-44, 1993.
- FENECH, M. Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes-a biomarker for DNA damage in human populations. **Mutat. Res.**, v.404, p.155-165, 1998.
- FENECH, M., DENHAM, J., FRANCIS, W., et al. Micronuclei in cytokinesis-blocked

- lymphocytes of cancer patients following fractionated partial-body radiotherapy. **Int. J. Radiat Biol.**, v.57, p.373-83, 1990.
- FENECH, M., MORLEY, A.A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutat. Res.**, v.147, p.29-36, 1985a.
- FENECH, M., MORLEY, A.A. The effect of donor age on spontaneous and induced micronuclei. **Mutat. Res.**, v.148, p.99-105, 1985b.
- FENECH, M., MORLEY, A. A. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. **Mutat. Res.**, v.161, p.193-8, 1986.
- FENECH, M., PEREPETSKAYA, G., MIKHALEVICH, L.A. More comprehensive application of the micronucleus technique for biomonitoring of genetic damage rates in human populations-experiences from the Chernobyl Catastrophe. **Environ. Mol. Mutagen.**, v.30, p.112-118, 1997.
- FRANKLIN, C.I., PARKER, C.A., MORTON, K.M. Late effects of radiation therapy for prostate carcinoma: the patient's perspective of bladder, bowel and sexual morbidity. **Australas Radiol.**, v.42, p.58-65, 1998.
- FRANSSON, P, WIDMARK, A. Late side effects unchanged 4-8 years after radiotherapy for prostate carcinoma. A comparison with age-matched controls. **Cancer**, v.85, p.678-88, 1999.
- GEARD, C.R., CHEN, C.Y. Micronuclei and clonogenicity following low and high dose rate γ irradiation of normal human fibroblasts. **Radiat. Res.**, v.124, p. S56-S61, 1990.
- GILL, O.M.; OLIVEIRA, N.G.; RODRIGUES, A.S. et al. Cytogenetic alterations and oxidative stress in thyroid cancer patients after iodine-131 therapy. **Mutagenesis**, v.15, p.60-75, 2000.
- GOODHEAD, S.T., THACKER, J., COX, R. Effects of radiations of different qualities on cells: molecular mechanisms of damage and repair. **Int. J. Radiat. Biol.**, v.63, p.543-56, 1993.
- GYNES, G., FORNANDER, T., CARLENS, P. et al. Myocardial damage in breast cancer patients treated with adjuvant radiotherapy: a prospective study. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v.36, p.899-905, 1996.
- HEDDLE, J.A., HITE, M., KIRKHART, B. et al. The induction of micronuclei as a

- measure of genotoxicity. A report of U.S. Environmental Protection Agency Gene-Rox Program. **Mutat Res.**, v.123, p. 61-118, 1983.
- HENDEE, W.R. History, currents status, and trends of radiation protection standarts. **Med. Phys.**, v.20, p.1303-4, 1993.
- HOSPITAL DO CÂNCER. Centro de Tratamento e Pesquisa. Tumores da cabeça e pescoço. In:____. **Rotinas e Condutas em Radioterapia**. São Paulo, 1999. Cap.2, p.21-54.
- KAISER, H.E., NASIR, A., GROGER, A.M. et al. The etiology of second primary tumor. **In Vivo**,v.12, p.89-93, 1998.
- KLEINERMAN, R.A., LITTELFIELD, L.G., TARONE, R.E. et al. Chromosome aberrations in peripheral lymphocytes and radiation dose to active bone marrow in patients treated for cancer of cervix. **Radiat. Res.**, v.119, p.176-90, 1989.
- KOISHI, S., KUBOTA, M., SAWADA, M. et al. Biomarkers in long survivors of pediatric acute lymphoblastic leukemia patients: late effects of cancer therapy. **Mutat. Res.**, v.422, p.213-22, 1998.
- LAND, H., PARADA, L., WEINBERG, R. Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. **Science**, v.222, p.771-8, 1983.
- LANE, D. p53, guardian of the genoma. **Nature**, v.358, p. 15-6, 1992.
- LIEVENS, Y., VANUYTSEL, L., RIJNDERS, A. et al. The time course of development of late side effects after irradiation of the prostate with multiple fractions per day. **Radiother. Oncol.**, v.40, p.147-52, 1996.
- LITTLE, J.B. Radiation induced genomic instability. **Int. J. Radiat. Biol.**, v.76, p.633-71, 1998.
- LIVINGSTON, G., REED, R., OLSON, B. et al. Induction of nuclear aberrations by smokeless tobacco in epithelial cells of human oral mucosa. **Environ. Mol. Mutagen.**, v.15, p.136-44, 1990.
- LUI, L., GLICKSMAN, A.S., COACHMAN, N. et al. Low acute gastrointestinal and genitourinary toxicities in whole pelvic irradiation of prostate cancer. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v.38, p.65-71, 1997.
- MAHESH, K. Introductory aspects of radiation. In: MAHESH, K., VIG, D.R. **Techniques of radiation dosimetry**. New Delhi Wiley Eastern., 1985, v.1, p.1-28.

- MAXYMIW, W.G., WOOD, R.E. The role of dentistry in head and neck radiation therapy. **Science**, v.55, p. 193-8, 1989.
- MIDENA, E., SEGATO, T., VALENTI, M. et al. The effect of external eye irradiation on choroidal circulation. **Ophthalmology**, v.103, p.1651-60, 1996.
- MITCHELL, M.J. , LOGAN, P.M. Radiation-induced changes in bone. **Radiographics**, v.18, p.1125-36, 1998.
- MOHNIKE, K., DORFELL, W., TIMME, J., et al. Final height and puberty in 40 patients after antileukaemic treatment during childhood. **Eur. J. Pediatr.**, v.156, p.272-6, 1997.
- MOSHER, R.B., MCCARTHY, B.J. Late effects in survivors of bone tumors. **J. Pediatr. Oncol.**, v.15, p.72-84, 1998.
- NIETHAMMER, D., MAYER, E. Long term survivors: an overview on late effects, sequelae and second neoplasias. **Bone Marrow Transplant.**, v.21, p.561-3, 1998.
- NOWELL, P.C. Mechanisms of tumor progression. **Cancer Res.**, v.46, p. 2203-7, 1986.
- ODEGAARD, E., YANG, C.R., BOOTHMAN, D.A. DNA dependent protein kinase does not play a role adaptive survival responses to ionizing radiation. **Environ. Health Perspec.**, v.106, suppl. 1, p. 301-5, 1998.
- PEREL, Y., LEVERGER, G., CARRERE, A. et al. Second thyroid neoplasms after prophylactic cranial irradiation for acute lymphoblastic leukemia. **Am. J. Hematol.**, v.59, p. 91-4, 1998.
- PERERA, F., BOFFETA, P. Perspectives on comparing risk of environmental carcinogens. **J.Natl. Cancer Inst.**, v.80, p. 1282-93, 1988.
- PHIL, A., ELDJARAN, L. Pharmacological aspects of ionizing radiation and chemical protection in mammals. **Pharmacol. Rev.**, v.10, p.437-4, 1958.
- PITOT, H.C. The terminal stage in carcinogenesis. **Cancer Res.**, v.80, p. 599-607, 1989.
- PITOT, H.C. – The molecular biology of carcinogenesis. **Câncer**, v.72, p. 962-70, 1993.

- PITOT, H.C., DRAGAN, Y. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. **FASEB J.**, v.5, p. 2280-86, 1991.
- PLAPPERT, U., RADDATZ, K., ROTH, S. et al. DNA-damage detection in man after radiation exposure-the Comet Assay - its possible application for human biomonitoring. **Stem Cells**, v. 13, p.215-22, 1995.
- POLLYCOVE, M. Nonlinearity of radiation health effects. **Environ. Health Perspect.**, v.106, p. 363-8, 1998.
- PUERTO, S., RAMIREZ, M.J., CREUS, A. et al. Induction, processing persistence of radiation-induced chromosomal aberrations involving hamster euchromatin and heterochromatin. **Mutat. Res.**, v.469, p.169-79, 2000.
- RAMALHO, A., COSTA, M.L., OLIVEIRA, M.S. Conventional radiation-biological dosimetry using frequencies of unstable chromosome aberrations. **Mutat. Res.**, v.404, p.97-100, 1998.
- RAMALHO, A., CURADO, M.P, NATARAJAN, A.T. Lifespan of human lymphocytes estimated during a six year cytogenetic follow-up of individuals accidentally exposed in the 1987 radiological accident in Brazil. **Mutat. Res.**, v.331, p.47-54, 1995.
- RAMALHO, A., SUNJEVARIC, I., NATAJARAN, A.T. Use of the frequencies of micronuclei as quantitative indicators of X-ray-induced chromosomal aberrations in human peripheral blood lymphocytes: Comparison of two methods. **Mutat. Res.**, v. 207, p.141-6, 1988.
- RAMIRÉZ, M.J., SURRÁLES, J., GALOFU, P. et al. Radioactive iodine induces clastogenic and age-dependent aneugenic effects in lymphocytes of thyroid cancer patient as revealed by interphase FISH. **Mutagenesis**, v.12, p.449-55, 1997.
- RIBEIRO, L.R. Teste do micronúcleo em células esfoliadas. In: RABELLO-GAY, M.N., RODRIGUES, M.A., RIBEIRO, L.R., et al. **Mutagêneses, Teratogêneses e Carcinogêneses - Métodos e critérios de avaliação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1991, p.91-96.
- RICH, D.C., CORPIO, C.A., SMITH, M.B. et al. Second malignant neoplasms in children after treatment of soft tissue sarcoma. **J. Pediatr. Surg.**, v.32, p.369-72, 1997.
- RON, E. Ionizing radiation and cancer risk: evidence from epidemiology. **Radiat.**

- Res.**, v.150, suppl., p.S30-S41, 1998.
- RON, E., LUBIN, J.H., SHORE, R.E. et al. Thyroid cancer after exposure to external radiation: A pooled analysis of seven studies. **Radiat. Res.**, v. 141, p.259-77, 1995
- ROSIN, M.P. The use of the micronucleus test on exfoliated cells to identify anti-clastogenic action in humans: a biological marker for the efficacy of chemopreventive agents. **Mutat. Res.**, v.267, p.265-276, 1992.
- SADDI, V., CURRY, J., NOHTURFFT, A. et al. Increased *hprt* mutant frequencies in brasilian children accidentally exposed to ionizing radiation. **Environ. Mol. Mutagen.**, v.28, p.267-75, 1996.
- SARTO, F., FINOTTO, S., GIACOMELLI, L. et al. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal. **Mutagenesis**, v.2, p.11-7, 1987.
- SARTO, F., TOMANIN, R., GIACOMELLI, L. et al. Evaluation of chromosomal aberrations in lymphocytes and micronuclei, oral mucosa and hair root cells of patients under antitlastic therapy. **Mutat. Res.**, v.228, p.157-69, 1990.
- SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutat. Res.**, v.31, p.9-15, 1975.
- SKANDALIS, A., CRUZ, A.D., CURRY, J. et al. Molecular analysis of T-lymphocyte HPRT mutations in individuals exposed ionizing radiation in Goiânia, Brazil. **Environ. Mol. Mutagen.**, v.29, p.107-16, 1997.
- SOLOMON, E., BORROW, J., GODDARD, A.D. Chromosome aberration and cancer. **Science**, v.214, p.1153-9, 1991.
- SONIS, S.T. Oral complications of cancer therapy. In: DE VITTA JR, V.T., HELLMAN, S., ROSENBERG, S.A. **Cancer principles & practice of oncology**. 3 ed. Philadelphia: Lippincott, 1989. v.2, p. 2144-52.
- SORBIN, L.H. (Ed.) **TNM Classificação dos Tumores Malignos**. 5 ed. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Cancer, 1998. 235 p.
- STEWART, J.R., FAJARDO, L.F., GILLETTE, S.M. et al. Radiation injury to the heart. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v.31, p.1205-11, 1995.
- STICH, H.F, ROSIN, M.P. Quantification the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. **Int. J. Cancer**, v. 31, p.304-8, 1983.
- STICH, H.F., CURTIS, J.R., PARIDA, B.B. Application of the micronucleus test to

- exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers. **Int. J. Cancer**, v. 30, p.553-9, 1982a.
- STICH, H.F., STICH, W., PARIDA, B.B. Elevated frequency of micronucleated cells in the buccal mucosa of individuals at high risk for oral cancer: betel quid chewers. **Cancer Lett**, v.17, p.125-134, 1982b.
- STICH, H.F., HORNBY, A.P., DUNN, B.P. A pilot beta-carotene intervention trial with inuits using smokeless tobacco. **Int. J. Cancer**, v. 36, p.321-7, 1985.
- STICH, HF., STICH, W., ROSSIN, MP., et al. Use of the micronucleus test to monitor the effect of vitamin A, beta-carotene and canthaxanthin on the buccal mucosa of betel nut/tobacco chewers. **Int. J. Cancer**, v. 34, p.745-50, 1984.
- STIMSON, N., SCHANTZ, MD., HSU, TC. Mutagen-induced chromosome fragility within peripheral blood lymphocytes of head and neck cancer patients. **Head and Neck**, v.11, p.337-42, 1989.
- SYNDIKUS, I., TAIT, D., ASHLEY, S., et al. Long-term follow up young children with tumors after radiation. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v.30, p.781-7, 1994.
- TAKEDA, A., SHIGEMATSU, N., SUZUKI, S. et al. Late retinal complications of radiation therapy for nasal and paranasal malignancies: relationship between irradiated-dose area and severity. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v.44, p.599-605, 1999.
- TATES, A .D., VAM DAM, F.J., NATAJARAN, A .T. Frequencies of HPRT mutants and micronuclei in lymphocytes of cancer patients under chemotherapy a prospective study. **Mutat. Res.**, v.307, p.293-306, 1994.
- THIERENS., H., VRAL, A., De RIDDER, L. A cytogenetic study of radiological workers: effect of age, smoking and radiation burden on the micronucleus frequency. **Mutat. Res.**, v.360, p.75-82, 1996.
- TOLBERT, P.E., SHY, C.M., ALLEN, J.W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. **Am. J. Epidemiol.**, v. 134, p.840-50, 1991.
- TOLBERT, P.E., SHY, C.M., ALLEN, J.W. Micronuclei and other anomalies in buccal smears methods development. **Mutat. Res.**, v.271, p.69-77, 1992.
- TOMANIN, R., BALLARIN, C., NARDINI, G. et al. Influence of smoking habit on

- frequency of micronuclei in human lymphocytes by cytokinesis-block method. **Mutagenesis**, v.6, p.123-6, 1991.
- TOUIL, N., ELHAJOUJI, A., THIERENS, H. et al. Analysis of chromosome loss and chromosome segregation in cytokinesis-blocked human lymphocytes: non-disjunction is the prevalent mistake in chromosome segregation produced by low dose exposure to ionizing radiation. **Mutagenesis**, v.15, p.1-7, 2000
- TRAVIS, L.B., CURTIS, R.E., GLIMELIUS, B. et al. Bladder and kidney cancer following cyclophosphamide therapy for non-Hodgkin's lymphoma. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.87, p. 524-30, 1995.
- ÜNDEGER, Ü., ZORLU, A.F., BASARAN, N. Use of the alkaline comet assay to monitor DNA damage in technicians exposed to low dose radiation. **J. Occup. Environ. Med.**, v.41, p.693-8, 1999.
- VENKATACHALAM, P., PAUL, S.F.D., MOHANKUMAR, M.N. et al. Higher frequency of dicentrics and micronuclei in peripheral blood lymphocytes of cancer patients. **Mutat. Res.**, v.425, p.1-8, 1999.
- VENOLE, P., TEDESCHI, B., CAPOROSSI, D. et al. A study on lymphocytes of neuroblastoma patients. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.36, p.13-23, 1988.
- WABER, D.P., TARBELL, N.J. Toxicity of CNS prophylaxis for childhood leukemia. **Oncology (Huntingt)**, v.11, p.259-64, 1997.
- WHITMYER, C.C., ESPOSITO, S.J., TEREZHALMY, G.T. Radiotherapy for head and neck neoplasms. **Gen. Dent.**, v.45, p.363-70, 1997.
- WOLFF, S. The adaptive response in radiobiology: evolving insights and implications. **Environ. Health Perspect.**, v.106, p. 277-83, 1998.
- WOLFF, S., JOSTES, R., CROSS, F.T. et al. Adaptive response of human lymphocytes for the repair of random-induced chromosomal damage. **Mutat. Res.**, v.250, p.299-306, 1991.
- XUE, K. Micronucleus formation in peripheral-blood lymphocytes from smokers and the influence of alcohol and tea-drinking habits. **Int. J. Cancer.**, v.50, p.702-5, 1992.
- ZAKRZEWSKI, S.F. Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis. In ____. **Principles of Environmental Toxicology**. Washington: American Chemical Society, 1991. p.66-101.

- ZINZANI, P.L., GHERLINZONI, F., PIOVACCARI, G. et al. Cardiac injury as late toxicity of mediastinal radiation therapy for Hodgkin's disease patients. **Haematologica**, v.81, p.132-7, 1996.
- ZWINGMANN, I.H., WELLE, I.J., ENGELN, J.J.M. et al. Analysis of oxidative DNA damage and HPRT mutant frequencies in cancer patients before and after radiotherapy. **Mutat. Res.**, v.431, p.361-9, 1999.

Tabela XVIII – Resultados individuais referentes a citopatologia da mucosa bucal, índice mitótico de linfócitos e frequência de células micronucleadas em pacientes com tumor maligno de cabeça e pescoço.

Código paciente	SANGUE						MUCOSA BUCAL			Citopatologia ^a Presença de neutrófilos	
	% micronúcleos			Índice Mitótico			% micronúcleos			2° coleta	3° coleta
	1° coleta	2° coleta	3° coleta	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	1° coleta	2° coleta	3° coleta		
201	0,1	4,8	10,1	1,58	1,62	1,57	0,05	0,36	0,1	+	0
203	0,1	1,8	4,8	2,04	1,55	1,63	0	0,36	0,05	0	+
210	0	4,5	6,4	1,52	1,36	1,2	0,25	0,45	0	++	0
214	0,5	4,5	2	2,09	1,48	1,61	0,05	0,13	0,55	+	+
216	0,4	5,5	Não retornou	- b	1,33	Não retornou	0,1	0,11	Não retornou	0	Não retornou
221	0,4	5,4	- c	1,39	1,36	Não retornou	0	9	Não retornou	++	Não retornou
222	- c	4,2	Não retornou	- c	- b	Não retornou	0,05	0	Não retornou	0	Não retornou
225	0,2	2,1	0,3	1,84	1,61	1,25	0,2	0,18	0,1	0	0
227	0,1	5,1	8,3	1,23	1,52	1,44	0	0,3	0,65	0	0
229	0,2	1,3	3	1,68	1,47	1,41	0,2	0,13	0,1	0	0
230	0	3,3	4,4	1,44	1,04	1,41	0,45	0,2	0	+	0
233	0,1	2,5	2,1	- b	1,34	- b	0,05	0,07	0,05	0	0
238	0,4	1,2	2,9	1,29	1,46	1,37	0	0,3	0,15	+	0
242	0,2	1,4	Não retornou	1,81	1,84	Não retornou	0	0,23	Não retornou	++	Não retornou
244	0,5	4,1	4	1,3	1,40	1,66	0	0,05	0	++	+
245	0,2	1,4	5,6	1,07	1,46	1,37	0,3	0,25	0,15	+	+
251	0,4	3,4	- c	- b	- c	1,33	0,05	0,05	0	+	0
250	0	1,1	3,2	1,15	1,34	1,33	0	0,27	Não retornou	+	Não retornou
252	0	2,2	0,9	1,76	1,27	1,17	0	0	0	0	0
257	0,1	3,2	1,2	1,50	1,23	1,15	0,1	0,07	0	0	0
264	0,2	1	1,8	1,21	1,62	- b	0	0	0,1	+	0
268	0,5	6,5	5,8	1,45	1,54	1,31	0	0,33	0,2	0	0
273	0,1	2,8	3,9	1,36	1,25	1,22	0	0,45	0,8	0	0
276	0,3	- c	2,7	1,14	- b	1,12	0,1	0,1	0,2	0	0
281	0,2	4,3	2,9	1,56	1,32	1,00	0,1	0,3	0,1	+	+
284	0,4	5,4	1,51	1,20	1,59	1,20	0,15	0,56	0,1	+	0
287	0	2,3	2,4	1,74	1,23	1,62	0,05	0,18	0	0	0
288	0,3	0,9	1	- b	1,43	- b	0,05	0,45	0,1	0	0
290	0,1	2,5	0,5	1,11	1,27	1,36	0,05	0,25	0,05	+	0
292	0,2	2,4	1,8	1,61	1,53	1,55	0,1	0,18	0,3	+	0
298	0,3	- c	3,6	2,01	- b	1,16	0	0,23	0,45	0	0
299	0,2	1	0,9	1,54	- b	1,6	0,05	0,25	0	++	0

^a – em nenhum paciente houve presença de neutrófilos na primeira coleta (antes do tratamento);

^b - não foi realizado índice mitótico; ^c – a cultura não cresceu.

0, +, ++ - ausência, poucos e muitos neutrófilos, respectivamente.

Tabela XIX – Doses de radiação recebidas por pacientes com neoplasia maligna de cabeça e pescoço, de acordo com o estágio clínico do tumor.

Código do paciente	Estádio do tumor	Dose (cGy) durante o tratamento	Média ± SD	Dose total (cGy)	Média ± SD
221	I	3240	3927 ± 929	Não retornou	6344 ± 462
244	I	4140		6000	
252	I	5200		6600	
229	II	3600		6040	
273	II	2700		7040	
287	II	4680		6040	
201	III	5000	3533 ± 1319	5500	6195 ± 501
203	III	4860		6040	
210	III	2160		6840	
214	III	5240		7040	
216	III	3420		Não retornou	
222	III	3780		Não retornou	
227	III	2700		5940	
250	III	1620		Não retornou	
281	III	3240		6120	
284	III	4860		6040	
292	III	1980		6040	
225	IV	2340		2873 ± 932	
230	IV	4000	7800		
233	IV	2520	6040		
238	IV	2700	6480		
242	IV	3400	Não retornou		
245	IV	1140	6040		
257	IV	3600	6700		
264	IV	2340	6640		
268	IV	1980	5400		
276	IV	4500	6440		
288	IV	3060	5980		
290	IV	2700	6040		
298	IV	3960	6480		
299	IV	1980	6040		

41 - Tipo de tumor (AP) _____
 42 - Localização (CID) _____
 43 - Estadiamento _____
 43 - Sequência de Tratamento Cirurgia [1] Qt [2] Rxt [3]|_____|
 45 - Drogas _____

46 - Data QT.....|_____|/_____|/_____|

V - Avaliação Odontológica

48 - Condição dentária [1] dentado [2] desdentado|_____|
 49 - Situação Dentária [1] boa [2] regular [3] ruim|_____|

VI - Coleta de Material

50- Mucosite [L] leve [M] moderada [S] severa [4] Não.....|_____|
 51- Tratamento [1] clorexidine [2] micostatin [3] sol bicarbonatadas
 [4] violeta de genciana [5] outros|_____|
 52- Esquema terapêutico _____

VII - Dados finais do tratamento

53 - Data término tratamento/_____|/_____|/_____|
 54 - Número de semanas [] número de sessões [] dose diária CGY []
 55 - Campo Rxt _____
 56 - Dose total de Rxt cGy|_____|
 57 - Anestésico cirúrgico _____
 58 - Último retorno [1] vivo s/ doença [2] vivo c/ Ca [3] morte por Ca
 [4] morte SOE [5] perdido de vista|_____|

VIII - Resultados

Nº da coleta	frequência micronúcleo		citopatologia
	Sangue	Mucosa	
1ª			
2ª			
3ª			

OBS

Legenda

RGH: Registro Geral Hospitalar
QT: quimioterapia
RXT: radioterapia
SOE: causas desconhecidas+

ANEXO 2**TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS INFORMADO****I. Dados de identificação do paciente ou responsável legal**

Nome do paciente _____

Documento identidade nº _____ Sexo M F

Endereço _____ nº _____ Apto _____

Bairro _____ CEP _____ - Cidade _____ Estado _____

Telefone(_____) _____

II. Dados sobre o estudo**Título:** Avaliação dos efeitos citogenéticos e citopatológicos da radioterapia em pacientes com tumores malignos de cabeça e pescoço**Pesquisador:** Eliana Maria Minicucci**Departamentos:** Patologia - Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP
Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Radioterapia - Hosp A.C.Camargo-SP**Cargo:** Cirurgiã dentista - Pós graduanda em nível de Mestrado no Núcleo de Avaliação Toxicogenética e Cancerígena - TOXICAN do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.**Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em 01 /09/1998****Início do estudo 10 / 09/1998****III. Explicações do pesquisador ao paciente ou representante legal**

1. Justificativas e Objetivos da Pesquisa: avaliar possíveis efeitos genéticos causados pela radioterapia na mucosa oral e células do sangue
2. Procedimentos utilizados: raspado de mucosa oral com espátula de madeira, e coleta de 5ml de sangue com seringa descartável para avaliação de material genético.
3. Complicações e riscos: Não há
4. Benefícios que poderão ser obtidos: avaliação dos efeitos citogenéticos da radioterapia
5. Fui esclarecido sobre a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa e o tratamento
 Sim Não
6. Fui esclarecido sobre a liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo quanto a continuidade do meu tratamento
 Sim Não

7. Fui esclarecido de que não haverá remuneração financeira além do previsto para as despesas do estudo
[] Sim [] Não
8. Fui esclarecido de que não haverá indenização além das previstas por lei, em reparação a dano imediato ou tardio causado pela pesquisa em questão
[] Sim [] Não
9. Fui esclarecido sobre a segurança de minha identidade será preservada, mantendo-se todas informações em carácter confidencial
[] Sim [] Não

IV. Consentimento pós-informado

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido dos riscos e benefícios deste estudo clínico conforme definido nos ítems 1 a 9, do inciso III, consinto em participar, na qualidade de paciente, do Projeto de Pesquisa referido no inciso II.

São Paulo, de de

Assinatura paciente ou responsável

Assinatura pesquisador

Tabela XVIII – Resultados individuais referentes a citopatologia da mucosa bucal, índice mitótico de linfócitos e frequência de células micronucleadas em pacientes com tumor maligno de cabeça e pescoço.

Código paciente	SANGUE						MUCOSA BUCAL			Citopatologia ^a Presença de neutrófilos	
	% micronúcleos			Índice Mitótico			% micronúcleos			2° coleta	3° coleta
	1° coleta	2° coleta	3° coleta	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	1° coleta	2° coleta	3° coleta		
201	0,1	4,8	10,1	1,58	1,62	1,57	0,05	0,36	0,1	+	0
203	0,1	1,8	4,8	2,04	1,55	1,63	0	0,36	0,05	0	+
210	0	4,5	6,4	1,52	1,36	1,2	0,25	0,45	0	++	0
214	0,5	4,5	2	2,09	1,48	1,61	0,05	0,13	0,55	+	+
216	0,4	5,5	Não retornou	- b	1,33	Não retornou	0,1	0,11	Não retornou	0	Não retornou
221	0,4	5,4	- c	1,39	1,36	Não retornou	0	9	Não retornou	++	Não retornou
222	- c	4,2	Não retornou	- c	- b	Não retornou	0,05	0	Não retornou	0	Não retornou
225	0,2	2,1	0,3	1,84	1,61	1,25	0,2	0,18	0,1	0	0
227	0,1	5,1	8,3	1,23	1,52	1,44	0	0,3	0,65	0	0
229	0,2	1,3	3	1,68	1,47	1,41	0,2	0,13	0,1	0	0
230	0	3,3	4,4	1,44	1,04	1,41	0,45	0,2	0	+	0
233	0,1	2,5	2,1	- b	1,34	- b	0,05	0,07	0,05	0	0
238	0,4	1,2	2,9	1,29	1,46	1,37	0	0,3	0,15	+	0
242	0,2	1,4	Não retornou	1,81	1,84	Não retornou	0	0,23	Não retornou	++	Não retornou
244	0,5	4,1	4	1,3	1,40	1,66	0	0,05	0	++	+
245	0,2	1,4	5,6	1,07	1,46	1,37	0,3	0,25	0,15	+	+
251	0,4	3,4	- c	- b	- c	1,33	0,05	0,05	0	+	0
250	0	1,1	3,2	1,15	1,34	1,33	0	0,27	Não retornou	+	Não retornou
252	0	2,2	0,9	1,76	1,27	1,17	0	0	0	0	0
257	0,1	3,2	1,2	1,50	1,23	1,15	0,1	0,07	0	0	0
264	0,2	1	1,8	1,21	1,62	- b	0	0	0,1	+	0
268	0,5	6,5	5,8	1,45	1,54	1,31	0	0,33	0,2	0	0
273	0,1	2,8	3,9	1,36	1,25	1,22	0	0,45	0,8	0	0
276	0,3	- c	2,7	1,14	- b	1,12	0,1	0,1	0,2	0	0
281	0,2	4,3	2,9	1,56	1,32	1,00	0,1	0,3	0,1	+	+
284	0,4	5,4	1,51	1,20	1,59	1,20	0,15	0,56	0,1	+	0
287	0	2,3	2,4	1,74	1,23	1,62	0,05	0,18	0	0	0
288	0,3	0,9	1	- b	1,43	- b	0,05	0,45	0,1	0	0
290	0,1	2,5	0,5	1,11	1,27	1,36	0,05	0,25	0,05	+	0
292	0,2	2,4	1,8	1,61	1,53	1,55	0,1	0,18	0,3	+	0
298	0,3	- c	3,6	2,01	- b	1,16	0	0,23	0,45	0	0
299	0,2	1	0,9	1,54	- b	1,6	0,05	0,25	0	++	0

^a – em nenhum paciente houve presença de neutrófilos na primeira coleta (antes do tratamento);

^b - não foi realizado índice mitótico; ^c – a cultura não cresceu.

0, +, ++ - ausência, poucos e muitos neutrófilos, respectivamente.

Tabela XIX – Doses de radiação recebidas por pacientes com neoplasia maligna de cabeça e pescoço, de acordo com o estágio clínico do tumor.

Código do paciente	Estádio do tumor	Dose (cGy) durante o tratamento	Média ± SD	Dose total (cGy)	Média ± SD
221	I	3240	3927 ± 929	Não retornou	6344 ± 462
244	I	4140		6000	
252	I	5200		6600	
229	II	3600		6040	
273	II	2700		7040	
287	II	4680		6040	
201	III	5000	3533 ± 1319	5500	6195 ± 501
203	III	4860		6040	
210	III	2160		6840	
214	III	5240		7040	
216	III	3420		Não retornou	
222	III	3780		Não retornou	
227	III	2700		5940	
250	III	1620		Não retornou	
281	III	3240		6120	
284	III	4860		6040	
292	III	1980		6040	
225	IV	2340		2873 ± 932	
230	IV	4000	7800		
233	IV	2520	6040		
238	IV	2700	6480		
242	IV	3400	Não retornou		
245	IV	1140	6040		
257	IV	3600	6700		
264	IV	2340	6640		
268	IV	1980	5400		
276	IV	4500	6440		
288	IV	3060	5980		
290	IV	2700	6040		
298	IV	3960	6480		
299	IV	1980	6040		