

Zeneide Martins da Silva

Avaliação do Sistema de Reparo do DNA em
Indivíduos Ocupacionalmente
Expostos à Radiação Não Ionizante



ZENEIDE MARTINS DA SILVA

AVALIAÇÃO DO SISTEMA DE REPARO DO DNA EM INDIVÍDUOS OCUPACIONALMENTE EXPOSTOS À RADIAÇÃO NÃO IONIZANTE

Dissertação apresentada no Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", para obtenção do grau de Mestre em Genética.



691/95

São José do Rio Preto

1994



Este trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética Humana, do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista, Campus de São José do Rio Preto e no Serviço de Genética do Hospital de Base da Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto, SP, com o auxílio financeiro de CNPq, CAPES e FAPESP.

Orientador: Profa. Dra. Nívea Dulce Tedeschi Conforti Froes



Dedico aos meus pais

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética Humana, do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista, Campus de São José do Rio Preto e no Serviço de Genética do Hospital de Base da Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto, SP, com o auxílio financeiro do CNPq, CAPES e FAPESP.

"E assim, no mundo, viver segundo a opinião do mundo é fácil, igualmente, no silêncio, viver segundo a sua própria opinião é muito melhor e aquilo que, no meio da multidão, constrói, com perfeita serenidade e calma, a natureza independente que desfrutará no silêncio"

R. W. Emerson

Dedico aos meus pais

Anita e Venâncio

pelo apoio na formação intelectual de tantos filhos.

"É fácil, no mundo, viver segundo a opinião do mundo; é fácil, igualmente, na solidão, viver segundo nossa própria opinião; o maior homem é aquele que, no meio da multidão, conserva, com perfeita serenidade e nobreza, a mesma independência que desfrutaria na solidão"

R. W. Emerson

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Nivea Dulce Tedeschi Centofanti Froes, capacidade de trabalho e dedicação aos orientandos.

As Profas. Dras. Eloiza Helena Tajara da Silva e Verônica E. P. Vicentini, pelas sugestões na análise da proforma.

Ao Prof. Antônio J. Marzato, do Departamento de Análise Numérica e Estatística deste Instituto, pela realização da análise estatística dos dados.

A direção da Companhia Paulista de Força e Luz por possibilitar, em grande parte a realização deste trabalho.

Ao médico L. A. Córria pelo empenho pessoal na organização da amostra e ao técnico A. C. Chandretti, pelo auxílio na configuração elétrica das residências da mostra controle.

As Profas. Dras. Eny M. Goloni Bertollo do Laboratório de Genética do Hospital de Base, por todo empenho na realização deste trabalho e Agnes C. F. Conte pela utilização do espaço laboratorial sob sua responsabilidade.

A direção do Instituto de Radioterapia de São José do Rio Preto pela utilização do aparelho de emissão de raios X.

A Profa. Dra. Maricela Varela Garcia por ter-me possibilitado vivências em parte do programa de mestrado e principalmente pela preocupação com a nossa formação intelectual.

Aos doadores de sangue, que permitiram a realização deste trabalho.

A Profa. Adília M. P. Scliarra, seu orientador.

Ao Prof. Dr. Eli N. Bichara, pela orientação.

As pós-graduandas Alba R. de Almeida, Erica C. Pavarino, Rosa S. Kawasaki Oyama, aos funcionários Nicola Viragine e Cristiano Nunes (Unidade de processamento de dados), Maria do Carmo Junqueira (Biblioteca), Kikue da Oliveira e Maria Aparecida do C. Costa (Arquivo) e estagiária Rosa Basso, pela preciosa colaboração em diversas etapas deste trabalho.

"Aventurar-se causa ansiedade, mas deixar de arriscar-se é perder a si mesmo.... É aventurar-se no sentido mais elevado é precisamente formar consciência de si próprio".

Kierkegaard

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Nívea Dulce Tedeschi Conforti Froes, capacidade de trabalho e dedicação aos orientandos.

Às Profas. Dras. Eloiza Helena Tajara da Silva e Verônica E. P. Vicentini, pelas sugestões na análise da proforma.

Ao Prof. Antônio J. Manzato, do Departamento de Análise Numérica e Estatística deste Instituto, pela realização da análise estatística dos dados.

À direção da Companhia Paulista de Força e Luz por possibilitar, em grande parte a realização deste trabalho.

Ao médico L. A. Ciórlia pelo empenho pessoal na organização da amostra e ao técnico A. C. Chandretti, pelo auxílio na configuração elétrica das residências da mostra controle.

Às Profas. Dras. Eny M. Goloni Bertollo do Laboratório de Genética do Hospital de Base, por todo empenho na realização deste trabalho e Agnes C. F. Conte pela utilização do espaço laboratorial sob sua responsabilidade,

À direção do Instituto de Radioterapia de São José do Rio Preto pela utilização do aparelho de emissão de raios X.

À Profa. Dra. Marileila Varella Garcia por ter-me possibilitado orientação em parte do programa de mestrado e principalmente pela preocupação com a nossa formação intelectual.

Aos doadores de sangue, que gentilmente se dispuseram a colaborar na realização deste trabalho.

À Profa. Adília M. P. Sciarra, sempre atenciosa, e ajuda na redação do summary.

Ao Prof. Dr. Eli N. Bechara, pela correção gramatical desta dissertação.

Às pós-graduandas Alba R. de A. Lima-Catelani, Érica C. Pavarino, Rosa S. Kawasaki Oyama, aos funcionários Nicola Viragine e Cristiano Nunes (Unidade de processamento de dados), Maria do Carmo Junqueira (Biblioteca), Kikue de Oliveira e Maria Aparecida do C. Costa (Ambulatório) e a estagiária Rosa Bosso, pela preciosa colaboração em diversas etapas deste trabalho.

À técnica Ma. Helena C. de Sá, do Depto. de Botânica, pelo grande auxílio na realização do trabalho fotográfico para versão final deste trabalho..

Ao "polivalente" Arno Hamel pela sua disponibilidade em ajudar sempre que solicitado.

Ao Prof. Marinônio Cornélio do Departamento de Física, pelas discussões sobre radiações.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação, em especial, às meninas do Laboratório de Citogenética Humana.

Às "parceiras de sala" Érika Pavarino, Andrea Sales e Rosane Queiroz.

Aos professores do Departamento de Biologia e da Pós-Graduação, pela notável dedicação, competência e responsabilidade profissional.

À Ana R. Chinelato, Eliana Versute, Dorotéia Souza, Liliam Ravazzi, Marlene Kobayashi, Grasiela Aguiar, e Olga Pelicer, pelo carinho da convivência.

À bióloga Paula Buassi, e à técnica Brasilina Martins, pelo descontraído ambiente de trabalho no laboratório do Hospital de Base.

Aos funcionários: Josué R. dos Santos, Rosana Silistino, Sidnei Olívio, Ademir Veschi e aos funcionários da Unidade de Processamento de Dados, Biblioteca, Seção de Pós-Graduação.

Aos meus irmãos, Zulmira, "Maninho", Zenira, "Nando", Flávio, Zilma e Fábio; às cunhadas, Deusa e Maria "pela torcida organizada" e às crianças Renê, Vitor, Luiza e Daniely, sempre doces lembranças.

Às grandes amigas Ângela Moura e Gardene Souza por saber que apesar da distância, a amizade continua.

À direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, pela disposição das condições materiais.



"Importante e bonito, no mundo, é isto: que as pessoas não estão sempre iguais, ainda não foram terminadas - mas elas vão sempre mudando. Afinam ou desafinam. Verdade maior. É isso que a vida me ensinou."

Guimarães Rosa

Ao término deste período o sentimento presente é o fato muito importante que foi a experiência vivida, a maturidade adquirida pelas experiências e solidão. E vocês, foram fundamentais em tudo esse processo. Por tudo isso quero referir-me especialmente,

À minha mãe, que por ser demais apegada aos seus, sofreu muito com essa longa ausência e sei que apesar das diferenças pede sempre por mim.

À Profa. Zélia A. Sampaio, a qual devo o grande incentivo para a continuidade da minha formação acadêmica, e a vinda para longe das minhas raízes, rumo ao (des)conhecido.

À Isabel R. Cabral, amiga que resistiu comigo a tantos e diferentes problemas na vida em comum e no trabalho. Disso brotou uma sólida amizade que me fez perceber trata-se não de uma pessoa ativa, mas de um ser humano doce, fragil e prestativo .

À Nívea D. T. Conforti Froes, muito mais que orientadora, foi uma pessoa muito interessada no meu bem estar e em não deixar que o excesso de trabalho desestruturasse a minha vida. Com certeza, devo-lhe muito ter chegado ao final desta tarefa de forma mais tranqüila.

Ao Sebastião Souza, por me mostrar outro significado da vida.

ÍNDICE

I - INTRODUÇÃO.....	01
1- Considerações gerais sobre radiação	01
2- Estudos epidemiológicos e experimentais sobre exposição residencial e ocupacional ao campo eletromagnético.....	08
3- Utilização de metodologia citogenética para predição de risco em organismos expostos.....	13
II - OBJETIVOS.....	18
III - MATERIAL E MÉTODOS.....	19
1- Caracterização da amostra estudada.....	19
2- Escolha da dose de radiação.....	23
3- Cultura temporária de linfócitos e preparação cromossômica.....	23
4- Análise citogenética.....	26
5- Análise estatística.....	28
IV - RESULTADOS.....	30
V - DISCUSSÃO	52
VI - RESUMO E CONCLUSÕES.....	63
VII- SUMMARY	66
VIII-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
IX- ANEXOS.....	81



I - INTRODUÇÃO

1 - Considerações Gerais sobre as Radiações

A energia existe no universo sob as mais variadas formas: mecânica, elétrica, térmica, química e luminosa, podendo uma forma ser convertida em outra, desse modo, mantendo conservada a energia total do universo (OKUNO et al., 1982).

A energia pode ser propagada de um ponto a outro sob a forma de radiação; portanto, entende-se por radiação a energia emitida por uma fonte que se propaga de um ponto a outro sob a forma de um feixe de partículas elementares ou núcleos atômicos, ou ainda, sob a forma de ondas eletromagnéticas (OKUNO, 1988).

A onda eletromagnética é uma das formas pela qual a energia se propaga no espaço, mediante oscilações elétricas e magnéticas entrelaçadas (MUNIZ & LOBO, 1984). O campo elétrico é produzido por uma corrente elétrica na superfície de um condutor, ou seja, ele existe em torno de um objeto que possui uma corrente elétrica que circula. O movimento dos campos elétricos gera campos magnéticos em movimento, enquanto esses campos magnéticos móveis dão origem aos campos elétricos, de modo que a variação do fluxo de cada campo gera o outro. Assim, todo o bloco de campos elétrico e magnético move-se através do espaço propelindo-se a si mesmo (HALLIDAY & RESNICK, 1980). O campo elétrico é descrito em frequência e o seu comprimento é medido em unidades de volts (V/m) ou kilovolts por metro (kV/m), enquanto o campo magnético no ar ou em materiais biológicos pode ser medido seja usando o seu comprimento em ampère por metro (A/m) ou, como mais comumente, em densidade de fluxo magnético dado em tesla (T) e



gauss (G) no Sistema Internacional de Unidades e no MKS, respectivamente ($10^4 \text{ G} = 1\text{T}$) (DEADMAN et al., 1988; SAVITZ et al., 1989). As ondas eletromagnéticas são constituídas de campos elétricos e magnéticos oscilantes, perpendiculares entre si, que se propagam no vácuo com uma velocidade de 300.000 Km/s. Essas oscilações podem ser representadas graficamente por uma senóide, como pode ser visto na Figura 1, onde a energia é quantizada e emitida através de ftons (ou quanta), que são partículas que constituem o feixe de radiação. Da interação entre a radiação eletromagnética com a matéria, a absorção e a emissão de energia só ocorrem em quantidades discretas. A radiação também costuma ser caracterizada pela energia de seus ftons, sendo que essa energia é diretamente proporcional à frequência da onda eletromagnética, ou seja, quanto maior sua frequência, maior será a energia de seus ftons. Alguns tipos de radiação são de natureza corpuscular, isto é, possuem massa, como é o caso de feixes das partículas elementares, ou seja, eletrons, protons, neutrons, mesons (OKUNO, 1988; OKUNO et al., 1982).

O espectro eletromagnético (Figura 2) é um conjunto contínuo de radiações que vão desde raios gama até ondas de rádio. Os nomes que identificam os vários trechos do espectro são históricos e constituem apenas uma classificação conveniente de acordo com a fonte de radiação. A natureza física da radiação é a mesma em todo o espectro e, em todos os trechos, a radiação tem a mesma velocidade e natureza eletromagnética; a única diferença de uma parte do espectro para outra está na frequência e, portanto, no comprimento da onda. Todas as radiações eletromagnéticas transportam energia que, quando absorvidas por um objeto, gera seu aquecimento. Isso significa que a radiação eletromagnética só pode ser emitida em um processo no qual haja fornecimento de energia (PSSC, 1976).



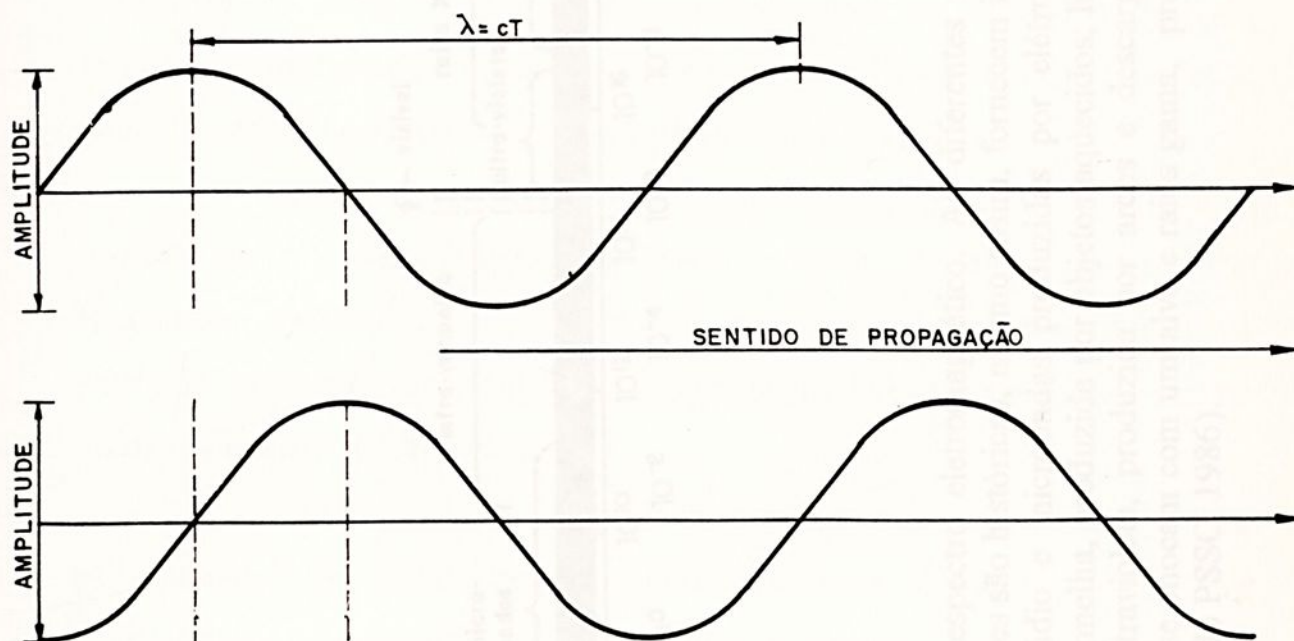


FIGURA 1 - Representação esquemática de uma onda onde o tempo de uma oscilação completa é o *período* (T), medido em segundos. O inverso deste número, $1/T$ é a *freqüência* (f) e representa o número de oscilações ocorridas em um segundo e é medida em Hertz (Hz), portanto, 1 Hz é igual a uma oscilação por segundo. A distância entre duas cristas sucessivas dessa curva é o *comprimento* da onda, representado pela letra grega lambda (λ). A distribuição de todos os comprimentos de onda contidos numa radiação é chamada de espectro (adaptado de MUNIZ & LOBO, 1984).

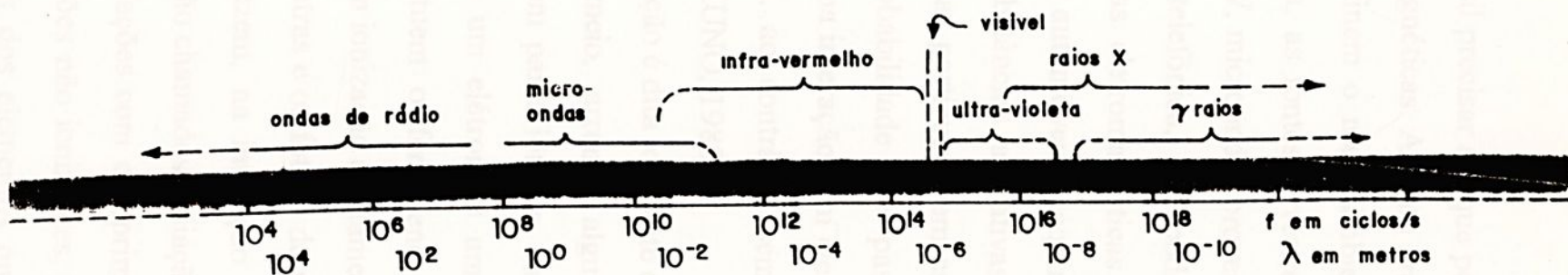


FIGURA 2 - Esquema representativo do espectro eletromagnético. As diferentes regiões do espectro se sobrepõem, mas as designações são históricas, mesmo assim, fornecem indicações a respeito das fontes comuns: ondas de rádio e microondas produzidas por elétrons que se movem em condutores; radiação infra vermelha, produzida por objetos aquecidos; luz visível, produzida por objetos quentes; radiação ultravioleta, produzida por arcos e descargas em gases; raios X, produzidos por elétrons que se chocam com um alvo e raios gama, produzidos por núcleos de átomo radioativos (adaptado do PSSC, 1986).

É difícil precisar até que ponto o homem se encontra mergulhado em ondas eletromagnéticas. A fonte predominante é o sol, no sentido de que suas radiações definem o meio ambiente que o homem, como espécie, se adaptou. Há, ainda, as fontes terrestres de radiação eletromagnética, como sinais de rádio e TV, microondas provenientes de fornos, de sistemas de radar e de transmissão telefônica, que podem nos atingir. Além disso, deve-se considerar as ondas eletromagnéticas provenientes de lâmpadas elétricas, motores quentes de automóveis, máquinas de raios X, relâmpagos e radiação gama oriunda de substâncias radioativas existentes no solo.

Todas as partículas sem cargas e os fótons de raios X e gama possuem certa probabilidade de passar através de um meio material sem sofrer nenhuma interação com ele e, portanto, sem perder energia. Uma partícula carregada, ao contrário, sempre sofre colisão, perdendo energia gradativamente (OKUNO, 1988).

A radiação é dita ionizante quando, na interação com os átomos e as moléculas do meio, arranca alguns dos seus elétrons orbitais. Em consequência, surgem pares iônicos, cada um formado por um íon positivo (átomo que perdeu um elétron) e um íon negativo (elétron removido do átomo), que constituem o fenômeno da *ionização*. Todas as partículas carregadas produzem ionização diretamente, quando possuem energia para tal. Já, as partículas neutras e os fótons de raios X e gama, embora eles próprios não ionizem, produzem, na interação com o meio, partículas capazes de ionizar, e por isso, são chamados radiação ionizante (OKUNO, 1988).

As radiações com comprimento de onda acima de 400 nm são consideradas radiações não ionizantes, por não possuírem energia suficiente para retirar elétrons dos elementos quantitativamente mais importantes da matéria viva, tais como o carbono, hidrogênio e nitrogênio (FREIRE-MAIA,



1972). Isso se dá porque uma radiação só é capaz de ionizar átomos de qualquer um desses quatro elementos se possuir energia fotônica superior a 11 elétron-volt (eV), sendo essa unidade correspondente a energia de carga de um elétron sob a ação de um volt (LEITÃO & GOMES, 1987).

Quando da interação radiação-matéria, com conseqüente formação de íons, é possível avaliar a quantidade de radiação à qual a matéria está exposta pela quantidade de cargas elétricas formadas em cada quilograma ou grama de matéria. Várias são as unidades empregadas no estudo das radiações. O rad é a unidade empregada para expressar a dose de radiação absorvida pela matéria e corresponde à quantidade de radiação que provoca a liberação de 100 ergs por grama de matéria. Este, juntamente com o joule (j), e o eV, são unidades de energia. A relação entre eles é de que $1 \text{ erg} = 10^{-7} \text{ j}$, $1 \text{ eV} = 1,6 \times 10^{-12} \text{ erg}$ ou $1,6 \times 10^{-19} \text{ j}$. A unidade que substitui o rad é o gray (Gy) definido como a quantidade de radiação absorvida que provoca a liberação, em 1 kg de matéria de uma energia igual a 1 joule. Logo, 1Gy é igual a 100 rads (GOMES, 1988a).

As radiações de diferentes naturezas (raios X, partículas alfa, beta, etc) têm capacidades também diferentes de lesar a matéria viva. Por essa razão, não basta conhecer a dose absorvida para prever a intensidade de um efeito biológico, é necessário introduzir fatores de correlação que levem em conta as diferentes eficiências das radiações para a produção de lesões. Obtém-se, dessa forma, a dose equivalente, o Siervert (Sv), atualmente empregada, $1\text{Gy} = 1 \text{ Sv}$ (GOMES, 1988a).

Quando um feixe de radiação ionizante interage com uma célula, ele pode provocar diversos efeitos, especialmente interações com o DNA, por dois mecanismos distintos. O efeito pode ser direto, pois a matéria transportada pela radiação é transferida para o DNA sem intermediários. Em



outra situação, a radiação interage com outra molécula, principalmente a da água, o que resulta na formação de moléculas altamente reativas, os radicais livres, que podem interagir com o DNA (LEITÃO & GOMES, 1987).

A vida na terra apareceu e evoluiu sob constante bombardeio de radiações, algumas oriundas do espaço (raios cósmicos), outras provenientes de substâncias radioativas do planeta; a partir do século XIX, somaram-se as produzidas pelo homem, tais como raios X, as inúmeras aplicações médicas e industriais de radioisótopos e os contaminantes ambientais gerados pelas explosões nucleares. Assim, iniciou-se a radiobiologia, campo de estudo dos efeitos da radiação, o que fez com que hoje se conhecesse muito sobre os efeitos da radiação ionizante. Sabe-se, por exemplo, que cada tipo de célula caracteriza-se por um certo nível de sensibilidade às radiações: é possível admitir serem mais radiosensíveis as células que mais rapidamente se dividem. Assim, os efeitos das radiações serão quase sempre maiores nas células que têm maior atividade mitótica ou menor grau de diferenciação, como as células da pele, do revestimento intestinal e dos órgãos hematopoiéticos. Exceção é dada aos linfócitos, que, embora só se dividam em condições excepcionais, são extremamente radiosensíveis (GOMES, 1988b).

As radiações ionizantes são, inquestionavelmente, um agente mutagênico, condição válida em relação às espécies animais e vegetais com base em resultados obtidos ao longo de décadas de experimentação. Os efeitos genéticos radioinduzidos são aberrações cromossômicas, que envolvem modificações tanto no número dos cromossomos, como na sua forma. Além destas, há mutações gênicas que provocam alterações na estrutura gênica. Na espécie humana a dose letal é da ordem de 4,5 Gy. A cancerização é o principal efeito tardio de exposição, fato já conhecido desde o início do uso dos raios X e confirmado nos sobreviventes de Hiroxima e Nagasaki (GOMES, 1988a).



2 - Relação entre exposição ocupacional e residencial ao campo eletromagnético e desenvolvimento de neoplasias

Muito pouco se conhece, no momento, sobre os efeitos biológicos das radiações cujas frequências são extremamente baixas, como é o caso do campo eletromagnético de 60 Hz (CEM).

A partir da década de setenta, com a publicação dos resultados obtidos por WERTHEIMER & LEEPER (1979), sugerindo associação entre residência com alta configuração elétrica e aparecimento de câncer em crianças, as atenções voltaram-se para os efeitos biológicos do campo eletromagnético de frequência extremamente baixa, definido como tendo uma frequência abaixo de 200-300 Hz. Desde então, são muitos os estudos publicados relacionados a este assunto (WRIGHT et al., 1982; COLEMAN et al., 1983; COLEMAN, 1985; SAVITZ & CALLE, 1987; SHORE, 1988; BEARDSLEY, 1990; BELL & COLEMAN, 1990; POOL, 1990a; 1990b; 1991; TYNES & ANDERSEN, 1990; BETHWAITE, 1991; WOLFF, 1991; SAVITZ, 1991; MATANOSKI et al., 1991; STEVENS & SAVITZ, 1992; TYNES et al., 1992; McDOWALL, 1993). Hoje em dia, toda a população está exposta a esse tipo de radiação, em maior ou menor intensidade, e, por esse fato, o assunto causa grande curiosidade e preocupação, visto que o uso da energia elétrica é imprescindível ao desenvolvimento científico e tecnológico.

A função do CEM na etiologia do câncer tem sido foco de considerável atenção, motivo pelo qual diferentes autores têm associado exposição ocupacional e/ou residencial a um risco aumentado para o desenvolvimento de alguns tipos de neoplasias.

Com relação à exposição ocupacional, MILHAM (1985) estudando o índice de mortalidade em trabalhadores expostos ao campo

eletromagnético, no estado de Washington, nos anos de 1950 a 1982, encontrou alta taxa de mortalidade causada por linfoma e leucemia. Dados confirmatórios foram obtidos por BASTUJI-GARIN et al. (1990), GARLAND et al. (1990) e TYNES et al. (1992).

O câncer de cérebro é um outro tipo de neoplasia que parece estar associado ao CEM, como demonstraram os estudos realizados por SPEERS et al. (1988) e DEMERS et al. (1991) em indivíduos ocupacionalmente expostos a tal agente. Em estudo mais abrangente, LOOMIS & SAVITZ (1990) verificaram, com base nos registros de óbitos entre os anos de 1985 e 1986, em 16 estados americanos, a incidência de morte por câncer de cérebro e leucemia em pessoas que tinham a eletricidade como ramo principal de ocupação profissional. Os resultados dessa pesquisa mostraram claramente que o agente em questão apresenta estreita relação com o aumento da mortalidade causada por câncer de cérebro não se podendo, contudo, afirmar o mesmo em relação à leucemia. Estudo semelhante, efetuado por GUÉNEL et al. (1993) em um período maior, compreendido entre os anos de 1970 e 1987, mostrou que apenas os homens com exposição contínua ao CEM apresentavam um risco maior para o desenvolvimento de leucemia, mas não para câncer de cérebro. É interessante ressaltar que, provavelmente, a ausência de resultados positivos nas mulheres, deve-se ao fato de que tal população se expunha ao agente, de forma intermitente.

Não se conhece, até o momento, explicação para associação entre CEM e câncer de cérebro, mas, dentre os poucos estudos sobre o assunto, vale destacar a investigação conduzida por KATKOV et al. (1992) mostrando que o CEM exerce efeito sobre os níveis de calmodulina em diferentes estruturas do cérebro e isso pode alterar diversos mecanismos envolvidos na atividade biológica.



Em relação à associação entre exposição residencial ao CEM e desenvolvimento de neoplasias, pode-se citar o estudo realizado por SEVERSON et al. (1988) que encontraram alta incidência de leucemia mielocítica aguda em crianças, cujas residências se situavam muito próximas às linhas de forças. No entanto, tais resultados são refutados por FULTON et al. (1980) e MYERS et al. (1990), em estudos semelhantes.

Também com o objetivo de verificar o aparecimento de câncer infantil, SAVITZ et al. (1990) realizaram um estudo com exposição ao campo magnético, só que proveniente de utensílios elétricos. O trabalho foi realizado com pessoas de 0 a 14 anos nas quais foram constatados casos de câncer, nos anos compreendidos entre 1976 e 1983, tendo sido investigado o uso de cobertor elétrico pela mãe durante o período da gravidez (exposição pré-natal) e o mesmo uso posterior pela criança (exposição pós-natal). A exposição pré-natal foi associada com um pequeno aumento na incidência de câncer infantil, principalmente leucemia e câncer de cérebro, o mesmo acontecendo com a exposição pós-natal. O estudo da exposição oriunda de cobertores é justificado, por ser este utensílio uma importante fonte doméstica de campo eletromagnético e pelo seu uso favorecer um contato íntimo com o corpo, além do que a exposição é prolongada e o campo eletromagnético é de emissão relativamente alta.

O risco para outros tipos de neoplasias pelo uso de cobertores elétricos foi pesquisado por VERREAULT et al. (1990), para câncer de testículo e por VENA et al. (1991), com relação a câncer de mama, sendo que ambos os estudos não detectaram qualquer relação.

Segundo DRAPER (1993), não deve ser descartada a probabilidade de que o campo magnético associado com a transmissão de eletricidade possa causar câncer infantil, mas a falta de consistência entre os

estudos publicados e a ausência de uma explicação biologicamente aceita para tal relação significa que, até o presente, nada foi estabelecido. Entretanto, existem evidências de numerosos e relevantes efeitos biológicos que induziriam ao aumento no desenvolvimento do câncer, que incluem alteração no fluxo de cálcio no cérebro (BLACKMAN, 1985), mudanças no ritmo circadiano em diferentes espécies (SULZMAN, 1985) e no ritmo cardíaco do homem (GRAHAM et al., 1988), e ainda, possíveis efeitos sobre a função pineal em ratos resultando em alterações nos níveis do hormônio melatonina (WILSON et al., 1988).

Os possíveis mecanismos pelos quais o CEM pode causar câncer envolvem algumas formas de atuação no estágio de promoção da carcinogênese. Segundo ADEY (1981; 1988), a atuação do CEM como agente promotor de carcinogênese ocorre na superfície da membrana celular, alterando eventos dependentes de cálcio nas proteínas transmembrânicas. Já, EASTERLY (1991) sugeriu um outro mecanismo envolvendo alteração no processo mitótico, levando a um aumento na proliferação celular em células tumorais no estado latente. Esse efeito mitogênico também foi referido por PHILLIPS et al. (1986) em linhagens de células de câncer de cólon expostas *in vitro*, ao CEM de 60 Hz. Para esses autores, tal exposição induz a mudanças permanentes nas células e podem envolver alteração na informação genética. Nessa mesma linha de pensamento situam-se os resultados obtidos por LIBOFF et al. (1984) relatando aumento na síntese do DNA de células cultivadas *in vitro*, e os de BYUS et al. (1987) identificando a elevação da taxa de síntese da ornitina descarboxilase, enzima envolvida no crescimento celular e na síntese de poliaminas e DNA, a qual, geralmente, tem sua síntese aumentada pelos agentes promotores de tumor.

Um outro tipo de câncer, o de mama, parece ter relação com níveis de exposição ao CEM. Apesar de existir grande diferença na incidência e mortalidade causada por esse tipo de câncer, existem evidências de que o CEM possa contribuir para o aumento dessa doença, provavelmente por sua capacidade em afetar a produção de um hormônio produzido pela glândula pineal, a melatonina, que, por sua vez, ocasionaria supressão na produção de prolactina pela pituitária e de estrógeno pelo ovário (STEVENS, 1987).

De modo geral, pode-se dizer que são numerosos os estudos envolvendo a ação do CEM, bem como são muitas as contradições existentes sobre o assunto. Isso se deve, principalmente, pela falta de uma metodologia adequada e segura que efetue medidas do referido campo, quando o efeito do agente está associado com a incidência de vários tipos de câncer. Não se conhece, por exemplo, qual é o componente mais importante do CEM, se é o seu comprimento, sua orientação, a intensidade ou duração do mesmo, ou ainda, se é a combinação de todos eles ou a exposição cumulativa a estes, na causa de efeitos positivos (ALDRICH & EASTERLY, 1987; COLEMAN & BERAL, 1988; BATES, 1991).

Somado a isso, está o fato de que todo corpo está exposto aos componentes do espectro eletromagnético proveniente de várias origens, os quais estão constantemente se movendo em torno do outro e mudando de direção com o passar do tempo. Em decorrência dessas ambigüidades e devido à complexidade de exposição ao campo eletromagnético, métodos adequados de medidas de exposição estão sendo debatidos. Enquanto isso, estão sendo usadas medidas indiretas como, por exemplo, a distância de uma residência em relação a uma instalação de transmissão elétrica para a avaliação do seu efeito. Tais medidas têm sido criticadas porque elas não levam em conta a ampla variação da intensidade do campo eletromagnético, no decorrer do dia e

nas diferentes épocas do ano, a duração da exposição e a contribuição total da exposição aos utensílios domésticos e aos fios elétricos das residências.

Em conclusão, baseado nos dados epidemiológicos disponíveis e nos estudos desenvolvidos experimentalmente, torna-se aparente que o CEM, seja atuando sozinho ou em associação com substâncias químicas caracterizadas como poluentes ambientais, constitui um risco potencial para a saúde humana (ADEY, 1990).

3 - Utilização da metodologia citogenética para predição de riscos em indivíduos expostos

Os seres vivos estão constantemente expostos a inúmeros agentes ambientais, que podem causar uma variedade de efeitos danosos sobre a saúde, expressos de imediato ou a longo prazo, o que torna necessário um contínuo esforço no sentido de identificar tais agentes, a fim de prevenir consequências desastrosas para as populações expostas e futuras.

O conhecimento dos efeitos da exposição a agentes físicos ou químicos em populações expostas é útil para estimativa de riscos e um dos meios disponíveis são os estudos de monitorização de populações expostas a biomarcadores capazes de demonstrar a origem de determinados danos genéticos. Para tanto, pode-se utilizar, muito freqüentemente, o parâmetro de indução de aberrações cromossômicas, por meio de testes citogenéticos. As alterações cromossômicas são freqüentes em células neoplásicas (ROWLEY, 1982; MITELMAN, 1986) e em fetos abortados (YAMAMOTO & WATANABE, 1979), e, por isso, podem ser usadas como biomarcadores para predição de câncer, perda fetal e outros problemas genéticos.

As alterações cromossômicas estruturais que ocorrem nos cromossomos podem ser classificadas em cromatídica e cromossômica, quando a lesão afeta uma ou ambas as cromátides, respectivamente. Os agentes genotóxicos podem ser divididos em duas classes quanto à ação do seu efeito sobre o DNA. As substâncias que provocam alterações que dependem da fase de síntese para ser visualizadas são denominadas S-dependentes; enquanto as S-independentes não necessitam da fase de síntese. Os agentes S-independentes, tais como radiação ionizante, produzem aberrações do tipo cromossômica em G₁, cromatídica em G₂ e ambos os tipos em S e os agentes S-dependentes, como a luz ultravioleta, produzem seu efeito na fase S ou quando as células passam por uma fase de síntese entre a exposição e a observação do efeito; as aberrações surgem devido a erros na duplicação do DNA e são do tipo cromatídico (NATARAJAN & OBE, 1986).

CARRANO & NATARAJAN (1980) relataram dados que justificam a relevância da análise de alterações cromossômicas como instrumento para avaliação de riscos de exposição a agentes mutagênicos e, segundo eles, a frequência dessas alterações em recém-nascidos é da ordem de 6 por 1.000. Todavia, a análise cromossômica em abortos humanos indica que cerca de 50% desses são cromossomicamente anormais. Por outro lado, populações expostas à radiação ionizante, como os sobreviventes da bomba atômica, ou a agentes químicos genotóxicos, apresentam frequências aumentadas de AC em seus linfócitos. Além disso, muitos tipos de câncer humano podem estar associados com aberrações cromossômicas específicas, do mesmo modo que inúmeras doenças hereditárias no homem, como a ataxia telangiectasia, anemia de Fanconi e síndrome de Bloom.

A análise cromossômica é realizada em metáfases de cultura de sangue periférico e pode-se identificar alterações estruturais não reparadas,



que se expressam como quebras, falhas, fragmentos acêntricos, cromossomos dicêntricos, figuras trirradiais e quadrirradiais e outros rearranjos detectáveis em nível de resolução do microscópio óptico. A capacidade de um agente em induzir tais anomalias denomina-se clastogenicidade (SHAW, 1970).

Os linfócitos do sangue periférico são considerados como um ótimo sistema para testar uma substância quanto à sua capacidade de produzir alterações cromossômicas, pois, além de ser um tipo celular facilmente disponível, para estudo, circulam por todo o corpo e podem ser considerados como monitor interno não específico de um órgão. Os linfócitos permanecem na circulação sanguínea em estágio não proliferativo, ou seja, se encontram no estágio G_0 e possuem vida média de quatro meses. Ao serem colocados em cultura, na presença da fitohemaglutinina são estimulados, sintetizam RNA, proteínas e DNA, após cerca de 24 horas (PRESTON et al., 1987).

A técnica serve também para monitorização de populações expostas a agentes genotóxicos, seja por razões profissionais, terapêuticas ou por acidentes de trabalho (NATARAJAN & OBE, 1980). Supondo-se que haja uma correlação entre o dano induzido no sangue e em outras células somáticas, os linfócitos serviriam como um sistema sentinela para estudos em grupos de risco (NORDENSON et al., 1984a).

Como os linfócitos humanos estimulados são capazes de reparar com muita eficiência os danos causados ao DNA, a grande maioria das aberrações causadas *in vivo* pelas substâncias S-dependentes será reparada em cultura, antes da célula entrar em fase de síntese, enquanto poucas lesões causadas pelas substâncias S-independentes sofrerão reparo e poderão dar origem a aberrações cromossômicas (NATARAJAN & OBE, 1980).

Quando as células são tratadas em G_0 ou G_1 , a fixação deve ser feita de modo que a grande maioria das células esteja em sua primeira divisão



in vitro. O tempo de fixação deverá ser, no máximo, de 52 horas após o início da cultura. Esse tempo máximo de cultura é para que as células estejam em primeira divisão; culturas de 72 horas dão melhor rendimento mas apresentam de 70 a 75% de suas células em segunda ou terceira divisão (CROSSEN & MORGAN, 1977).

PRESTON et al. (1987) relataram que, para se obter o máximo de sensibilidade no teste citogenético, é necessário analisar células em primeiro ciclo de divisão, após o tratamento. Segundo esses autores, é difícil determinar um tempo no qual existam suficientes células analisáveis, todas em primeira divisão, especialmente quando são utilizadas amostras de vários doadores. Assim, torna-se necessário identificar as células de primeiro ciclo de divisão usando a incorporação de 5-bromodesoxiuridina (5-BrdU), seguida de técnica apropriada para coloração diferencial das cromátides-irmãs.

Os testes citogenéticos permitem detectar também a ação do CEM sobre a cinética do ciclo celular através do índice de proliferação celular e índice mitótico. O índice de proliferação celular é medido pela frequência de células em 1^o, 2^o e 3^o ciclos de divisão e o índice mitótico pela frequência de células em divisão em 2000 linfoblastos. Esses parâmetros fornecem informações sobre a cicloatividade, ou seja, a ocorrência de alterações na duração do ciclo celular.

No entanto, existem casos em que as técnicas citogenéticas não conseguem detectar danos causados pela exposição a baixas doses de um agente. Na tentativa de solucionar esse impasse, AU et al. (1991), usando a metodologia citogenética, desenvolveram o "challenge assay" que, como o próprio nome indica, consta de um teste que desafia o cromossomo a reparar as lesões induzidas em seu DNA, após ser submetido a um tratamento com radiação ionizante.

O princípio do teste está baseado no fato de que agentes físicos e químicos podem reagir com o DNA e proteínas, dentre essas últimas, principalmente enzimas de reparo. Se células expostas a tais agentes forem subsequentemente desafiadas por exposição a determinadas doses de um agente mutagênico, como por exemplo os raios X, elas terão problemas em reparar os danos induzidos pela radiação. A consequência disso é revelada pelo aparecimento de rearranjos complexos, que são detectados por meio da análise citogenética. Tais rearranjos são, portanto, produtos anormalmente reparados e constituem, principalmente, aberrações cromossômicas do tipo quebra, cromossomos dicêntricos, ou outras figuras anômalas, todas indicativas de que houve deficiência no sistema de reparo do DNA.

É amplamente aceito (SETLOW, 1978; COHEN & LEVY, 1989) que a incapacidade de reparar danos induzidos ao DNA é uma das principais contribuições no desenvolvimento de neoplasias; por conseguinte, falhas nas reações de reparo podem ser um mecanismo crucial na produção de múltiplas alterações genéticas nas várias etapas do processo de carcinogênese. Desse modo, torna-se preeminente a detecção de agentes capazes de lesar o DNA ou alterar as reações que processam os reparos a fim de que haja contribuição na prevenção de patologias degenerativas.



II - OBJETIVOS

Apesar dos dados contraditórios da literatura, sabe-se, atualmente, que o CEM representa um risco à saúde humana, uma vez que é crescente o nível de exposição do homem a esse tipo de radiação. Dos muitos estudos realizados, poucos foram aqueles que enfocaram a ação *in vivo* desse agente sobre o material genético. Por essa razão, realizou-se este estudo na tentativa de detectar uma possível ação clastogênica do CEM sobre o material genético de indivíduos ocupacionalmente expostos ao agente em questão, bem como de avaliar por meio do "challenge assay" a eficiência desses indivíduos quanto ao mecanismo de resposta no reparo do DNA, através dos parâmetros de índices mitótico e de proliferação celular e de frequência de aberrações cromossômicas.



III - MATERIAL E MÉTODOS

1 - Características da amostra

O estudo citogenético foi realizado em dez indivíduos do sexo masculino, com idades variando de 25 a 56 anos (média de 42,0 e desvio padrão 8,567), todos eletricitas de linha de transmissão da Companhia Paulista de Força e Luz (CPFL) da região Noroeste do Estado de São Paulo (Figura 3), expostos ao CEM de 60 Hz, durante a manutenção de cabos de alta tensão, há pelo menos seis anos (Figura 4). O grupo controle foi composto por nove indivíduos da população geral, com idade variando de 23 a 52 anos (média de 39,22 e desvio padrão 9,84) cujas residências e locais de trabalho foram avaliados quanto a proximidade a fios e equipamentos envolvidos na transmissão e distribuição de energia elétrica (Anexo 1). Assim, a amostra controle sofria exposição ao CEM em níveis muitas vezes inferiores aqueles da amostra de expostos. A configuração elétrica desses locais mostrou que situavam-se a mais de 150 m de subestação, 100 m de linhas de transmissão (linhão), 50 m de transformadores, 25 m dos fios primários e 15 m dos secundários. A caracterização das amostras exposta e controle é apresentada na Tabela 1.

Considerou-se, para ambas as amostras, a exposição desses indivíduos a agentes físicos e químicos, ao consumo de álcool e cigarros, ao aparecimento de doenças viróticas ou bacterianas e outros fatores ocorridos até seis meses antes da coleta de sangue. Para a amostra controle, considerou-se, ainda, o uso, a frequência e o tempo de exposição a aparelhos elétricos como rádio-relógio, televisão, jogos de vídeo-game, dentre outros. Essas informações foram obtidas e registradas, por meio de um amplo questionário (Anexo 2), aplicado durante entrevista antes da coleta de sangue.





FIGURA 4 - Eletrofisiologia de fômites de transmissão da Companhia Paulista de Força e Luz durante manutenção de cabos de alta tensão (132 kV). Observar a forma de contato entre os fios primários e a linha secundária.

FIGURA 3: Mapa geográfico do Estado de São Paulo, apresentando a procedência dos indivíduos da amostra exposta ao CEM

Tabela 1- Caracterização das amostras expostas ao campo eletromagnético (E) contínuo, quanto à idade (I), tempo de exposição ao CEM, tempo de origem e atividade profissional.

INDIVÍDUO	IDADE (anos)	TEMPO DE EXPOSIÇÃO AO CEM (anos)	MUNICÍPIO DE ORIGEM	ATIVIDADE PROFISSIONAL
-----------	-----------------	---	------------------------	---------------------------



FIGURA 4 - Eletricistas de linha de transmissão da Companhia Paulista de Força e Luz durante manutenção de cabos de alta tensão (138 kV). Observar a forma de contato entre esses profissionais e a linha energizada.

Tabela 1- Caracterização das amostras exposta ao campo eletromagnético (E) e controle (C), quanto à idade, tempo de exposição ao CEM, município de origem e atividade profissional.

INDIVÍDUOS	IDADE (anos)	TEMPO DE EXPOSIÇÃO AO CEM (anos)	MUNICÍPIO DE ORIGEM	ATIVIDADE PROFISSIONAL
E1	25	06	Bauru	ELT*
E2	37	12	Bauru	ELT
E3	38	16	Araraquara	ELT
E4	39	04	Araraquara	ELT
E5	39	16	Araraquara	ELT
E6	42	17	Araraquara	ELT
E7	43	06	Araraquara	ELT
E8	46	26	Ribeirão Preto	ELT
E9	55	27	Araraquara	ELT
E10	56	25	Bauru	ELT
C1	23	-	S. J. Rio Preto	Estudante
C2	31	-	S. J. Rio Preto	Vigia
C3	33	-	S. J. Rio Preto	Ag. Administrativo
C4	34	-	S. J. Rio Preto	Contador
C5	40	-	S. J. Rio Preto	Aux.Serv.Gerais
C6	41	-	S. J. Rio Preto	Comerciante
C7	49	-	S. J. Rio Preto	Porteiro
C8	50	-	S. J. Rio Preto	Pedreiro
C9	52	-	S. J. Rio Preto	Bancário

* ELT = Eletricista de linha de transmissão



2 - Escolha da dose de radiação

Foi efetuado um teste-piloto na tentativa de escolha da dose de raios X a ser utilizada para o emprego do "challenge assay". Em razão disso, as células foram expostas a doses de 50, 75 e 100 cGy de raios X, sendo que a exposição da cultura às doses de 50 e 75 foi dupla, seguida de um tempo de reparo de 60 minutos, enquanto que a dose de 100 cGy foi única. Em função dos resultados obtidos, escolheu-se duas doses de 75 cGy separadas por um intervalo de 60 minutos, para realização do experimento definitivo.

O "challenge assay" foi proposto por AU et al. (1991) e consiste em "desafiar" o DNA a reparar as lesões induzidas por um agente sabidamente genotóxico. Assim sendo, os linfócitos são cultivados por 24 horas e, após esse tempo, são submetidos a duas doses sucessivas de raios X.

Para a realização do experimento, cultivou-se linfócitos de ambos os grupos, indivíduos expostos e não expostos ao CEM, cujas células foram submetidas à radiação ionizante.

3 - Cultura temporária de linfócitos e preparação cromossômica

De cada indivíduo foram colhidos 10 ml de sangue periférico com seringa descartável e heparinizada (Liquemine Roche, 500 U/M). Os linfócitos foram cultivados em meio RPMI 1640 (Cultilab), suplementado com soro bovino fetal 15% (Cultilab), penicilina G potássica (100 UI/ml), quemisetina (5 µg/ml) segundo MOORHEAD et al., (1960), com modificações (VARELLA-GARCIA & TAJARA, 1991). Em 38 ml de meio de cultura completo adicionou-se 2 ml de plasma contendo linfócitos ressuspendidos e,



então, preparou-se três alíquotas: uma com 20 ml, a ser tratada com raios X, e duas contendo 10 ml, correspondendo ao controle do experimento.

Os frascos permaneceram sob cultivo em estufa a 37°C por 24 horas, após o que foram todos, sob as mesmas condições, conduzidos ao Instituto de Radioterapia de São José do Rio Preto, onde a alíquota com 20 ml foi submetida ao tratamento com duas doses de 75 cGy de raios X. Em seguida, retornou-se ao laboratório onde se dividiu o material tratado em duas réplicas de 10 ml. Assim, de cada indivíduo foram cultivadas quatro alíquotas: duas tratadas e duas não tratadas com raios X. Todos os frascos foram submetidos às mesmas condições de variação de temperatura quando do transporte para a exposição à radiação e, nesse período de 20 a 30 minutos, os frascos foram acondicionados em isopor contendo água a $\pm 37^{\circ}\text{C}$, com diminuição até 33°C . Em todos os frascos adicionou-se 25 μl de 5-BrdU, um análogo da timidina (Sigma) com concentração final de 16,25 μM , possibilitando a identificação dos ciclos celulares, ilustrados na Figura 5, pela incorporação desse análogo de base no DNA sintetizado *in vitro* (WOLFF & PERRY, 1974). A seguir, as culturas foram novamente incubadas à 37°C por mais 28 horas de cultivo.

Desse modo, caracterizou-se quatro grupos experimentais, a saber: linfócitos expostos ao CEM, tratados com raios X (ETx); e não tratados (ENTx) e linfócitos de indivíduos controle, tratados com raios X (CTx) e não tratados (CNTx).

A colheita foi realizada com 52 horas de cultivo, porém, aproximadamente 50 minutos antes de completar esse tempo, adicionou-se em cada frasco, 0,2 ml da solução de colchicina (Houdé) a $4,10^{-5}$ M, para interrupção

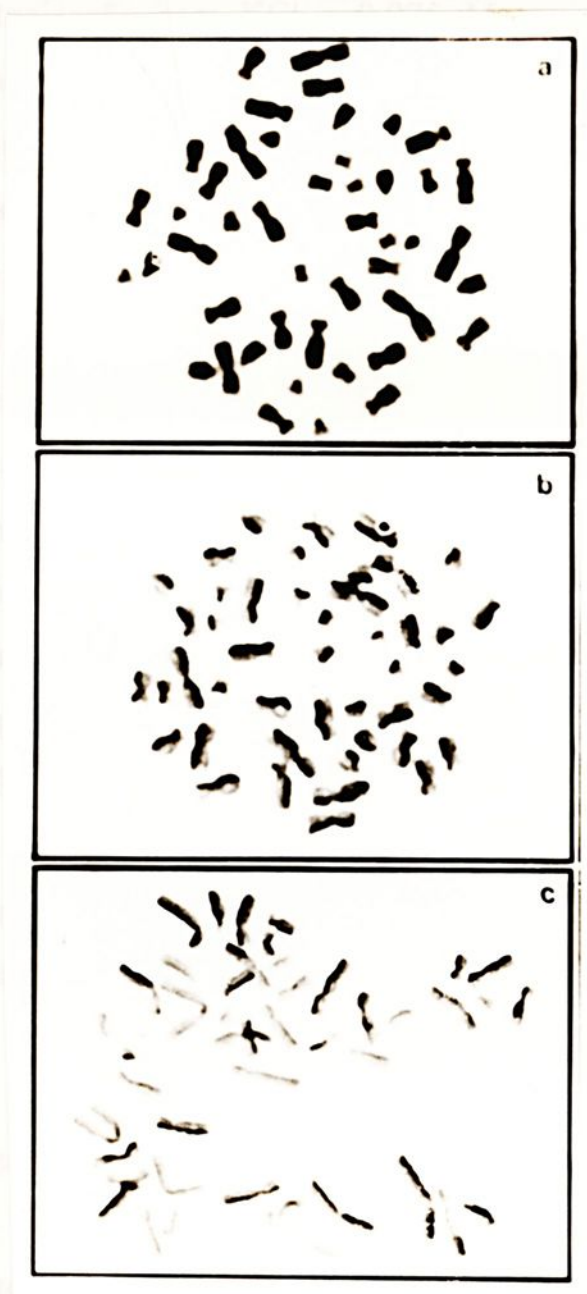


FIGURA 5 - Fotomicrografias de metáfases em primeiro (a), segundo (b) e terceiro (c) ciclos de divisão celular, obtidas pelo cultivo celular na presença de 5-bromodesoxiuridina e submetidas à coloração diferencial das cromátides-irmãs.

da divisão celular e conseqüente obtenção de células em metáfase. A seguir, realizou-se a hipotonização com KCl a 0,075 M, seguida da fixação do material com metanol e ácido acético (3:1) e da preparação das lâminas. Após secas, em temperatura ambiente, as lâminas foram envelhecidas em estufa à temperatura de 90 a 92°C, por 20 minutos.

Para a coloração diferencial das cromátides-irmãs, seguiu-se a técnica de KORENBERG & FREEDLENDER (1974) com modificações. As lâminas foram cobertas com um filme de Hoechst 33258-Sigma (LATT, 1973) preparada em solução de Hanks, à concentração de $0,94 \times 10^{-7}$, e submetidas à luz ultravioleta (Philips UV, 15 W) a uma distância de 12 cm por um tempo de 12 minutos; após a exposição, as lâminas foram lavadas em água corrente. A seguir, as mesmas foram aquecidas a temperaturas variáveis de 87 a 89°C em solução de tampão fosfato (NaH_2PO_4) 1,0 M com pH 8,1 a 8,3 por um tempo variável de 2 a 10 segundos, lavadas em água destilada e coradas em solução de Giemsa 2%, por cinco minutos (PERRY & WOLFF, 1974), com modificações. A partir de então, as lâminas foram codificadas para análise citogenética, em teste cego.

4 - Análise citogenética

O material foi analisado, objetivando-se dados quanto aos parâmetros de índice mitótico, índice de proliferação celular e freqüência de aberrações cromossômicas.

Para análise do índice mitótico pesquisou-se a proporção de células nas fases de metáfase e prometáfase em uma seqüência de 2.000 linfoblastos e para a determinação do índice de proliferação celular (IPC)



computou-se a proporção de células em primeiro, segundo e terceiro ciclos de divisão celular em 100 células, a qual foi aplicada na fórmula descrita por LAMBERTI et al. (1983), onde:

$$\text{IPC} = (1(\text{M1}) + 2(\text{M2}) + 3(\text{M3}))/100$$

Para o parâmetro aberrações cromossômicas foram analisadas metáfases exclusivamente de primeiro ciclo de divisão, e as mesmas foram classificadas de acordo com o *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN, 1985). Para tal análise, foram escolhidas metáfases de melhor qualidade, nas quais os cromossomos ou grupos cromossômicos pudessem ser identificados com segurança. A classificação do lote cromossômico foi feita com base no número do cromossomo (1, 2, 3, 16, 17, 18) ou grupo cromossômico (B, C, D, F, G).

Em relação às aberrações cromossômicas estruturais encontradas, considerou-se como quebra a situação em que o segmento cromossômico encontrava-se separado do restante do cromossomo por uma distância superior à largura da cromátide e falha quando a separação não ultrapassava a distância equivalente à largura da cromátide. Os eventos foram considerados cromatídicos (ct) quando afetavam apenas uma das cromátides e cromossômicos (cs) quando ambas as cromátides eram afetadas. Designou-se cromossomos marcadores (mar) aqueles com morfologia que não se enquadrava em qualquer das morfologias dos cromossomos normais, como resultado de rearranjos. Considerou-se adição (+) e deficiência (-) situações em que o cromossomo apresentava tamanho diferente do seu respectivo par, resultante de quebra com subsequente junção dos fragmentos ou perda do fragmento, respectivamente. Foram considerados ainda, fragmentos com ausência de centrômeros (ace) e cromossomos dicêntricos (dic) resultantes de

duas quebras em diferentes cromossomos e religação dos fragmentos, além de figuras de quatro e três braços cromossômicos e rearranjo do material genético, denominadas quadrirradiais (Qr) e trirradiais (Tr).

A análise citogenética foi realizada em microscópio Carl Zeiss, modelo Jenamed 2. Para documentação dos eventos anômalos encontrados, as metáfases foram fotografadas em microscópio Carl Zeiss, modelo Standard WL com equipamento fotográfico MC 36, usando filme Ilford Panf 50 ASA. Os negativos foram revelados em solução Kodak D-72 por dois minutos e meio, tratados com solução fixadora ácida (Kodak) por dez minutos e copiados em papel fotográfico Kodabrome F₃.

5 - Análise estatística

A comparação entre os grupos foi realizada mediante análise do número médio de alterações por célula e a frequência relativa de alterações cromossômicas estruturais. Para ambas as variáveis de interesse, inicialmente obteve-se as estatísticas descritivas: média, mediana, desvio padrão e valores de mínimo e máximo. Para a variável número médio de alterações por célula, a análise das variâncias mostrou que não havia homocedasticidade nos dados, entre os grupos, de forma que foi necessária a comparação dois a dois através do teste t-Student com variâncias diferentes. Sempre que o valor de t-calculado foi maior que o t-crítico, a diferença foi considerada significativa.

A comparação do índice mitótico entre os grupos experimentais foi realizada através do teste do qui-quadrado e para os índices de proliferação celular utilizou-se a análise de variância para comparação entre os quatro grupos experimentais.



Os testes estatísticos seguiram fórmulas apresentados por BUSSAB & MORETTIN (1985) e NETER & WASSERMAN (1984). O nível de significância para testar a hipótese de nulidade foi fixado em 5%.

Uma comparação interessante que pode ser feita pelos dados apresentados nas Tabelas 1 e 2 é quanto à frequência de alterações cromossômicas em indivíduos sob estudo e aqueles em casamentos. Pode-se observar que, com relação à idade na amostra exposta, indivíduos mais jovens (ENTx1 com 25 anos) apresentaram frequência de 2,04%, enquanto indivíduos mais velhos (ENTx10 de 56 anos) apresentaram 18,00%, portanto, acima da frequência média. Pode-se depreender, também, pelos dados das Tabelas, uma associação entre a frequência de alterações cromossômicas e o tempo de exposição aos indivíduos que foram submetidos à ação da CEM,



IV - RESULTADOS

As frequências relativas (FR) de alterações cromossômicas estruturais nos indivíduos expostos ao campo eletromagnético, não tratados com raios X, e seus respectivos controles, estão apresentadas na Tabela 2. Pode-se observar, pelos resultados obtidos, que a amostra exposta apresentou grande variabilidade interindividual quanto à esse parâmetro, com valores médios de 2,27 a 18%; ao contrário, a amostra controle apresentou maior homogeneidade. Apesar da ampla variação encontrada nos indivíduos expostos, a maioria deles apresentou elevada frequência de alterações cromossômicas, sendo que apenas os indivíduos ENTx1 e ENTx6 apresentaram frequências baixas dessas alterações, respectivamente 2,27 e 3,3%. Com isso, a amostra exposta ao CEM apresentou frequência de alterações cromossômicas significativamente mais elevada em comparação com a amostra controle, conforme resultado da análise constante da Tabela 3. Essa grande diferença pode ser visualizada graficamente na Figura 6.

Uma comparação interessante que pode ser feita pelos dados apresentados nas Tabelas 1 e 2 é quanto à frequência de alterações cromossômicas em relação à idade dos indivíduos e ao tempo de exposição. Pode-se observar que, com relação à idade, na amostra exposta o indivíduo mais novo (ENTx1 com 25 anos) apresentou uma frequência de 2,04%, muito abaixo da frequência média de amostra exposta, enquanto o indivíduo mais velho (ENTx 10 de 56 anos) apresentou uma frequência de 18,00%, portanto acima da frequência média. Pode-se depreender, também, pelos dados dessas Tabelas, uma associação entre a frequência de alterações cromossômicas e o tempo de exposição, haja vista que os indivíduos submetidos à ação do CEM,

por um período superior a 12 anos apresentaram as frequências mais elevadas de alterações cromossômicas.

Quanto aos achados referentes ao número médio de alterações cromossômicas por célula analisada, observa-se que os indivíduos expostos apresentaram 1,07 alterações por célula e os controles 0,67. Desse modo, a comparação estatística revelou diferença significativa entre as duas amostras, conforme demonstrado na Tabela 4, demonstrando que além de maior frequência de células alteradas, os indivíduos expostos ao CEM exibem maior taxa de alteração por célula.

Com relação aos tipos de alterações cromossômicas encontradas, observa-se na Tabela 5 que o grupo exposto apresentou um número maior de alterações estruturais do tipo quebra cromossômica (Figura 7), seguidas de um número menor, de eventos cromatídicos. Em proporção inferior foram encontradas falhas cromatídicas e cromossômicas, adição, cromossomos marcadores e fragmentos acêntricos, enquanto que registrou-se apenas um evento do tipo deficiência e cromossomo dicêntrico. A amostra controle apresentou maior proporção de quebras do tipo cromossômico, tendo apresentado pequena proporção de quebras e falhas cromatídicas. A Figura 8 traz a representação gráfica da ocorrência desses eventos nas duas amostras estudadas.

As frequências relativas de alterações cromossômicas estruturais nos indivíduos expostos ao CEM, cujas células foram desafiadas a reparar seu DNA pelo tratamento com raios X, juntamente com a amostra controle, estão representadas na Tabela 6. Por meio dessa tabela, pode-se avaliar, indiretamente, a resposta desses indivíduos quanto à eficiência em promover as reações de reparo nas lesões induzidas ao DNA. De modo geral, percebe-se que a amostra exposta apresentou frequência relativa de alteração



cromossômica superior à amostra controle, respectivamente, 80,14% para 62,89%. A representação gráfica desses achados consta da Figura 9. Todavia, ao se comparar estatisticamente tais frequências, as mesmas não mostraram ser significativamente diferentes (Tabela 7).

Quanto ao número médio de alterações cromossômicas encontradas por célula analisada, observa-se na Tabela 8 que a média do evento foi de 1,68 e 1,57 nos expostos e controles, respectivamente. Realizada a comparação estatística, o valor de t-calculado apresentou-se menor (1,30) que o t-crítico (2,20), de modo ser a diferença não significativa.

Com relação aos tipos de alterações encontradas, a Tabela 9 mostra que os eventos do tipo cromossomo acêntrico, quebras cromossômicas e cromossomos dicêntricos foram os mais frequentes nas duas amostras. A taxa de ocorrência, bem como a comparação de todos os eventos anômalos nas duas amostras podem ser melhor visualizadas por meio da Figura 10, onde estão representadas graficamente. Fotomicrografias das principais alterações cromossômicas encontradas no presente constam da Figura 11..

Analisou-se também os parâmetros de índices mitótico e de proliferação celular. Em relação aos valores encontrados para o índice mitótico (Tabela 10), observa-se que os indivíduos das amostras exposta e controle, tratados ou não com raios X, apresentaram diferentes proporções de células em divisão. Quando comparou-se essas proporções em cada amostra (Tabela 11), por meio do teste de qui-quadrado, ficou evidenciado que as amostras expostas ao CEM, tratadas e não tratadas com raios X, apresentaram valores significativamente inferiores em relação aos seus respectivos controles. Em adição a isso, constatou-se também que a amostra exposta ao CEM e tratada com raios X apresentou significativa redução de seu índice mitótico em comparação com a amostra exposta ao CEM porém, não tratada com raios X; observação semelhante pode ser feita em relação à amostra controle tratada e não tratada com raios X.

Para o parâmetro relativo ao índice de proliferação celular, observa-se nas Tabelas 12 e 13 as frequências absolutas de células em metáfases de primeiro (M_1), segundo (M_2) e terceiro (M_3) ciclos de divisão, para indivíduos expostos ao CEM e controle, respectivamente. Apresenta-se, ainda, o resultado do cálculo desse índice, conforme Tabela 14, onde detectou-se diferença significativa apenas quando efetuou-se a comparação entre os grupos ETx e ENTx, ou seja, a amostra exposta ao CEM e tratada com raios X apresentou significativa redução do índice de proliferação celular em comparação à amostra de indivíduos expostos ao CEM e não tratados com raios X.

ENTx1	30	47	3	6,00
ENTx2	30	47	3	6,00
ENTx3	33	32	1	3,03
ENTx7	30	40	7	14,0
ENTx8	42	44	3	10,41
ENTx9	46	39	7	13,21
ENTx11	30	41	9	18,00
TOTAL	40	402	47	10,40
ETx1	49	48	1	2,04
ETx2	30	49	1	2,90
ETx3	30	30	0	0,00
ETx4	40	43	0	0,00
ETx5	40	39	1	2,51
ETx6	30	42	2	4,00
ETx7	40	49	1	4,08
ETx8	39	30	0	0,00
ETx9	32	39	1	2,50
TOTAL	391	388	7	1,79

Tabela 2- **Frequência relativa (FR) de alterações cromossômicas estruturais nos indivíduos expostos ao CEM não tratados com raios X (ENTx) e nos seus respectivos controles (CNTx).**

AMOSTRA	Nº DE CÉLULAS ANALISADAS	Nº DE CÉLULAS NORMAIS	Nº DE ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS	FR (%)
ENTx1	44	43	1	2,27
ENTx2	24	22	2	8,30
ENTx3	50	44	9	18,00
ENTx4	50	47	3	6,00
ENTx5	50	47	3	6,00
ENTx6	33	32	1	3,03
ENTx7	50	43	7	14,0
ENTx8	48	44	5	10,41
ENTx9	46	39	7	15,21
ENTx10	50	41	9	18,00
TOTAL	445	402	47	10,46
CNTx1	49	48	1	2,04
CNTx2	50	49	1	2,00
CNTx3	50	50	0	0,00
CNTx4	43	43	0	0,00
CNTx5	40	39	1	2,50
CNTx6	50	48	2	4,00
CNTx7	40	49	1	4,08
CNTx8	30	30	0	0,00
CNTx9	39	38	1	2,50
TOTAL	391	384	7	1,70

Tabela 3- Características descritivas para os dados de frequência de alterações cromossômicas estruturais nos indivíduos expostos ao CEM não tratados com raios X (ENTx) e seus respectivos controles (CNTx) seguida da comparação estatística entre os dois grupos experimentais, segundo os dados da Tabela 2.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	N	MÉDIA	MEDIANA	DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO
ENTx	10	10,15	9,35	5,87	2,27	18,00
CNTx	9	1,90	2,04	1,61	0,0	4,08

COMPARAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	VALOR DE t -CRÍTICO	VALOR DE t -CALCULADO	SIGNIFICÂNCIA
ENTx X CNTXx	10	2,23	2,33	$p < 0,05$

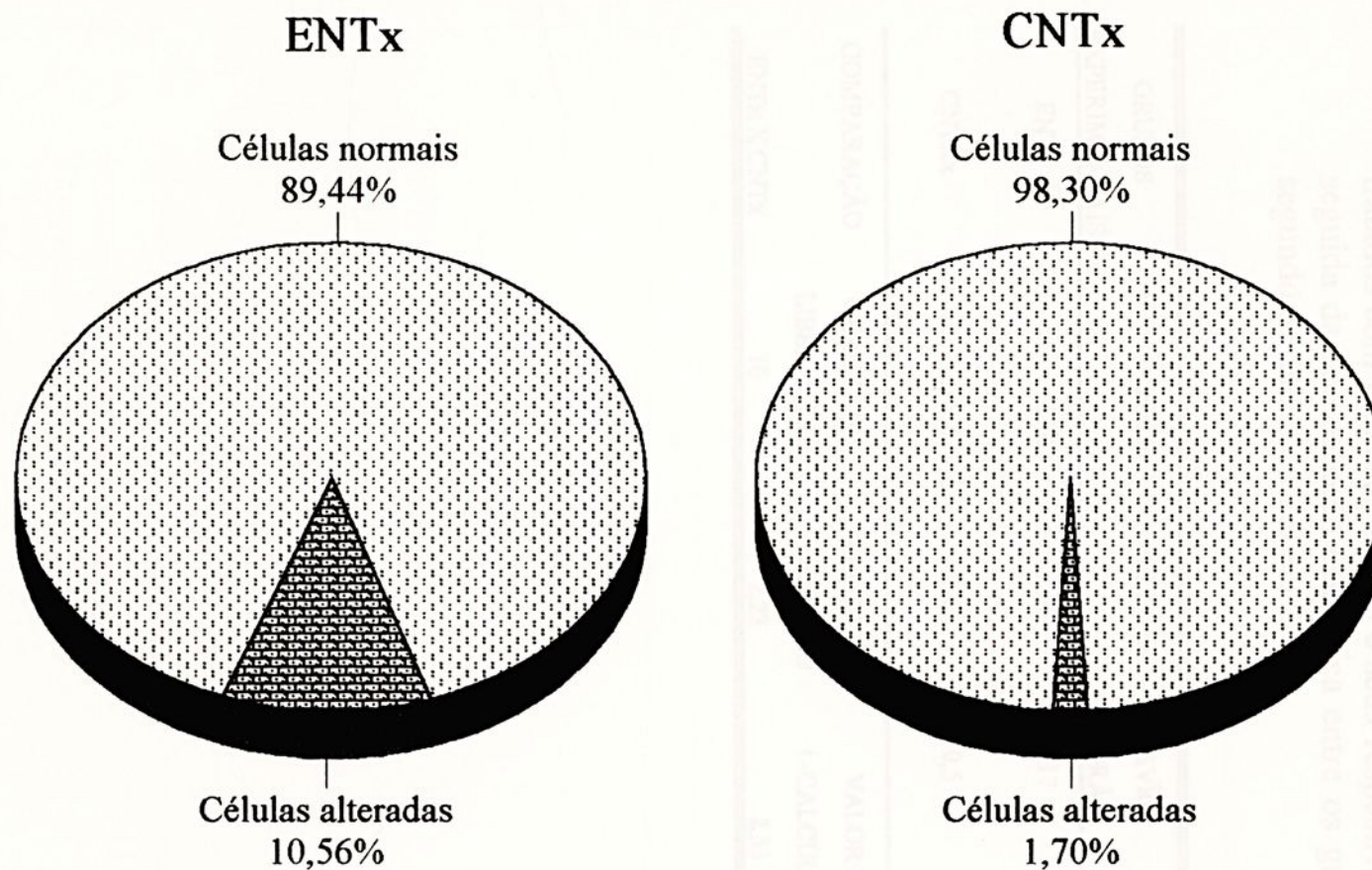


FIGURA 6 - Representação gráfica da frequência relativa (FR) de alterações cromossômicas estruturais nos indivíduos expostos ao CEM, não tratados com raios-x (ENTx) e seus respectivos controles (CNTx) conforme os dados da Tabela 2.

Tabela 4- Características descritivas do número médio de alterações cromossômicas por célula nos indivíduos expostos ao CEM não tratados com raios X (ENTx) e seus respectivos controles (CNTx) seguida da comparação estatística entre os grupos experimentais, segundo os dados da Tabela 2.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	N	MÉDIA	MEDIANA	DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO
ENTx	10	1,07	1,00	0,17	1,00	1,50
CNTXx	9	0,67	1,00	0,5	0,00	1,00

COMPARAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	VALOR DE t -CRÍTICO	VALOR DE t -CALCULADO	SIGNIFICÂNCIA
ENTx X CNTx	10	2,23	2,33	P < 0,05

Tabela 5- Tipos de alterações cromossômicas estruturais encontradas nos indivíduos expostos ao CEM não tratados com raios X (ENTx) e controles (CNTx).

AMOSTRA	Ctb	Csb	Ctg	Csg	Ad	Del	Mar	Ace	Dic	Total
ENTx1	--	1	--	--	--	--	--	--	--	1
ENTx2	--	--	--	1	1	--	--	--	--	2
ENTx3	1	4	--	--	1	--	2	1	--	9
ENTx4	1	--	1	--	1	--	--	--	--	3
ENTx5	--	1	1	--	--	1	--	--	--	3
ENTx6	--	1	--	--	--	--	--	--	--	1
ENTx7	--	2	--	--	1	--	1	1	--	5
ENTx8	1	3	--	--	--	--	1	--	--	5
ENTx9	1	3	--	--	--	--	--	1	1	6
ENTx10	2	2	2	3	--	--	--	--	--	9
TOTAL	6	17	4	4	4	1	4	3	1	44
CNTx1	--	1	--	--	--	--	--	--	--	1
CNTx2	--	1	--	--	--	--	--	--	--	1
CNTx3	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0
CNTx4	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0
CNTx5	--	1	--	--	--	--	--	--	--	1
CNTx6	1	1	--	--	--	--	--	--	--	2
CNTx7	--	--	2	--	--	--	--	--	--	2
CNTx8	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0
CNTx9	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0
TOTAL	1	4	2	--	--	--	--	--	--	7

Ctb-quebra cromatídica

Csb-quebra cromossômica

Ctg-falha cromatídica

Csg-falha cromossômica

Ad-adição

Del-deficiência

Mar-cromossomo marcador

Ace-fragmento acêntrico

Dic-cromossomo dicêntrico

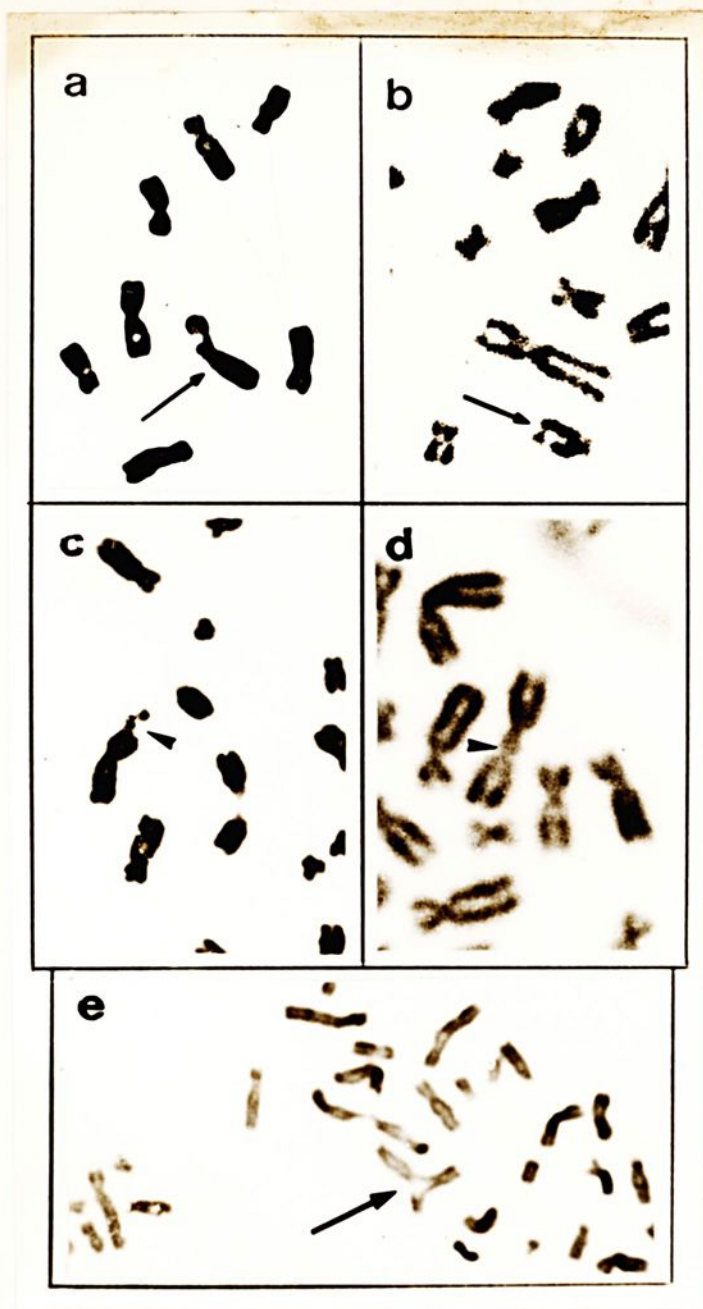


FIGURA 7- Fotomicrografias de metáfases parciais evidenciando alguns tipos de alterações estruturais encontradas em linfócitos de indivíduos expostos ao CEM, não tratados com raios X: quebra cromatídica (a, b); quebra cromossômica (c, d); figura trirradial (e).

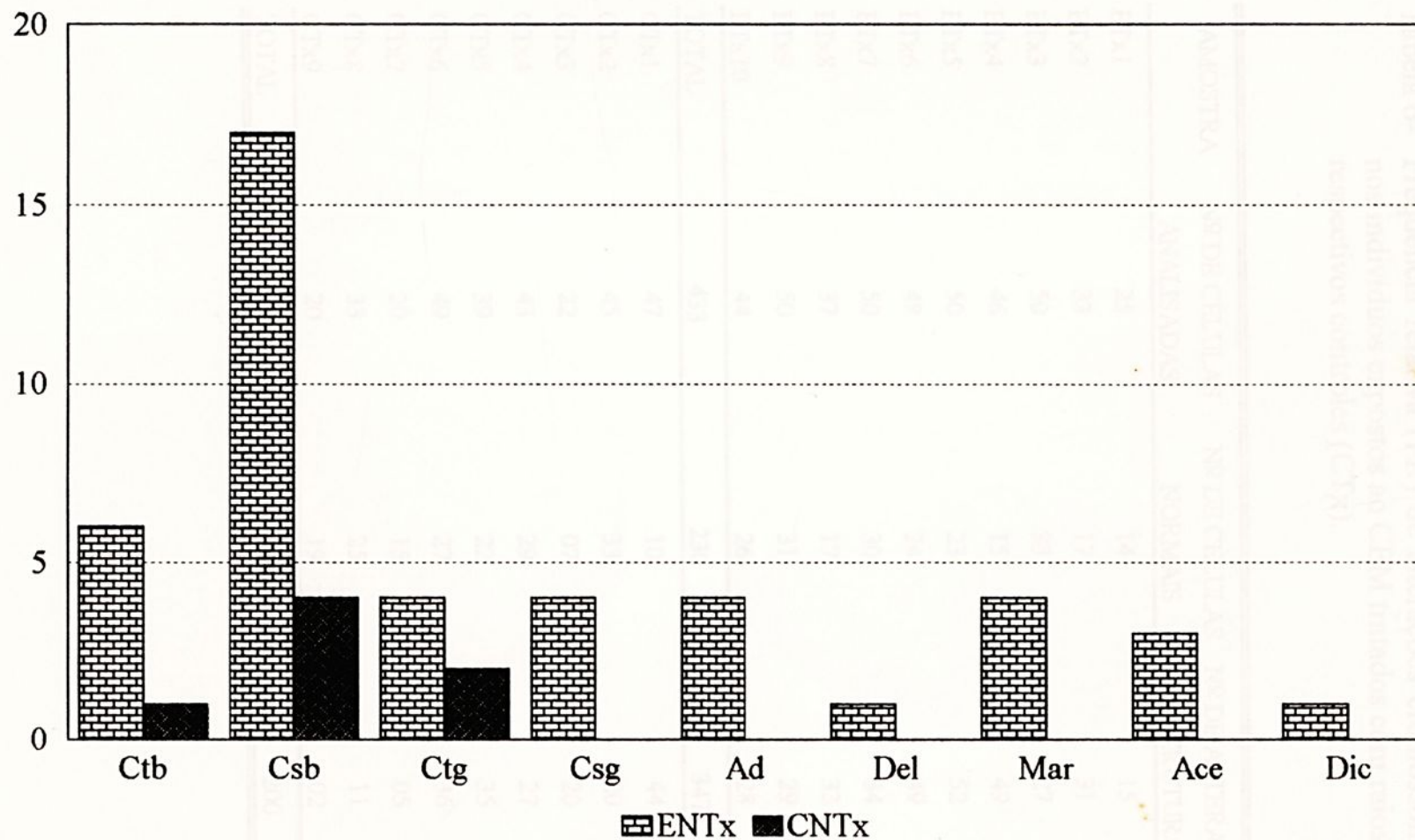


FIGURA 8 - Representação gráfica dos tipos de alterações cromossômicas estruturais encontradas nos indivíduos expostos ao CEM, não tratados com raios X (ENTx) e seus respectivos controles (CNTx), conforme os dados da Tabela 5.

Tabela 6- Frequência relativa (FR) de alterações cromossômicas estruturais nos indivíduos expostos ao CEM tratados com raios X (ETx) e seus respectivos controles (CTx).

AMOSTRA	Nº DE CÉLULAS ANALISADAS	Nº DE CÉLULAS NORMAIS	Nº DE ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS	FR (%)
ETx1	25	14	15	60,0
ETx2	33	17	31	93,9
ETx3	50	33	27	54,0
ETx4	46	15	49	104,0
ETx5	50	23	52	104,0
ETx6	48	24	49	102,0
ETx7	50	30	34	68,0
ETx8	37	17	33	89,0
ETx9	50	31	29	58,0
ETx10	44	26	28	63,0
TOTAL	433	230	347	80,14
CTx1	47	10	44	93,6
CTx2	45	33	20	44,4
CTx3	22	07	20	90,6
CTx4	43	29	27	62,7
CTx5	39	22	35	89,7
CTx6	49	27	36	73,4
CTx7	20	15	05	25,0
CTx8	33	25	11	33,3
CTx9	20	19	02	10,0
TOTAL	318	187	200	62,89

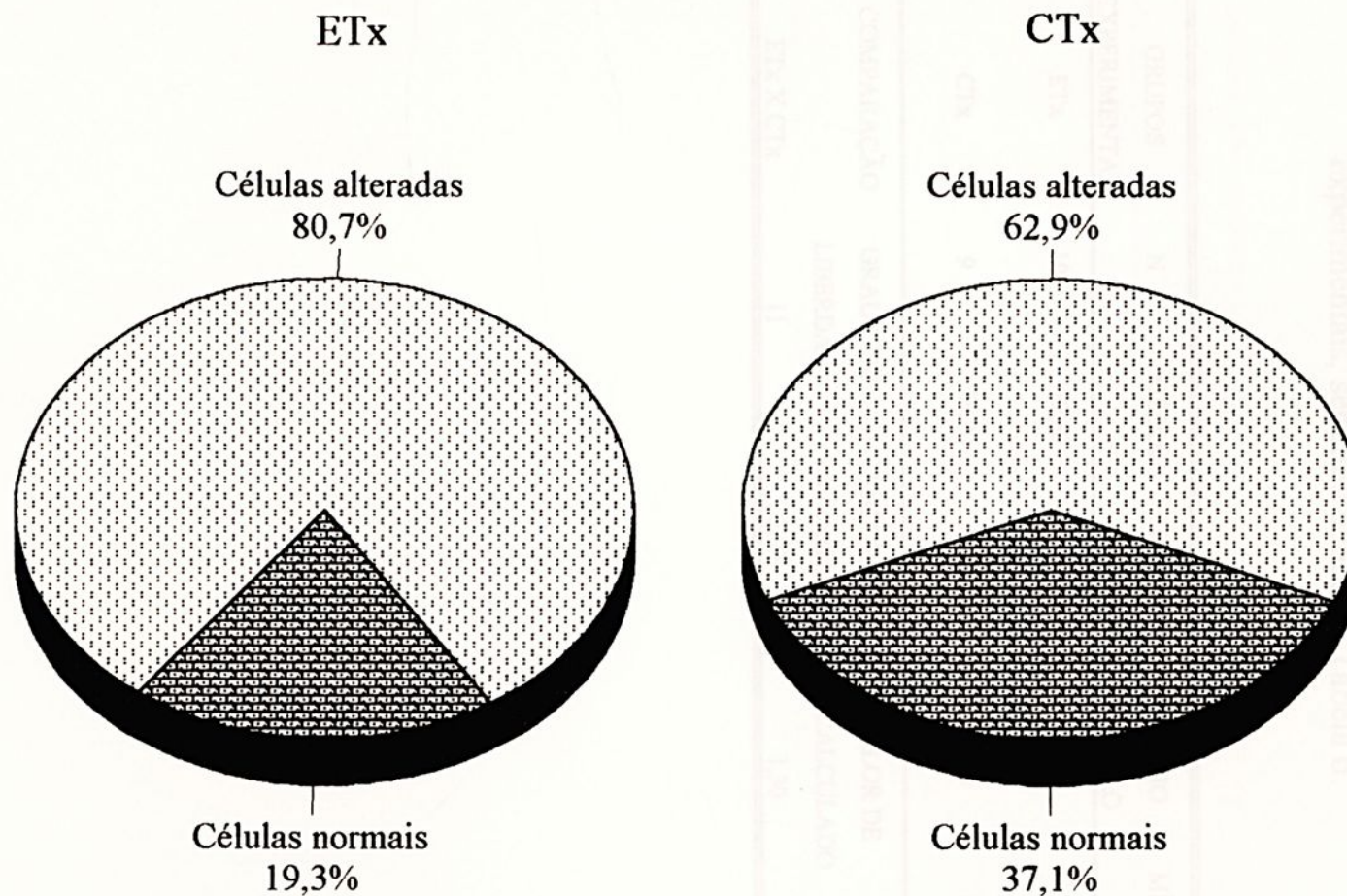


FIGURA 9: Representação gráfica da freqüência relativa de alterações cromossômicas estruturais em linfócitos de indivíduos expostos ao CEM (ETx) e controle (CTx), tratados com raios X.

Tabela 7- Estatísticas descritivas para os dados de frequência relativa das alterações cromossômicas estruturais nos indivíduos expostos ao CEM (ETx) e seus respectivos controles (CTx) tratados com raios X, seguida da comparação estatística entre os grupos experimentais, segundo dados da Tabela 6.

GRUPOS	N	MÉDIA	MEDIANA	DESVIO	MÍNIMO	MÁXIMO
EXPERIMENTAIS				PADRÃO		
ETx	10	79,60	78,55	20,83	54,00	104,00
CTx	9	58,20	62,70	31,10	10,00	93,60
COMPARAÇÃO	GRAUS DE	VALOR DE	VALOR DE	SIGNIFICÂNCIA		
	LIBERDADE	t -CRÍTICO	t -CALCULADO			
ETx X CTx	11	2,20	1,30	p > 0,05		

Tabela 8- Características descritivas do número médio de alterações cromossômicas por célula nos indivíduos expostos ao CEM (ETx) e seus respectivos controles (CTx) tratados com raios X, seguida da comparação estatística entre os grupos experimentais, segundo os dados da Tabela 6.

GRUPOS	N	MÉDIA	MEDIANA	DESVIO	MÍNIMO	MÁXIMO
EXPERIMENTAIS				PADRÃO		
ETx	10	1,68	1,61	0,21	1,36	2,04
CTXx	9	1,57	1,63	0,37	1,00	2,05
COMPARAÇÃO	GRAUS DE	VALOR DE	VALOR DE	SIGNIFICÂNCIA		
	LIBERDADE	t-CRÍTICO	t-CALCULADO			
ETx X CTx	11	2,20	1,30	p > 0,05		

ETx - testes cromossômicos

CTx - testes cromossômicos

CTx - testes cromossômicos

CTx - testes cromossômicos

Ad - prólio

Del - deficiência

Tr - figura triangular

Q - figura quadrada

Met - metacentro

Acro - braço acromático

Dist - cromossomo distal

Cent - cromossomo central

Tabela 9- Tipos de alterações cromossômicas estruturais encontradas nos indivíduos expostos ao CEM (ETx) e controles (CTx) tratados com raios X.

AMOSTRA	Ctb	Csb	Ctg	Csg	Ad	Del	Tr	Qr	Mar	Ace	Dic	R	Total
ETx1	1	3	--	1	--	--	1	1	1	5	2	3	18
ETx2	1	11	1	1	2	--	1	1	1	8	4	1	32
ETx3	3	3	--	--	1	3	1	1	3	12	3	1	31
ETx4	3	7	--	--	1	5	1	1	2	17	4	2	43
ETx5	--	8	--	1	1	2	1	1	1	25	9	1	50
ETx6	--	7	1	1	1	2	1	1	3	28	5	1	50
ETx7	--	6	--	--	1	4	1	1	4	14	2	1	34
ETx8	1	13	--	--	1	2	--	--	--	14	1	--	32
ETx9	5	5	2	--	--	2	--	--	--	13	2	1	30
ETx10	--	--	3	2	1	1	--	--	1	17	1	1	27
TOTAL	14	63	7	6	9	21	7	7	16	153	33	12	347
CTx1	7	18	--	1	1	2	1	1	3	33	8	3	77
CTx2	--	--	--	--	3	3	--	--	2	8	3	--	19
CTx3	--	4	--	--	--	--	--	--	2	8	2	2	18
CTx4	1	2	--	--	--	--	--	--	2	13	2	--	20
CTx5	--	13	--	--	1	--	--	--	1	6	6	1	28
CTx6	--	1	1	--	--	--	--	--	4	20	3	1	30
CTx7	--	--	--	--	--	--	--	--	1	1	--	--	2
CTx8	1	--	--	--	--	1	--	--	--	1	1	--	4
CTx9	1	--	--	--	--	--	--	--	--	1	--	--	2
TOTAL	10	38	1	1	5	6	1	1	15	91	25	7	200

Ctb - quebra cromatídica
 Csb - quebra cromossômica
 Ctg - falha cromatídica
 Csg - falha cromossômica

Ad - adição
 Del - deficiência
 Tr - figura trirradial
 Qr - figura quadrirradial

Mar - marcador
 Ace - fragmento acêntrico
 Dic - cromossomo dicêntrico
 R - cromossomo em anel

Tabela 10 - Valores dos índices mitóticos obtidos para os indivíduos do sistema de avaliação de suscetibilidade ao câncer de mama expostos ao CPM e tratados, expostos ou não aos raios X.

	AMOSTRAS			
	EXPOSTOS		CONTROLES	
	(xP metáfases 1000 linfócitos)		(xP metáfases 1000 linfócitos)	
	Tx	NTx	Tx	NTx
E1	34	59	27	36
E2	16	28	108	131
E3				
E4				
E5				
E6				
E7				
E8				
E9				
E10				



FIGURA 11- Fotomicrografias de metáfases parciais evidenciando alguns tipos de alterações cromossômicas estruturais encontradas nos indivíduos expostos e tratados: cromossomos dicêntricos (a); cromossomos em anel (b); fragmento acêntrico (c)

COMPARAÇÕES	GRUPO EXPOSTO	GRUPO CONTROLE
ONTx X INTx	30,641	p=0,005
CTx X INTx	15,492	p=0,005
ENTx X INTx	49,711	p=0,005
ONTx X CTx	67,653	p=0,005

Tabela 10 - Valores dos índices mitóticos para os indivíduos da amostra de expostos ao CEM e controles, expostos ou não aos raios X.

AMOSTRAS					
EXPOSTOS (nº metáfases/1000 linfoblastos)			CONTROLES (nº metáfases/1000 linfoblastos)		
	Tx	NTx		Tx	NTx
E1	54	50	C1	23	36
E2	16	29	C2	104	151
E3	08	63	C3	02	20
E4	15	69	C4	27	28
E5	36	15	C5	10	17
E6	37	66	C6	27	38
E7	09	09	C7	96	113
E8	54	90	C8	19	85
E9	20	30	C9	20	80
E10	16	29			

Tabela 11- Comparação dos índices mitóticos obtidos para os grupos experimentais expostos ao CEM e controles, tratados e não tratados com raios X, utilizando-se o teste do qui-quadrado.

COMPARAÇÕES	QUI-QUADRADO	SIGNIFICÂNCIA
CNTx X ENTx	30,641	$p < 0,005$
CTx X ENTx	15,492	$p < 0,005$
ENTx X ETx	49,711	$p < 0,005$
CNTx X CTx	67,653	$p < 0,005$

Tabela 12- Frequências absolutas de metáfases nos diferentes ciclos de divisão celular, em 100 metáfases analisadas, apresentando-se os respectivos índices de proliferação celular (IPC), obtidos para indivíduos expostos ao CEM..

AMOSTRA	M1	M2	M3	IPC
E1 Tx	62	09	0	0,80
NTx	55	45	0	1,45
E2 Tx	76	04	0	0,84
NTx	55	45	0	1,45
E3 Tx	93	03	0	0,99
NTx	72	28	0	1,28
E4 Tx	97	17	0	1,31
NTx	64	37	0	1,36
E5 Tx	95	05	0	1,05
NTx	67	33	0	1,33
E6 Tx	93	05	0	1,03
NTx	70	30	0	1,30
E7 Tx	79	01	0	0,81
NTx	79	24	0	1,27
E8 Tx	88	02	0	0,92
NTx	95	05	0	1,05
E9 Tx	60	01	0	0,62
NTx	81	19	0	1,19
E10 Tx	99	01	0	0,01
NTx	94	07	0	1,08

Tabela 13- Frequências absolutas de metáfases nos diferentes ciclos de divisão celular, em 100 metáfases analisadas, apresentando-se os respectivos índices de proliferação celular (IPC), obtidos para indivíduos controle.

AMOSTRA	M1	M2	M3	IPC (%)
C1 Tx	93	07	00	1,07
NTx	58	42	00	1,42
C2 Tx	38	36	26	1,88
NTx	15	63	26	2,19
C3 Tx	90	10	00	1,10
NTx	80	45	00	1,70
C4 Tx	96	04	00	1,04
NTx	91	09	00	1,09
C5 Tx	96	04	00	1,04
NTx	83	17	00	1,17
C6 Tx	95	05	00	1,05
NTx	60	40	00	1,40
C7 Tx	54	46	00	1,46
NTx	65	35	00	1,35
C8 Tx	15	01	00	0,17
NTx	99	05	00	1,09
C9 Tx	90	06	00	1,02
NTx	80	12	00	1,04



Tabela 14- Estatística descritiva obtidas para o índice de proliferação celular dos diferentes grupos experimentais, complementada pela análise de variância (ANOVA) para comparação entre esses grupos, segundo os dados das Tabelas 11 e 12.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	N	MÉDIA	MEDIANA	DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO
ETx	10	0,008	0,009	0,003	0,0001	0,013
ENTx	10	0,013	0,013	0,001	0,011	0,015
CTx	09	0,011	0,011	0,005	0,002	0,019
CNTx	09	0,014	0,014	0,037	0,010	0,022
COMPARAÇÃO	ESTATÍSTICA F			SIGNIFICÂNCIA		
CNTx X ENTx	0,74			p>0,05		
CTx X ETx	1,94			p>0,05		
CNTx X CTx	2,25			p>0,05		
ETx X ENTx	13,95			p<0,05		

V - DISCUSSÃO

A exposição a diversos agentes físicos ou compostos químicos pode induzir alterações no material genético (CARRANO & NATARAJAN, 1988) que compreendem mudanças na localização dos genes nos cromossomos, no número de genes nos cromossomos ou no número de cromossomos. Tais alterações podem atingir células germinativas ou suas precursoras, resultando em anomalias cromossômicas constitucionais na descendência dos afetados; quando o alvo são as células somáticas, o resultado pode ser a morte do portador ou a diminuição da função celular, contribuindo, assim, para os processos envolvidos na transformação neoplásica.

Todavia, existem os mecanismos enzimáticos de reparo do DNA nas células humanas, assim como na maioria das células de procarioto e eucarioto, que reconstituem o DNA lesado antes da sua duplicação ou restauram a sequência original após a duplicação. Esses processos, em geral, envolvem o reconhecimento do local lesado e a substituição da sequência anômala do DNA pela original, e ocorrem por vários mecanismos distintos.

O processo de reparo de quebras no DNA corrige lesões que ocorrem em uma única fita e na dupla hélice da molécula, tais lesões podem ser causadas diretamente por radiação ionizante ou por um grande número de compostos químicos ou ainda indiretamente durante alguns processos de reparo. O número de quebras em uma hélice ou na fita dupla da molécula de DNA varia com o tipo de radiação usada. As quebras são reparadas de forma relativamente rápida em células cultivadas de mamíferos, quebras na dupla hélice, por exemplo, têm cerca de dez minutos de vida média (VAN ZEELAND, 1984).



O processo de fotorreativação é um dos mecanismos que a célula utiliza para reparação de danos ao DNA. Esse processo atua sobre uma lesão clássica, os dímeros de pirimidina de ciclobutano, formados pela fusão de bases pirimídicas adjacentes na molécula de DNA pela absorção da luz ultravioleta, de comprimento de onda germicida. O processo é mediado pela enzima fotoliase, a qual age rompendo a ligação ciclobutano entre as duas pirimidinas e ocorre basicamente, quando a enzima se liga na seqüência de DNA contendo bases adjacentes ligadas anormalmente denominada o dímero, o que ocorre mesmo na ausência da luz, gerando o complexo DNA-enzima. Este, quando iluminado, absorve a luz visível e se dissocia, sendo então liberados o DNA reparado e a enzima, podendo esta última atuar em outros sítios nos quais ainda existam dímeros. A enzima fotoliase já foi identificada em procariontes e eucariontes, inclusive em células humanas; entretanto, apesar dos inúmeros estudos, a real contribuição desse mecanismo ainda permanece obscura (HANAWALT et al., 1979; THIELMANN, 1984; VAN ZEELAND, 1984; LEITÃO & GOMES, 1987).

Há mais de duas décadas, o isolamento de mutantes de *Escherichia coli*, bastante sensíveis à radiação, levou à proposição da existência de outro mecanismo de reparo independente da iluminação e que, nesses mutantes, seria deficiente. Por essa razão, esse mecanismo foi inicialmente denominado de reparo no escuro ("dark-repair"), sendo hoje conhecido como reparo por excisão ou reparo por excisão-ressíntese. Este é, provavelmente, o mecanismo mais importante de eliminação de lesões foto, radio ou quimioinduzidas, não somente em bactérias mas também em células de mamíferos, inclusive no homem. É um tipo de reparo muito eficiente não somente para dímeros de pirimidina, como também em danos induzidos por radiação ionizante, bases quimicamente alteradas e ligação cruzada. Seu

princípio é simples. Na etapa inicial é efetuada uma incisão adjacente ao sítio danificado na molécula de DNA por uma endonuclease; a seguir ocorre a excisão do segmento contendo a região lesada, mediada por uma exonuclease. A reconstituição da molécula no local danificado, feita pela DNA polimerase usando o segmento intacto como molde, constitui a etapa seguinte, quando a porção reconstituída é então ligada à molécula pela enzima ligase. Este tipo de reparo somente é possível em regiões da molécula onde existe a dupla hélice do DNA, obviamente não podendo operar sobre regiões de fita simples, tais como as forquilhas de replicação onde as fitas parentais estão separadas (HANAWALT et al., 1979; HOWARD-FLANDERS, 1981; THIELMANN, 1984; VAN ZEELAND, 1984; LEITÃO & GOMES, 1987).

Um outro mecanismo dito de reparo é a resposta adaptativa e ela ocorre quando células de procariontes e eucariontes são incubadas em concentrações reduzidas de determinados agentes químicos, podendo-se tornar mais resistentes a tratamentos posteriores, mediante concentrações mais elevadas do mesmo agente. O fenômeno é explicado pelo acúmulo intracelular de uma ou mais enzimas capazes de eliminar lesões provocadas ao DNA pelo tratamento, reduzindo assim, seus efeitos letais ou mutagênicos. Para que a resposta adaptativa se expresse é indispensável que a célula possa sintetizar proteínas após o primeiro tratamento, dito indutor. Desde que foi descrita pela primeira vez em bactérias (SANSON & CAIRNS, 1987) por indução de agentes alcalinos, a resposta adaptativa tem sido extensivamente estudada em linfócitos humanos expostos a doses muito baixas de radiação ionizante, cerca de 0,01 Gy de raios X (HOWARD-FLANDERS, 1981; THIELMANN, 1984; FROSINA & ABBONDANDOLO, 1985; WIENCKE et al., 1986; IKUSHIMA, 1987; LEITÃO & GOMES, 1987; SHADLEY & WOLFF, 1987; SHADLEY et al., 1987; BOSI & OLIVIERE, 1989;

SANKARANARAYANAN et al., 1989; WANG et al., 1991). Apesar disso, os mecanismos moleculares desse processo ainda não estão muito bem esclarecidos, além do que, há controvérsias de que o reparo adaptativo ocorra em células de mamíferos de forma análoga à descrita em *Escherichia coli* (HANAWALT et al., 1979; THIELMANN, 1984).

A resposta SOS também é uma situação disponível para reparar lesões induzidas ao DNA e diz respeito a um conjunto de reações que ocorre quando uma célula é exposta a condições adversas que, de alguma forma, interferem no seu material genético, lesando-o ou alterando as reações de duplicação, ou ainda aumentando a taxa de mutagenicidade. Nos mamíferos, ainda não se tem confirmação da ocorrência da resposta SOS, no entanto, quando células de eucariontes são expostas a situações de estresse, tem-se observado aumento na atividade de reparo do DNA. É possível, portanto, que nesses organismos exista um sistema tipo SOS para atender a situações de emergência (RADMAN, 1980; HERRLICH et al., 1984; LEITÃO & GOMES, 1987); no entanto, HALL et al.(1993), por exemplo, demonstraram o aparecimento rápido da proteína Tp53 na epiderme após exposição de células humanas expostas a radiação ultra violeta, indicando mecanismo semelhante a resposta SOS.

Existe, ainda, um mecanismo comumente denominado de reparo pós-duplicação, termo pouco apropriado, visto que, nesse caso, não ocorre realmente um reparo da lesão na molécula de DNA, e sim a duplicação do material genético, apesar da lesão. Basicamente, o mecanismo ocorre da seguinte forma: na célula exposta ao agente indutor de danos ao DNA, os segmentos das cadeias parentais da molécula que não sofreram alteração duplicam-se normalmente até no ponto onde as duas cadeias parentais estão desenroladas pela presença do dímero que não foi eliminado. Em seguida, a

síntese da nova cadeia é interrompida e reinicia-se algumas bases após o dímero e, como resultado, são formadas falhas pós duplicação na cadeia filha. Essas falhas não podem ser reparadas pelo mecanismo de excisão, pois este requer uma cadeia complementar intacta como molde e isso não ocorre na situação descrita, na qual uma cadeia tem a falha e a outra possui o dímero. Portanto, este processo atua pela combinação entre a cadeia com a falha e a cadeia bicatenária irmã, além da participação da proteína denominada Rec A. O preenchimento da falha é realizado com base no molde de DNA não danificado da cadeia parental, auxiliado pela proteína Rec A que se une à região unicatenária contendo o dímero, e dispõe-se frente à região homóloga da cadeia bicatenária irmã. Quando se concretiza o pareamento homólogo, uma enzima corta um dos filamentos da cadeia bicatenária normal, a proteína Rec A se liga à extremidade livre da cadeia parental da molécula bicatenária, originando um intercâmbio de cadeias-irmãs e, a seguir, a DNA polimerase regenera o segmento cortado da molécula que era normal com base na cadeia complementar. Com a sequência correta na frente do dímero e com a proteína Rec A liberada, as enzimas do reparo por excisão podem, então, eliminá-lo; finalmente, uma enzima corta o sítio de intercâmbio entre as cadeias das moléculas irmãs e o processo termina com duas moléculas bicatenárias de DNA normais (HOWARD-FLANDERS, 1981).

Apesar da existência desses mecanismos, a exposição a agentes genotóxicos pode interferir na eficiência em que se processam as reações de reparo do DNA. Em adição, observa-se uma grande variabilidade interindividual quanto à capacidade de remover as lesões induzidas no material genético. Tais fatos constituem indícios de fundamental importância no desenvolvimento de neoplasias (OESCH et al., 1987).



Os erros no reparo de lesões, induzidas ou espontâneas, geralmente convertem danos inócuos em lesões mais complexas, as quais podem, a longo prazo, afetar o seu portador. É aceitável que a infidelidade no reparo do DNA proporciona instabilidade no genoma, o que possibilita a ocorrência de significantes alterações genéticas no desenvolvimento do câncer. Esse fato foi observado, por exemplo, nos genes Tp53 em células expostas a concentrações não genotóxicas do níquel (MAEHLE et al., 1992). São também consistentes com essa hipótese os dados que comprovam aumento no risco para o desenvolvimento de câncer entre pacientes com defeitos no mecanismo de reparo do DNA e/ou síndromes de instabilidade cromossômica (LEHMANN, 1981; HANAWALT & SARASIN, 1986; LEHMANN & NORRIS, 1989); por conseguinte, essa deficiência no reparo pode contribuir para a produção de alterações genéticas múltiplas e seqüenciais, dentro da mesma célula por adaptação clonal e progressão de células anormais (WEINBERG, 1989; FEARON & VOGELSTEIN, 1990; LOEB, 1991; FARBER & RUBIN, 1991).

O teste proposto por AU et al.. (1991) objetiva avaliar a eficiência do mecanismo de reparo baseado exatamente na hipótese de que a infidelidade nesse mecanismo é causa de instabilidade genética que conduz a um fenótipo mutante, o qual pode favorecer o desenvolvimento de neoplasias (AU, 1993). Tal metodologia tem sido proposta com bastante eficiência (AU et al., 1991; 1992) na predição de riscos em indivíduos ocupacionalmente expostos. Assim sendo, no presente estudo, objetivou-se o emprego deste teste a fim de se avaliar a eficiência no mecanismo de reparo em indivíduos ocupacionalmente expostos ao CEM. Para tanto, foi necessário avaliar também a ação do campo eletromagnético no material genético desses indivíduos.

Há poucos estudos de exposição ocupacional ao campo eletromagnético de frequência extremamente baixa utilizando a metodologia citogenética. O ponto inicial para avaliar o CEM como agente de risco à saúde humana foi dado pelo estudo epidemiológico realizado por NORDSTROM et al. (1983), cujos resultados evidenciaram uma frequência aumentada de malformação congênita na descendência de trabalhadores expostos. Seguiram-se os estudos realizados por BAUCHINGER et al. (1981) e NORDENSON et al. (1984), ambos com abordagem citogenética e cujos resultados são contraditórios, pois somente o último evidencia um efeito genotóxico do CEM, corroborado posteriormente por VALJUS et al. (1993).

Existem relatos de trabalhos desenvolvidos com exposição *in vitro* ao CEM. KHALIL & QASSEM (1991) realizaram exposição experimental e constataram que o CEM induz um tipo de lesão no DNA que leva à produção de aberrações cromossômicas, achados esses coincidentes com COHEN et al. (1986) em linfócitos expostos ao CEM de 60 Hz e por D' AMBROSIO et al. (1985) que efetuaram a exposição de linfócitos de bovinos ao campo elétrico. Entretanto, NORDENSON et al. (1984b), que também realizaram estudos sobre exposição *in vitro* ao CEM, e ROSENTHAL & OBE (1989), não detectaram indução de danos cromossômicos em linfócitos humanos.

No presente estudo, o CEM mostrou-se clastogênico, fato que pode ser depreendido pela elevada frequência de alterações cromossômicas encontrada nos indivíduos expostos. Costatou-se elevada frequência de alterações cromossômicas estruturais no grupo dos indivíduos expostos ao CEM não tratados com raios X; diferença significativa também foi observada considerando-se o número médio de alterações por célula. Considerando esses achados, o evento mais freqüente foi do tipo quebra cromossômica, o que demonstra ter havido erros durante a duplicação do DNA ou deficiência nos

mecanismos de reparo. Um outro fato relevante foi o registro de eventos do tipo adição, fragmentos acêntricos e cromossomos marcadores classificados também como eventos instáveis que levam à morte celular.

Observou-se ainda que o grupo exposto ao agente em teste, apresentou considerável variabilidade interindividual quanto à frequência de alterações cromossômicas (2,27 a 18 %), essa diferença, no entanto, não foi observada no controle (0 a 2,0 %). Não se pode concluir, com segurança, a respeito da relação entre frequência de alterações cromossômicas e tempo de exposição ao CEM; o que se pode dizer é que altas frequências de anomalias foram encontradas em quase todos os indivíduos com tempo prolongado de exposição. A continuação deste estudo, com conseqüente ampliação da amostra fornecerá subsídios para uma conclusão mais segura.

A principal abordagem deste estudo foi a avaliação do mecanismo de reparo do DNA em células cultivadas de indivíduos expostos ocupacionalmente ao CEM, e submetidas ao "challenge assay" que consiste em desafiar o DNA a reparar lesões induzidas. Com relação a esta resposta, verificou-se que os indivíduos expostos ao CEM apresentaram, em número absoluto uma incidência mais elevada de alteração cromossômica em comparação ao grupo controle, todavia, a comparação estatística não demonstrou diferenças, provavelmente em decorrência do tamanho da amostra.

A literatura é escassa sobre avaliação do processo de reparo do DNA submetido ao CEM. COSSARIZA et al. (1989) constaram que o CEM não afetou a síntese de DNA, sugerindo que este tipo de radiação considerada não ionizante e à qual os seres humanos estão constantemente expostos, não interferiu no mecanismo de reparo do DNA. Em outro estudo, CHAHAL et al. (1993) utilizando *E. coli* observaram que o CEM não aumentou a frequência de mutações espontâneas, bem como não teve efeito sobre as reações de reparo

do DNA, nem atuou como agente sinérgico na indução de mutagenicidade causada por radiação ultra-violeta e mitomicina C. Do mesmo modo, REESE et al. (1988) não encontraram diferença significativa expondo células de ovário de hamster chinês ao campo elétrico e/ou magnético, quando da comparação com o controle positivo tratado com raios X. Segundo esses autores, embora o DNA não pareça ser diretamente danificado pela exposição, quaisquer dos muitos mecanismos indiretos podem contribuir para as relações entre o CEM e a incidência de leucemia. Um desses mecanismos, que necessita investigação, é a possibilidade do CEM alterar a razão ou o tipo das reações envolvidas no mecanismo que opera os danos em células expostas.

Alguns fatores podem atuar como efetivos promotores de alterações cromossômicas, razão pela qual escolheu-se como amostra indivíduos, cujo estilo de vida não interferisse nos resultados obtidos por exposição a agentes como álcool, fumo, inseticida, raios X, infecção virótica. Somente a amostra exposta relatou exposição esporádica a produtos químicos como verniz, usado mensalmente, tinta utilizada uma vez por semana e, anualmente, a produtos de manutenção de equipamentos, cujos componentes incluem álcoois, cetonas e hidrocarbonetos aromáticos. Desse modo, pode-se concluir que a ação desses compostos não interferiu nos resultados obtidos, pois a sua utilização pelos indivíduos expostos ao CEM pode ser comparada à da população geral.

A ocorrência de câncer, aborto e malformações congênitas na família, foram relatados por quatro indivíduos da amostra exposta ao CEM, porém em nenhum dos casos em descendentes desses.

Sobre a cinética do ciclo celular COHEN et al. (1986) não detectaram em seus experimentos aumento na taxa de proliferação celular, enquanto KHALIL & QASSEN (1991) estudando os efeitos do CEM em

culturas de linfócitos humanos, encontraram que, em células submetidas à exposição contínua e cultivadas em torno de 72 horas ocorreu diminuição dos índices mitótico e de proliferação celular, sendo que o mesmo não aconteceu em culturas cultivadas por 24 e 48 horas. Ao contrário desses achados, ROSENTHAL & OBE (1989) sugeriram que a exposição ao CEM de 60 Hz aumentou a proliferação celular. Segundo eles, uma possível explicação para a estimulação do ciclo celular seria a elevação da temperatura justificada pela presença do CEM, porém a medida da temperatura não justificou tal suposição; ambos os estudos também analisaram o índice mitótico, não tendo sido encontradas diferenças significativas entre expostos ao CEM e controles.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram atividade cicloativa do CEM pois, das comparações realizadas entre os grupos experimentais, os indivíduos expostos ao CEM apresentaram redução significativa do índice mitótico em comparação ao controle. Do mesmo modo, as células desses indivíduos expostos quando tratadas com raios X também apresentaram proporções significativamente inferiores de células em divisão quando comparadas ao seu controle. Em relação ao índice de proliferação celular, o CEM só pareceu interferir, reduzindo a cinética celular, quando em ação conjunta com os raios X pois, a amostra ETx foi a única que diferiu significativamente, quando da comparação estatística.

Durante a execução deste estudo foi necessário, para efetuar o "challenge assay", retirar os frascos de cultura da estufa e transportá-los para o local onde as células seriam tratadas com raios X. Apesar de todos os cuidados terem sido tomados, foi detectada pequena variação de temperatura, contudo, tal variação não interferiu na cinética celular, como comprovado pelos resultados obtidos que são discordantes, portanto, dos obtidos por ABDEL-FADIL et al. (1982) que, estudando o efeito da temperatura sobre a duração



do ciclo celular em linfócitos humanos cultivados, encontraram efetiva alteração na distribuição de células em primeiro (M_1), segundo (M_2) e terceiro (M_3) ciclos, como consequência da diminuição da temperatura.

Em relação aos efeitos do CEM sobre a síntese de DNA, TAKAHASHI et al. (1986) estudando esses efeitos em células de mamíferos cultivadas, não detectaram diferença significativa entre os diversos tempos de exposição ao CEM e tampouco entre expostos e controles; estes achados, de certa forma, reforçam a idéia de que exposição intermitente ao CEM pode acelerar a progressão do ciclo celular.

De acordo com os dados obtidos neste estudo, o CEM exerceu efeito genotóxico sobre o material genético constatado pela elevada frequência de alterações cromossômicas estruturais verificada nos indivíduos expostos e exerceu atividade cicloativa evidenciada pela diferença entre os grupos expostos e controles tratados e não tratados por raios X, como comprovado pela análise dos parâmetros índices mitótico e de proliferação celular.

No entanto, torna-se mais difícil concluir sobre os resultados obtidos quanto à eficiência com que se processaram as reações de reparo nos indivíduos expostos, pois apesar de ter sido observada uma elevação de aberrações cromossômicas nesses indivíduos quando suas células foram tratadas com raios X, essa elevação não se mostrou estatisticamente diferente, quando se efetuou a comparação com o controle e, nesse caso, parece que o número de células amostradas pode ter interferido nos resultados.

É importante ressaltar que os mecanismos que conduzem à indução de quebras e os que operam as reações de reparo no DNA são distintos; portanto, podem existir agentes clastogênicos que não interferem nas reações de reparo, ou vice-versa.

O que é consistente, neste estudo, é o fato de ter-se confirmado que a exposição prolongada ao CEM pode ser um fator de risco à saúde da população, não importando se, por tratar-se de um agente que lesa o DNA ou que inibe suas reações de reparo, ambos os mecanismos, separadamente, são efetivos no desencadeamento do processo neoplásico em células somáticas ou de alterações em gerações futuras, caso seja detectada ação do CEM em células germinativas.

São ainda necessários, estudos complementares que visem esclarecer o mecanismo de ação através do qual o CEM desencadearia desequilíbrio orgânico, propiciando o aparecimento de patologias degenerativas.

Apesar dos dados contritórios da literatura, sabe-se atualmente que o CEM representa um risco à saúde humana e dos estudos realizados para isso são aqueles que enfocam a ação in vivo de um agente sobre o material genético. Por esse motivo, realizou-se este estudo na tentativa de detectar uma possível ação mutagênica do campo eletromagnético em indivíduos ocupacionalmente expostos, bem como avaliar a eficiência desses mecanismos de reparo de danos ao DNA, através da observação dos parâmetros de índice mitótico e de proliferação celular e de frequência de alterações cromossômicas.

O estudo citogenético foi realizado em 10 indivíduos da Companhia Paulista de Força e Luz (CPFL), expostos ao agente há pelo menos

VI- RESUMO E CONCLUSÕES

A radiação eletromagnética é uma das formas pela qual a energia se propaga no espaço, mediante oscilações elétrica e magnética. Um campo elétrico existe em torno de objetos que possuem corrente elétrica e o movimento das cargas elétricas gera campos magnéticos. A radiação costuma ser caracterizada pela energia de seus fótons, sendo essa diretamente proporcional à frequência da onda, ou seja, quanto maior a frequência maior a energia dos fótons.

Há muito se conhece a respeito dos efeitos biológicos da radiação de alta frequência sobre os organismos e, em virtude da baixa energia nos fótons de frequência extremamente baixa, considerava-se que esse tipo de radiação não oferecia riscos à saúde humana e do ambiente. No entanto, a partir da década de setenta inúmeros estudos epidemiológicos evidenciaram relação entre o referido campo eletromagnético e o risco para o desenvolvimento de neoplasias.

Apesar dos dados contraditórios da literatura, sabe-se, atualmente, que o CEM representa um risco à saúde humana e dos muitos estudos realizados poucos são aqueles que enfocam a ação *in vivo* desse agente sobre o material genético. Por essa razão, realizou-se este estudo na tentativa de detectar uma possível ação clastogênica do campo eletromagnético em indivíduos ocupacionalmente expostos, bem como avaliar a eficiência desses indivíduos em responder ao mecanismo de reparo do DNA, através dos parâmetros de índices mitótico e de proliferação celular e de frequência de alterações cromossômicas.

O estudo citogenético foi realizado em 10 indivíduos da Companhia Paulista de Força e Luz (CPFL), expostos ao agente há pelo menos



seis anos. Para a amostra controle, foram selecionados indivíduos, pareados por idade e sexo, cujas residências e locais de trabalho foram previamente avaliados, a fim de se confirmar que tais indivíduos não estivessem expostos intensamente ao agente em questão.

Utilizou-se cultura temporária de linfócitos do sangue periférico, tendo sido preparadas três alíquotas por indivíduo, ou seja, uma contendo 20 ml, a ser tratada com raios X, e duas contendo 10 ml, correspondendo ao controle do experimento. Os frascos permaneceram sob cultivo por 24 horas, após o que, foram conduzidos ao Instituto de Radioterapia, sob as mesmas condições, onde a alíquota com 20 ml foi submetida a duas doses sucessivas de 75 cGy de raios X. Posteriormente a isso, em câmara asséptica, o material tratado foi subdividido em duas réplicas e adicionou-se BrdU, na concentração final de $16,25\mu\text{M}$, cultivando-se o material por mais 28 horas.

Os resultados obtidos demonstraram efeito genotóxico do campo eletromagnético, evidenciado pela elevada frequência de alterações cromossômicas nos indivíduos expostos ao CEM, em comparação aos indivíduos da amostra controle. Além disso, quando avaliou-se, por meio do "challenge assay", a eficiência desses indivíduos quanto aos mecanismos de reparo do DNA, percebeu-se que a amostra exposta ao CEM apresentou frequência maior de alterações cromossômicas em comparação ao controle, todavia, em virtude dessa diferença não ter sido estatisticamente significativa, apenas sugere-se uma possível interferência do CEM em relação a esse parâmetro.

O efeito do CEM sobre a cinética do ciclo celular foi observado pelos parâmetros de índices mitótico e de proliferação celular. Essa análise demonstrou atividade cicloativa do CEM traduzida pela significativa redução do índice mitótico em indivíduos expostos, enquanto que para o índice de

proliferação celular obteve-se diferença significativa apenas entre os grupos expostos ao CEM e tratados com raios X, indicando possível efeito sinérgico entre o CEM e a radiação ionizante, sobre a cinética celular.

Visto que, a exposição ao referido agente é uma constante em nosso cotidiano, não há dúvidas que a continuação de estudos que visem melhor esclarecer os efeitos do CEM sobre o organismo humano serão de grande relevância para a comunidade.

The radiations with the wave length up to 40 nm are considered ionizing since they do not have enough energy to cause ionization, opposite to the ionizing radiation which has wide known effects over the alive matter nothing was questioned in the 70's about the biological effects of the radiation with low-extremely frequency (200-300 Hz), however in the end of this period it was initiated the epidemiological studies showing a positive relationship of the referred electromagnetic fields (ELF) with some cancer types, although not over these experimental studies just been realized are assured to its real effect or how this would induce the neoplasms.

Although the contradictory data in the literature it is known that the ELF represents a risk to the human health and among all the other realized studies, there are few that have highlighted the *in vivo* action of this agent on the genetic material. This is the reason, this study was produced in the experiment to realize the feasible clastogenic action of the electromagnetic

VII - SUMMARY

The electromagnetic energy is one of the forms through which the energy spreads into space, by means of electric and magnetic oscillations, the electric fields is produced by an electric charge on a conductor surface, that is; it exists around an object that has an electric charge that circulates; the movement of the magnetic fields generate magnetic fields in movement, while these moving magnetic fields give origin to the electric fields, so that the variation of the flow of each field generates the other. It is given the name of electromagnetic specter to the continuous battery of radiation that go since the gamma rays till the radio waves the physics nature of the radiation is the same in all the specter, the only difference is in the frequency, and so in the length of the wave.

The radiations with the wave length up to 40 nm are considered radiations non-ionizing since they do not have enough energy to cause ionization, opposite to the ionizing radiation which has wide known effects over the alive matter nothing was questioned in the 70's about the biological effects of the radiation with low-extremely frequency (200-300 Hz), however in the end of this period it was initiated the epidemiological studies showing a positive relationship of the refered electromagnetic fields (ELF) with some cancer types, although not ever these experimental studies just been realized are ensured to its real effect or how this would induce the neoplasms.

Although the contradictory data in the literature, it is known that the ELF represents a risk to the human health and among all the other realized studies, there are few that have highlighted the *in vivo* action of this agent on the genetic material. This is the reason, this study was produced in the experiment to realize the feasible clastogenic action of the electromagnetic



fields in occupational exposed person, as so to evaluate the effectiveness of these people to the response mechanism in the DNA repair, through the mitotic rate, cellular proliferation and chromosome alterations.

The cytogenetic study was realized in 10 CPFL workers and exposed to the agent at least for six years. To the control samples, it has been selected individuals, age and gender matched to exposed sample, which residences and work places were first checked to confirm that this samples was not exposed to ELF. The cells were cultivated through the technique of temporary culture of the peripheral blood lymphocyte. It were analyzed particular cells of the first division cellular cycle.

The obtained results showed genotoxic effect of the electromagnetic fields, cleared by the elevated frequency in the chromosome alterations in the exposed workers when compared with control sample. Dealing with DNA repair mechanisms, the ELF exposed and X-rays treated sample showed frequency of chromosomal alterations bigger than the control sample, nevertheless it had not detected a significant difference between the two sample, so it can be suggested a possible ELF action in these mechanisms.

The cellular proliferation length was analyses by mitotic rate and cellular proliferation parameters and the results showed an ELF cycloactive action denoted by the reduced mitotic rate in ELF exposed individuals and a decreased cellular proliferation in ELF exposed and X rays treated individual. In spite of that, continuous studies are necessary to elucidate the ELF mechanism of action in human.



VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-FADIL, M.R., PALMER, C.G., HEEREMAN, N. Effect of temperature variation on sister-chromatid exchange and cell-cycle duration in cultured human lymphocytes. *Mutat. Res.*, v.104, p.267-273, 1982.
- ADEY, W.R. Cell membranes: the electromagnetic environment and cancer promotion. *Neurochem. Res.*, v.13, p. 671-677, 1988.
- ADEY, W.R. Joint actions of environmental nonionizing electromagnetic fields and chemical pollution in cancer promotion. *Environ. Health Perspec.*, v.86, p.297-305, 1990.
- ADEY, W.R. Tissue interactions with nonionizing electromagnetic fields. *Physiol. Rev.*, v.61, p.435-513, 1981.
- ALDRICH, T.E., EASTERLY, C.E. Electromagnetic fields and public health. *Environ. Health Perspec.*, v.75, p.159-171, 1987.
- AU, W.W., WALKER, D.M., WARD, J.B., WHORTON, E., LEGATOR, M.S., SINGH, V. Factors contributing to chromosome damage in lymphocytes of cigarette smokers. *Mutat. Res.*, v.260, p.137-144, 1991.
- AU, W.W. Abnormal chromosome repair and risk to develop cancer. *Environ. Health Perspec.*, v.101 (Suppl. 3), p.303-308, 1993.
- AU, W.W., HEO, M.-Y., CHIEWCHANWITY, T. Cytogenetic determination of infidelity of DNA repair from exposure to nickel acetate. *Environ. Health Perspect.*, 1992.(submitted.).
- BATES, M.N. Extremely low frequency electromagnetic fields and cancer: the epidemiologic evidency. *Environ. Health Perspec.*, v.95, p.147-156, 1991.



- BASTUGI-GARIN, S., RICHARDSON, S., ZITTOUN, R. Acute leukaemia in workers exposed to electromagnetic fields. *Eur. J. Cancer*, v.26, p.1119-1120, 1990.
- BAUCHINGER, M., HAULF, R., SCHIMID, E., DRESP, J. Analysis of structural chromosome changes and SCE after occupational long-term exposure to electric and magnetic fields from 380 kV-systems. *Radiat. Environ. Biophys.*, v.19, p.235-238, 1981.
- BEARDSLEY, T. Shocking genes-electromagnetic fields stimulate genetic activity. *Sci. Am.* 1990.
- BELL, J; COLEMAN, M.P. Extremely low frequency (ELF) electromagnetic fields and leukaemia in children. *Br. J. Cancer*, v.62, p.331-332, 1990.
- BETHWAITE, P. Electromagnetic fields and cancer: an ongoing debate. *New Z. Med. J.*, v.12, p.225-226, 1991.
- BLACKMAN, C.F., BENANE, S.G., RABINOWITZ, J.R. et al. A role for the magnetic field in the radiation-induced efflux of calcium ions from brain tissue *in vitro*. *Bioelectromagnetics*, v.6, p.327-337, 1985.
- BOSI, A., OLIVIERI, G. Variability of the adaptive response to ionizing radiations in humans. *Mutat. Res.*, v.211, p.13-17, 1989.
- BUSSAB, W.O., MORETTIN, P.A. *Estatística básica*, 3.ed. São Paulo: Atual, 1985.
- BYUS, C.V., PIEPER, S.E., ADEY, W.R. The effects of low-energy 60 Hz environmental electromagnetic fields upon the growth-related enzyme ornithine decarboxylase. *Carcinogenesis*, v.8, p.1385-1389, 1987.
- CARRANO, A.V., NATARAJAN, A.T. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat. Res.*, v.204, p.379-406, 1988.

- CHAHAL, R., CRAIG, D.Q.M., PINNEY, R.J. Investigation of potential genotoxic effects of low frequency eletromagnetic fields on *Escherichia coli*. *J. Pharm. Pharmacol.*, v.45, p.30-33, 1993.
- COHEN, M. M., LEVY, H.P. Chromosome Instability Syndromes. *Ad. Hum. Genet.*, v.18, p.43-149, 1989.
- COHEN, M.M., KUNSKA, A., ASTEMBORKI, J.A., McCULLOCH, D. The effect of low-level 60 Hz electromagnetic fields on human lymphoid cells. II. Sister-chromatid exchanges in peripheral lymphocytes and lymphoblastoid cell lines. *Mutat. Res.*, v.172, p.177-184, 1986.
- COLEMAN, M.P. Leukaemia mortality in amateur radio operators. *The Lancet*, v.2, p.106-107, 1985.
- COLEMAN, M.P., BELL ,C.M.J., SKEET,R. Leukaemia incidence in electrical workers. (Letter). *The Lancet*, v.1, p.982-983, 1983.
- COLEMAN, M.P., BERAL, V. A review of epidemiological studies of the health effects of living near or working with electricity generation and transmission equipment. *Int. J. Epidemiol.*, v.17, p.1-13, 1988.
- COSSARIZZA, A., MONTI, D., SOLA,P., MOSCHINI, G., CADOSSÌ,R., BERSANI, F., FRANCESCHI, C. DNA repair after γ irradiation in lymphocytes exposed to low-frequency pulsed electromagnetic fields. *Radiat. Res.*, v.118, p.161-168, 1989.
- CROSSEN, P.E., MORGAN, W.F., Analysis of humam lymphocyte cell cycle time in culture measured by sister chromatid differential staining. *Exp. Cell Res.*, v.104, p.453-457, 1977.
- D'AMBROSIO, G., SCAGLIONE, A. Chromosomal aberrations induced by ELF eletric fields. *J. Bioelet.*, v.4, p.279-284, 1985.
- DEADMAN, J.E., CAMUS, M., ARMSTRONG, B.G., HÉROUX, P., CYR, D., PLANTE, M., THÉRIAULT, G. Occupational and residencial 60-Hz

electromagnetic fields and high-frequency transients: exposure assessment using a new dosimeter. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, v.49, p.409-419, 1988.

DEMERS, P.A., THOMAS, D.B., ROSENBLATT, K.A. et al. Occupational exposure to electromagnetic fields and breast cancer in men. *Am. J. Epidemiol.*, v.134, p.340-347, 1991.

DRAPER, G. Electromagnetic fields and childhood cancer no causal relation has been established. *BJM.*, v.307, p.884-885, 1993.

EASTERLY, C.E. Cancer link to magnetic field exposure: A hypothesis. *Am. J. Epidemiol.*, v.114, p.168-174, 1991.

FARBER, E., RUBIN, H. Cellular adaptation in the origin and development of cancer. *Cancer Res.*, v.51, p.2751-2760, 1991.

FEARON, E.R., VOLGESTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, v.61, p.759-767, 1990.

FREIRE-MAIA, N. *Radiogenética humana*, São Paulo: Edgard Blucher, 1972. 196p.

FROSINA, G., ABBONDANDOLO, A. The current evidence for an adaptive response to alkylating agents in mammalian cells, with special reference to experiments with in vitro cell cultures. *Mutat. Res.*, v.154, p.85-100, 1985.

FULTON, J.P., COBB, S., PREBLE, L., LEONE, L., FORMAN, E. Electrical wiring configurations and childhood leukemia in Rhode Island. *Am. J. Epidemiol.*, v.111, p.292-296, 1980.

GARLAND, F.C., SHAW, E., GORHAM, E.D., GARLAND, C.F. WHITE, M.R., SINSHEIMER, P.J. Incidence of leukemia in occupations with potential electromagnetic field exposure in United States navy personnel. *Am. J. Epidemiol.*, v.132, p.293-303, 1990.

- GOMES, R.A. Autos de Goiania:-efeitos biológicos, **Ciênc. Hoje**, v.7, n. 40, supl. p.23-26, 1988a.
- GOMES, R.A. Autos de Goiania. **Ciênc. Hoje**, v.7, n.40, supl. p.36-37, 1988b.
- GRAHAM, C., COBEN, H.D., COOK, M.R. et al. Effects of intermittent exposure to 60 Hz fields on human physiologic. Presented at the Department of Energy/Electric Power Research Institute Contractors Review of "Biological effects from electric and magnetic fields, air ions and currents associated with high voltage transmission lines". Phoenix, A. Z., October 30-November 3, 1988.
- GUENÉL, P., RASKMARCK, P., ANDERSEN, J.B. et al. Incidence of cancer in persons with occupational exposure to electromagnetic fields in Denmark. **Br. J. Ind. Med.**, v.50 p.758-764, 1993.
- HALL, A.P., McKee, H.P., MENAGE, H. du P., DOVER, R., LANE, D.P. High levels of p53 protein in UV-irradiated normal skin. **Oncogene**, v.8, p.203-207, 1993.
- HALLIDAY, D., RESNICK, R. **Física..** Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científico, v.3, 1980. 353p.
- HANAWALT, P.C., COOPER, P.K., GANESAN, A.K., SMITH, C.A. DNA repair in bacteria and mammalian cells. **Annu. Rev. Biochem.**, v.48, p.783-836, 1979.
- HANAWALT, P.C., SARASIN, A. Cancer-prone hereditary diseases with DNA processing abnormalities. **Trends Genet.**, v.2, p.124-129, 1986.
- HERRLICH, P., MALLICK, U., RAHMSDORF, H.J. Genetic changes in mammalian cells reminiscent of an SOS response. **Hum. Genet.**, v.67, p.360-368, 1984.

- HOWARD-FLANDERS, P. Inducible repair of DNA. *Sci. Am.*, v.245, p.56-64, 1981.
- IKUSHIMA, T. Chromosomal responses to ionizing radiation reminiscent of an adaptive response in cultured Chinese hamster cells. *Mutat. Res.*, v.180, p.215-221, 1987.
- ISCN - An international system for human cytogenetic nomenclature. Basel, Karger: 1985. 117p.
- KATKOV, V.F., PAVLOVSKII, V.F. POLTAVCHENKO, G.M. Effect of modulated SHF electromagnetic fields on calmodulin levels in brain structures. *Bull. Exp. Biol. Med.*, v.114, 1992.
- KHALIL, A.M., QASSEM, W. Cytogenetic effects of pulsing eletromagnetic field on human lymphocytes in vitro: chromosome aberrations, sister-chromatid exchanges and cell kinetics. *Mutat. Res.* v.247, p.141-146, 1991.
- KORENBERG, J.R., FREEDLENDER, E.F. Giemsa technique for the detection of sister chromatid exchanges. *Chromosoma*, v.48, p.355-360, 1974.
- LAMBERTI, L.; PONZETTO, P.B.; ARDITO, G. Cell kinetics and sister-chromatid frequency in human lymphocytes. *Mutat. Res.*, v.120, p.193-199, 1983.
- LATT, S. A. Microfluoremetric detection of deoxyribonucleic acid replication in humam metaphase chromosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v.70 p. 3395-9, 1973.
- LEHMANN, A.R., NORRIS, P.G. DNA repair and cancer: speculations based on studies with xeroderma pigmentosum, Cockayne's syndrome and tricothiodystrophy. *Carcinogenesis*, v.10, p.1353-1356, 1989.
- LEHMANN, R. Cancer-associated human genetic diseases with defects in DNA repair. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, v.100, p.117-124, 1981.

- LEITÃO, A.C., GOMES, R.A. Mecanismos de reparo do DNA em *Escherichia coli*. In: COSTA, S.O.P. **Genética molecular e de microrganismos: os fundamentos da engenharia genética**. São Paulo: Manole, 1987.
- LIBOFF, A.R., WILLIAMS, T., STRONG, D.M., WISTAR, R. Time-varying magnetic fields: effects on DNA synthesis. **Science**, v.223, p.818-820, 1984.
- LOEB, L.A. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. **Cancer Res.**, v.51, p.3075-3079, 1991.
- LOOMIS, D., SAVITZ, D.A. Mortality from brain cancer and leukaemia among electrical workers. **Br. J. Ind. Med.**, v.47, p.633-638, 1990.
- MAEHLE, L., METCALF, R.A., RYBERG, D., BENNETT, P.W., HARRIS, C.C., HAUGEN, A., Altered p53 gene structure and expression in human cells after exposure to nickel. **Cancer Res.**, v.52, p.218-221, 1992.
- MATANOSKI, G.N., BREYSSE, P.N., ELLIOTT, E.A. Electromagnetic field exposure and male breast cancer. **The Lancet**, v.337, p.737, 1991.
- McDOWALL, M.E. Leukaemia mortality in electrical workers in England and Wales. (Letter). **The Lancet**, v.1, p.246, 1993.
- MILHAM, S.Jr. Mortality in workers exposed to electromagnetic fields. **Environ. Health Perspec.**, v.62, p.297-300, 1985.
- MITELMAN, F. Clustering of break points to specific chromosomal regions in human neoplasia. **Hereditas**, v.104, p.113-119, 1986.
- MOORHEAD, P.S., NOWELL, P.C., MELLMAN, W.J., BATTIPS, D.M., HUNGERFORD, D.A. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Exp. Cell Res.**, v.20, p.613-616, 1960.

- MUNIZ, R., LOBO, R. Radiação de sincrotron- características da radiação eletromagnética. *Ciênc. Hoje*, v.2, p.38-43, 1984.
- MYERS, A., CLAYDEN, A.D., CARTWRIGHT, R.A., CARTWRIGHT, S.C. Childhood cancer and overhead powerlines: a case-control study. *Br. J. Cancer*, v.62, p.1008-1014, 1990.
- NATARAJAN, A.T., OBE, G. How do *in vivo* mammalian assays compare to *in vitro* assays in their ability to detect mutagens? *Mutat. Res.*, v.167, p.189-102, 1986.
- NATARAJAN, A. T., OBE, G. Screening of humam population for mutations induced by environmental pollutants: use of humam lymphocyte system. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v.4, p.468-481, 1980.
- NETER, J., WASSERMAN, W. **Applied linear statistical models.** Homewood: Richard D. Irwin, 1974.
- NORDSTROM, S., BIRKE, E., GUSTAVSSON, L. Reproductive hazards among workers at high voltage substations. *Bioelectromagnetics.*, v.4, p.91-101, 1983.
- NORDENSON, I., BECKMAN, L.; LIDÉN, S., STJERNBERG, N. Chromosomal aberration and cancer risk. *Hum. Hered.*, v.34, p.76-81, 1984a.
- NORDENSON, I., MILD, H.K., NORDSTROM, S., SWEINS, A., BIRKE, E. Clastogenic effects in human lymphocytes of power frequency eletric fields: *in vivo* and *in vitro* studies. *Radiat. Environ. Biophys.*, v.23, p.191-201, 1984b.
- OESCH, F., AULMANN, W., PLATT, K.L., DOERJER, G. Individual differences in DNA repair capacities in man. *Arch. Toxicol.*, v.10, suppl., p.172-179, 1987.



- OKUNO, E. Radiação ionizante. **Ciênc. Hoje**, v.7, n 40, supl., p.20-21, 1988.
- OKUNO, E., ALDAS, I.L., CHOW, C. **Física para ciências biológicas e biomédicas**. São Paulo: Harbra, 1982. 490p.
- PERRY, P.E., WOLF, S. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. **Nature**, v.251, p.156-158, 1974.
- PHILLIPS, J.J., WINTERS, J.; D., RUTLEDGE, L. *In vitro* exposure to electromagnetic field: changes in tumor cell properties. **Int. J. Radiat. Biol.**, v.49, p.463-469, 1986.
- Physical Science Study Committee (PSSC). **Física**. São Paulo:Edart, 1986 261p.
- POOL, R. Electromagnetic fields: the bioelectromagnetic evidence. **Science**, v.249, p.1378-1381, 1990a.
- POOL, R. Is there an EMF - cancer connection? **Science.**, v.2473, p.1096-1073, 1990b.
- POOL, R. EMF - cancer link still murky. **Nature**, v.349, p.554, 1991
- PRESTON, R.J., SEBASTIAN, J.R.S., McFEE, A.F. The *in vitro* human lymphocyte assay for assessing the clastogenicity of chemical agents. **Mutat. Res.**, v.189, p.175-183, 1987.
- RADMAN, M. Is there SOS induction in mammalian cells? **Photochem. Photobiol.**, v.32, p.823-830, 1980.
- REESE, J.A., JOSTES, R.F., FRAZIER, M.E. Exposure of mammalian cells to 60-Hz magnetic and electric fields: analysis for DNA single-strand breaks. **Bioelectromagnetics**, v.9, p.237-247, 1988.



- ROSENTHAL, M., OBE, G. Effects of 50-Hertz eletromagnetic fields on proliferation and on chromosomal alterations in human peripheral lymphocytes untreated or pretreated with chemical mutagens. *Mutat. Res.*, v.210, p.329-335, 1989.
- ROWLEY, J.D. Identification of the contact chomosome regions involved in human hematologic malignant disease. *Science*, v.216, p.749-751, 1982.
- SANSON, L., CAIRNS, J. A new pathway for DNA repair in *Escherichia coli*. *Nature*, v.267, p.281-282, 1987.
- SANKARANARAYANAN, K., DUYN, A.V., LOOS, M.J., NATARAJAN, A.T. Adaptative response of human lymphocytes to low-level radiation from radioisotopes or X-rays. *Mutat. Res.*, v.211, p.7-12, 1989.
- SHORE, R.E. Electromagnetic Radiations and cancer - cause and prevention. *Cancer*, v.62, p.1747-1754, 1988.
- SAVITZ, D.A. Power lines and cancer risk. *JAMA*, v.267, p.1458, 1991.
- SAVITZ, D.A., CALLE, E. Occupational exposure to electromagnetic fields: Review of epidemiologic surveys. *J. Occup. Med.*, v. 29, p.47-51, 1987.
- SAVITZ, D.A., JOHN, E.M., KLECKNER, R.C. Magnetic field exposure from electric appliances and childhood cancer. *Am. J. Epidemiol.*, v.131, p.763-773, 1990.
- SAVITZ, D.A., WACHTEL, H., BARNES, F., JOHN, E.M., TVRDIK J.G. Case control of childhood cancer and exposure to 60-Hz magnetic fields. *Am. J. Epidemiol.*, v.128, p.21-38, 1988.
- SETLOW, R. S. Repair deficient human disorders and cancer. *Nature*, v.271, p.713-717, 1978.

- SEVERSON, R.K., STEVENS, R.G., KAUNE, W.T., THOMAS, D.B., HEUSER, L., DAVIS, S., SEVER, L. Acute nonlymphocytic leukemia and residencial exposure to power frequency magnetic fields. *Am. J. Epidemiol.*, v.128, p.10-20, 1988.
- SHADLEY, J.D., WOLFF, S. Very low doses of X-rays can human lymphocytes to become less susceptible to ionizing radiation. *Mutagenesis*, v.2, p.95-96, 1987.
- SHADLEY, J.D., AFZAL, V., WOLFF, S. Characterization of the adaptative response to ionizing radiation induced by low doses of X rays to human lymphocytes. *Radiat. Res.*, v.111, p.511-517, 1987.
- SHAW, M.N. Human chromosome damage by chemical agents. *Ann. Rev. Med.*, v.21, p.409-432, 1970.
- SPEERS, M.A., DOBBINS, J.G., MILLER, V.S. Occupational exposure and brain cancer mortality: a preliminary study of east Texas residents. *Am. J. Ind. Med.*, v.13, p.629-638, 1988.
- STEVENS, R.G. Electric power use and breast cancer: A Hipotesis. *Am. J. Epidemiol.*, v.125, p.556-560, 1987.
- STEVENS, R.G., SAVITZ, D.A. Is electromagnetic and cancer an issue worthy of study? *Cancer*, v.69, 1992.
- SULZMAN, F. N. Effects of electromagnetic fields on Circadian rhythms. In: *Assessment and view-points on the biological and human health effects of extremely low frequency (ELF) electromagnetic fields*. Washington, American Institute of Biological Sciences, 1985. p.337-350.
- TAKAHASHI, K., KANEKO, I, DATE, M., FUKADA, E. Effect of pulsing electromagnetic fields on DNA synthesis in mammalian cells in culture. *Experientia*, v. 42, p. 185-186, 1986.

- THIELMANN, H.W. Enzymology of DNA repair: a survey. In: GREIM, H. et al. (Ed.). **Biochemical basis of chemical carcinogenesis**. New York: Raven Press, 1984. p.233-255.
- TYNES, T., ANDERSEN, A. Electromagnetic fields and male breast cancer. **The Lancet**, p.1596, 1990.
- TYNES, T., ANDERSEN, A., LANGMARK, F. Incidence of cancer in Norwegian workers potentially exposed to electromagnetic fields. **Am. J. Epidemiol.**, v.136, 1992.
- VALJUS, J., NORPPA, H., JÄRVENTAU, H., SORSA, M., NYKYRIE, E., SALOMAA, S. Analysis of chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges and micronuclei among power linesmen with long-term exposure to 50-Hz electromagnetic fields. **Radiat. Environ. Biophys.**, v.32, p.325-336, 1993.
- VAN ZEELAND, A.A. DNA Repair mutations in man. In: OBE, **Mutation in man**. Berlin: Springer, 1984, p.38-50.
- VARELLA-GARCIA, M., TAJARA, E.H. **Métodos para análise de cromossomos humanos: manual de protocolos**. UNESP-IBILCE São José do Rio Preto, 1991.
- VENA, E., GRAHAM, S., HELLMAN, R. et al. Use of electric blankets and risk of postmenopausal breast cancer. **Am. J. Epidemiol.**, v.134, p.180-185, 1991.
- VERREAULT, R., WEISS, N.S., HOLLENBACH, K.A. Use of electric blankets and risk of testicular cancer. **Am. J. Epidemiol.**, v.131, p.759-762, 1990.
- WANG, Z.Q., SAIGUSA, S., SASAKI, M. S., Adaptative response to chromosome damage in cultured human lymphocytes primed with low doses of X-rays. **Mutat. Res.**, v.246, p.176-186, 1991.

WEINBERG, R.A. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogeneses. *Cancer Res.*, v.49, p.3713-3721, 1989.

WERTHEIMER, N., LEEPER, E. Electrical wiring configurations and childhood cancer. *Am. J. Epidemiol.*, v.109, p.273-284, 1979.

WIENCKE, J.K.; AFZAL, V., OLIVIERI, G., WOLFF, S. Evidence that the [^3H] thymidine-induced adaptive response of human lymphocytes to subsequent doses of X-rays involves the induction of a chromosomal repair mechanism. *Mutagenesis*, v.1, p.375-380, 1986.

WILSON, B. W.; WRIGHT, C W., MORRIS, J., et al. Effects of electric blanket use on human -pineal gland function: preliminary report. Presented at the Department of Energy/Electric Power Research Institute Contractors Review of "Biologic effects from electric and magnetic fields, air ions and ion currents associated with high voltage transmission lines." Phonix, A. Z., October 30-November 3, 1988.

WOLFF, P.S. Cancer - EMF connection. *Nature*, v.351, p.10, 1991.

WOLFF, S., PERRY, P. Differential staining of sister chromatid exchange without autoradiography. *Chromosoma*, v.48 p.341-353, 1974.

WRIGHT, W.E., PETERS, J.M., MACK, T.M. Leukemia in workers exposed to electrical and magnetic fields. (Letter). *The Lancet*, v.20, p.1160-1161, 1982.

YAMAMOTO, M., WATANABE, G. Epidemiology of gross chromosome anomalies at the early embrionic stage of pregnancy. *Contr. Epidemiol. Biostat.*, v.1, p.101-106, 1979.

VII- ANEXOS

ANEXO 1

Nº de registro: _____ Código: _____

1- Nome: _____

2- Data de nascimento: ____/____/____ RG: _____

3- Endereço residencial: _____, _____
(rua) (nº)_____
(bairro) (cidade - UF) (CEP) (telefone)

4- Função: _____ Tempo de exercício: _____

5- Tempo médio de exposição profissional ao CEM de alta tensão:
_____ h/semana

Última exposição (data e tempo de exposição): _____

6- Uso de produtos químicos

(especificar: produto, frequência de uso e data da última utilização)

6.1- Uso profissional _____

7.2- Uso pessoal

A- Crônico: _____

B- Esporádico (últimos 6 meses) _____

7.3- Consumo de álcool: _____

7.4- Exposição a inseticidas (Domésticos ou de dedetizadoras): _____

7.5- Tabagismo:

- consumo de cigarros no passado: _____ un/dia

- duração do hábito: _____

- tempo de abstinência: _____



- convívio com fumantes:

Residência: _____

Trabalho: _____

8- Exposição a raios-X nos últimos seis meses (tipo de radiografia): _____

9- Ocorrência de infecções viróticas nos últimos seis meses: _____

10- Casos de câncer na família: _____

11- Ocorrência de malformações congênitas e abortamentos espontâneos: _____

12- Sobre o uso de eletrodomésticos: (especificar a frequência de uso e tempo de exposição)

() Barbeador elétrico _____

() Secador de cabelos _____

() Rádio relógio (quarto) _____

distância da cama: _____

() Televisão _____

distância à que se assiste: _____

() Vídeo game _____

distância da TV: _____

() Forno de microondas _____

() Computador _____

() _____

Data de coleta do sangue: ____/____/____



ANEXO 2

Nº de registro: _____

Código: _____

1- Nome: _____

2- Endereço residencial: _____, _____

(rua)

(nº)

(bairro)

(cidade - UF)

(CEP)

(telefone)

CONFIGURAÇÃO ELÉTRICA NO LOCAL DE RESIDÊNCIA E TRABALHO

1- "LINHÃO" (raio de 100 m, especificar a tensão) - 139 kV

2- SUBESTAÇÃO (raio de 150 m, especificar a tensão elétrica)

3- REDE PRIMÁRIA (raio de 50 m) - 13 kV

4- TRANSFORMADORES (raio de 50 m) - 13 kV

5- REDE SECUNDÁRIA (raio de 30 m) - 117 kV



