

Isabel Rosa Cabral

Estudo Citogenético em Indivíduos Ocupacionalmente
Expostos ao Campo Eletromagnético de
Frequência Extremamente Baixa (60 Hertz)



Isabel Rosa Cabral

**ESTUDO CITOGENÉTICO EM INDIVÍDUOS
OCUPACIONALMENTE EXPOSTOS AO CAMPO
ELETROMAGNÉTICO DE FREQUÊNCIA
EXTREMAMENTE BAIXA (60 Hertz).**

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, para obtenção do grau de
Mestre em Genética.



696 195

S. José do Rio Preto
1994



Este trabalho foi realizado no Laboratório de Orogênese Humana do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" e no Serviço de Genética do Hospital de Base da Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto (SRF), com auxílio da CAPES (PRODIPI), FAPESP e FUNDUNESP.

Orientador: Profa. Dra. Nívea Dulce Tedeschi Conforti Froes



Ào Amigo, amigo e amante

Companheiro digno dos mais sublimas adjetivos e de mais glórias

Sem a sua compreensão jamais teria concluído o curso de licenciatura

Por ignorância meus próprios conhecimentos deu-me força para realizá-lo

Por isso, e por muito mais, dedico-lhe este trabalho

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 "Júlio de Mesquita Filho" e no Serviço de Genética do Hospital de Base da Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto (SP), com auxílio da CAPES (PICD/UFPa), FAPESP e FUNDUNESP.

Ao Arno, amigo e amante.

Companheiro digno dos mais sublimes adjetivos e do meu amor.
Sem a sua compreensão jamais teria concluído o curso de Mestrado,
pois ignorando seus próprios sentimentos deu-me força para realizá-lo.
Por isso, e por muito mais, dedico-lhe este trabalho.

Eu sei que vou te amar
Por toda a minha vida, eu vou te amar
A cada despedida, eu vou te amar
Desesperadamente.
Eu sei que vou te amar.
E cada verso meu será pra te dizer
Que eu sei que vou te amar por toda minha vida
Eu sei que vou chorar
A cada ausência tua eu vou chorar
Mas cada volta tua há de apagar
O que essa tua ausência me causou
Eu sei que vou sofrer
A eterna desventura de viver
A espera de viver ao lado teu por toda minha vida.

(Tom Jobim e Vinícius de Moraes)

Aos meus pais, João e Fátima Cabral,
que perceberam a importância da
instrução acadêmica e jamais mediram
esforços para que alcançássemos esse
objetivo.
Obrigada pelo amor de vocês.

*"O amor é um farol permanente que contempla as
tormentas sem jamais estremecer. É a estrela fixa nos
barcos sem rumo. É o astro cuja altura medimos; mas
cuja essência é mistério."
(William Shakespeare)*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*"De um sentimento nobre pode depender a
mudança definitiva de nossa vida
moral, intelectual e até física."
(Paul Bourget)*

Ao concluir mais esta etapa, quero agradecer intensamente a algumas pessoas que contribuíram de forma decisiva para eu seguir a carreira acadêmica.

Ao José Carneiro, grande amigo, que no momento certo fez-me perceber que através da Universidade eu conseguiria encontrar um caminho digno. Ensinou-me o prazer da leitura como fonte inesgotável de conhecimento.

A Prof. Dra. Marúcia Irena M. Amorim, que me introduziu no mundo da ciência fazendo-me crer que não existem fronteiras quando se tem o conhecimento.

AGRADECIMENTOS

*Descobertas e aperfeiçoamentos importantes
invariavelmente envolvem a cooperação de muitas
mentes. Eu posso ter recebido o crédito por ter
deixado uma trilha, mas quando olho o
desenvolvimento subsequente, eu percebo que o mérito
pertence também aos outros.
(Graham Bell)*

Mais uma etapa de vida concluída. Tenho a consciência de que o êxito alcançado teve a colaboração de muitas pessoas, por interesses diversos. Aqui, a algumas dessas farei menção, como forma de mostrar-lhes meu afeto e gratidão.

À Profa. Dra. Nívea D.T. Conforti Froes que desempenhou com nobreza o seu papel de orientadora, sendo elegante ao corrigir minhas falhas, paciente ao deparar-se com minha obstinação e compreensiva ao consentir o meu afastamento quando percebia que a saudade afetava meu desempenho. Certamente transformou-se em uma amiga muito especial.

À Profa. Dra. Iris Ferrari, minha primeira orientadora neste curso que apesar da sua vida atribulada, sempre me dispensou atenção.

À Profa. Dra. Marileila Varella Garcia. Não sou capaz de traduzir em poucas linhas o seu verdadeiro papel durante a minha passagem por esta Universidade. Sinto que a sua pessoa servirá de modelo para os meus sonhos profissionais.

À todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do IBILCE (UNESP), pela disponibilidade em atender-nos quando precisávamos. Em especial à Profa. Dra. Cláudia Márcia A. Carareto, exemplo de competência didática, que ao iniciar-me no mais nobre ramo da Biologia - a Evolução - permitiu-me perceber a vida com outro significado.

Às Dras. Christine Hackel e Ma. Tercília Vilela A. Oliveira, membros da banca de avaliação desta Dissertação, pelas contribuições na finalização da mesma.

À Profa. Dra. Ana Elizabeth Silva pela disponibilidade em auxiliar sempre que sua ajuda foi solicitada.

À Profa. Adriana Barbosa Santos do Departamento de Análise Numérica e Estatística do IBILCE, pelo auxílio fundamental na análise estatística.

À Profa. Dra. Eny Ma. G. Bertolo, que como profissional ofereceu condições para a etapa laboratorial deste estudo e esteve sempre disposta a discutir as dúvidas científicas e técnicas surgidas na execução do mesmo trabalho. Paralelamente mostrou-se grande amiga.

Ao Dr. L.A. Ciórlia, médico da Companhia Paulista de Força e Luz (CPFL - S.J. Rio Preto), pelo empenho e eficiência com que nos auxiliou na seleção da amostra, realizando todos os contatos que nos permitiram trabalhar com as Regionais de outros municípios.

Ao Antonio Carlos Chandretti, eletricista da CPFL, pelo seu espírito cômico, o que tornou divertido o árduo trabalho de descrição da configuração elétrica da amostra controle sob o intenso sol do verão Riopretense.

Aos funcionários dos Departamentos de Biologia e Botânica e do Centro de Microscopia, cuja gentileza na execução de suas tarefas e simpatia no convívio tornaram mais ameno o dia-a-dia de trabalho.

Especialmente, agradeço aos funcionários da Unidade de Processamentos de Dados (UPD) do IBILCE, sempre prestativos, que inúmeras vezes se dispuseram a solucionar minhas dúvidas na área da informática e às bibliotecárias Olinda Vacari, Maria Helena Lima e Gislaine Gameiro, sempre educadas, atenciosas e eficientes no desempenho de suas funções.

À Paula Buassi e Brasilina Martins funcionárias do Serviço de Genética do Hospital de Base pela eficiência no desempenho de funções e pelo ambiente agradável proporcionado no laboratório.

Ao Arno Hamel, pela análise crítica da discussão estatística, auxílio na confecção das figuras e pela paciência com que lidou com a instabilidade de humor que vivi nos momentos finais da confecção da versão inicial desta.

Aos companheiros da Pós-graduação, pelo convívio salutar e proveitoso, seja pelas conversas nas "salinhas" e corredores ou pelas discussões durante as



disciplinas cursadas. Em especial às amigas do Laboratório de Citogenética Humana pela disponibilidade em auxiliar na resolução dos "pepinos" técnicos.

Aos meus amigos do Laboratório de Citogenética Humana - CCB-UFPa, pelo imenso carinho e amizade.

À Direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, pela disponibilidade das condições materiais.

À Marlene Kobayashi, Liliam Maddi Ravazzi, Eliana Morielle Versute e Grasiela Severi Aguiar, cuja amizade ultrapassou os limites dos muros do IBILCE.

À Dorotéia Rossi Souza, grande amiga em qualquer momento.

À Zeneide Martins da Silva, amiga incondicional. Juntas vivemos as mais intensas emoções (prazerosas ou não) sem as quais certamente teria sido mais difícil a conclusão desta etapa.

E finalmente, entretanto em enorme nível de importância, aos meus irmãos João, Léa, Conce, Eugênia, Tety, Pedro e Ivone, que juntos vivemos inesquecíveis momentos durante nossa vida estudantil. Sou-lhes extremamente grata pelo apoio emocional que me dispensaram quando nos separamos para a realização deste curso. E, aos meus sobrinhos Andréa, Éder, Fernanda, Carolina, Thiago e Pedro Henrique, que por seu carinho e muitas vezes admiração estimulam a continuidade da caminhada.

À todos vocês, meus sinceros agradecimentos.



SUMÁRIO

I-	INTRODUÇÃO	1
I.1-	CONSIDERAÇÕES SOBRE RADIAÇÃO.....	1
I.2-	ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS SOBRE A EXPOSIÇÃO AO CAMPO ELETROMAGNÉTICO	7
1.2.1-	Exposição Residencial	7
1.2.2-	Exposição Ocupacional	12
I.3-	ESTUDOS EM EXPOSIÇÃO EXPERIMENTAL AO CAMPO ELETROMAGNÉTICO	15
II-	OBJETIVOS	22
III-	MATERIAL E MÉTODOS	23
III.1-	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	23
III.2-	METODOLOGIA CITOGENÉTICA	33
III.3-	ANÁLISE CITOGENÉTICA	36
III.4-	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	37
IV-	RESULTADOS	38
IV.1-	ANOMALIAS CROMOSSÔMICAS	38
IV.2-	TROCAS ENTRE CROMÁTIDES-IRMÃS	57
V-	DISCUSSÃO	76
VI-	RESUMO E CONCLUSÕES	95
VII-	SUMMARY.....	98
VIII-	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
IX-	ANEXOS	122



I- INTRODUÇÃO

*"A vida sobre a face da Terra evoluiu na presença de um incessante fluxo de campo eletromagnético natural."
(Adey, 1990)*

I.1- CONSIDERAÇÕES SOBRE RADIAÇÃO

As radiações correspondem à propagação de energia de um ponto a outro sob a forma de um feixe de partículas elementares e núcleos atômicos (radiação particulada) ou fótons (radiação eletromagnética).

Um objeto que possui cargas elétricas apresenta campo elétrico e sempre que essas cargas fluem gera-se um campo magnético, sendo que ambos correspondem à energia irradiada e que se propaga no espaço sob a forma de ondas eletromagnéticas, perpendiculares entre si e à direção de propagação da onda.

Todas as ondas eletromagnéticas são geradas à partir da aceleração de uma carga elétrica, ou seja, têm a mesma natureza, e ainda apresentam a mesma velocidade. Assim, os diversos tipos de ondas são individualizados apenas pela sua frequência e, conseqüentemente, comprimento. As ondas exibem uma periodicidade que caracteriza a sua frequência (Figura 1) que é expressa na unidade de Hertz (Hz = unidade de frequência equivalente a um ciclo completo por segundo, medido para qualquer oscilação periódica). A frequência das ondas é idêntica a do fluxo das cargas elétricas; por conseguinte, poderiam assumir todos os valores, de zero a infinito.



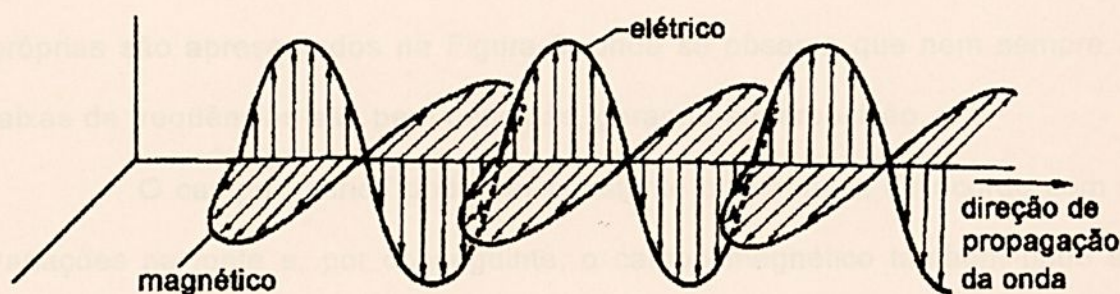


FIGURA 1: Ilustração demonstrando a natureza ondulatória do campo eletromagnético, gerado a partir do movimento de um fóton. A distância entre duas cristas corresponde ao comprimento da onda, representado pela letra grega lambda (λ). Ao tempo necessário para uma oscilação completa denomina-se periodicidade, medida em segundos, sendo que a frequência da onda equivale ao inverso desse valor. Portanto, 1 Hz é igual a uma oscilação por segundo.

Entretanto, existe uma classificação segundo as frequências, na qual as ondas compõem o espectro eletromagnético. Nesse, elas são classificadas em ionizantes (10^{15} a 10^{22} Hertz ou Hz) ou não (10^0 a 10^{15} Hz), sendo as não-ionizantes subdivididas em UHF (*Ultra High Frequency* - 10^8 a 10^{10} Hz), VHF (*Very High Frequency* - 10^6 a 10^8 Hz), HF, MF e LF (*High, Midle e Low Frequency*, 10^3 a 10^6 Hz) e ELF (*Extremely Low Frequency* - 10^1 a 10^2 Hz). Entre as ondas ionizantes e as UHF existem ainda os espectros da ultravioleta, luz visível e infravermelho. Os espectros das ondas eletromagnéticas e algumas características próprias são apresentados na Figura 2, onde se observa que nem sempre as faixas de frequências são bem definidas, gerando superposição.

O campo elétrico pode ser constante ou variável, de acordo com as variações na fonte e, por conseguinte, o campo magnético também pode ser estático ou alternado, dependendo da corrente elétrica que o está gerando (DEADMAN *et al.*, 1988). A descrição do campo elétrico é feita em termos de frequência das ondas e de potência, que se refere ao gradiente de tensão espacial, na unidade de volts por metro (V/m); enquanto o campo magnético o é na unidade de Ampère por metro (A/m), Gauss (G) ou Tesla (T), sendo que 1 mG é igual a 1 μ T.

Durante toda a sua vida o ser humano está exposto a campos magnéticos naturais e artificiais. O natural refere-se ao campo estático da Terra e considerando as ondas de 50 Hz, sua potência é de 10^{-8} a 10^{-9} G; no entanto, quando esse está associado aos campos gerados artificialmente sua potência é muitas vezes maior, na ordem de 10^{-4} a 10^{-2} G (COLEMAN & BERAL, 1988).

Ao contrário do campo elétrico, cuja potência é acentuadamente diminuída por barreiras físicas, o campo magnético penetra facilmente muitos



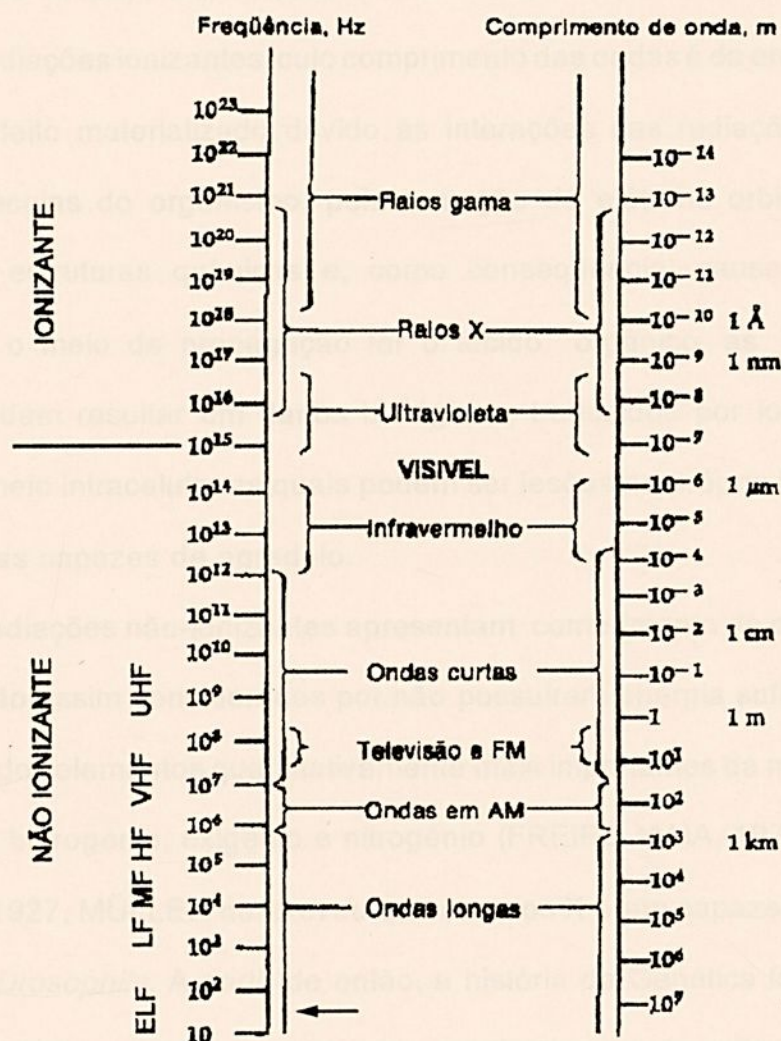


FIGURA 2: Espectro eletromagnético, demonstrando as frequências com respectivos comprimentos de onda (↑ indica a frequência em questão no presente estudo). Notar a superposição de diversas classes de radiação.

materiais e, por isso, torna-se difícil a proteção contra ele. Essa radiação penetra no corpo humano e, no caso de ser alternado, produz um turbilhonamento de corrente que não flui para a terra (DEADMAN *et al.*, 1988).

As radiações ionizantes, cujo comprimento das ondas é da ordem de 10^{-5} cm, têm seu efeito materializado devido às interações das radiações com os átomos e moléculas do organismo, pela remoção de elétrons orbitais, o que modifica suas estruturas químicas e, como consequência, causa danos às moléculas. Se o meio de propagação for o tecido orgânico, as ionizações provocadas podem resultar em danos biológicos, traduzidos por ionização de moléculas no meio intracelular as quais podem ser lesões no próprio DNA ou em outras moléculas capazes de agredi-lo.

As radiações não-ionizantes apresentam comprimento de onda acima de 400 nm e são assim consideradas por não possuírem energia suficiente para retirar elétrons dos elementos quantitativamente mais importantes da matéria viva, como carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio (FREIRE-MAIA, 1972).

Em 1927, MÜLLER descreveu que os raios X eram capazes de induzir mutações em *Drosophila*. A partir de então, a história da Genética foi marcada, principalmente, por um grande interesse no reconhecimento da ação mutagênica de agentes físicos, químicos e biológicos, sintetizados pelo homem ou pré-existentes no ambiente. Tal interesse tornou-se ainda maior nas últimas décadas, em consequência da elevada produção de substâncias potencialmente capazes de gerar efeitos genotóxicos irreversíveis. Hoje já foi identificada uma enorme gama de agentes ambientais como indutora de danos no material genético de células somáticas ou germinativas, dentre os quais estão drogas quimioterápicas, aditivos alimentares e pesticidas.



Algumas das radiações ionizantes foram identificadas como genotóxicas, dentre elas os raios X e gama (GRIFFIN *et al.*, 1990; JAGETIA, 1990; NATARAJAN *et al.*, 1991; VYAS *et al.*, 1991). As primeiras pesquisas sobre efeitos da radiação não-ionizante mostraram que elas tinham um efeito mutagênico em organismos procariotos (KUBITSCHKEK, 1967; WEBB & MALINA, 1967). Mais recentemente, as radiações não-ionizantes com comprimento de onda bastante longo e cuja frequência alcança no máximo 10^2 Hz, têm recebido especial atenção, pois é intensa a exposição humana à mesma. São exemplos dessas radiações aquelas produzidas por eletrodomésticos e por aparelhos e fios envolvidos na transmissão e distribuição de energia elétrica.

A energia contida nos fótons da radiação de 60 Hz é de 10^{-13} eV, extremamente pequena quando comparada àquela da ionizante (10 eV), e portanto, não é capaz de produzir ionização. Daí acreditar-se não serem capazes de alterar a estrutura molecular, mas alguns dados têm colocado tal proposição sob suspeita. Serão enfocados a seguir dados epidemiológicos existentes sobre as exposições residencial e ocupacional ao campo eletromagnético de 50-60Hz, acrescidos dos efeitos biológicos obtidos experimentalmente.

1.2.1. EXPOSIÇÃO RESIDENCIAL

O estudo pioneiro sugerindo os riscos da exposição humana ao CEM foi realizado por WERTHEIMER & LEPPER (1979) através da análise da configuração elétrica das áreas circunvizinhas às subestações de 244 milhares de VA, que apresentaram um câncer entre os anos de 1950 a 1973 em Denver (USA). Essa configuração elétrica considerava o arranjo dos fios de transmissão e distribuição de energia elétrica, assim como a proximidade de subestações e transformadores.

1.2- ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS SOBRE EXPOSIÇÃO AO CAMPO ELETROMAGNÉTICO

Nas últimas décadas houve um crescimento exponencial do campo eletromagnético de 50-60 Hz (CEM) produzido pelo homem. Esse fato deveu-se ao contínuo aumento dos sistemas de comunicação que cobrem a Terra e das redes de transmissão e distribuição de energia elétrica urbana, em consequência do desenvolvimento industrial e do incremento no uso de eletrodomésticos, característicos da tecnologia moderna.

Por conseguinte, nas sociedades industrializadas, houve um aumento na exposição a esse tipo de radiação que permaneceu classificada como "inócua" até o final da década de 70, quando surgiram os primeiros debates sobre os riscos à saúde humana por ela produzidos. A partir de então, foram realizadas inúmeras pesquisas enfocando desde levantamentos epidemiológicos até análise de biomoléculas, objetivando-se verificar a nocividade desse agente.

1.2.1- EXPOSIÇÃO RESIDENCIAL

O estudo pioneiro sugerindo os riscos da exposição humana ao CEM foi realizado por WERTHEIMER & LEEPER (1979) através da análise da configuração elétrica das áreas circunvizinhas às residências de 344 menores de 18 anos, que morreram de câncer entre os anos de 1950 e 1973 em Denver (USA). Essa configuração elétrica considerava o arranjo dos fios de transmissão e distribuição de energia elétrica, assim como a proximidade de subestações e transformadores.



Os indivíduos que morreram de câncer foram identificados, mais freqüentemente, como habitantes de casas com alta configuração de corrente; fato esse que intensificava o risco para o desenvolvimento de neoplasias (principalmente leucemias, tumores de sistema nervoso e linfomas) em cerca de duas a três vezes.

Dentre os itens que caracterizavam alta configuração de corrente, a proximidade às subestações obteve maior correlação com o desenvolvimento de neoplasias, haja vista a presença de seis dos 491 indivíduos portadores de câncer que residiam a menos de 150 m de subestações, enquanto a média da cidade, menor que uma unidade, foi concordante na amostra controle ($n=702$).

Os achados desses autores causaram grande repercussão no mundo científico, o que desencadeou uma série de críticas (COPELAND *et al.*, 1979; ROTH, 1985; POOL, 1990, 1991), principalmente por não terem sido obtidas medidas diretas da intensidade do CEM, ao menos dentro das residências, tampouco obtidas informações com os pais dos pacientes sobre a exposição a outros agentes físicos e químicos sabidamente genotóxicos, que poderiam ser o fator causal do câncer.

No ano seguinte ao estudo pioneiro, FULTON *et al.* (1980) buscaram reproduzir tais ensaios com 199 leucêmicos, menores de 20 anos, moradores de Rhode Island (USA), classificando as residências com base nos mesmos critérios de WERTHEIMER & LEEPER (1979). Os autores não observaram qualquer evidência da relação entre a exposição ao CEM e a incidência de leucemia; contudo, para esses resultados foram demonstradas inúmeras falhas de metodologia, além daquelas já observadas no primeiro estudo, como o fato de selecionar controles apenas na região urbana detectado por WERTHEIMER &

LEEPER (1980) e BETHWAITE & PEARCE (1991), além de usar erroneamente o conceito de que o campo eletromagnético decai sempre com o quadrado inverso da distância evidenciado por COLEMAN & BERAL (1988).

Essas falhas foram tão acentuadas, que em uma análise dos dados de FULTON *et al.* (1980), ponderando a amostra controle, WERTHEIMER & LEEPER (1980) demonstraram que, para menores de oito anos de idade, existia associação entre leucemia e alta configuração de corrente com risco relativo de 1,65. Sobre o fato da taxa de risco ser menor que o referido no estudo pioneiro, WERTHEIMER & LEEPER (1980) concluíram que as diferenças no cálculo da potência do CEM tornam improvável a comparação entre as duas publicações.

Inúmeros outros tipos de câncer foram associados com a exposição crônica ao CEM; entretanto, especificamente para o caso de leucemia, houve uma concordância entre diversos autores. COLEMAN *et al.* (1985, *apud* COLEMAN & BERAL, 1988) detectaram um aumento discreto dos casos de leucemia em áreas dentro de 100 m das linhas de alta tensão e esse aumento foi significativo, quando a área se restringia a 25 m de subestações. McDOWALL (1986) observou que nos indivíduos que residiam a 30 m de fios ou equipamentos de alta tensão ou 50 m de subestações havia um excesso de casos de leucemia. ALDRICH & EASTERLY (1987) compilaram dados de quatro estudos já publicados (WERTHEIMER & LEEPER, 1979; FULTON *et al.*, 1980; McDOWALL, 1983; PEARCE *et al.*, 1985) e apontaram um risco realmente elevado para leucemias em pessoas expostas cronicamente ao CEM.

A inflamada polêmica sobre o assunto foi amenizada quando SAVITZ *et al.* (1990) publicaram seu estudo, que supria a falha há muito criticada nos estudos epidemiológicos, ou seja, a necessidade de se conhecer, além da configuração



elétrica e medida direta do campo magnético das residências, o histórico sobre a exposição a diversos fatores, genéticos e ambientais, que podem contribuir para a ocorrência do câncer infantil. Em vista disso, esse trabalho obteve grande aceitação no mundo científico, com resultados fidedignos associando aumento na incidência de cânceres, principalmente leucemia e câncer de cérebro, com exposição ao CEM.

Outros autores, usando a mesma metodologia de WERTHEIMER & LEEPER (1979), observaram associação entre cânceres em geral e exposição ao CEM. TOMENIUS *et al.* (1982, *apud* TOMENIUS, 1986), considerando a configuração elétrica e a medida direta do campo magnético em frente às casas de menores de 18 anos portadores de neoplasmas, verificaram que 2,8% dos casos residiam a menos de 150 m de linhas de 200 kV contra 1,2% dos controles (risco relativo = 2,1), assim como foi detectado um campo magnético de 3 mG em 2,9% dos pacientes e em apenas 1,4% dos controles (risco relativo = 2,7). TOMENIUS (1986), reanalisando seus dados, considerando os indivíduos que habitavam o mesmo endereço desde o nascimento, concluiu que onde o campo magnético era de 3 mG ou mais, o risco aumentava de 2,7 para 5,6. Além desses, OLSEN *et al.* (1993) e VERKASALO *et al.* (1993) também demonstraram relação positiva entre exposição crônica ao campo magnético e a incidência de câncer na infância.

Esses resultados são parcialmente contraditos por trabalhos como os de SEVERSON *et al.* (1988), que não observaram qualquer associação entre as configurações elétricas e leucemia não linfocítica aguda, e MYERS *et al.* (1990), que não relacionaram diversos tipos de câncer infantil com alta configuração de



corrente elétrica, ressaltando-se que SEVERSON *et al.* (1988) usaram metodologia semelhante à de SAVITZ *et al.* (1990).

As pesquisas sobre exposição residencial ao CEM também têm considerado a exposição a eletrodomésticos, visto que existe um campo de 250 V/m próximo a um cobertor elétrico, com conseqüente elevação do campo magnético natural em muitas ordens de grandeza. Entretanto, em virtude da diminuição da potência do CEM com a distância da fonte, os equipamentos de maior interesse são aqueles cujo contato é íntimo e freqüente, como cobertores e almofadas elétricos, colchões térmicos e rádios-relógios colocados na cabeceira de camas. Em relação a esse aspecto, SAVITZ *et al.* (1990) determinaram que a exposição pré-natal ao CEM de cobertores elétricos está associada ao aumento na incidência de câncer infantil, principalmente leucemia, em especial linfocítica aguda, e câncer de cérebro; estando este último com maior precisão. Entretanto, não houve qualquer associação entre o desenvolvimento de câncer por exposição pré ou pós-natal a colchão d'água elétrico e rádio-relógio de cabeceira. Esses dados são corroborados por outros autores que também não demonstraram associação entre o uso de cobertores elétricos e a ocorrência de neoplasias específicas, como de testículos (VERREAULT *et al.*, 1990) e de mama (VENA *et al.*, 1991).

Sabe-se do interesse mundial pela comprovação dos riscos à saúde provocados pela intensa exposição residencial ao CEM; entretanto, o número de profissões onde tal exposição é acentuada cresce paralelamente ao desenvolvimento tecnológico, e esse fato vem instalando pânico, havendo necessidade de maiores investimentos para se esclarecer o assunto, buscando reduzir o risco tanto quanto possível.



1.2.2- EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL

O aumento na mortalidade por leucemia entre profissionais expostos ao CEM foi primeiramente proposto por MILHAM (1982), e desde então muitos estudos têm fornecido suporte a esse achado (WRIGHT *et al.*, 1982; McDOWALL, 1983; COLEMAN *et al.*, 1983; MILHAM, 1985; TORNQVIST *et al.*, 1986; MILHAM, 1988; BASTUJI-GARIN *et al.*, 1990; TYNES *et al.*, 1992; GUÉNEL *et al.*, 1993), bem como, também foi demonstrado risco aumentado para câncer de cérebro (LIN *et al.*, 1985; TORNQVIST *et al.*, 1986; MILHAM, 1988; SPEERS *et al.*, 1988; LOOMIS & SAVITZ, 1990).

SAVITZ & CALLE (1987) agruparam alguns estudos e demonstraram que havia um discreto aumento (geralmente menor que 50%) na incidência de leucemias, entre todos os eletricitas, mas ao referirem-se a ocupações como telegrafistas, operadores de rádio e radar, eletricitas de linha de transmissão e engenheiros elétricos e eletrônicos, a incidência de leucemia mielóide aguda era elevada em cerca de duas ou mais vezes.

Em exposição ocupacional também existem controvérsias nos resultados, pois alguns autores não verificaram associação dessa com a ocorrência de leucemia (LOOMIS & SAVITZ, 1990; GARLAND *et al.*, 1990) e câncer de cérebro (McLAUGHLIN *et al.*, 1987; PEARCE *et al.*, 1989; TYNES *et al.*, 1992).

Outros tipos de câncer também já foram relacionados ao CEM, mas com resultados pouco ou nada consistentes, como é o caso de neuroblastomas (SPITZ & JOHNSON, 1985) e melanomas malignos (VAGERO *et al.*, 1985). Entretanto, o câncer de mama em homens, pela sua raridade, não vinha recebendo a devida atenção nos estudos epidemiológicos até que STEVENS (1987) suscitou a hipótese

de que a exposição crônica ao CEM aumentaria o risco para o desenvolvimento desse câncer. Esse autor postulou tal assertiva baseado em dados já publicados por outros autores, que demonstraram ser o CEM supressor da elevação noturna da melatonina pineal, alterando com isso o ritmo circadiano do seu nível no sangue (WILSON *et al.*, 1981). A relação da melatonina com o câncer de mama deve-se ao fato dela agir como inibidor da produção de estrógeno pelo ovário e da prolactina pela pituitária. Com a diminuição dos níveis de melatonina haveria um excesso desses hormônios sexuais na corrente sanguínea, os quais têm conhecida associação com o câncer de mama.

Apesar da coerência nessas conclusões, faltavam comprovações epidemiológicas, que foram posteriormente apresentadas por TYNES & ANDERSEN (1990), MATANOSKY *et al.* (1991), DEMERS *et al.* (1991) e TYNES *et al.* (1992), que demonstraram haver um excesso de casos de câncer de mama em indivíduos ocupacionalmente expostos ao CEM, principalmente para eletricitistas de linha de transmissão, com risco de duas até seis vezes maior que para a população geral.

Os estudos em exposição residencial ao CEM e o risco para o câncer de mama apresentam resultados conflitantes, com associação positiva (WERTHEIMER & LEEPER, 1987) e negativa (McDOWALL, 1986; VENA *et al.*, 1991), enquanto que os estudos em exposição ocupacional apresentam resultados mais consistentes. Diante disso, alguns autores têm sugerido que é provável estar ocorrendo uma falsa correlação em virtude dos eletricitários, em geral, estarem em contato com outros agentes de natureza química que poderiam ser mais um agente causal das neoplasias, inclusive câncer de mama (SAVITZ & CALLE, 1987; GAMMON & JOHN, 1993). Além disso, o mecanismo proposto por STEVENS



(1987) não explica o aumento das taxas de câncer de mama em homens pois, da mesma forma que ocorreria o aumento no nível de estrógeno, haveria também na produção de andrógenos o que, pelo esperado, reduziria o risco para o câncer de mama em homens (THOMAS, 1993).

O modelo proposto por STEVENS (1987) não foi desconsiderado em virtude das críticas sofridas (GAMMON & JOHN, 1993; THOMAS, 1993), posto que TAMARKIN *et al.* (1981) já haviam demonstrado que a inibição da melatonina por pinealectomia aumenta a ocorrência, em ratos, de carcinoma mamário induzidos por dimetil benzo[a]antraceno e ainda por terem WILSON *et al.* (1981) e WELKER *et al.* (1983) comprovado que o CEM reduz em 50% a taxa noturna de melatonina.

A associação entre exposição ao CEM e câncer de mama, mesmo que de forma indireta, é clara. Entretanto, não há explicações plausíveis para tal correlação nas mais diversas neoplasias já relacionadas a esse agente.

Assim considerando e, aliando-se às dificuldades para o delineamento de uma pesquisa com indicadores biológicos em indivíduos com exposição residencial ou ocupacional, os cientistas vêm buscando identificar os mecanismos pelos quais seriam explicados tais riscos elevados, usando exposição *in vitro* e análises em nível celular e molecular.



1.3- ESTUDOS EM EXPOSIÇÃO EXPERIMENTAL AO CAMPO ELETROMAGNÉTICO

A determinação do potencial de um agente induzir danos em sistemas biológicos fornece o embasamento científico para o desenvolvimento de uma política ambiental que almeje minimizar as consequências à saúde humana e ao ambiente.

Tal conhecimento pode derivar da análise de biomarcadores, como proteínas alteradas qualitativa ou quantitativamente, funções celulares anormais e a demonstração de danos genéticos, os quais podem ser estudados em células ou indivíduos submetidos à exposição experimental, profissional, terapêutica ou acidental, sendo as três últimas agrupadas como monitorização de população.

Para auxiliar no esclarecimento da polêmica sobre o provável potencial genotóxico do CEM, foram realizadas análises de biomarcadores em diversos estudos utilizando-se de animais de laboratório ou linhagens celulares em exposição experimental ao CEM.

Nessa direção, BYUS *et al.* (1987) obtiveram que a exposição ao CEM de linhagens celulares estabelecidas de linfoma humano e mieloma de camundongo resultou em aumento de 5 e 3 vezes, respectivamente, na concentração da ornitina descarboxilase. Essa enzima, que ocorre em todas as células eucarióticas, é essencial para o crescimento celular e síntese de DNA e é regulada por uma grande variedade de fatores de crescimento e hormônios ativos na superfície celular. Portanto, sua atividade pode-se alterar rapidamente em resposta a estímulos extracelulares (BYUS *et al.*, 1987; ADEY, 1990). Assim, a elevação na síntese dessa enzima provocada pelo CEM permite considerá-lo como

um estímulo à produção de tumor, pois os agentes promotores de tumor induzem síntese elevada de ornitina descarboxilase (ADEY, 1990).

Outras evidências foram obtidas implicando o CEM como promotor de câncer. PHILLIPS *et al.* (1986) detectaram uma capacidade proliferativa elevada, a se julgar pela habilidade na formação de colônias, em duas linhagens de células humanas após exposição ao CEM. Além disso, com exposição de roedores ao CEM, BENIASHVILI *et al.* (1991) e LÖSCHER *et al.* (1993) demonstraram haver um aumento excessivo no número de tumores induzidos por metilnitrosouréia e por dimetilbenzo[a]antraceno, respectivamente.

Diante do exposto, há convicção de que o CEM atue sobre os sistemas biológicos. No entanto, permanecem dúvidas sobre qual estrutura celular tal efeito reside. Existem especulações sobre o assunto, visto que muitos autores referem-se ao efeito do CEM sobre a fisiologia ou estrutura da membrana celular (LUBEN *et al.*, 1982; JOLLEY *et al.*, 1983) pois, nessa estrutura encontram-se os tradutores de sinais externos, incluindo aqueles para estímulo de síntese protéica. Além disso, acredita-se que a ação dos promotores de câncer - como supõem-se seja o CEM - resida na membrana celular, ao contrário dos agentes iniciadores, cuja ação primária é no DNA (ADEY, 1990).

A membrana celular como alvo do CEM foi o resultado do primeiro estudo experimental sobre o efeito desse tipo de radiação em sistemas celulares, quando BAWIN & ADEY (1976) detectaram um aumento na concentração de íons de cálcio na superfície da membrana celular, resultado esse corroborado por outros pesquisadores (ADEY *et al.*, 1982; BLACKMAN *et al.*, 1982).

Outra indicação da ação do CEM sobre a membrana celular foi revelada por LUBEN *et al.* (1982), quando observaram uma drástica inibição na habilidade



das células ósseas responderem a estímulos do hormônio da paratireóide (PTH) com aumento da adenosina monofosfatase cíclica (AMPc) após exposição a esse agente. Considerando o fato de que o PTH tem seus receptores na superfície celular e que não foi afetada a síntese de colágeno estimulada pela hidroxivitamina D3, cujos receptores residem no citoplasma, os autores sugerem que o CEM provavelmente interfere na ligação do PTH ao seu receptor, logo, sua ação é diretamente na membrana.

Esse postulado explica as evidências de que o CEM acelera o crescimento ósseo e reparo de suas lesões; achado esse que culminou com o emprego terapêutico do CEM, introduzido na clínica médica desde os meados da década de 70 (BASSETT *et al.*, 1974). Assim, se o PTH, que tem atividade osteolítica comprovada, encontrar-se com atividade bloqueada, então a exposição ao CEM conduzirá ao aumento na osteogênese.

A ação do CEM também já foi identificada no núcleo celular, atuando sobre genes ou seus produtos. Foi demonstrado que o CEM estimula a síntese de DNA em fibroblastos humanos (LIBOFF *et al.*, 1984) e células de hamster chinês (TAKAHASHI *et al.*, 1986), em intensidade magnética similar àquela do campo magnético natural, e em células ósseas, em intensidade usada terapeuticamente (RINALDI *et al.*, 1974; NORTON, 1975;1982).

Também já foi demonstrado que essa radiação atua sobre os processos de transcrição gênica. GOODMAN *et al.* (1983) obtiveram quantidades aumentadas de RNAs mensageiros inespecífico em glândulas salivares do díptero *Sciara*. Posteriormente, GOODMAN *et al.* (1989), usando técnicas de análise molecular, descreveram uma elevação na taxa de transcrição de genes cujos RNA



mensageiros tinham homologia com os genes da β -actina, histona H2B e oncogene *v-myc* em células HL-60 expostas ao CEM.

Além disso, foi evidenciada a ação do CEM na biossíntese de moléculas pela interferência pós-transcricional e pela alteração qualitativa e quantitativa de polipeptídeos sintetizados, sendo que diferentes pulsos elétricos induziram diferentes padrões de síntese de RNA e de polipeptídeos. Foi ainda detectado que essas respostas diferiram daquelas induzidas por *heat-shock*, refutando a hipótese de as referidas alterações terem sido promovidas pela suposta elevação da temperatura durante a irradiação, sem descartar, entretanto, que poderia ter ocorrido um efeito sinérgico (GOODMAN *et al.*, 1987; GOODMAN & HENDERSON, 1988). O aumento da taxa de tradução de diversas proteínas também foi verificado por BLANK *et al.* (1993).

Em culturas de células osteoprogenitoras (fibroblastos de estroma de medula óssea) expostas ao CEM, houve um aumento extremamente acentuado da quantidade de colágeno (FARNDAL & MURRAY, 1985), o que era esperado devido ao fato de que a degradação do colágeno é um evento dependente de AMPc (RENNARD *et al.*, 1982) e que o CEM reduz em até 90% os níveis dessa enzima (LUBEN *et al.*, 1982).

Os estudos experimentais também apresentaram resultados negativos, entretanto em menor escala. FARNDAL & MURRAY (1985) não observaram qualquer alteração na taxa de proliferação celular de fibroblastos cultivados de medula óssea, e AZADNIV & MILLER (1992) não observaram aumento na taxa de transcrição gênica em células HL-60, após exposição das referidas células ao CEM.

PHILLIPS *et al.* (1986) sugeriram que o CEM atua sobre as informações hereditárias, pois algumas propriedades, como capacidade clastogênica, expressão de receptores, resistência a células *killer*, mantiveram-se alteradas por inúmeras gerações quando da exposição a tal radiação.

Acredita-se, portanto, que determinadas respostas celulares induzidas pelo CEM são potencialmente resultantes da atividade mutagênica desse agente, pois, alteram os processos de duplicação do DNA, transcrição e tradução gênicas.

A atividade genotóxica do CEM, analisada em nível cromossômico após exposição *in vitro* de células humanas, é ainda um evento sob questionamento, devido às correlações positivas (NORDENSON *et al.*, 1984; KHALIL & QASSEM, 1991) e negativas (COHEN *et al.*, 1986, ROSENTHAL & OBE, 1989).

Todos esses dados obtidos experimentalmente podem ser extrapolados para o homem, mas de forma cautelosa, pois são resultados de estudos em linhagens celulares cultivadas ou em outros animais que não o homem. O ideal seria a análise de biomarcadores após a exposição da própria espécie humana. Entretanto, por questões éticas, não é possível a realização de um experimento controlado com a referida espécie; dessa forma, o material humano só encontra-se à disposição de pesquisas científicas quando da exposição ocupacional, terapêutica ou acidental.

A análise de parâmetros citogenéticos em indivíduos ocupacionalmente expostos ao CEM também resultou em dados contraditórios, com identificação de efeito genotóxico (NORDENSON *et al.*, 1984; VALJUS *et al.*, 1993) e ausência de correlação entre as variáveis em questão (BAUCHINGER *et al.*, 1981).

Infelizmente, existem poucos métodos diretos para se medir os danos induzidos no genoma humano. Um desses mede as macroalterações que ocorrem



no DNA, as quais são passíveis de visualização ao microscópio óptico. Essas alterações incluem quebras e rearranjos cromossômicos, assim como alterações mais sutis como as trocas entre cromátides-irmãs (TCI).

A pesquisa das aberrações cromossômicas tem sido rotineiramente utilizada para detectar a atividade genotóxica de agentes potencialmente nocivos à saúde, mostrando-se altamente acurada na identificação de agentes carcinogênicos e não-carcinogênicos (ASHBY, 1988). Portanto, detectar uma frequência aumentada de aberrações cromossômicas em uma população exposta a um agente suspeito de ser genotóxico é, geralmente, considerado como uma evidência de um risco potencial, com conseqüências imediatas ou a longo tempo na saúde.

A grande credibilidade das aberrações cromossômicas como biomarcadores deve-se ao fato de que tal fenômeno é freqüentemente observado em células de tecidos neoplásicos, abortos espontâneos e em indivíduos portadores de algumas anomalias genéticas (THOMPSON *et al.*, 1991).

A análise das TCI é um outro ensaio bastante utilizado, porém, apenas como indicador de exposição. O fenômeno pode ser definido como resultante de trocas recíprocas, envolvendo pontos homólogos e porções simétricas do DNA de cromátides-irmãs (TICE *et al.*, 1975; SASAKI, 1977; CARRANO *et al.*, 1978). Apesar do seu significado como bioindicador ainda ser desconhecido, sua utilização na pesquisa de agentes genotóxicos é estimulada pelas evidências de que inúmeras substâncias comprovadamente genotóxicas aumentam sua ocorrência (BANERJEE & BENEDICT, 1979; ARDITO *et al.*, 1980; GEBHART, 1981; KELSEY *et al.*, 1991; MILLER, 1991; SBRANA *et al.*, 1991) e algumas vezes o referido aumento se dá sob doses inferiores àquelas necessárias para elevar a



incidência de aberrações cromossômicas (BAUKNECHT *et al.*, 1977; BANERJEE & BENEDICT, 1979; LATT *et al.*, 1981). Dessa forma, observa-se que a análise combinada de TCI e de aberrações cromossômicas parece ser bastante sensível e acurada na detecção de agentes genotóxicos.

Nos estudos de populações humanas expostas a agentes presumivelmente genotóxicos, o sistema mais freqüentemente empregado é a análise de biomarcadores cromossômicos em linfócitos de sangue periférico.

A grande maioria dos linfócitos circulantes encontra-se no estágio G_0 do ciclo celular, ou seja, são células especializadas e, portanto, não mais se dividem. Dessa forma podem acumular danos no seu DNA, quando da exposição prolongada a um determinado agente. Assim, quando estimuladas artificialmente à divisão, elas podem reparar as lesões (total ou parcialmente) ou exibi-las no cromossomo, agora passíveis de observação sob técnicas adequadas.

Pode-se, ainda, supor uma correlação entre os danos induzidos nos linfócitos e outras células, tomando-os como um sistema sentinela para grupos de risco como provavelmente o são os indivíduos expostos a índices elevados de campos elétrico e/ou magnético, pelas alterações biológicas evidenciadas nos estudos experimentais.

O desenvolvimento de uma nação, medido por fatores sócio-econômico e tecnológicos, está intrinsecamente relacionado à utilização da energia elétrica; portanto, a exposição ao campo eletromagnético é uma constante em crescimento no cotidiano da população humana. Como consequência adicional o próprio desenvolvimento tecnológico gera ocupações de intensa exposição ao CEM. Portanto, é de grande valia a realização de pesquisas nessa direção, o que contribuirá para um melhor entendimento da questão.



II- OBJETIVOS

Considerando que a inocuidade do CEM ainda está sob questionamento, propôs-se o presente estudo citogenético onde foram verificados os efeitos do CEM sobre a integridade cromossômica. Para isso, foram pesquisadas as frequências de aberrações cromossômicas e de trocas entre cromátides-irmãs em linfócitos periféricos cultivados de eletricitistas de linha de transmissão, ocupacionalmente expostos ao CEM.



III- MATERIAL E MÉTODOS

III.1- CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

É praticamente impossível precisar a intensidade da exposição humana ao CEM, devido a complexidade da sua composição num determinado ambiente. Assim sendo, sucessivas medições realizadas com dosímetros podem apresentar variações significativas. Todavia, é certo que os indivíduos que habitam áreas próximas aos fios de alta tensão e às subestações, assim como os que trabalham como eletricitários, têm maior exposição ao CEM que a população geral. Diante do exposto, justifica-se a seleção das amostras de indivíduos expostos ao referido agente, conforme a ocupação profissional, e seus respectivos controles, considerando-se a configuração elétrica de suas residências.

Assim sendo, foram realizados estudos citogenéticos em trinta indivíduos do sexo masculino, agrupados em duas categorias: amostra de expostos (E), composta por quinze eletricitistas de linha de transmissão, funcionários da Companhia Paulista de Força e Luz (CPFL), expostos ocupacionalmente a campo eletromagnético gerado por cabos de transmissão de energia elétrica (Figuras 3 e 4) cuja tensão elétrica se equivale a 138 kV e corrente de até 600 A (campo magnético médio de 130 A/m); e amostra controle (C), formada por quinze indivíduos saudáveis, de profissões diversas, cujas residência e ocupação não os expunham ao CEM.

Embora a monitorização de populações humanas possa fornecer informações diretas sobre o risco da exposição a um determinado agente, tais estudos exibem limitações metodológicas que podem alterar os resultados. Sabe-





FIGURA 3: Torre de sustentação das linhas de transmissão de energia elétrica (139 Quilovolts)

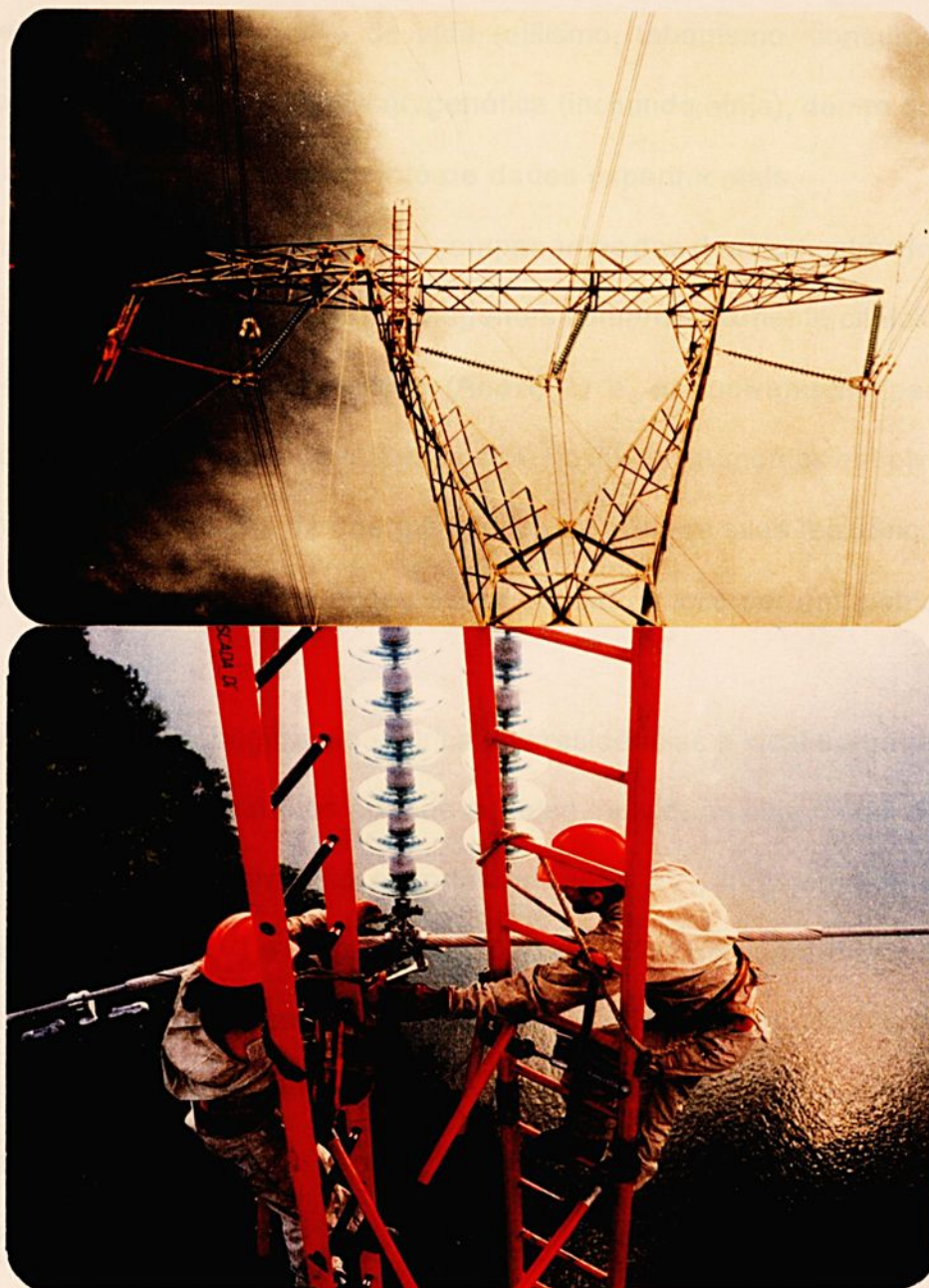


FIGURA 4: Eletricistas de linha de transmissão, exercendo atividades de manutenção em cabos energizados (138 kV). Notar a estreita aproximação entre esses profissionais e as referidas linhas.

se que a exposição a uma enorme variedade de agentes nocivos, muitos dos quais ubíquos agentes ambientais, estilo de vida (etilismo, tabagismo, consumo de drogas terapêuticas ou não), constituição genética (incluindo etnia), dentre outros fatores, podem resultar em enviesamento de dados experimentais.

Assim considerando, todos os componentes das duas amostras foram submetidos a questões sobre exposição a agentes comprovadamente citotóxicos e ao CEM gerado por eletrodomésticos (Anexo 1) e, exclusivamente para a amostra C, foram obtidas informações sobre o arranjo dos instrumentos envolvidos na transformação e distribuição da energia elétrica na área de suas residências e local de trabalho (Anexo 2), informações essas obtidas *in loco* por um eletricista da CPFL.

Baseado na configuração elétrica das residências e local de trabalho, foram selecionados como controles apenas aqueles indivíduos cuja distância de subestações, cabos de transmissão ou primários (138 kV), transformadores e cabos de distribuição (13 kV) e cabos secundários (127 V) ultrapassassem 250, 100, 50 e 18 metros, respectivamente. Dessa forma, a intensidade dos campos elétrico e magnético ao qual essa amostra estava exposta, foi considerada, indubitavelmente, muitas vezes inferior àquela a que estão submetidos os indivíduos da amostra E.

Os dados sobre idade, profissão, tempo de exercício, hábito de tabagismo e exposição profissional à produtos químicos referentes às amostras E e C encontram-se dispostos nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

A amostra C foi selecionada conforme idade (± 5 anos) dos componentes da amostra E, haja vista a possibilidade desse caráter influenciar nos parâmetros citogenéticos analisados neste estudo. Os indivíduos da amostra E têm



Tabela 1: Descrição da amostra de indivíduos expostos ao CEM (E), segundo a idade, tempo de exposição ao CEM, cigarros e produtos químicos manuseados profissionalmente.

Amostra	Idade (anos)	Tempo de exposição ao CEM (anos)	Exposição a cigarros	Produtos químicos manuseados*
E01	37	07	EF, CT	- Verniz isolante, contendo pelo menos um dos seguintes compostos: álcoois, hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos, cetona, éteres, ésteres, aminas, amidas, isocianatos;
E02	35	06	N	
E03	50	14	CT	
E04	25	06	CT	
E05	39	04	CT	
E06	43	06	CT, CR	
E07	55	27	CT	- Tinta, contendo resinas sintéticas, solvente orgânico, metais pesados (chumbo e cromo)
E08	39	16	CR	
E09	43	16	CT	
E10	38	16	CT	
E11	37	12	CT	- Thinner, contendo hidrocarbonetos aromáticos, álcoois, ésteres, cetona, éteres
E12	56	25	CT	
E13	30	08	CT	
E14	51	25	CT	
E15	48	15	CT, CR	

N - sem exposição
EF - ex-fumante

CT - convívio com fumantes no trabalho
CR - convívio com fumantes na residência

* Produtos químicos utilizados esporadicamente por todos os eletricitistas de linha de transmissão da Companhia Paulista de Força e Luz.

Tabela 2: Descrição da amostra controle (C), segundo a idade, profissão, tempo de exercício da mesma, exposição a cigarros e produtos químicos manuseados profissionalmente.

Amostra	Idade (anos)	Profissão	Tempo de exercício (anos)	Exposição a cigarros	Produtos químicos manuseados
C01	50	pedreiro	30	EF, CT	Tintas
C02	49	administrador	23	N	
C03	39	agente administrativo	17	N	
C04	29	agente administrativo	06	CT	
C05	40	auxiliar de serviços gerais	12	N	
C06	34	contabilista	15	N	
C07	49	porteiro	17	EF	
C08	26	agente administrativo	08	EF	
C09	39	motorista	12	N	
C10	37	agente administrativo	15	N	
C11	49	administrador	23	N	
C12	31	vigia		N	
C13	51	bancário	29	EF	
C14	45	militar (bombeiro)	25	CT	Gasolina
C15	40	professor	10	N	Fenol

N - sem exposição

CT - convívio com fumantes no trabalho

EF - ex-fumante

CR - convívio com fumantes na residência

idades entre 24 e 55 anos com média (X) de 41,7 anos e desvio padrão (S) de 8,92, e tempo de exposição ao CEM variando de 4 a 27 anos ($X = 13,5$ e $S = 7,6$). Na amostra C a média de idades é de 40,5 ($S = 8,15$), com distribuição similar àquela da amostra E ($p > 0,05$). Na Figura 5 tem-se a distribuição das amostras considerando a idade, onde observa-se tal similaridade.

Todos os indivíduos estudados residem na região noroeste do Estado de São Paulo (Figura 6), sendo que a amostra C é residente no município de São José do Rio Preto, e a amostra E distribuída em quatro municípios: Araraquara ($n=7$), Bauru ($n=3$), Ribeirão Preto ($n=3$) e São José do Rio Preto ($n=2$).

Com relação à exposição a agentes químicos, todos os membros da amostra E expõem-se, cerca de uma vez por mês, a tintas cuja composição inclui solventes orgânicos e metais pesados como chumbo e cromo; com menor frequência (semestralmente) expõem-se a solda à base de estanho e chumbo; e em maiores intervalos (anual), a produtos de manutenção de equipamentos cujos componentes incluem álcoois, aminas, cetonas, ésteres, éteres, hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos. Na amostra C apenas três indivíduos (20%) sofriam exposição ocasional a químicos: C01, a tintas, C14 a gasolina e o C15 a fenol.

Em virtude do consumo de cigarros (ativa ou passivamente), elevar as taxas de danos no material genético, os quais poderão ser traduzidos citogeneticamente através de aberrações cromossômicas e TCI, foram estudados apenas indivíduos não-fumantes, mas, todos foram argüidos quanto ao provável hábito no passado, assim como sobre o convívio com fumantes no presente. As Tabelas 1 e 2 contêm as informações sobre o fumo passivo e a Tabela 3 fornece mais detalhes sobre o tabagismo no passado de alguns componentes das amostras E e C. Nessas tabelas observa-se que apenas um indivíduo da amostra



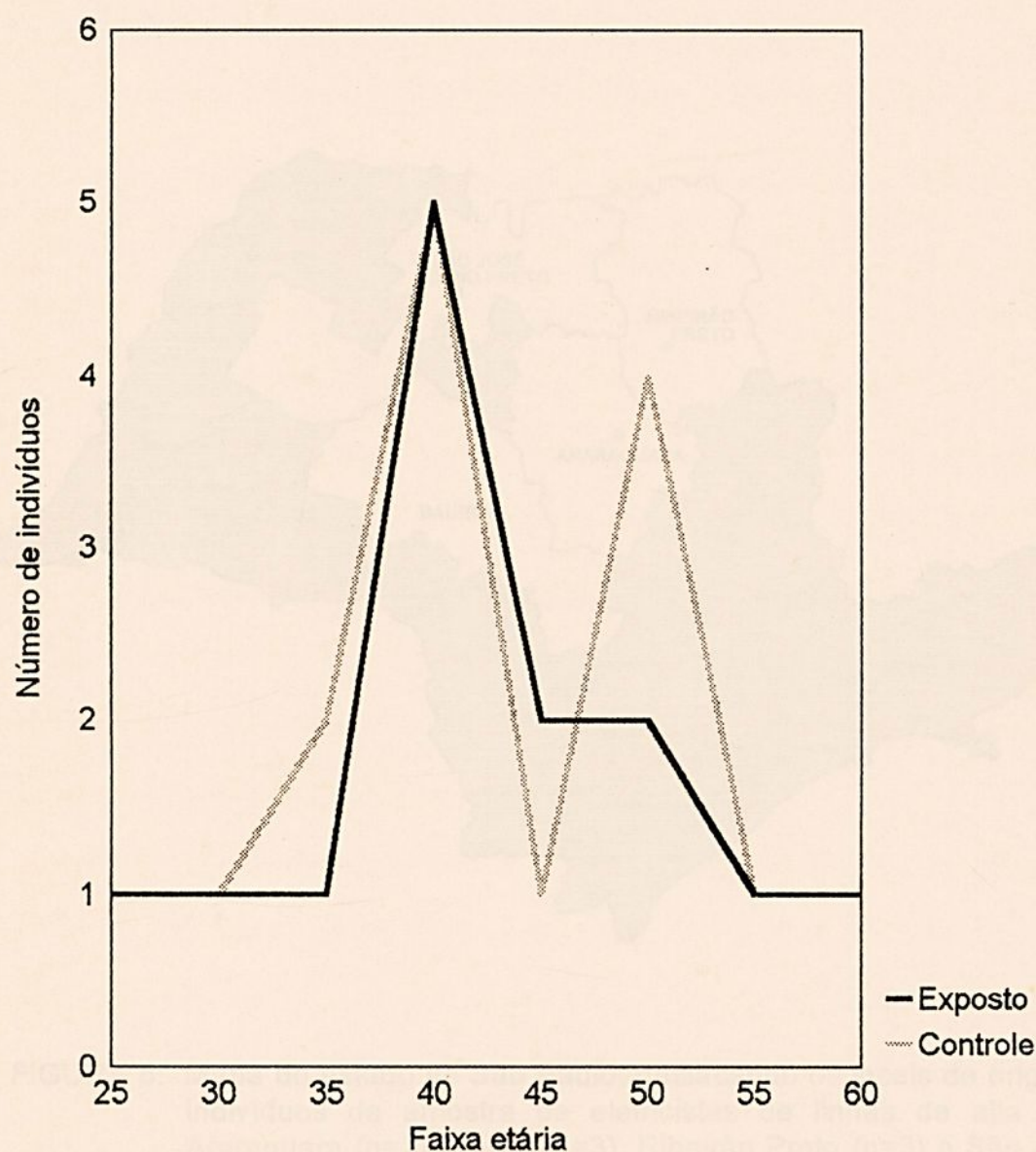


FIGURA 5: Distribuição dos indivíduos expostos ao CEM e seus controles conforme a faixa etária em que se encontram.



FIGURA 6: Mapa do estado de São Paulo, destacando os locais de origem dos indivíduos da amostra de eletricitistas de linhas de alta tensão. Araraquara ($n=7$), Bauru ($n=3$), Ribeirão Preto ($n=3$) e São José do Rio Preto ($n=2$).

Tabela 3: Dados referentes ao consumo de cigarros no passado dos indivíduos ex-fumantes, integrantes da amostra de expostos ao campo eletromagnético (E) e controle (C).

Amostra	Duração do hábito (anos)	Consumo médio (un/dia)	Tempo de abstinência (anos)
E01	03	10	17
C01	40	40	03
C07	13	30	10
C08	03	20	07
C13	15	07	10

E (6,7%) foi fumante, com consumo médio de 10 cigarros por dia, durante três anos, mas com 17 anos de abstinência. Entretanto, quatro componentes da amostra C (26,7%) assumiram o consumo de cigarros no passado, sendo um fumante leve (até 10 unidades/dia), dois moderados (de 20 a 30 unidades/dia) e um pesado (40 unidades/dia), mas, com tempo de abstinência superior a três anos.

No que se refere ao convívio com fumantes, apenas 10% do total de indivíduos estudados co-habitam com fumantes, entretanto, referem-se ao não-consumo de cigarros dentro de seus quartos, o que reduz a exposição aos produtos tóxicos liberados na queima do cigarro. Com relação ao ambiente de trabalho, praticamente toda a amostra E (87%) expõe-se ao fumo durante o trajeto entre a empresa e o local de trabalho no campo. Já na amostra C, apenas três membros (20%) têm contato com fumantes no ambiente de trabalho, sendo que somente o C04 o faz de forma estreita, por ser ambiente fechado.

Nenhum indivíduo havia se submetido a quimioterápicos ou radiação ionizante nos últimos seis meses, assim como, nenhum se referiu ao consumo de álcool além do esporádico.

Diante da seleção criteriosa acredita-se na adequação dessas amostras para a presente pesquisa.

III.2- METODOLOGIA CITOGENÉTICA

Na execução do presente estudo foram realizadas culturas temporárias de linfócitos para a obtenção das metáfases necessárias à realização das análises de trocas entre cromátides-irmãs e aberrações cromossômicas. O procedimento



básico de cultura deu-se conforme a técnica descrita por MOORHEAD et al. (1960), com modificações, obedecendo os seguintes procedimentos:

a) Colheita

De cada indivíduo foram puncionados 10 ml de sangue periférico em seringa previamente heparinizada (Liquemine Roche, 5000 U/M) sendo em seguida deixados em repouso para sedimentação das hemácias.

Para os indivíduos da amostra E estabeleceu-se a coleta de sangue em, no máximo, 24 horas após a última exposição prolongada ao CEM, a qual entende-se em um mínimo de cinco horas. Entretanto, de três indivíduos (E04, E11 e E12) a amostra de sangue foi colhida cerca de 90 horas após uma exposição intensa.

b) Semeadura e incubação

Foram transferidos cerca de 2 ml de plasma contendo linfócitos ressuspensos para um frasco de cultura envolto em folha de alumínio, contendo 18 ml de meio de cultura RPMI 1640 (CULTILAB), suplementado com soro fetal bovino (15% - CULTILAB), fitohemaglutinina (GIBCO), penicilina G potássica (100 UI/ml), quemicetina (5µg/ml) e 5-bromodesoxiuridina (concentração final de 16,25 µM - SIGMA).

Após cuidadosa homogeneização o material foi dividido em duas réplicas e incubado em estufa a 37°C. Uma dessas foi interrompida em 48 horas objetivando maior acúmulo de células em primeira divisão, para análise de aberrações cromossômicas, e a outra em 72 horas, para obtenção de maior número de células em segunda divisão, utilizadas na análise de TCI.



c) Preparação citológica

Sessenta minutos antes de concluída a incubação, em cada frasco de cultura foi adicionado 0,2 ml de colchicina (concentração final de $0,8 \mu\text{M}$ - HOUDÉ) deixando-se completar o tempo de incubação; após o que, foi realizada a hipotonização do material ($\text{KCl } 0,075 \text{ M}$ a 37°C - MERCK) e sucessivas lavagens com solução de metanol e ácido acético, na proporção de 3:1, como forma de fixação. Quando, na lâmina-teste, o material se apresentou com citoplasma realizou-se algumas lavagens com o fixador na proporção de 2:1 a fim de se obter material adequado à técnica de coloração.

A suspensão celular obtida foi gotejada em lâminas previamente limpas e geladas, e armazenadas por, no mínimo, três dias (ou submetidas a um "envelhecimento" em estufa, sob temperaturas entre 82 e 90°C durante 20 minutos) para posterior coloração.

d) Coloração dos cromossomos

Todas as lâminas foram submetidas a coloração diferencial das cromátides-irmãs segundo KORENBERG & FREEDLANDER (1974), com modificações (VARELLA-GARCIA, 1991). Tal técnica consistiu de, após o referido "envelhecimento", as lâminas receberem um filme ($\pm 1,5 \text{ ml}$) de Hoechst 33258 (SIGMA) diluído em solução de Hanks (concentração final de $0,94 \times 10^{-7} \text{ M}$), e imediatamente foram expostas à luz ultravioleta numa distância de 20 cm durante 12 minutos, sendo então lavadas em água destilada e secas ao ar.

À seguir, deu-se o tratamento de hidrólise em tampão fosfato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} - 1 \text{ M}$, pH 8.1-8.3), em banho-maria a uma temperatura entre 85 e



87°C, variando-se o tempo de 5 a 15 segundos, conforme o tempo de envelhecimento do material.

As lâminas foram, então, lavadas em água destilada e coradas numa solução aquosa de Giemsa a 2% durante 4 minutos.

III.3- ANÁLISE CITOGENÉTICA

Sob a técnica de coloração diferencial de cromátides, é provável a identificação do número de ciclos realizado por uma determinada metáfase durante o cultivo. Assim, foram consideradas como metáfases em primeira divisão aquelas com coloração uniforme em ambas as cromátides; em segunda divisão quando para cada região cromatídica escura observou-se um segmento escuro complementar; e em terceira divisão quando haviam segmentos cromossômicos integralmente claros.

As lâminas foram codificadas e de cada indivíduo analisadas 100 metáfases em primeira divisão, para o teste de aberrações cromossômicas, e 50 metáfases de segunda divisão para análise das TCI.

Para o teste das aberrações cromossômicas, computou-se as quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas assim como os rearranjos estruturais passíveis de detecção sob a referida técnica e os eventos anômalos foram classificados conforme os critérios descritos na ISCN (1985). Considerou-se como TCI cada descontinuidade na coloração das cromátides-irmãs. Tanto as alterações cromossômicas como as TCI, foram computados considerando o número (1, 2, 3, 16, 17, 18) ou grupo cromossômico (B, C, D, F e G).



Os parâmetros foram analisados em teste cego igualmente na amostra de indivíduos expostos ao CEM e nos controles e os resultados submetidos a testes estatísticos específicos para cada situação.

Diversos eventos foram fotografados, em filme preto e branco (ILFORD ISO 50) para documentação ou maiores esclarecimentos.

III.4- ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para ambos parâmetros citogenéticos analisados, primeiramente realizou-se análise descritiva, determinando-se a média, mediana, erro padrão, desvio padrão e valores de ocorrência máximo e mínimo.

Assim, as características que apresentaram distribuição próxima à normal foram comparadas através de teste paramétrico (teste t-Student); enquanto aquelas cuja distribuição não se aproximava da normal o foram através de testes não paramétricos, como o de Mann-Whitney e qui-quadrado, sendo consideradas diferenças significativas quando o valor de p (probabilidade) foi inferior a 5%.

Para pesquisar a existência de associação entre duas características procedeu-se a análise de regressão linear.



IV- RESULTADOS

IV.1- ANOMALIAS CROMOSSÔMICAS

Para as análises citogenéticas, utilizou-se um conjunto de 100 metáfases, com exceção de dois casos da amostra E onde foram computadas 91 e 111 metáfases, respectivamente para os casos E02 e E09. Nessas células foram pesquisados quaisquer tipos de alterações cromossômicas, passíveis de detecção sob a coloração empregada.

Tomando-se todos os tipos de alterações como variável única, gerou-se amostras cuja estatística descritiva está apresentada na Tabela 4. O teste do qui-quadrado, aplicado às proporções de alterações cromossômicas observadas nos dois grupos, revelou uma probabilidade extremamente pequena ($p < 0,001$) de que não existam diferenças entre tais proporções. A diferença entre esses grupos torna-se evidente quando se observa as médias de alterações que foram de 0,281 e 0,063 para as amostras E e C, respectivamente, mas também, por fatos como o de 75% da amostra E (observar o valor de Q1) apresentar taxas de alterações cromossômicas superiores àquela obtida como maior valor (MAX) na amostra C. Essas diferenças tornam-se visualmente mais expressivas na Figura 7, um gráfico tipo *boxplot*¹, onde observa-se a pequena área comum entre as amostras estudadas. Entretanto, para melhor esclarecer tais diferenças, procedeu-se a

¹Um gráfico tipo *boxplot* apresenta os dados de uma amostra, organizados em ordem crescente, divididos em quatro quartis denominados, respectivamente, Q1, Q2, Q3 e Q4, cujos limites superiores demarcam 25%, 50%, 75% e 100% da referida amostra. Dessa forma, o limite entre Q2 e Q3 corresponde à mediana.



aplicação de testes estatísticos considerando-se grupos específicos de alterações cromossômicas.

As anomalias cromossômicas observadas neste estudo puderam ser classificadas em três categorias, as quais estão apresentadas na Tabela 5, juntamente com suas freqüências, e são assim definidas:

- a) alterações estruturais, cromatídicas ou cromossômicas, incluindo a presença de fragmentos, falhas, quebras, deficiência e adições;
- b) alterações numéricas, dos tipos euploidia ($4n$) e aneuploidia;
- c) anáfase-C, um tipo específico de alteração, provavelmente centromérica, na qual a metáfase é caracterizada por exibir todas ou a maioria das cromátides individualizadas.

Assim considerando, tem-se que na amostra E as alterações estruturais estavam presentes em 8,12% das células, poliploidias em 0,73% e anáfases-C em 18,84%, enquanto que na amostra C tais índices foram de 3,8%, 0,8% e 1,27%, respectivamente. Dessa forma, observa-se que a diferença entre as amostras E e C deveu-se às alterações dos tipos estruturais e anáfase-C, pois as poliploidias ocorreram em taxas similares. A Figura 8 demonstra graficamente essas freqüências, na qual é bastante óbvia tal diferença.

Ainda na Tabela 5, observa-se que da amostra exposta, apenas três membros apresentaram células normais em taxa superior a 90% do total de metáfases analisadas: são os indivíduos E04, E11 e E12, os quais são os únicos da amostra a não terem sofrido exposição intensa ao CEM nas últimas 24 horas. O teste qui-quadrado demonstrou que os referidos indivíduos diferem do seu grupo ($p < 0.001$) exibindo comportamento similar ao da amostra C ($p = 0,690$).

Referindo-se apenas às alterações estruturais, a Tabela 6 apresenta suas diversas categorias com as respectivas frequências de ocorrência. A visualização desses resultados está complementada na Figura 9 que demonstra a superioridade das taxas de alterações estruturais ocorridas na amostra E, confirmada pela diferença entre as proporções dada pelo teste de Mann-Whitney ($p=0,007$).

Considerando o grau de complexidade das alterações estruturais, procedeu-se análise estatística (teste de Mann-Whitney) utilizando-se apenas os eventos tipo adição e deficiência (Figura 10), excluindo-se falhas, quebras e fragmentos, a proporção obtida para as amostras foi considerada diferente ($p=0,015$). Da mesma forma, agrupados os eventos falha, quebra e fragmento (Figura 11), a diferença tornou-se ainda mais acentuada ($p=0,002$).

As alterações do tipo adição e deficiência não ocorreram simultaneamente numa célula, à exceção do indivíduo E06 que apresentou um rearranjo computado como uma adição e uma deficiência, mas que sugere uma alteração de maior complexidade do tipo translocação entre os grupos A e B, onde parte do material cromossômico de 2q foi translocado para o Bq, resultando em 2q- e Bq+ (Figura 10e). Entretanto, são suposições baseadas apenas na morfologia dos cromossomos, pois a técnica de coloração utilizada não permite se elucidar a questão.

O evento alteração numérica foi, em geral, do tipo poliploidia (incluindo endorreduplicação); entretanto, o indivíduo controle C12 apresentou, além dessas, uma célula aneuplóide com uma provável trissomia do cromossomo 3 (Figura 12).

Conforme o exposto, todos os tipos de agrupamento investigados conduziram a resultados estatísticos que confirmam maior quantidade de danos cromossômicos na amostra de indivíduos expostos ao CEM.

A Tabela 7 considera apenas os eventos do tipo falha e quebra, classificando-as em cromatídicas e cromossômicas. A aplicação do teste qui-quadrado comparando as proporções em nível interamostral, não detectou diferença significativa entre as mesmas, demonstrando não haver qualquer dependência entre a exposição ao CEM e um tipo específico de lesão no DNA ($p=0,641$). Referindo-se à análise intra-amstral, na amostra E observa-se um maior índice de quebras cromatídicas, mas a diferença não foi significativa ($p=0,068$); entretanto, a inabilidade em se demonstrar significado estatístico deve-se, muito provavelmente, ao pequeno número de componentes da amostra, haja vista a probabilidade obtida ter seu valor bem próximo do limite de 5%.

A outra classe de alteração cromossômica observada, que conferiu diferença entre as amostras, foi aquela denominada anáfase-C (Figura 13). Em se tratando dessa, a amostra E apresentou 18,8% das metáfases de primeira divisão com tal característica anômala contra apenas 1,3% na amostra C, tendo-se ainda que na amostra C apenas um indivíduo (C03) exibiu esse fenômeno com um número substancial de metáfases, contribuindo com 42% do total de anáfases-C da amostra (Tabela 5). Houve enorme disparidade entre as amostras E e C, e o baixo número de ocorrência na amostra C dificultou a aplicação de testes estatísticos. Mas, os próprios dados brutos já indicam uma forte associação entre exposição ao CEM e apresentação desse caráter, de forma que um indivíduo exposto possui risco relativo 13,39 vezes maior de apresentar anáfase-C, comparado à um controle.



Foi possível ainda, computar a frequência de anáfases-C nos diferentes ciclos de divisão celular (Figura 13), utilizando-se material das culturas de 72 horas. Entretanto, três indivíduos foram excluídos dessa análise por não se ter obtido material adequado sob esse tempo de cultivo (amostras E04, E11 e E12).

Assim sendo, considerou-se 100 metáfases em qualquer ciclo de divisão, pesquisando-se a ocorrência de anáfases-C e o resultado dessa análise está apresentado na Tabela 8, onde é possível observar que todos os indivíduos exibiram anáfases-C nos 1º e 2º ciclos celulares de divisão e que cerca de 33% desses (E03, E09, E13, E14 e E15) não apresentaram anáfase-C de 3ª divisão. Entretanto, como o número de metáfases de 3ª divisão também é pequeno, houve uma compensação, o que, através do qui-quadrado, resultou na não identificação de preferência por um determinado ciclo celular, ou seja, a proporção de anáfases-C não difere significativamente entre os diferentes ciclos celulares ($p=0,142$).

A Figura 14 demonstra, para cada componente da amostra E, a frequência de anáfases-C no total de metáfases por ciclo celular. Nele, torna-se mais evidente a grande heterogeneidade que ocorre na frequência de células em cada ciclo (ver E01 e E14) bem como no percentual de anáfase-C nos mesmos (ver E02 e E05). Observa-se ainda, que nem sempre o ciclo que abriga o maior número de metáfases coincide com aquele que possui a mais elevada taxa de anáfase-C (ver E06 e E14). Esse, provavelmente, é o fato que fundamenta a ausência de significância na comparação das proporções de metáfases nos diferentes ciclos de divisão assim como na ocorrência de anáfases-C nos mesmos.



A Figura 15 apresenta a frequência relativa das anáfases-C nos diferentes ciclos de divisão, na qual merece destaque o fato dos indivíduos E01 e E07 exibirem uma grande proporção das anáfases-C em 3ª divisão, além de, mais uma vez, demonstrar-se que não existe um padrão regular na distribuição das anáfases-C.

Tabela 4: Descrição estatística das amostras de indivíduos expostos ao CEM (E) e controles (C) referente ao número total de alterações cromossômicas observadas em células no primeiro ciclo de divisão, apresentando-se os resultados do teste do qui-quadrado (χ^2).

Amostra	N	X	Md	EP	Min	Max	Q1	Q3
E	1502	0,281	0,27	0,116	0,04	0,53	0,15	0,49
C	1500	0,063	0,06	0,066	0,02	0,15	0,04	0,08
$\chi^2 = 252,542$				$p = 7,87 \times 10^{-11}$				

N - nº de células

X - média

Md - mediana

EP- erro padrão

IC - intervalo de confiança

Min - nº mínimo

Max - nº máximo

Q1 - 1º quartil

Q3 - 3º quartil

Figura 07: "Boxplot" das amostras de indivíduos expostos ao CEM (E) e controles (C) obtido pelo agrupamento das suas freqüências médias de alterações cromossômicas (AC), apresentando-se quartis e médias (x).

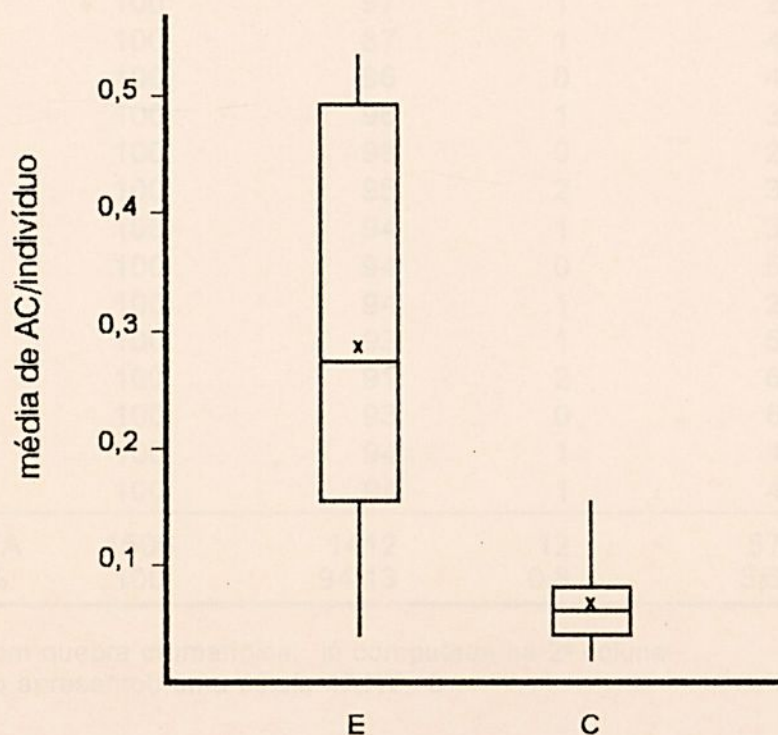
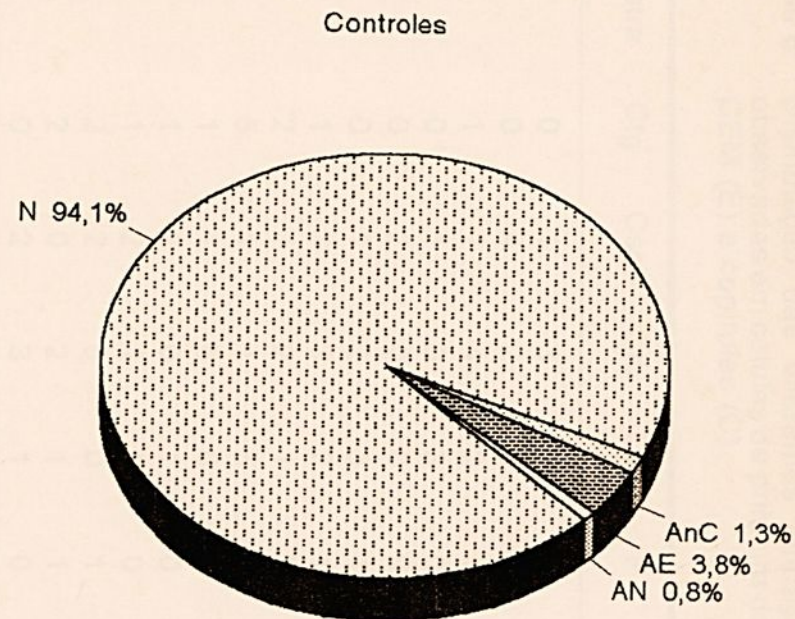
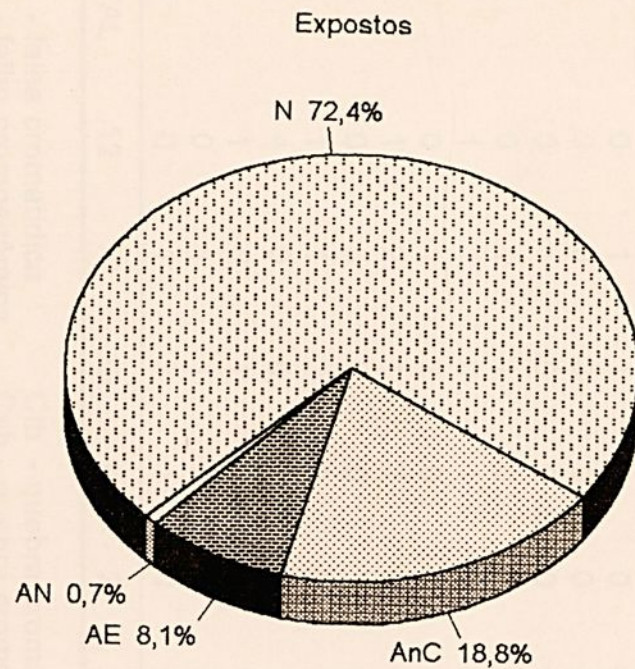


Tabela 5: Frequência absoluta (FA) de metáfases em 1ª divisão, analisadas de indivíduos expostos ao CEM (E) e controles (C), classificadas quanto à presença de alterações cromossômicas estruturais (AE), numéricas (euploidia = 4n) e centroméricas (anáfase-C = An-C).

Amostra	Nº de células analisado		Frequência absoluta de células			
			normal	4n	AE	An-C
EO1	100		85	2	10	3
E02	91		74	1	8	8
E03	100		72	1	11	16
E04	100		92	0	7	1
E05	100		72	1	2	25
E06	100		49	0	9	43 ^a
E07	100		50	0	14	36
E08	100		52	0	8	41 ^a
E09	111		85	0	11	15
E10	100		63	1	9	27
E11	100		96	0	4	0
E12	100		92	0	6	2
E13	100		74	0	10	17 ^a
E14	100		52	1	7	40
E15	100		81	4	6	9
Total	FA	1502	1089	11	122	283
	%	100	72,50	0,73	8,12	18,84
C01	100		96	0	4	0
C02	100		97	1	2	0
C03	100		87	1	4	8
C04	100		96	0	4	0
C05	100		96	1	3	0
C06	100		98	0	2	0
C07	100		95	2	3	0
C08	100		94	1	3	2
C09	100		94	0	5	1
C10	100		94	1	2	3
C11	100		93	1	5	1
C12 ^b	100		91	2	6	1
C13	100		93	0	6	1
C14	100		94	1	4	1
C15	100		94	1	4	1
Total	FA	1500	1412	12	57	19
	%	100	94,13	0,8	3,8	1,27

^a célula com quebra cromatídica, já computada na 2ª coluna

^b indivíduo apresentou uma célula 47,XY,+3



N= normal AnC= anáfase-C AE= alteração estrutural AN= alteração numérica (4n)

FIGURA 8: Caracterização gráfica da análise de células em primeiro ciclo de divisão nos indivíduos expostos ao CEM e seus respectivos controles.

Tabela 6: Distribuição das diferentes alterações cromossômicas estruturais observadas em células de primeira divisão dos indivíduos expostos ao CEM (E) e controles (C).

Amostra	Ctg	Csg	Ctb	Csb	F	Csa	Csd	Total (*)	FR(%)
E01	0	1	3	2	0	3	1	10	10,00
E02	0	4	2	2	1	0	0	09 (8)	9,89
E03	1	1	4	2	1	0	2	11	11,00
E04	0	1	0	3	0	3	0	07	7,00
E05	0	2	0	0	0	0	0	02	2,00
E06	0	1	2	3	1	1	2	10 (9)	10,00
E07	1	3	3	2	1	2	2	14	14,00
E08	2	1	2	1	2	0	0	08	8,00
E09	5	1	1	5	0	1	1	14 (11)	12,61
E10	1	1	6	0	0	1	0	09	9,00
E11	1	2	0	1	0	0	0	04	4,00
E12	1	2	1	1	0	0	1	06	6,00
E13	2	2	5	0	1	0	0	10	10,00
E14	2	0	2	1	1	1	1	08 (7)	8,00
E15	0	2	3	1	0	0	0	06	6,00
TOTAL	16	24	34	24	8	12	10	128	8,52
C01	3	0	0	1	0	0	1	05 (4)	5,00
C02	1	0	1	0	0	0	0	02	2,00
C03	0	1	1	3	0	0	1	06 (4)	6,00
C04	0	0	3	0	0	1	0	04	4,00
C05	0	1	0	2	0	0	0	03	3,00
C06	0	1	1	0	0	0	0	02	2,00
C07	1	1	0	1	0	0	0	03	3,00
C08	0	1	2	0	0	0	0	03	3,00
C09	1	2	1	1	0	0	1	06 (5)	6,00
C10	0	0	3	0	1	0	0	04 (2)	4,00
C11	1	1	3	0	0	0	0	05	5,00
C12	4	0	0	1	0	1	0	06	6,00
C13	1	0	1	2	1	0	1	06	6,00
C14	0	1	1	2	0	0	0	04	4,00
C15	0	1	2	1	0	0	0	04	4,00
TOTAL	12	10	19	14	2	2	4	63	4,20

Ctg - falha cromatídica

Csg - falha cromossômica

F - fragmento

Ctb - quebra cromatídica

Csb - quebra cromossômica

Csa - adição

Csd - deficiência

*Os valores entre parênteses indicam o total de células que abrigam o referido nº de alterações estruturais.



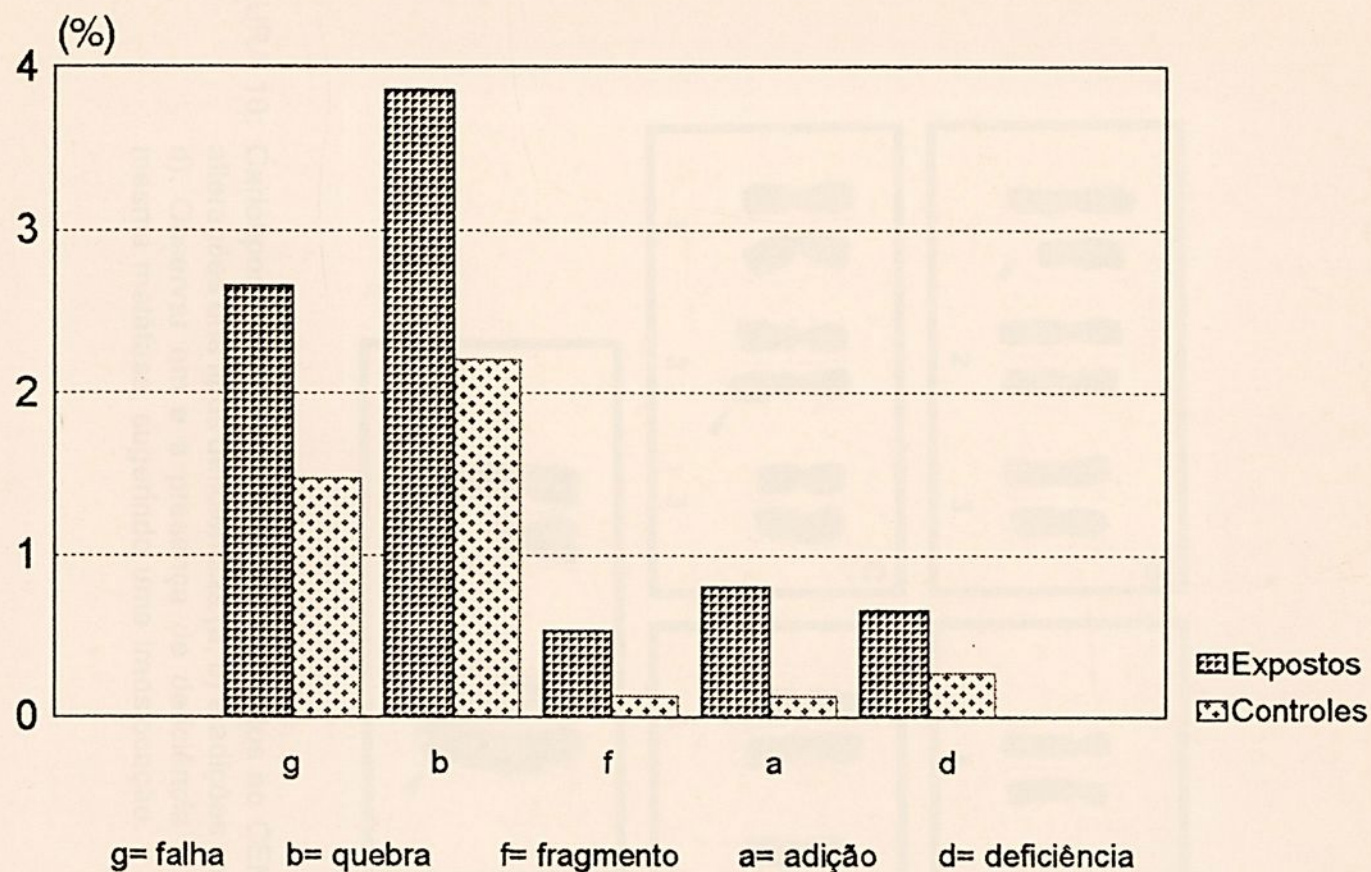


FIGURA 9: Frequências relativas das diversas alterações estruturais observadas em metáfases de primeira divisão, nas amostras de indivíduos expostos ao CEM e de controles.

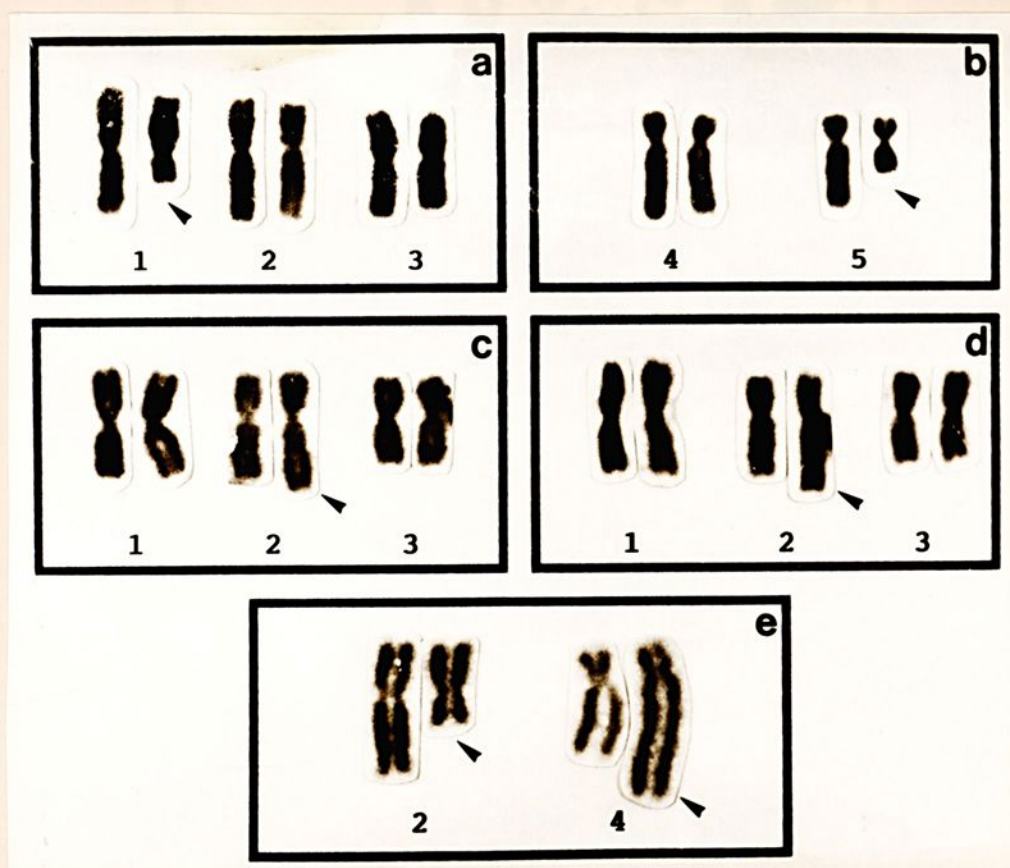


FIGURA 10: Cariótipos parciais de indivíduos expostos ao CEM, apresentando alterações dos tipos deficiências (a, b) e adições cromossômicas (c, d). Observar em e a presença de deficiência e adição em uma mesma metáfase, sugerindo uma translocação.

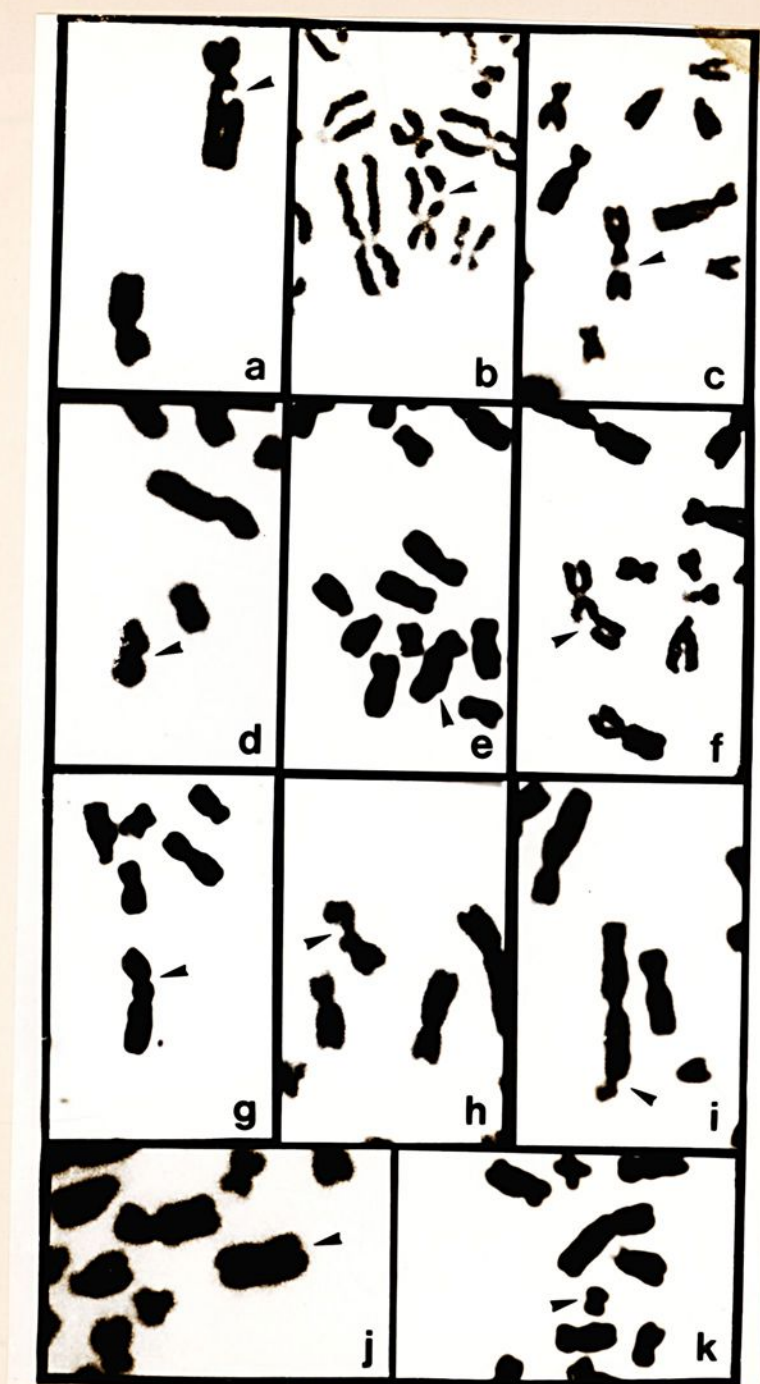


FIGURA 11: Metáfases parciais de indivíduos expostos ao CEM, exibindo as seguintes alterações: falhas cromatídica (a, b) e cromossômica (c); quebras cromatídica (d, e, f) e cromossômica (g, h, i) e fragmento cromossômico (j, k).



FIGURA 12: Fotomicrografia de metáfase e respectivo cariótipo, apresentando trissomia do cromossomo 3, observada no indivíduo controle C12.

Tabela 7: Frequências absoluta (FA) e relativa (FR - %) de falhas e quebras, cromatídicas e cromossômicas, nas amostras de indivíduos expostos ao CEM (E) e de controles (C).

Amostra	Tipo de evento	ALTERAÇÃO					
		Falha		Quebra		Total	
		FA	FR	FA	FR	FA	FR
E	Ct	16	16,33	34	34,69	50	51,02
	Cs	24	24,49	24	24,49	48	48,98
	Ct + Cs	40	40,82	58	59,18	98	100,00
C	Ct	12	21,82	19	34,54	31	56,36
	Cs	10	18,18	14	25,45	24	43,64
	Ct + Cs	22	40,00	33	60,00	55	100,00

Ct - cromátide

Cs - cromossomo

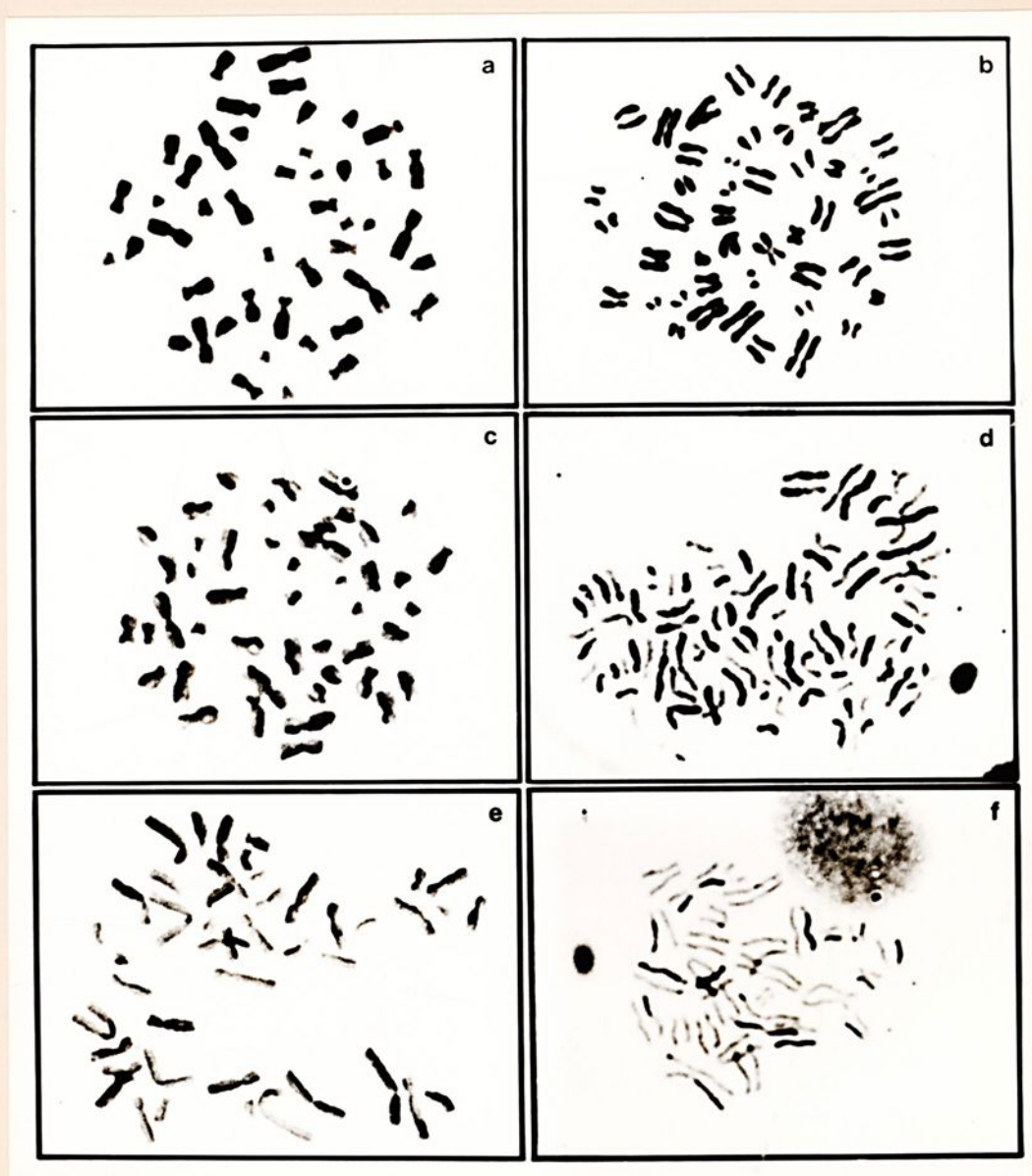


FIGURA 13: Metáfases em primeiro (a), segundo (c) e terceiro (e) ciclos de divisão celular exibindo centrômero normal e apresentando separação das cromátides, caracterizando o fenômeno anáfase-C (b, d, f) nos respectivos ciclos. Notar, em anáfase-C, a possível identificação da região centromérica mesmo após a divisão do centrômero.

Tabela 8: Apresentação das freqüências relativas (%) das figuras em anáfase-C (AnC) dentre as metáfases (M) de primeiro, segundo e terceiro ou mais ciclos de divisão, em células de indivíduos expostos ao CEM (E).

Amostra	F I G U R A S					
	1ª divisão		2ª divisão		3ª divisão	
	M	AnC (%)	M	AnC (%)	M	AnC (%)
E01	09	33,33	21	23,81	70	35,71
E02	47	10,64	50	10,00	03	33,33
E03	38	21,05	40	37,50	22	00,00
E05	46	52,17	34	67,65	20	70,00
E06	42	28,57	43	41,86	15	53,33
E07	29	31,03	34	23,52	37	51,35
E08	46	26,09	45	31,11	09	33,33
E09	29	31,03	43	6,98	28	00,00
E10	42	33,33	47	55,32	11	36,36
E13	58	18,96	33	18,18	09	00,00
E14	68	26,47	30	46,67	02	00,00
E15	51	9,80	40	10,00	09	00,00
TOTAL	505	25,74	460	30,65	235	31,49

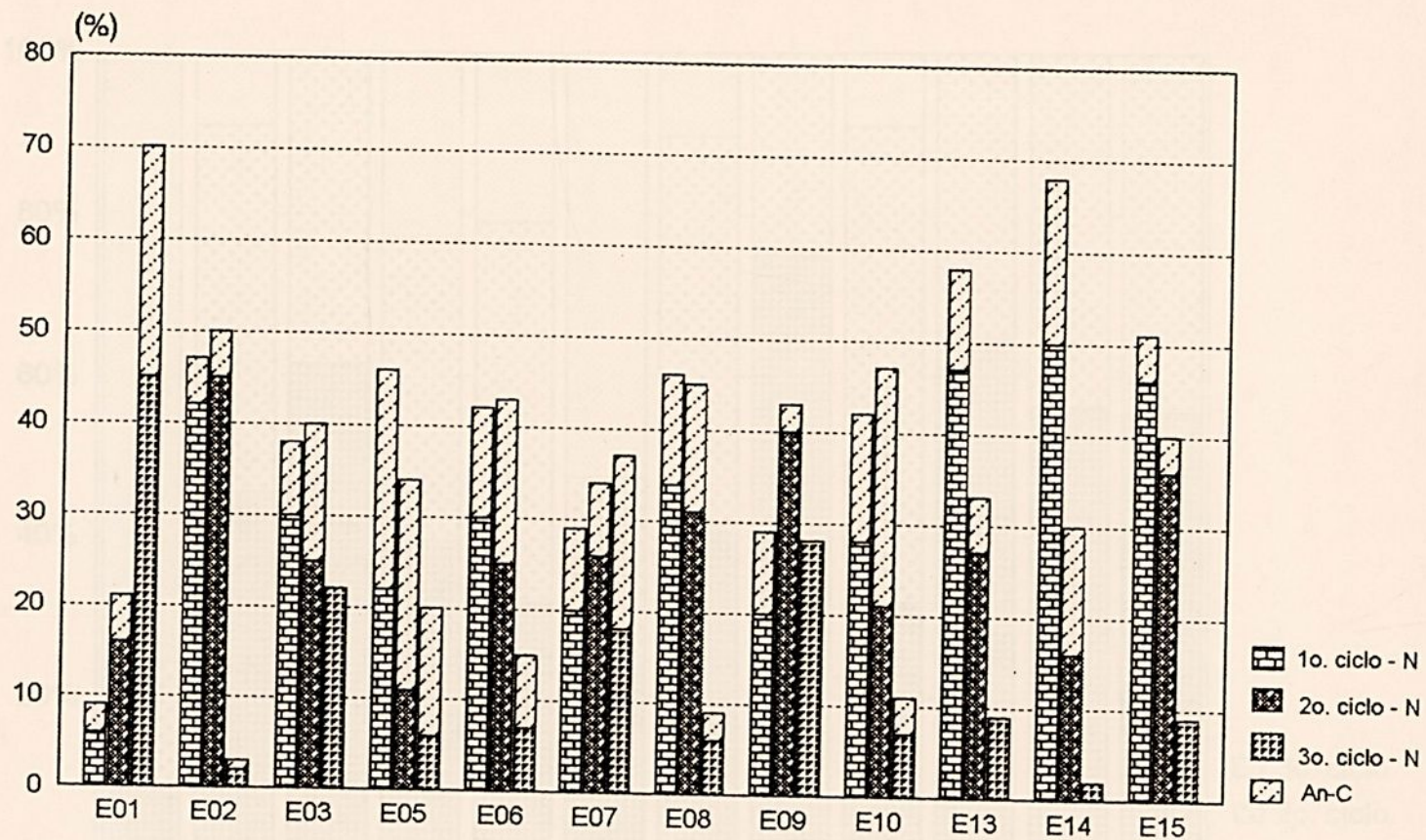


FIGURA 14: Frequências das metáfases normais (N) e anáfases-C (An-C) nos diferentes ciclos de divisão celular, em indivíduos expostos ao CEM (E).

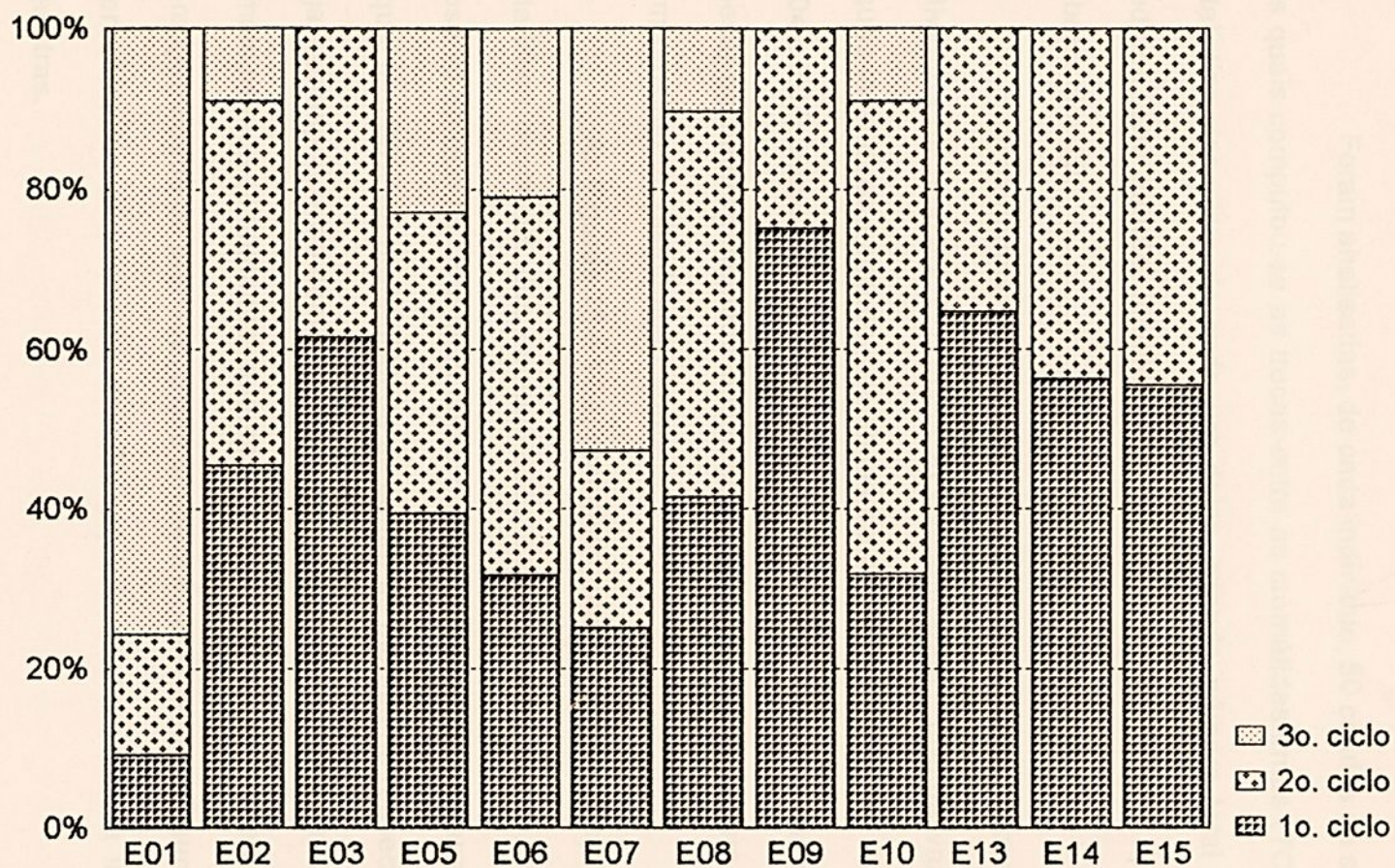


FIGURA 15: Frequências relativas de anáfases-C nos diferentes ciclos de divisão celular, em indivíduos expostos ao CEM (E).

IV.2- TROCAS ENTRE CROMÁTIDES-IRMÃS

Foram analisadas, de cada indivíduo, 50 células de segunda divisão, nas quais computou-se as trocas entre as cromátides-irmãs (TCI). Os dados da estatística descritiva de cada um deles, citando número total de TCI, média, mediana, erro padrão, intervalos de confiança e quartis, são apresentados nas Tabelas 9 e 10.

Referindo-se ao número de TCI por célula observa-se que os indivíduos da amostra E (Tabela 9) apresentaram, grande variabilidade, com alguns indivíduos exibindo diferenças de até 14 TCI de uma células para outra (E04 e E07), enquanto que a amostra C (Tabela 10) mostrou-se mais homogênea. Apesar da heterogeneidade observada as amostras tiveram um comportamento bem próximo da distribuição normal.

As Figuras 16 e 17 apresentam, sob a forma de *boxplots*, os dados da estatística descritiva dos componentes das amostras E e C, respectivamente. Observa-se que há uma faixa comum entre eles (porção hachurada nas figuras), a qual tem 95% de probabilidade de conter as médias da respectiva amostra, ou seja, corresponde ao desvio padrão das médias obtidas. Na amostra C essa faixa é mais estreita (2 unidades) que na amostra E (4 unidades), demonstrando maior homogeneidade da primeira, o que também é observado na Figura 18, onde estão representados os intervalos de confiança da média de cada indivíduo dessas amostras.

Em virtude de ambas as amostras apresentarem distribuição próxima da normal, não foi necessária a transformação dos dados para a utilização de um teste paramétrico. Assim, utilizando-se como unidade de observação, o número

médio de TCI por célula obtido para cada indivíduo, aplicou-se o teste t-Student para variâncias desiguais, devido à maior variabilidade na amostra E.

A Tabela 11 apresenta o agrupamento dos dados para cada amostra, incluindo estatística descritivas e resultados do teste t-Student. Tem-se que a amostra E teve uma média de 6,13 TCI/célula ($EP=0,29$) enquanto que na amostra C, tal média foi de 4,51 ($EP=0,16$) sendo $p < 0,001$; ou seja, existe uma probabilidade de 0,01% de não existir diferença entre as médias exibidas pelas duas amostras. Isso é uma forte evidência de que a amostra de indivíduos expostos ao CEM apresenta valores bem mais elevados de TCI. Essa tabela, assim como o desenho esquemático na Figura 19, sugere uma diferença acentuada no número de TCI entre as amostras E e C, com uma coincidência em apenas 10% dos valores.

Ainda na Figura 19 observa-se que há coincidência (amostra C), ou quase (amostra E), entre a localização dos valores de média e mediana, o que é mais um indicativo de que a presente amostra assemelha-se a distribuição normal dos dados.

Buscando-se verificar se a distribuição das TCI entre os diversos grupos cromossômicos deu-se de acordo com o esperado, através do teste do qui-quadrado, comparou-se os resultados obtidos à proporção esperada baseada no que representa cada grupo cromossômico em relação ao lote diplóide. O resultado da aplicação desse teste (Tabela 12) revelou que há diferença significativa na proporção esperada e obtida de TCI entre os grupos cromossômicos em quaisquer das amostras estudadas, pois as probabilidades das amostras não serem diferentes (p) foram muito inferiores a 0,001. Esses valores revelam diferença não-significativa ao nível de 5%. A Figura 20 ilustra as proporções obtidas e esperada

na qual pode-se observar que os cromossomos maiores (A, B e C) apresentaram mais TCI que o esperado enquanto que para os de menor tamanho (grupos F e G) obteve-se um número de TCI muitas vezes inferior ao esperado. Esse fatos demonstram que a distribuição de TCI por grupo cromossômico não se baseia exclusivamente no tamanho dos cromossomos.

Realizou-se, ainda, análise da ocorrência de trocas múltiplas, traduzidas pela presença de mais de uma TCI em um mesmo cromossomo. Sob esse prisma, elaborou-se a Tabela 13, na qual temos que a amostra E teve um total de 3584 TCI das quais 378 eram múltiplas (10,55%) enquanto que a amostra C apresentou um total de 2506 TCI onde apenas 186 foram múltiplas (7,42%). Essa diferença foi considerada altamente significativa pelo teste do qui-quadrado ($P < 0,001$).

Os dados apresentados demonstram que a amostra de indivíduos expostos ao CEM, quando comparada a de controles, apresenta uma taxa superior de TCI por célula, não só por envolver maior número de cromossomos mas também pela ocorrência, em maior número, de trocas múltiplas.

Para pesquisar a ocorrência de correlação entre tempo de exposição ou idade e as alterações observadas (aberrações cromossômicas, TCI e anáfase-C) procedeu-se a análise de regressão linear, baseando-se nos valores apresentados nas Tabelas 15 e 16, que resumem os dados obtidos no presente estudo. Nessas, são apresentadas as freqüências de metáfases exibindo alterações estrututrais e anáfase-C e número médio de TCI/célula, relacionando-os às idades e, para a amostra E, tempo de exposição ao CEM. Através desses dados, buscou-se verificar se as alterações observadas mantêm relação de dependência com idade ou tempo de exposição. Em virtude do pequeno número

de componentes em cada faixa etária é mais coerente inferir que não foi possível concluir se há a referida correlação. entretanto, pode-se afirmar que se houver tal correlação, a mesma é fraca pois do contrário, apesar da limitação no tamanho da amostra, seria possível observá-la. As Figuras 21, 22 e 23 apresentam, respectivamente, os eventos citogenéticos alteração estrutural, anáfase-C e TCI, como variáveis dependentes da idade (a) e tempo de exposição ao CEM (b). Nelas, observa-se que o padrão de dispersão é praticamente aleatório, o que justifica a ausência de correlação entre as variáveis em questão.

Tabela 9: Caracterização dos indivíduos expostos ao CEM (E) quanto ao número total de TCI exibido na análise de 50 células e apresentação dos dados da estatística descritiva .

Amostra	Total	Média	Mediana	EP	IC (95%)	Min	Max	Q1	Q3
E01	253	5,06	5,0	0,3238	4,409 ; 5,710	1	11	4	7
E02	295	5,90	5,5	0,3273	5,213 ; 6,587	2	14	4	7
E03	246	4,92	5,0	0,2678	4,382 ; 5,458	1	09	3	6
E04	415	8,30	8,0	0,4800	7,336 ; 9,264	1	15	6	11
E05	365	7,30	7,0	0,3717	6,553 ; 8,047	2	15	5	9
E06	333	6,66	6,0	0,4700	5,716 ; 7,604	0	14	4	8
E07	303	6,06	6,0	0,3901	5,276 ; 6,843	0	14	4	8
E08	274	5,48	5,0	0,2941	4,891 ; 6,068	3	11	4	7
E09	339	6,78	7,0	0,2639	6,249 ; 7,310	3	12	6	8
E10	246	4,92	5,0	0,2840	4,439 ; 5,490	0	09	4	6
E13	261	5,22	5,0	0,2446	4,728 ; 5,711	2	10	4	6
E14	312	6,24	6,0	0,2612	5,715 ; 6,765	2	09	5	8
E15	342	6,84	7,0	0,1837	6,471 ; 7,209	3	09	6	8

EP - erro padrão

IC - intervalo de confiança

Min - nº mínimo

Max - nº máximo

Q1 - 1º quartil

Q3 - 3º quartil



Tabela 10: Caracterização dos indivíduos controles do estudo (C) quanto ao número total de TCI exibido na análise de 50 células e apresentação dos dados da estatística descritiva .

Amostra	Total	Média	Mediana	EP	IC (95%)	Min	Max	Q1	Q3
C01	229	4,58	5,0	0,212	4,154 ; 5,006	1	08	4	6
C02	238	4,76	5,0	0,233	4,292 ; 5,228	1	09	4	6
C03	191	3,82	4,0	0,168	3,482 ; 4,158	2	09	4	4
C04	218	4,36	4,5	0,314	3,729 ; 4,990	0	10	3	5
C05	223	4,46	4,0	0,294	3,868 ; 5,051	1	10	3	6
C06	190	3,80	3,5	0,251	3,296 ; 4,304	1	09	2	5
C07	244	4,88	4,5	0,348	4,180 ; 5,579	1	12	3	6
C08	251	5,02	5,0	0,334	4,349 ; 5,690	1	10	3	7
C09	283	5,66	5,0	0,314	5,029 ; 6,290	2	11	4	7
C11	190	3,80	4,0	0,260	3,277 ; 4,323	1	10	3	5
C13	220	4,40	4,0	0,192	4,015 ; 4,785	2	08	3	5
C14	228	4,56	5,0	0,279	4,000 ; 5,119	1	09	3	6

EP - erro padrão

IC - intervalo de confiança

Min - nº mínimo de TCI

Max - nº máximo de TCI

Q1 - 1º quartil

Q3 - 3º quartil



No. TCI

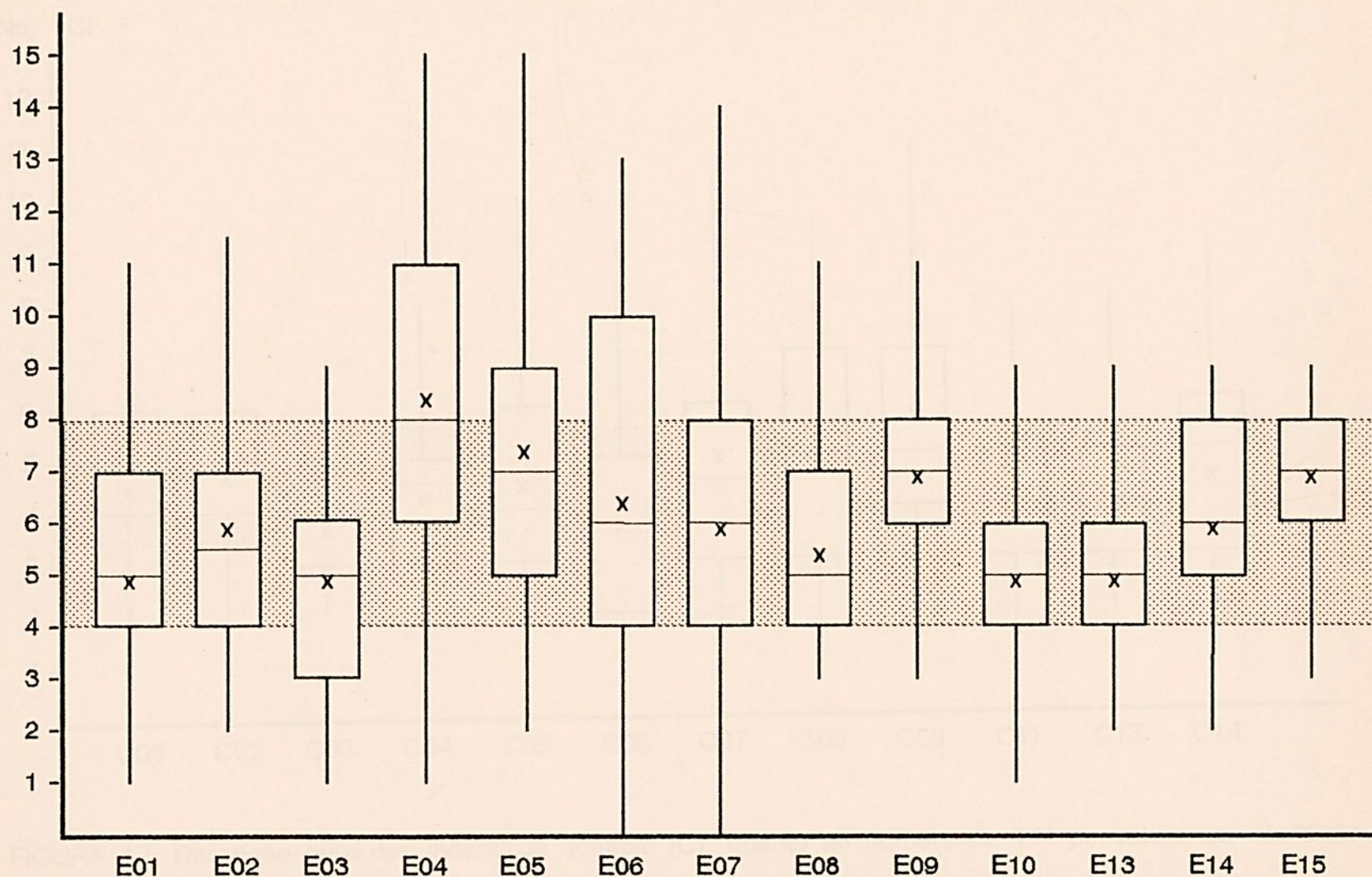


FIGURA 16: Descrição geral dos indivíduos expostos (E), quanto ao número de TCI por célula, apresentando quartis e média (x).

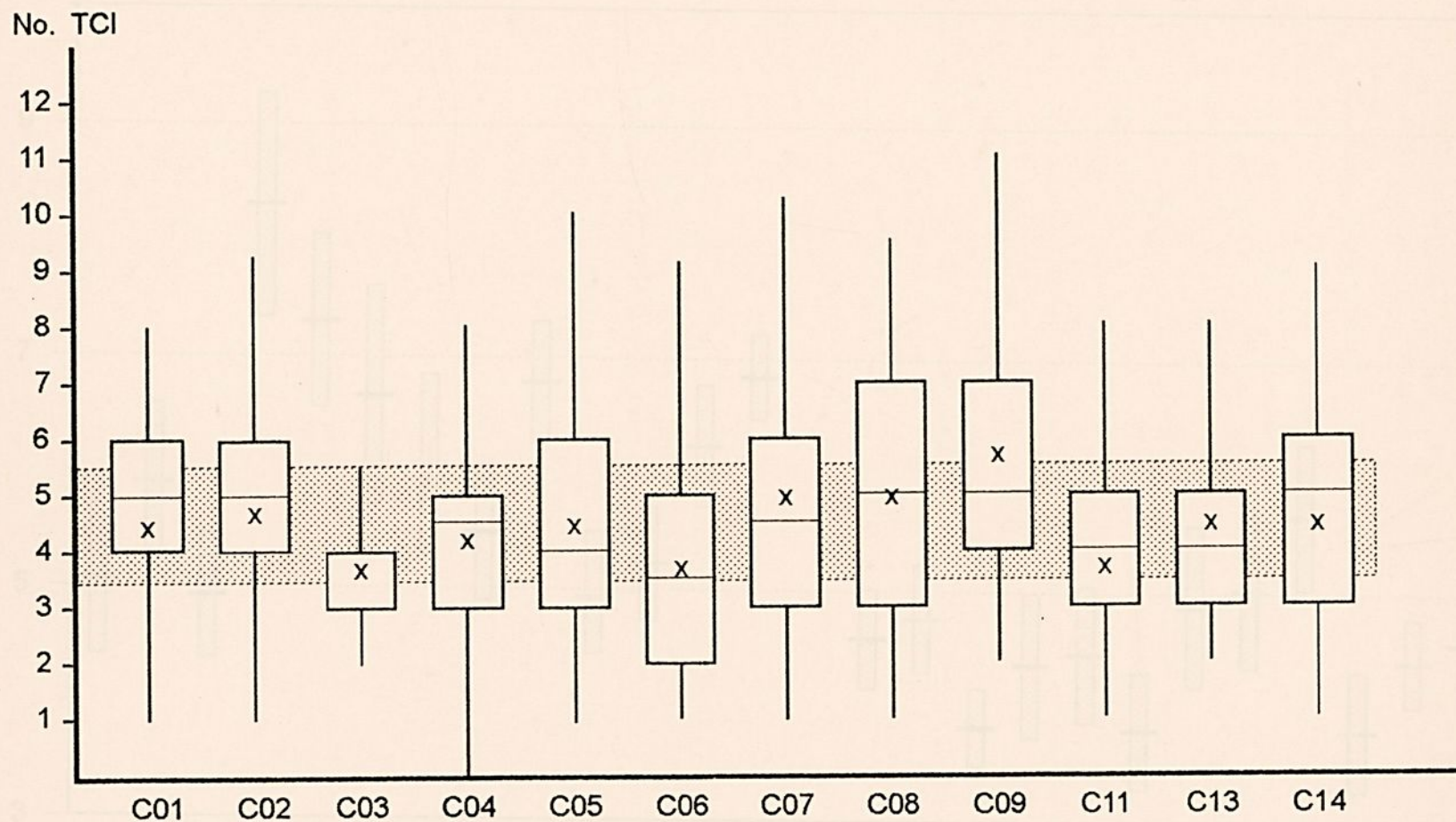


FIGURA 17: Descrição geral dos indivíduos controle (C), quanto ao número de TCI por célula, apresentando quartis e média (x).

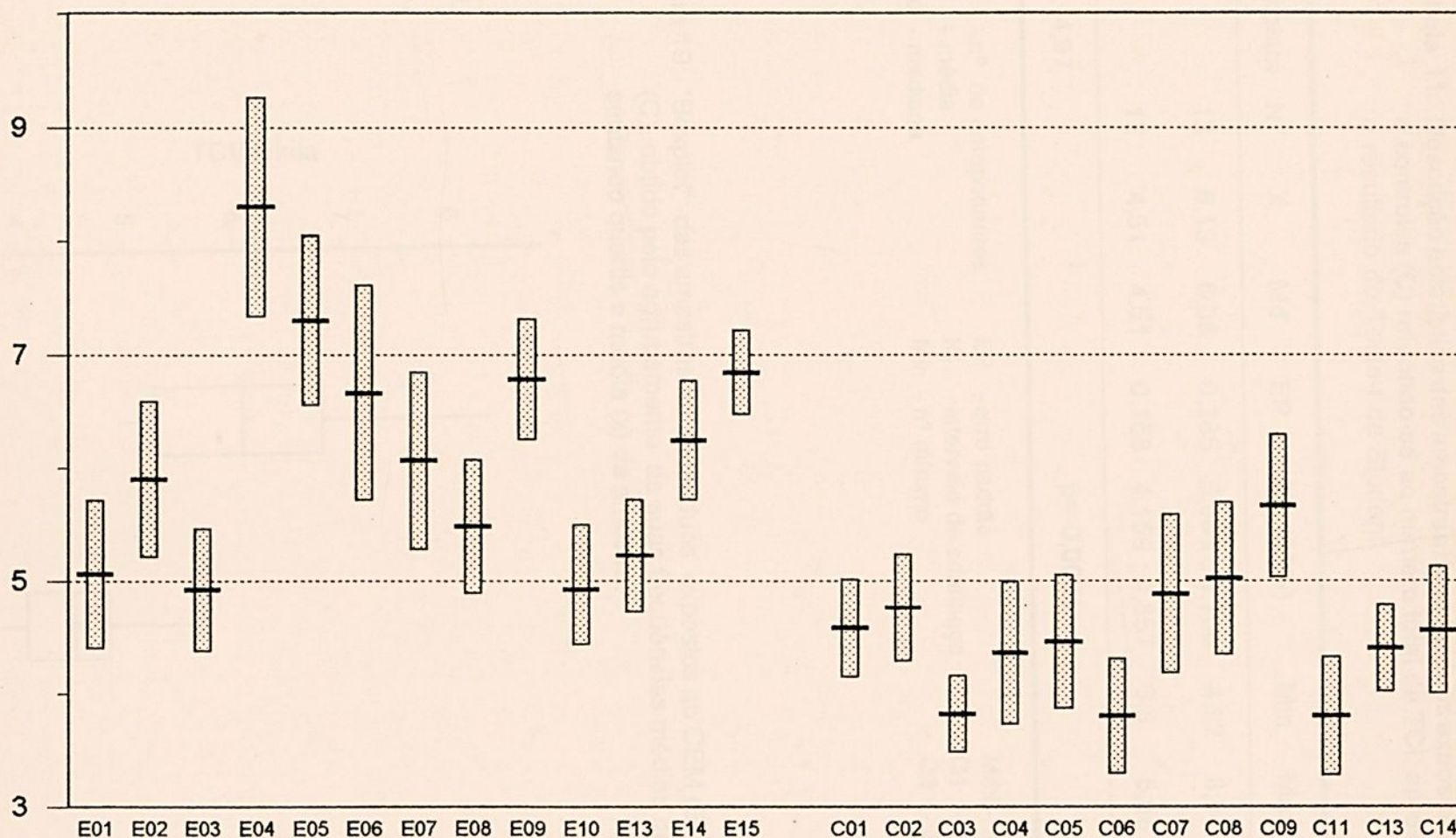


FIGURA 18: Representação gráfica das médias do número de TCI (—) e seus intervalos de confiança, nos indivíduos expostos ao CEM (E) e controles (C) do presente estudo.

Tabela 11: Descrição estatística das amostras de indivíduos expostos ao CEM (E) e controles (C) referindo-se ao número total de TCI, apresentando-se o resultado do Teste-t de Student.

Amostra	N	X	Md	EP	IC (95%)	Min	Max	Q1	Q3
E	13	6,13	6,06	0,285	5,508 ; 6,750	4,92	8,3	5,22	6,78
C	12	4,51	4,51	0,158	4,159 ; 4,857	3,8	5,66	4,09	4,82
$t = -4,97$					$p = 0,0001$				

N - n° de componentes

X - média

Md - mediana

EP - erro padrão

IC - intervalo de confiança

Min - n° mínimo

Max - n° máximo

Q1 - 1° quartil

Q3 - 3° quartil

Figura 19: "Boxplot" das amostras de indivíduos expostos ao CEM (E) e controles (C), obtido pelo agrupamento de suas frequências médias de TCI, apresentando quartis e média (x) da amostra.

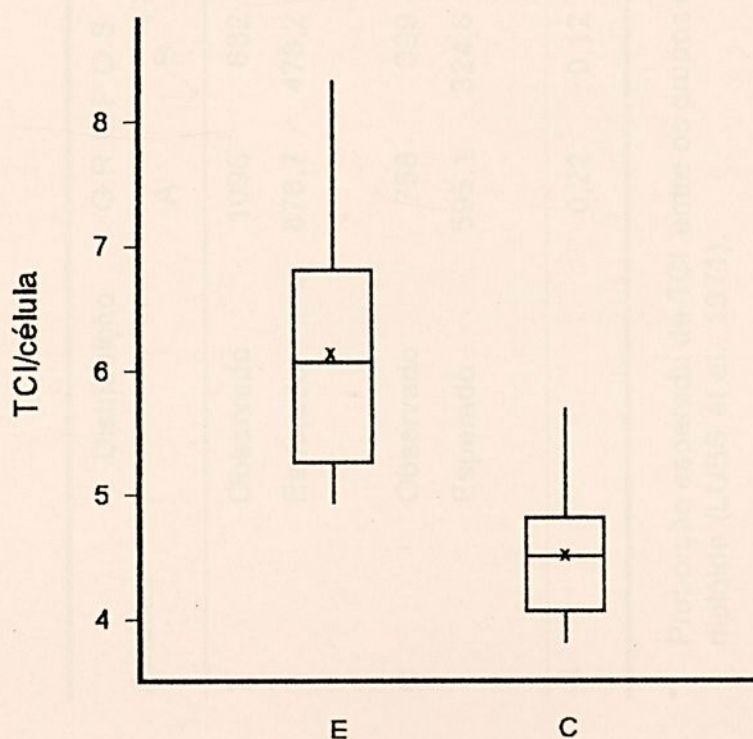


Tabela 12: Distribuição das frequências absolutas de TCI por grupo cromossômico e valores de qui-quadrado para a comparação com as frequências esperadas com base no tamanho relativo dos cromossomos (GL= 9, *P<0,05).

Amostra	Distribuição	GRUPOS CROMOSSÔMICOS							Total	Qui-Quadrado
		A	B	C	D	E	F	G		
E	Observado	1096	632	1522	473	213	30	19	3985	0,108*
	Esperado	876,7	478,2	1514,3	398,5	358,6	199,25	159,4		
C	Observado	758	399	1090	297	119	17	27	2706	0,112*
	Esperado	595,1	324,6	1027,9	270,5	243,4	135,2	108,2		
**		0,22	0,12	0,38	0,10	0,09	0,05	0,04		

** Proporção esperada de TCI entre os grupos cromossômicos, baseada no tamanho relativo do grupo em relação ao lote diplóide (LUBS et al., 1971).

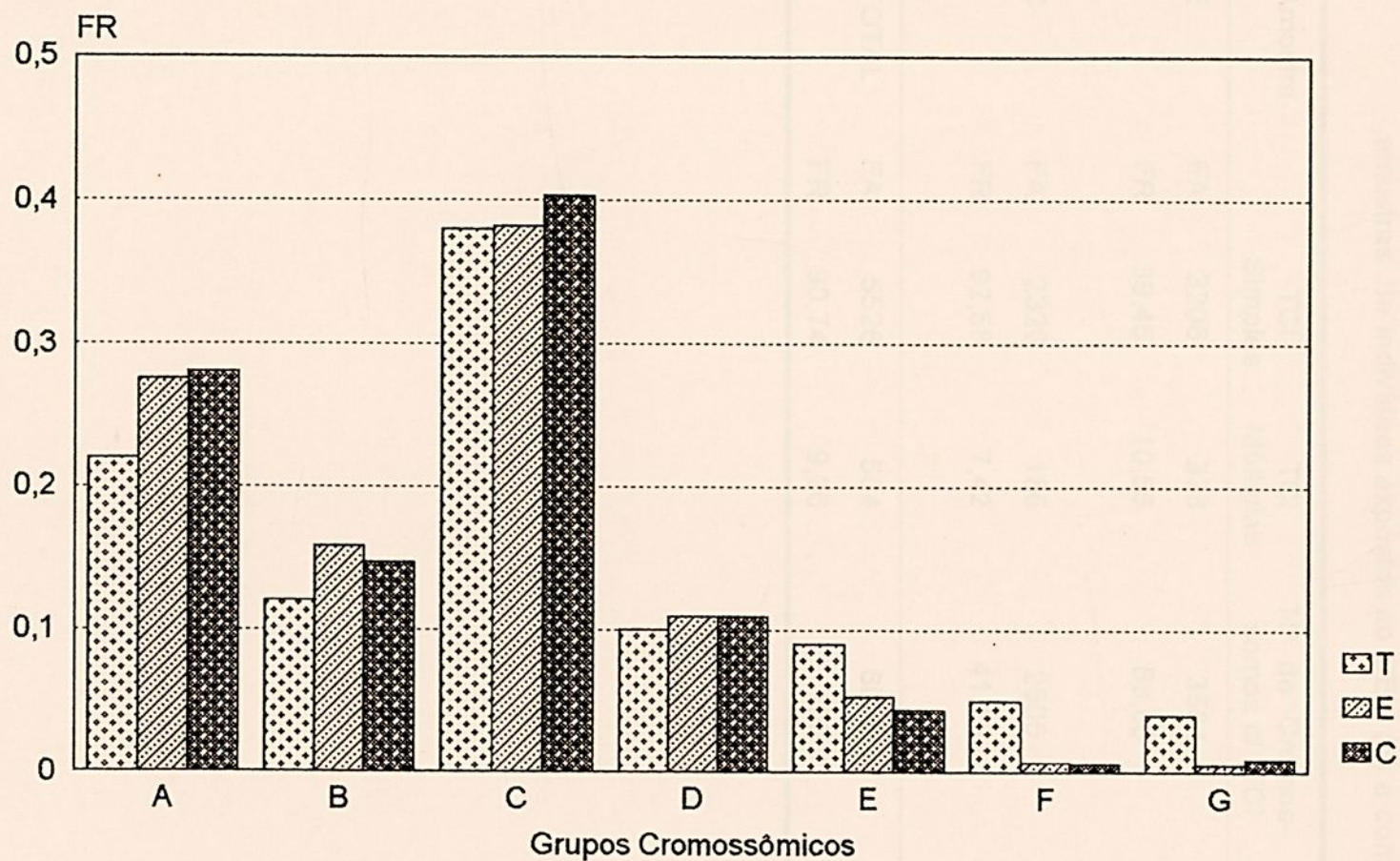


FIGURA 20: Distribuição das freqüências relativas de TCI por grupo cromossômico casualmente esperadas (T), baseado no tamanho relativo dos cromossomos, comparadas àquelas obtidas nas amostras de expostos ao CEM (E) e controles (C).

Tabela 13: Frequências absoluta (FA) e relativa (FR) de cromossomos apresentando uma única TCI (simples) ou duas e mais (múltiplas) nas amostras de indivíduos expostos ao CEM (E) e controles (C).

Amostra		TCI Simples	TCI Múltiplas	Nº de Cromos- somos c/ TCI	
E	FA	3206	378	3584	
	FR	89,45	10,55	58,85	
C	FA	2320	186	2506	
	FR	92,58	7,42	41,15	
TOTAL	FA	5526	564	6090	$\chi^2 = 17,135$
	FR	90,74	9,26	100	$p < 0,001$

Tabela 14: Distribuição das metáfases nos diferentes ciclos celulares, em culturas de 72 horas, identificadas através da técnica de coloração diferencial das cromátides-irmãs.

Amostra	Frequência de metáfases nos diferentes ciclos (%)			IPC (%)
	1ª divisão	2ª divisão	3ª divisão	
E01	09	21	70	2,61
E02	47	50	03	1,56
E03	38	40	22	2,17
E05	46	34	20	1,74
E06	42	43	15	1,73
E07	29	34	37	2,08
E08	46	45	09	1,94
E09	29	43	28	1,99
E10	42	47	11	1,69
E13	58	33	09	1,51
E14	68	30	02	1,34
E15	51	40	09	1,58
TOTAL	505	460	235	
%	42,08	38,33	19,58	
C01	34	57	09	1,75
C02	48	37	15	1,66
C03	22	60	18	1,96
C04	15	14	71	2,56
C05	57	31	12	1,55
C06	38	30	32	1,94
C07	49	28	23	1,74
C08	41	56	03	1,62
C09	35	47	18	1,83
C11	33	43	24	1,91
C13	38	51	11	1,77
C14	48	38	16	1,72
C15	41	51	08	1,67
TOTAL	499	543	260	
%	38,32	41,71	19,97	

Tabela 15: Descrição da amostra de indivíduos expostos ao CEM (E), segundo a idade, tempo de exposição ao CEM, frequências de células com alterações cromossômicas estruturais e anáfase-C e número médio de TCI por célula.

Amostra	Idade (anos)	Tempo de exposição ao CEM (anos)	Alteração estrutural (%)	Anáfase-C (%)	Nº TCI/cél.
E04	25	06	07	01	8,30
E13	30	08	10	17	5,22
E02	35	06	09	08	5,90
E01	37	07	10	03	5,06
E11	37	12	04	0	NR
E10	38	16	10	27	4,92
E05	39	04	02	25	7,30
E08	39	16	09	41	5,48
E06	43	06	10	43	6,66
E09	43	16	14	15	6,78
E15	48	15	06	09	6,84
E03	50	14	11	16	4,92
E14	51	25	08	40	6,24
E07	55	27	14	36	6,06
E12	56	25	06	02	NR

NR = Teste não-realizado pela ausência de material adequado

Tabela 16: Descrição da amostra controle (C) segundo a idade, freqüências de células com alterações cromossômicas estruturais e anáfase-C e número médio de TCI por célula.

Amostra	Idade (anos)	Alteração estrutural (%)	Anáfase-C (%)	Nº TCI/cél.
C08	26	3	2	5,02
C04	29	4	0	4,36
C12	31	6	1	NR
C06	34	2	0	3,80
C10	37	4	3	NR
C03	39	6	8	3,82
C09	39	6	1	5,66
C15	40	4	1	NR
C05	40	3	0	4,46
C14	45	4	1	4,56
C02	49	2	0	4,76
C07	49	3	0	4,88
C11	49	5	1	3,80
C01	50	5	0	4,58
C13	51	6	1	4,40

NR = Teste não-realizado pela ausência de material adequado

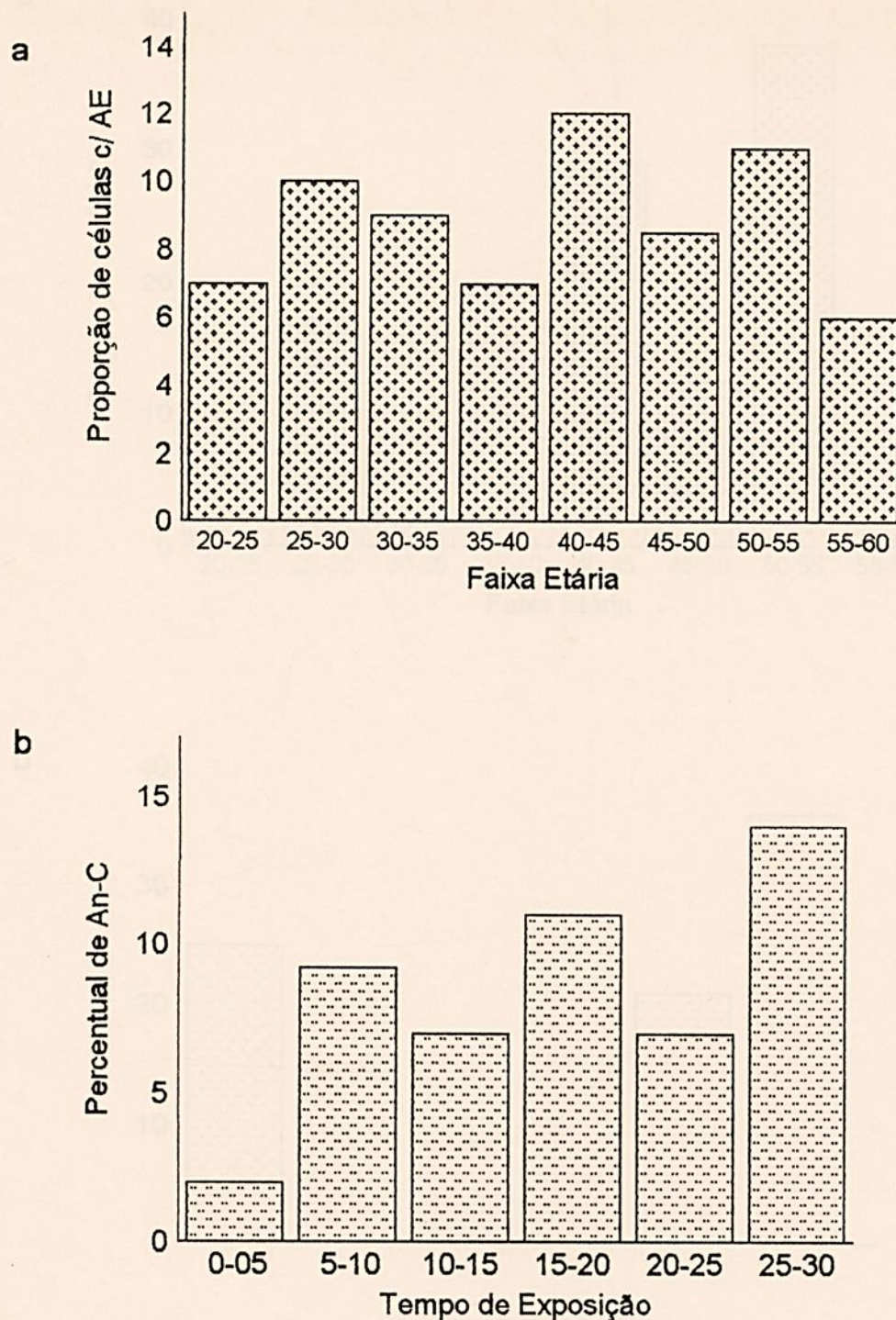


FIGURA 21: Distribuição de metáfases exibindo alterações cromossômicas estruturais (AE) com relação às faixas etárias dos indivíduos expostos ao CEM (a) e ao tempo de exposição ao referido agente (b)

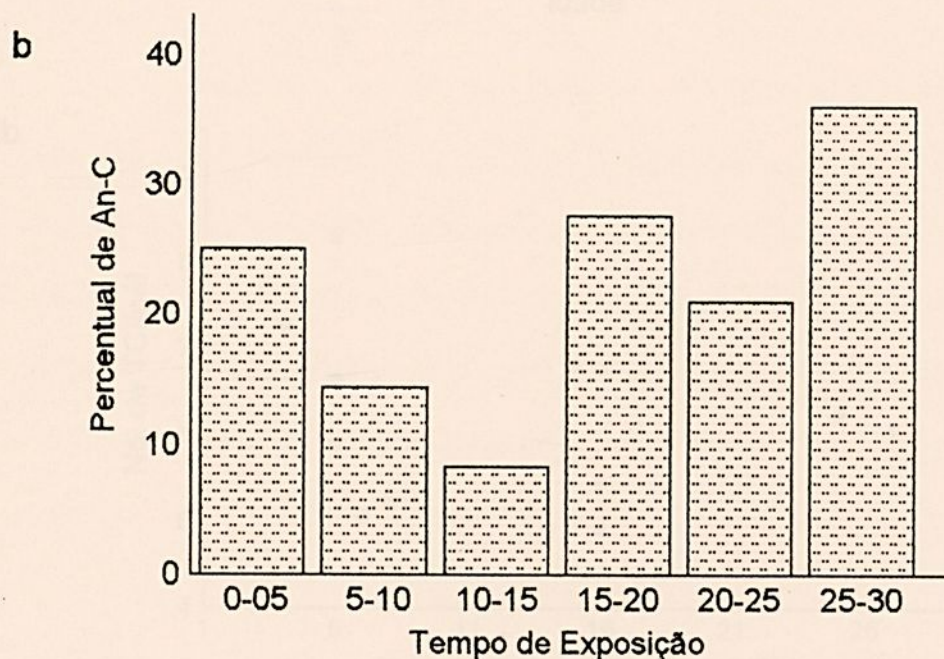
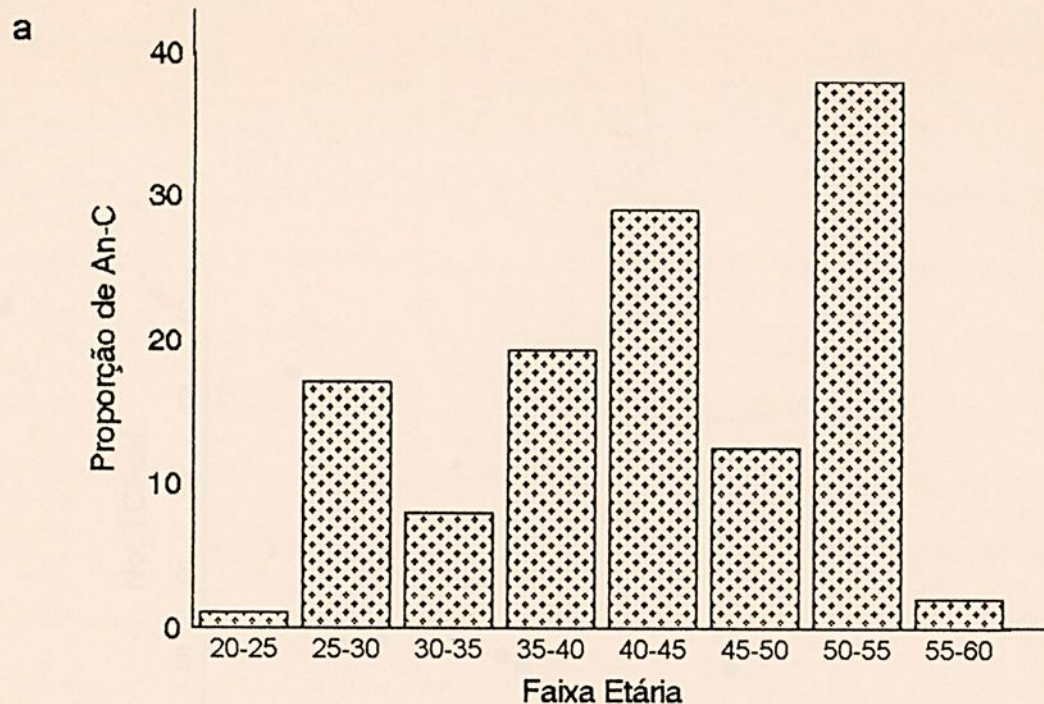


FIGURA 22: Distribuição do percentual de anáfases-C (An-C) nas faixas etárias em que se encontram os indivíduos expostos ao CEM (a) e com relação ao tempo de exposição a esse agente (b) .

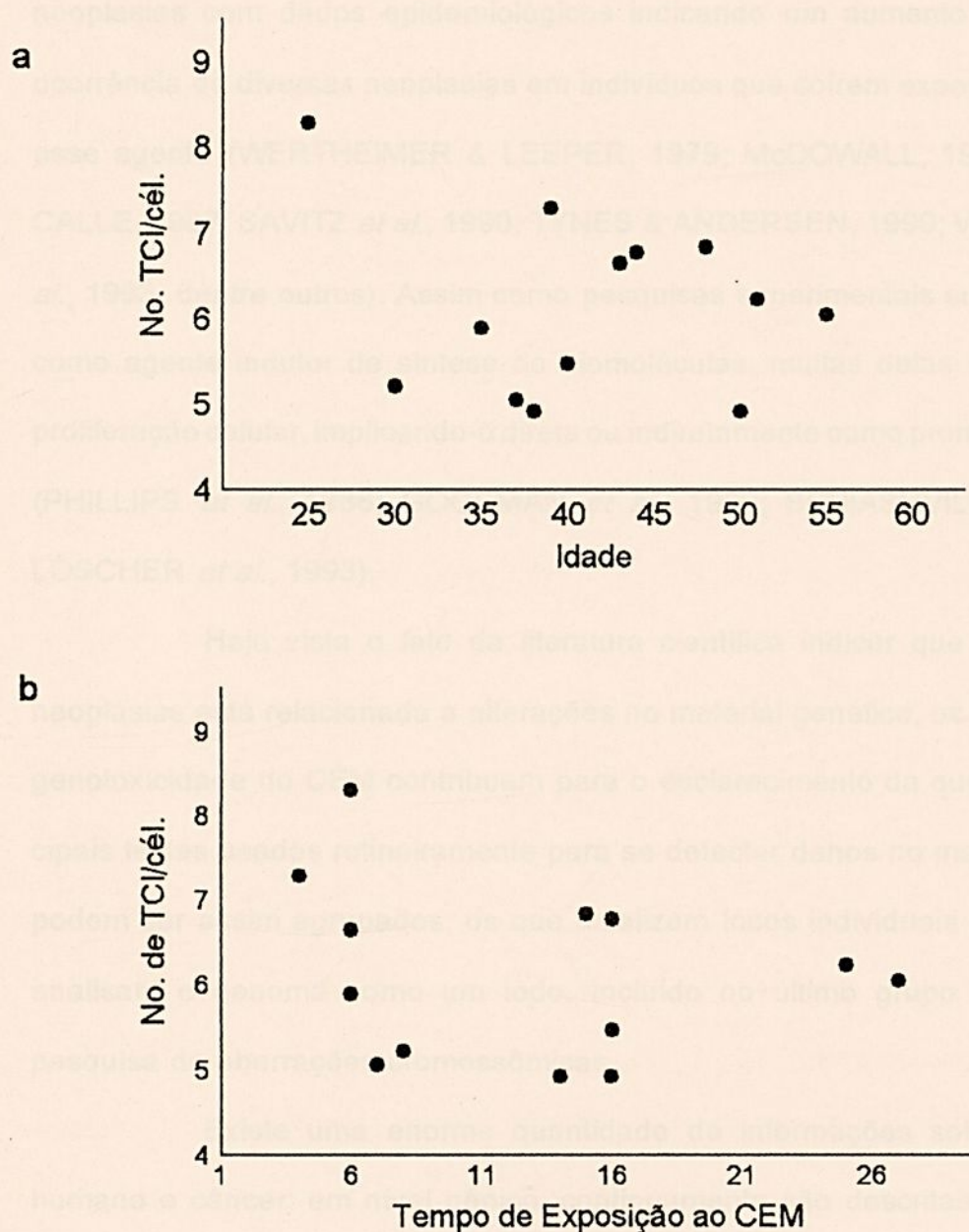


FIGURA 23: Correlação do número medio de TCI/célula, em indivíduos expostos ao CEM, com as suas idades (a) e tempo de exposição ao referido agente (b)

V- DISCUSSÃO

Inúmeros estudos têm relacionado o CEM ao desenvolvimento de neoplasias com dados epidemiológicos indicando um aumento nas taxas de ocorrência de diversas neoplasias em indivíduos que sofrem exposição intensa a esse agente (WERTHEIMER & LEEPER, 1979; McDOWALL, 1983; SAVITZ & CALLE, 1987; SAVITZ *et al.*, 1990; TYNES & ANDERSEN, 1990; VERKASALO *et al.*, 1993, dentre outros). Assim como pesquisas experimentais sugerem o CEM como agente indutor de síntese de biomoléculas, muitas delas relacionadas à proliferação celular, implicando-o direta ou indiretamente como promotor de câncer (PHILLIPS *et al.*, 1986; GOODMAN *et al.*, 1989; BENIASHVILI *et al.*, 1991; LÖSCHER *et al.*, 1993).

Haja vista o fato da literatura científica indicar que a origem das neoplasias está relacionada a alterações no material genético, os dados sobre a genotoxicidade do CEM contribuem para o esclarecimento da questão. Os principais testes usados rotineiramente para se detectar danos no material genético podem ser assim agrupados: os que focalizam locos individuais e aqueles que analisam o genoma como um todo. Incluído no último grupo encontra-se a pesquisa de aberrações cromossômicas.

Existe uma enorme quantidade de informações sobre o genoma humano e câncer: em nível gênico, continuamente são descritas mutações em oncogenes e genes supressores de tumor que conduzem ao desenvolvimento de neoplasias; e em nível cromossômico, as aneuploidias e rearranjos estruturais são marcadores citogenéticos de inúmeras neoplasias, assim como a instabilidade

cromossômica, refletida na forma de quebras excessivas é característica de algumas síndromes que predispoem ao câncer.

Entretanto, existe quase nada a cerca da região centromérica dos cromossomos. Os centrômeros são regiões especializadas que, associados a proteínas estruturais específicas, servem como ponto de fixação para os microtúbulos do fuso mitótico. Através dessa região, as cromátides-irmãs permanecem unidas até o preciso momento em que os centrômeros dividem-se; esse momento, sem dúvida nenhuma, é regulado geneticamente e situado na transição metáfase-anáfase (VIG *et al.*, 1993). A separação cromatídica se dá de forma seqüencial e não-casual. Por exemplo, os cromossomos 18, 2, 10 e 8 são os primeiros a dividirem seus centrômeros e os acrocêntricos os últimos (MÉHES, 1975; 1978; VIG & WODNITZKI, 1974).

Portanto, alterações no momento de separação de um determinado cromossomo, principalmente antecipação, podem conduzir a aneuploidias, pois o cromossomo afetado não se liga ao fuso mitótico. Esse fato foi primeiramente demonstrado para o cromossomo X, por FITZGERALD *et al.* (1975) que denominaram de Divisão Precoce de Centrômero (DPC). Atualmente é excessivamente conhecido que o cromossomo X tem antecipada a sua divisão em mulheres idosas, quadro esse relacionado a aneuploidias de X em células somáticas e germinativas (FITZGERALD *et al.*, 1975; GALOWAY & BUCKTON, 1978). A correlação entre DPC e não-disjunção cromossômica também já foi descrita para os cromossomos 18, 21 e Y (FITZGERALD *et al.* 1986; BAJNÓCZKY & MÉHES, 1988; MÉHES & KOSZTOLÁNNYI, 1992). Outras condições patológicas foram relacionadas à DPC, como leucemia (VIG, 1984) e linfoma de Burkitt (ZHANG, 1986), entretanto consistindo de descrição de casos isolados.



A antecipação da divisão de um centrômero pode atingir a maioria ou totalidade dos cromossomos de uma célula, caracterizando o que alguns autores denominam anáfase-C (CHAMLA *et al.*, 1980; RIVERA & DOMINGUEZ, 1991), enquanto outros preferem chamar também de DPC (RUDD *et al.*, 1983; GABARRÓN *et al.*, 1986; MADAN *et al.*, 1987). O termo anáfase-C foi inicialmente cunhado por acreditar-se tratar de um evento dependente da colchicina; entretanto, muitos trabalhos não observaram essa correlação, pois em alguns indivíduos as culturas isentas de colchicina exibiam índices elevados de anáfase-C, assim como aquelas submetidas ao tratamento com essa droga (RUDD *et al.*, 1983; GABARRÓN *et al.*, 1986; MADAN *et al.*, 1987). Por isso RIVERA & DOMINGUEZ (1991) assumem o termo anáfase-C como etiológicamente inadequado.

Embora a classificação das anomalias centroméricas seja debatida polemicamente (RIVERA & DOMINGUEZ, 1991, 1992; DOMINGUEZ & RIVERA, 1992; CHAMLA, 1992; FITZGERALD, 1992), há uma forte tendência de critérios para diferenciar anáfase-C de DPC: em anáfase-C todos ou a maioria dos centrômeros encontram-se divididos, entretanto observa-se a constrição da região centromérica enquanto que em DPC um número muito reduzido de cromossomos, em geral apenas um, exibe as cromátides-irmãs individualizadas e apresentando-se como fragmento acêntrico, ou seja, não é possível a visualização da constrição centromérica (RIVERA & DOMINGUEZ, 1992; BAJNÓCZKY & GARDÓ, 1993).

A anáfase-C é um fenômeno de raríssima citação na literatura especializada, mas ATKIN & BAKER (1992) sugeriram que esse fato deve-se a grande probabilidade do observador confundir tais figuras com uma simples poliploidia, mas a cuidadosa análise da morfologia das cromátides, assim como a observação de cromossomos íntegros em algumas células com anáfase-C conduz



o analisador à verdadeira identidade da figura. Esses autores acreditam que esse é um caráter bastante freqüente em algumas formas neoplásicas. Desse modo, com o alerta dado aos cientistas, brevemente haverá um acúmulo de publicações sobre a ocorrência de anáfase-C, o que auxiliará na elucidação da questão.

Sobre a dependência da colchicina, os autores têm obtido resultados controversos, com elevação, diminuição ou manutenção das taxas de anáfase-C considerando a mesma amostra cultivada na presença e ausência de colchicina, e muitas vezes tal plasticidade é obtida na mesma família (CHAMLA *et al.*, 1980; RUDD *et al.*, 1983; GABARRÓN *et al.*, 1986). Segundo RUDD *et al.* (1983), esses fatos sugerem uma heterogeneidade na origem da anáfase-C, a qual poderia inclusive ser explicada por diversas mutações conduzindo a um mesmo fenótipo.

Nenhuma pesquisa faz qualquer menção sobre uma provável indução de anáfase-C por agentes ambientais a que o homem expõe-se ocasionalmente, de forma terapêutica, ou não, como exposição ocupacional.

Em virtude da polêmica na literatura pertinente, no presente trabalho tais figuras serão denominadas anáfases-C, exclusivamente em consideração aos critérios citados anteriormente, sem relevar a etiologia da palavra, pois aqui demonstra-se não haver dependência da colchicina. Essa afirmação é feita baseada em dois pontos: (a) utilizou-se colchicina em concentração final (0,8 μ M) e tempo de incubação (50 - 60 minutos) rotineiramente utilizados em diversos laboratórios, sem que exista menção sobre taxas elevadas de anáfases-C; (b) a concordância desses altos índices de anáfase-C em uma amostra de indivíduos não-relacionados geneticamente, agrupados apenas pela ocupação que exercem.

Diante desses fatos, pode-se descartar um provável efeito dependente de colchicina ou de qualquer outro agente introduzido no cultivo das células, pois

as amostras E e C receberam o mesmo tipo de tratamento, e apenas a amostra E exibiu grande percentual de células com anáfase-C, sugerindo que os componentes da amostra E estão expostos a algum agente indutor desse caráter citogenético.

Acredita-se que esse agente seja o CEM, pois a triagem realizada indica que a exposição a produtos químicos genotóxicos é rara e não havia ocorrido nas últimas semanas que antecederam à coleta de sangue. Além do que, não há relato sobre a indução de anáfases-C pelos produtos químicos que ocasionalmente a amostra E se expõe. Existem referências ao aumento nas taxas de quebras cromossômicas e TCI induzido por exposição crônica ou aguda a alguns desses produtos químicos; entretanto, a amostra E tem contato esporádico com os referidos, o que, provavelmente, não culmina com o mesmo resultado biológico.

É provável que, como qualquer outra anomalia cromossômica, as anáfases-C ocorram em baixos índices nos linfócitos cultivados humanos, sem que haja um significado patológico inerente. Essa hipótese embasa-se na taxa $\leq 3\%$ obtida para amostras controles em diversas pesquisas, incluindo o presente estudo (RUDD *et al.*, 1983; GABARRÓN *et al.*, 1986; MADAN *et al.*, 1987; MILLER *et al.*, 1990). Entretanto índices elevados já foram descritos em casais com abortos espontâneos (RUDD *et al.*, 1983; GABARRÓN *et al.*, 1986), o que não pode ser corroborado com o presente trabalho, pois apenas um indivíduo da amostra E referiu abortamento espontâneo sem causa clínica determinada: o E11, sendo que esse foi um dos expostos ao CEM apresentando taxa baixíssima de anáfases-C (2%). Entretanto, por se tratar de uma amostra reduzida, não se pode concluir a esse respeito.

Há muito, o alto índice de anáfase-C vem sendo sugerido como um caráter herdado e McKUSICK (1990) o adotou como o fenótipo *176430 na última edição do *Mendelian Inheritance in Man*. Mas, no presente estudo é difícil aceitar essa alteração como uma herança genética pelo fato de 73% de uma amostra não-relacionada apresentar anáfase-C em taxa superior a 5% das metáfases de primeiro ciclo de divisão.

É fato consumado que a anáfase-C é uma anormalidade celular, mas o que existe sobre a sua origem são meras especulações. RUDD *et al.* (1983), examinando famílias com altos índices de anáfase-C, através de estudos cinemicrográficos, demonstraram que grande parte de suas células apresentava o tempo de duração da metáfase significativamente menor que nos controles. Esse achado os levou a supor que as células observadas como anáfase-C seriam as mesmas com o tempo de metáfase encurtado; dessa forma, o que estaria equivocadamente classificado como anomalia de centrômero corresponderia à modificação no tempo metafásico, mas de caráter herdável.

Para debater os dados da presente pesquisa sob essa ótica teria que se assumir uma ação do CEM sobre o ciclo celular pela concordância do caráter anáfase-C na amostra E. Entretanto, para confirmar tal proposição, haveria necessidade de estudar-se uma mesma amostra antes e depois de exposição prolongada ao referido agente físico, o que não foi objetivo deste.

Ainda sob essa óptica esperar-se-ia que a maioria das anáfases-C estivesse em células de terceiro ciclo mitótico, pois haveria um acúmulo das diferenças de tempo dos ciclos anteriores. Dos escassos trabalhos sobre anáfase-C, apenas um faz citações da sua distribuição em ciclos de divisão (GABARRÓN *et al.*, 1986). Assim há excessiva limitação para comparações de resultados o que

impossibilita a investigação da veracidade na proposição de RUDD *et al.* (1983), sobre o encurtamento da etapa metafásica. GABARRÓN *et al.* (1986) corroboraram essa suposição, quando, à análise de linfócitos na família de um casal infértil ($n=5$), obtiveram uma taxa média de 16,4% ($S=14,40$) de anáfases-C, sendo que 81,6% correspondiam a células de terceiro ciclo de divisão, quando apenas 25,7% das metáfases com centrômero normal encontravam-se nesse ciclo. Esse fato também não foi confirmado na presente pesquisa, onde, conforme a Tabela 08, apesar de haver maior taxa de anáfases-C em células de terceiro ciclo de divisão, não houve demonstração estatística de preferência dessa condição em qualquer um dos ciclos identificados.

São poucos os trabalhos sobre anáfase-C e em geral versam sobre a sua herdabilidade, ou seja, são estudos familiares (RUDD *et al.*, 1983; GABARRÓN *et al.*, 1986; MADAN *et al.*, 1987; BAJNÓSCZKY & GARDÓ, 1993). Um único estudo utilizou amostra de indivíduos não-relacionados (DOMINGUEZ & RIVERA, 1992), no qual foram analisados 100 indivíduos sendo observada uma taxa média de 0,6% de anáfase-C, bastante inferior àquelas obtidas nos estudos familiares e, principalmente, inferior a taxa da presente pesquisa.

Ainda assim, na Tabela 17 apresentam-se os dados de diversas pesquisas e nela observa-se que no presente trabalho os índices de anáfase-C são notadamente superiores. Esse é mais um fato que implica as altas taxas de anáfase-C não como um caráter herdado, e sim induzido por um agente a que os eletricitistas de linha de transmissão estão expostos de forma diferencial da população geral, provavelmente o CEM.

Tabela 17: Apresentação das frequências de anáfase-C observadas em linfócitos periféricos cultivados por 72 horas.

AMOSTRA	N	MÉDIA; DESVIO PADRÃO	REFERÊNCIA
Famílias com casos de infertilidade	20	11,23; 14,936	RUDD <i>et al.</i> , 1983
Controles	15	0,50; ND	
Famílias com casos de infertilidade	06	13,83; 14,328	GABARRÓN <i>et al.</i> , 1986
Controles	05	0,90; ND	
Família com herança de translocação recíproca	18	3,17; 3,978	MADAN <i>et al.</i> , 1987
Controles	04	0,63; 0,479	
Família com infertilidade	04	20,58; 15,866	BAJNÓCZKY & GARDÓ, 1993
Controles	04	4,65; 0,532	
Indivíduos não relacionados, expostos ao CEM	12	28,75; 15,363	Presente estudo
Controles	13	1,38; 2,785	

ND= Desvio Padrão não divulgado.

Na presente década, diversos trabalhos foram realizados sobre o potencial genotóxico do CEM, utilizando-se de análises moleculares e em nível cromossômico, entretanto, sem qualquer referência ao evento anáfase-C.

Em estudos com exposição experimental foram observados aumento na taxa de síntese de DNA, bem como alterações qualitativas e quantitativas nos processos de transcrição do RNA e síntese de polipeptídeos, demonstrando-se que, de forma direta ou não, a exposição ao CEM induz modificações na função normal de uma célula.

Em nível cromossômico, as análises de linfócitos humanos cultivados, expostos *in vitro* ao CEM tendem a indicar ausência de correlação entre alterações cromossômicas e esse agente. NORDENSON *et al.* (1984) não observaram qualquer alteração nas taxas de aberrações cromossômicas; entretanto utilizaram amostra sangüínea de apenas dois doadores. Mas, esse resultado foi corroborado por trabalhos com amostras mais significativas. Dentre esses, COHEN *et al.* (1986a, b) não observaram qualquer alteração nos índices de aberração cromossômica, TCI e de proliferação celular, nem mesmo em células de indivíduos suscetíveis a danos cromossômicos, por serem portadores de patologias como ataxia-telangiectasia, síndrome de Bloom, xeroderma pigmentoso ou anemia de Fanconi. Posteriormente, ROSENTHAL & OBE (1989) realizaram um estudo em linfócitos de 54 indivíduos e nenhuma alteração foi detectada nas taxas de TCI e aberração cromossômica. Um único estudo referiu-se ao aumento nas taxas de TCI e aberrações cromossômicas induzida pelo CEM (KHALIL & QASSEN, 1991), as quais mostraram-se dependentes diretas da duração da exposição ao agente.

O índice de proliferação celular também exhibe resultados contraditórios com ROSENTHAL & OBE (1988), descrevendo elevação do referido índice e

KHALIL & QASSEN (1991) a sua diminuição, ressaltando-se haver similaridade dos campos eletromagnéticos aplicados às culturas em ambos os trabalhos. Também não se observou efeito sinérgico, na indução de aberrações cromossômicas e TCI, entre o CEM e determinados produtos químicos (ROSENTHAL & OBE, 1989; YAMAZAKI *et al.*, 1993).

O presente trabalho apresenta dados de um estudo *in vivo*, onde os indivíduos estudados sofreram exposição ocupacional ao CEM. Neste, não pôde ser evidenciada a ação do CEM sobre a cinética do ciclo celular, o que foi pesquisado através da determinação do índice de proliferação celular. Entretanto, as alterações cromossômicas na amostra de eletricitas de linha de transmissão ocorreram em taxas significativamente superiores às aquelas exibidas pela amostra controle, atribuindo um potencial genotóxico ao CEM, que pode ser classificado como clastogênico pois as alterações observadas foram do tipo estruturais, incluindo falhas e quebras, sendo que essas últimas por vezes originaram formas estabilizadas como translocações e deficiências.

O efeito clastogênico em indivíduos ocupacionalmente expostos ao CEM também foi observado por alguns autores. NORDENSON *et al.* (1984) analisando linfócitos periféricos de 20 eletricitas expostos ao CEM de 400 kV. Esses, exibiram uma frequência de 5.4% de células com alterações cromossômicas, o que diferiu estatisticamente ($p < 0,005$) daquela observada na amostra controle (3,1%). VALJUS *et al.* (1993), detectaram um discreto aumento nas taxas de alterações cromossômicas em uma amostra de 27 eletricitas de linha.

As lesões cromossômicas instáveis, como fragmentos acêntricos, cromossomos dicêntricos e em anel, são rearranjos que, em geral, conduzem a

célula à morte, enquanto que as alterações estáveis, como translocações balanceadas, inversões e outros rearranjos simétricos, podem ser transmitidas de uma à outra geração celular (CARRANO & NATARAJAN, 1988; AWA, 1990). Dessa forma, considerando que os dados obtidos no presente estudo foram de metáfases em primeiro ciclo de divisão, tem-se que dificilmente houve seleção *in vitro* das células portadoras de alterações instáveis; assim, as taxas de alterações cromossômicas observadas devem estar próximas das que efetivamente ocorrem *in vivo*.

As quebras cromatídicas foram o tipo de alteração mais freqüente, sugerindo que o CEM induz lesões na cadeia simples do DNA as quais, se não reparadas, são convertidas a esse tipo de quebra no primeiro ciclo de divisão após a referida lesão. Esse achado diverge do resultado obtido *in vitro* em células ovarianas de hamster chinês onde, após exposição ao CEM, não se observou maior taxa de quebras na cadeia simples do DNA (REESE *et al.*, 1988).

A informação citogenética de maior quantidade de quebras cromatídicas coincide com o descrito em estudos de monitorização humana (NORDENSON *et al.* 1984) e ensaio com linfócitos bovinos em exposição *in vitro* ao CEM (D'AMBRÓSIO *et al.* 1985). KHALIL & QASSEN (1991) generalizam as quebras como a alteração mais freqüentemente observada após exposição de linfócitos humanos ao CEM, sem distinguir entre cromatídicas e cromossômicas.

As quebras cromatídicas consistem na alteração cromossômica mais freqüentemente observada em estudos de mutagênese através da metodologia citogenética. Sua origem deve-se a quebras na cadeia simples de DNA antes de uma fase de duplicação ou na dupla hélice, após a duplicação. As quebras cromossômicas são oriundas de quebras na dupla hélice, após uma passagem

pela fase S. Ambos os tipos de quebra constituem eventos instáveis, sendo que as quebras cromossômicas, que geram cromossomos dicêntricos, acêntricos e em anel, são passíveis de estabilização através do processo de reintegração do fragmento, originando cromossomos com deficiência, inversão, duplicação ou translocação (BRØGER, 1979).

A maioria dos produtos químicos genotóxicos induzem quebras na fita simples do DNA, constituindo-se em agentes S-dependentes, pois os danos só podem ser visualizados após uma passagem pela fase S, onde os danos não reparados são convertidos em lesões cromatídicas. Já a quebra na dupla hélice é um evento mais raro sendo geralmente induzido por radiações ionizantes e por drogas radiomiméticas, como a bleomicina, que são considerados agentes S-independentes, pois os danos podem ser observados no mesmo ciclo celular que ocorrem. É variável a taxa com que ocorrem as quebras na fita simples ou dupla de DNA: raios-X e bleomicina as induzem em proporções próximas de 1:10, enquanto radiações β induzem uma maioria de quebras na dupla hélice (EVANS, 1977).

Os estudos *in vitro* de mutagênese química indicam que os agentes genotóxicos, outros que não as drogas radiomiméticas, em geral induzem quebras cromatídicas, enquanto que os estudos de populações expostas referem-se a elevadas taxas de alterações dos tipos cromatídicas e cromossômicas (OBE & BEEK, 1982). As pesquisas sobre agentes físicos, na sua maioria, referem-se à radiação ionizante e, portanto, limitam-se às alterações do tipo cromossômicas (RAMALHO *et al.*, 1988; AWA, 1990); mas o presente estudo investiga os efeitos da radiação não-ionizante, cujas publicações sobre monitorização populacional são em número limitado, e neste apresentam-se dados concordantes com o observado

em mutagênese química. Neste trabalho, assim como nos demais deste gênero (NORDENSON *et al.*, 1984; VALJUS *et al.*, 1993), observaram-se taxas elevadas de alterações (quebras e falhas) do tipo cromossômicas que, provavelmente, tiveram sua origem de alterações cromatídicas nos linfócitos circulantes que não foram reparadas na fase S após o estímulo da fitohemaglutinina.

Uma célula com quebra cromatídica em geral morre, mas se entrar num processo de divisão, apresenta cerca de quatro formas de segregar suas cromátides, existindo uma probabilidade de 25% de que as células-filhas contenham o lote cromossômico normal e a mesma probabilidade para conter translocação equilibrada, deficiência ou adição (AU, 1991).

As células com adições cromossômicas observadas no presente trabalho provavelmente contêm cópia extra de uma região cromossômica, pois são originadas dessa forma, e os demais cromossomos da metáfase mostravam-se íntegros, considerando-se o nível de acuracidade que a técnica de coloração permite. Assim, descartou-se a possibilidade de corresponder a translocações balanceadas, exceto numa metáfase (Figura 08e) onde existiu simultaneamente um cromossomo deficiente e outro com adição de material genético. Dessa forma, as adições, assim como as deficiências, são resultantes de eventos mais complexos pois envolvem, no mínimo, duas quebras cromossômicas com posterior inserção ou perda do fragmento, respectivamente. Esse tipo de alteração cromossômica também foi de maior ocorrência entre os indivíduos expostos. Tal achado é raramente descrito em estudos de mutagênese onde, em geral, computam-se os eventos deficiência, adição, translocação e inversão como duas quebras, dificultando a comparação deste com os dados da literatura.

O evento do tipo falha ou lesão acromática é uma aparente descontinuidade no cromossomo metafásico, considerada como resultante de alterações no empacotamento do DNA por alterações no próprio DNA, ou nas proteínas que se ligam a ele (BRØGGER, 1979). Sua identificação é bastante controversa, principalmente devido à grande subjetividade embutida na identificação das falhas. Em vista disso, alguns grupos simplesmente desconsideram tais lesões enquanto outros as consideram como verdadeiras quebras na estrutura do cromossomo ou ainda as computam, diferenciando-as das verdadeiras quebras considerando o alinhamento ao cromossomo ou o tamanho da descontinuidade do fragmento. No presente estudo, considerou-se um evento como falha quando a descontinuidade foi inferior ao diâmetro da cromátide envolvida. Esse tipo de alteração também foi mais freqüente na amostra de indivíduos expostos ao CEM, confirmando o potencial genotóxico sugerido pelos índices de quebras.

Generalizando, pode-se concluir que todas as alterações cromossômicas observadas neste trabalho resultam da ineficiência do sistema de reparo celular e, conseqüentemente, é possível a extrapolação de que o excesso de quebras observado na amostra de indivíduos expostos ao CEM corresponde à referida inabilidade no seu sistema de reparo, provavelmente devido à grande quantidade de lesões induzidas pelo agente em questão.

A importância desse achado reside no fato de que algumas patologias humanas são caracterizadas por instabilidade cromossômica gerada pela ineficiência na excisão dos dímeros de pirimidina (xeroderma pigmentoso) ou de reparar danos na dupla hélice (ataxia-telangiectasia), dentre outros mecanismos ainda indeterminados com exatidão. Todas essas doenças estão associadas ao



aumento na predisposição a neoplasias (PATHAK *et al.*, 1989). Assim, o aumento nas taxas de alterações cromossômicas em populações expostas a um determinado agente pode ser indicativo de uma possível predisposição ao desenvolvimento de câncer, o que, quando evidenciado no presente trabalho, corrobora os dados epidemiológicos que indicaram maior ocorrência de neoplasias em exposição acentuada ao CEM.

O potencial genotóxico de um agente também é pesquisado considerando-se as taxas de TCI. Esse fenômeno ocorre espontaneamente nas células e, apesar do desconhecimento de seu significado biológico, a elevação nas suas taxas, produzida por um determinado agente, permite a sua identificação como provável indutor de danos no DNA, sendo considerados como fortes indutores de TCI aqueles que têm resposta dependente da dose ou que elevam a sua taxa ao dobro daquela observada no controle do experimento (LATT *et al.*, 1981).

Apesar dos avanços científicos na elucidação dos processos biológicos, ainda permanece obscura a base molecular para a formação da TCI, mas há fortes sugestões de que elas representam algum tipo de reparo associado ao processo de duplicação do DNA, pois em geral os agentes genotóxicos S-dependentes são fortes indutores de TCI, enquanto os S-independentes não o são (NATARAJAN & OBE, 1982). Além disso, há evidências de que as TCI ocorrem durante a duplicação do DNA; assim, os agentes que interferem nesse processo, como o CEM, conforme já demonstrado por NORTON (1982), LIBOFF *et al.* (1984) e TAKAHASHI *et al.*, (1986), podem alterar suas taxas.

Nessa direção, BAUCHINGER *et al.* (1981) e VALJUS *et al.* (1993) relataram não haver elevação nas taxas de TCI em culturas de linfócitos de



homens ocupacionalmente expostos ao CEM. Em estudos experimentais, TAKAHASHI *et al.* (1987) não observaram alteração nos índices de TCI, em uma linhagem celular, realizando exposição no período entre 24 e 48 horas em culturas de 72 horas. Por outro lado, KHALIL & QASSEN (1991) realizaram três tipos de experimentos em linfócitos humanos cultivados por 72 horas e identificaram o CEM como fraco indutor de TCI nas culturas onde a exposição se deu de forma contínua. Entretanto, quando a exposição foi em tempo parcial (24 e 48 horas), não houve tal indução, ocorrendo similaridade com os resultados apresentados por TAKAHASHI *et al.* (1987).

O presente estudo relata a elevação das taxas de TCI em indivíduos ocupacionalmente expostos ao CEM. Essa elevação, da ordem de 35%, foi estatisticamente significativa. Entretanto, pelo fato da amostra de expostos não exibir o dobro da taxa de TCI observada na amostra controle, apenas podemos sugerir o CEM como fraco indutor de TCI, corroborando o sugerido por KHALIL & QASSEN (1991).

Há muito busca-se identificar se as lesões que conduzem à TCI são, parcial ou integralmente, semelhantes àquelas que geram aberrações cromossômicas como quebras. Entretanto, muitas observações conflitantes são feitas. Anemia de Fanconi e síndrome de Bloom são duas patologias humanas caracterizadas pelo aumento nas taxas de aberrações cromossômicas espontâneas, mas apenas na síndrome de Bloom observam-se níveis elevados de TCI. Esse fato representa que, ao menos com relação à forma de reparo, há diferença entre as referidas lesões (NATARAJAN & OBE, 1982). Por outro lado, é similar a concentração necessária para dobrar as taxas de aberração cromossômica e TCI induzidas por agentes alquilantes monofuncionais (VOGEL

& NATARAJAN, 1981 *apud* NATARAJAN & OBE, 1982), o que indica uma similaridade na origem desses parâmetros citogenéticos. Diante disso, pode-se concluir que TCI e aberração cromossômica têm diferenças e similaridades na sua origem e/ou reparo.

No presente estudo, observaram-se elevadas taxas de TCI e aberrações cromossômicas na amostra de indivíduos expostos em relação aos controles. Assim considerando, análises estatísticas foram realizadas para se verificar uma possível correlação entre as taxas de TCI e aberrações cromossômicas, não resultando em associação estatisticamente significativa entre esses fenômenos.

A literatura contém dados conflitantes sobre a idade como fonte de variações nas taxas de TCI e aberrações cromossômicas. OBE & HESHA (1978), EVANS (1979) e NAKANO & AWA (1982) demonstraram haver uma elevação das taxas de aberrações cromossômicas com o aumento da idade, assim como SOPER *et al.* (1984) e HUSUM *et al.* (1986) o fizeram para os índices de TCI. Entretanto, outros trabalhos não demonstraram tal associação (MORGAN & CROSSEN, 1977; HEDNER *et al.*, 1982; SINHA *et al.*, 1986; BENDER *et al.*, 1989).

Com relação ao nível de elevação nas taxas de TCI, HUSUM *et al.* (1986) o demonstraram discretíssimo, de forma que com o aumento de 10 anos na idade, esperar-se-ia um acréscimo de 0,17 TCI/célula. No presente trabalho, apenas um pequeno número de indivíduos foi amostrado para cada faixa etária, assim é provável que, se realmente houver correlação entre TCI e idade, outras fontes mais importantes de variabilidade a tenham mascarado. Essa proposição é

coerente pois HUSUM *et al.* (1986) definiu que no máximo 20% da variabilidade interindividual pode ser explicada pelo consumo de cigarros e idade.

Assim como para a idade, são inconclusivos os dados sobre o consumo de cigarros como indutor de danos no DNA em nível cromossômico. OBE & HESHA (1978) descreveram acentuado aumento nas taxas de aberrações cromossômicas de indivíduos fumantes. Entretanto, para as taxas de TCI há maior concordância na correlação positiva (HUSGAFVEL-PURSIANEN *et al.*, 1980; WULF *et al.*, 1985; HUSUM *et al.*, 1986; GHOSH & GHOSH, 1987; REIDE *et al.*, 1988), mas também existem relatos de ausência de correlação (CROSSEN & MORGAN, 1980; ARDITO *et al.*, 1980). No presente estudo todos os indivíduos são não-fumantes, entretanto a maioria sofre exposição passiva ao fumo, fato já relacionado ao aumento nas taxas de TCI induzidas (MORIMOTO *et al.*, 1984). Todavia, não foi possível concluir sob esse ponto de vista, devido à heterogeneidade no tipo de exposição, reduzindo o número de componentes em cada classe.

As taxas de TCI exibem acentuada variação inter e intraindividual, mesmo em condições rigorosamente padronizadas para o cultivo celular, conforme pôde ser observado na Figura 18 deste trabalho. Assim, os níveis de TCI descritos por diversos laboratórios não são diretamente comparáveis, principalmente pelas diferenças técnicas, pois já foram descritas alterações relacionadas ao tipo de meio de cultura (TAWN & EARL, 1988) e concentrações do soro (KATO & SANDBERG, 1977) e da BrdU (GUTIERREZ *et al.*, 1983; TUCKER *et al.*, 1986).

A BrdU é um análogo de base que, por si própria, induz TCI (LATT, 1974; WOLFF & PERRY, 1974; CARRANO *et al.*, 1986; NATARAJAN *et al.*, 1986) e pode ser responsável por parte da frequência na linha basal de TCI obtida



quando da ausência de agentes genotóxicos. A utilização de concentrações inferiores a 10 μM gera aceitáveis resultados de coloração e permitiu identificar a média basal de TCI por linfócito humano, a qual não é variável sob concentrações até esse limite (RICHER *et al.*, 1987; TUCKER *et al.*, 1986). Entretanto, em alguns indivíduos não é possível a obtenção de coloração diferencial adequada sob concentração tão diminuta (RICHER *et al.*, 1986). Mas, a partir dessa, aumenta-se a qualidade da coloração pelas técnicas convencionais, todavia é recomendada a utilização de doses próximas a 10 μM , pois com isso a atividade genotóxica da BrdU torna-se reduzida aumentando a sensibilidade do teste. Assim, as alterações observadas nas taxas de TCI muito provavelmente serão aquelas induzidas pelo agente em questão.

No presente trabalho a BrdU foi utilizada na concentração de 16 μM e a média de TCI por célula para a amostra controle foi bastante reduzida, quando comparada àquelas obtidas por FROES (1988), BERTOLLO (1991) e SILVA (1988) em trabalhos realizados no mesmo laboratório, diferindo deste apenas pela concentração da BrdU, pois esses autores a empregaram na concentração de 65 μM e obtiveram as respectivas médias de 13,4, 9,26 e 18,95, que diferem acentuadamente da média de 4,8 TCI por célula, obtida neste estudo.

Considerando os resultados obtidos neste estudo, acrescidos dos dados da literatura científica ora disponíveis, pode-se considerar que os eletricitistas de linha de transmissão exercem profissão de risco para a ocorrência de lesões no DNA e que, provavelmente, nesse caso, o agente genotóxico seja o CEM.

VI- RESUMO E CONCLUSÕES

Desde o final da década de 70, muitos estudos epidemiológicos têm associado o campo eletromagnético de 60 Hz (CEM), gerado por fios e equipamentos de alta tensão, ao desenvolvimento de neoplasias. Paralelamente, os estudos em exposição experimental corroboram esses achados demonstrando a ação desse agente sobre a síntese de biomoléculas, como DNA, RNA e peptídeos diversos, incluindo alguns relacionados ao crescimento e divisão celular.

O desenvolvimento de uma nação, medido por fatores sócio-econômicos e tecnológicos, está intrinsecamente relacionado à utilização da energia elétrica; portanto, a exposição humana ao campo eletromagnético é uma constante em crescimento no cotidiano da população. Como consequência adicional, o próprio desenvolvimento tecnológico gera ocupações de intensa exposição ao CEM.

Em vista disso, estudaram-se citogeneticamente trinta indivíduos do sexo masculino, agrupados em duas amostras: amostra E, formada por quinze eletricitas de linha de transmissão, cuja ocupação os expõe, em média, a 20 horas/semana, a um campo eletromagnético de 60 Hz gerado por linhas de 138 kV; e a amostra C, composta por indivíduos de profissões diversas, pareados pela idade da amostra E, sem exposição residencial ou ocupacional ao referido campo.

Os critérios na seleção das amostras envolveu a aplicação de questões sobre hábitos sociais e outros itens que ocasionalmente poderiam enviesar os resultados. Assim, obteve-se que todos os indivíduos estudados eram não-fumantes, sendo que apenas cinco haviam consumido cigarros no passado, mas com abstinência mínima de três anos. Nenhum havia contraído virose ou sofrido



exposição a agentes sabidamente genotóxicos, como raios X e alguns quimioterápicos, no período que antecedeu a coleta do material a ser estudado.

Cultivaram-se linfócitos periféricos em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino, antibióticos e, para identificar os ciclos de divisão celular, a cultura foi realizada na presença da bromodesoxiuridina em concentração de 16,25 μM . O tempo de cultivo foi de 48 e 72 horas, bloqueando-se pela adição de colchicina (0,8 μM) nos últimos 60 minutos. Todas as lâminas foram submetidas à técnica para coloração diferencial das cromátides irmãs.

Os parâmetros considerados foram a frequência de aberrações cromossômicas e TCI, analisados em metáfases de primeiro e segundo ciclo de divisão, respectivamente.

Para o teste de aberrações cromossômicas foram analisadas, em média, 100 metáfases em primeira divisão de cada indivíduo e a amostra E exibiu um total de 8,52% de alterações clássicas (tipo quebras, falhas, deficiências e outras) e 18,84% de uma alteração, possivelmente centromérica, denominada anáfase-C, onde todas ou a maioria das cromátides-irmãs apresentam-se individualizadas. Esses dados diferiram estatisticamente dos obtidos para a amostra C (4,2% e 1,27%, respectivamente). Computaram-se também as euploidias (4n) e aneuploidias, entretanto, as taxas não diferiram entre as amostras.

A anomalia do tipo anáfase-C vem sendo descrita como um caráter herdável e sem qualquer significado patogênico, exceto pelo relato esporádico de alguns casos familiares relacionados a sub-tipos de infertilidade. Até o presente não havia qualquer relato sobre altas taxas de anáfase-C em populações expostas a um agente específico.

Na amostra E apenas três indivíduos apresentaram metáfases normais em índices superiores a 90% e, coincidentemente, esses foram os únicos cuja coleta de sangue para o cultivo se deu em tempo superior a 24 horas após a última exposição, merecendo destacar que apenas as suas taxas de anáfase-C foram similares a dos componentes da amostra C.

As freqüências de TCI também diferiram entre as amostras estudadas. Os dados obtidos sob esse parâmetro indicam que a amostra E apresenta uma taxa superior de TCI por célula ($X=6,78$; $EP=0,280$) em relação à amostra C ($X=4,51$; $EP=0,158$), bem como abrigou um maior percentual de cromossomos com trocas múltiplas, sendo que essas corresponderam a 10,55% das trocas na amostra E contra 7,42% na amostra C. Mas, apesar dos valores altamente significativos, pôde-se considerar o CEM apenas como fraco indutor de TCI, pois a amostra E não exibiu o dobro de trocas que a amostra C.

O evento anáfase-C foi aquele que conferiu maior diferença entre as amostras estudadas, entretanto ainda não foi esclarecido o seu significado biológico. Todavia, o excesso de danos no DNA, traduzido pela ocorrência de alterações estruturais e TCI, permite a conclusão de que os eletricitistas de linhas de alta tensão compõem um grupo de risco para a ocorrência de lesões no DNA e ainda, sugerir que o agente genotóxico em questão é o campo eletromagnético.



VII- SUMMARY

Since the 70's decade, a lot of epidemiologic studies has been related to the 60-Hz eletctromagnetic field (ELF) to the development of neoplastic diseases. In addition, the results from experimental exposition studies demonstrated that ELF has a potent action on DNA, RNA and others biomolecules synthesis and interferes with cellular growth and division.

For these reasons, 30 individuals, healthy, male, composed the two samples of this study: the exposed sample at means 15 employees exposed 20 hours/week to an ELF power transmsion lines of 138 kV and the control sample, matched by age and gender, without residential or occupational exposition to the agent in reference.

The criterions employed to select the samples envolved the aplication about social customs and others itens that occasionally could the set the results on the bias. Therefore, we got that all the individuals who had been studied were no-smoking, and only five individuals among them had smoked in the past, but with a minimum abstinence of 3 years. No one of them had got a virose or had soffered exposition to a genotoxic agents, like X-ray and some chemotherapics during the period that preceded the gothering on the material that will be studied.

The lymphocytes were cultivated in RPMI supplemented with fetal calf serum, antibiotics and bromodeoxyuridine (16.25 μ M) and the cells were harvested with 48 and 72 hours, blocking the culture adding colchicine (0.8 μ M) at the last 60 minutes.

The parameters analysed were chromosomal aberrations (CA) and sister chromatid exchanges (SCE) frequencies, analysed in the first and second



cycle division, respectively. For the CA parameter, 100 metaphases per individual were analysed and the exposed sample showed structural aberrations (8.12%) as breaks, gaps, deletions, etc. and others anomaly, probably a centromeric event, was found in a high frequency (18.84%). This event was designated by C-anaphase because all the sister chromatid were individualized. The CA and C-anaphase frequencies differed significantly among the exposed and controls samples.

The C-anaphase has been described as a heritable character without some pathogenic significance, except by sporadic reports about familial cases relating to infertility sub-types. Since then, there is no data about high taxes of C-anaphase in populations who had been exposed to a specific agent.

The exposed sample presented a SCE frequency per cell higher than the control sample, respectively $X = 6.78$; $SE = 0.28$ and $X = 4.51$; $SE = 0.158$; also showing a high percentage of chromosomes with multiple changes, the means 10.55% for the exposed sample compared to 7.42% for the control sample. Besides the significance of these values, the ELF was considered a weak SCE inductor.

The event of C-anaphase was that one that has showed the biggest difference among the analysed samples. Therefore, until now the biologic meaning hasn't showed yet. However, the excess of damage in DNA, relationed by the occurence of some change in the chromosomal structures and SCE; this allows in the conclusion that the electrical workers of high tension lines, on part of a risk group to get lesions in DNA and we can still sugest that the genotoxic agent in question is the ELF.

In conclusion, the clastogenic action observed that can been traslacted by the high frequencies of chromosomal aberrations encountered lead us to consider the ELF as as harzardous agent.



VIII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEY, W.R., BAWIN, S.M., LAURENCE, A.F. Effects of weak amplitude-modulates microwave fields on calcium efflux from awake cate cerebral cortex. *Bioelectromagnetics*, v.3, p.295-307, 1982.
- ADEY, W.R. The sequence and energetics of cell membrane transductive coupling to intracellular enzyme systems. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, v.15, p.447-56, 1986.
- ADEY, W.R. Joint actions of environmental nonionizing electromagnetic fields and chemical pollution in cancer promotion. *Env. Health Perspect*, v.86, p.297-305, 1990.
- ALDRICH, T.E., EASTERLY, C.E. Electromagnetic fields and public health. *Env. Health Perspec.*, v.75, p.159- , 1987.
- ARDITO, G., LAMBERTI, L., ANSALDI, E., PONZETTO, P. Sister-chromatid exchanges in cigarette-smoking human females and their newborns. *Mutat. Res.*, v.78, p.209, 1980.
- ASHBY, J. Comparison of techniques for monitoring human exposure to genotoxic chemicals. *Mutat. Res.*, v.204, p.543-551, 1988.
- ATKIN, N.B., BAKER, M. C. Mitotic spindle failure in human cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.*, v.62, p.106-107, 1992.
- AU, W.W. Monitoring human populations for effects of radiation and chemical exposures using cytogenetic techniques. *Occup. Med.*, v.6, n.4, 1991



696/95

- AWA, A.A. Chromosome aberrations in A-bomb survivors, Hiroshima and Nagasaki. In: OBE, G., NATARAJAN, A.T. (Eds.). *Chromosomal aberrations: basic and applied aspects*. Berlin: Springer-Verlag, 1990. p.180-190.
- AZADNIV, M., MILLER, M.W. ^3H -Uridine uptake in human leukemia HL-60 cells exposed to extremely low frequency electromagnetic fields. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.189, n.1, p.437-444, 1992.
- BAJNÓCZKY, K., MÉHES, K. Parental centromere separation sequence and aneuploidy in the offspring. *Hum. Genet.*, v.78, p.286-288, 1988.
- BAJNÓCZKY, K., GARDÓ, S. "Premature anaphase" in a couple with recurrent miscarriages. *Hum. Genet.*, v.92, p.388-390, 1993.
- BANERJEE, A., BENEDICT, W.F. Production of sister chromatid exchanges by various cancer chemotherapeutic agents. *Cancer Res.*, v.39, p.797-799, 1979.
- BASSETT, C.A.L., PAWLUK, R.J., PILLA, A.A. Acceleration of fracture repair by electromagnetic fields. A surgically noninvasive method. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.238, p.242, 1974.
- BASTUJI-GARIN, S., RICHARDSON, S., ZITTOUN, R. Acute Leukaemia in workers exposed to electromagnetic fields. *Eur. J. Cancer*, v.26, n.11/12, p.1.119-1120, 1990.
- BAUCHINGER, M., HAULF, R., SCHMID, 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.



- BAUKNECHT, Th., VOGEL, W., BAYER, U., WILD, D. Comparative *in vivo* mutagenicity testing by SCE and micronucleus induction in mouse bone marrow. *Hum. Genet.*, v.35, p. 299-307, 1977.
- BAWIN, S.M., ADEY, W.R. Sensitivity of calcium binding in cerebral tissue to weak environmental electric fields oscillating at low frequency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.73, p.1999-2003, 1976.
- BENDER, M.A., PRESTON, J.A., LEONARD, R.C., et al. Chromosomal aberration and sister-chromatid exchange frequencies in peripheral blood lymphocytes of a large human population sample. II. Extension of a age range. *Mutat. Res.*, v.212, p.149-154, 1989.
- BENIASHVILI, D.S, BILANISHVILI, V.G., MENABDE, M.S. Low frequency electromagnetic radiation enhances the induction of rat mammary tumors by nitrosomethyl-urea. *Cancer Let.*, v.61, p.75-79, 1991.
- BERTOLLO, E.M.G. *Estudo Citogenético em profissionais expostos a agentes antineoplásicos*. S. J. Rio Preto: Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas. UNESP, 1988. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas. UNESP, 1990.
- BETHWAITE, P., PEARCE, N. Electromagnetic fields and cancer: an ongoing debate. *N. Zealand Med. J.*, v.104, p.225-226, 1991.
- BLACKMAN, C.F., BENANE, S.G., KINNEY, L.S., JOINES, W.T., HOUSE, D.E. Effects of ELF fields on calcium-ion efflux from brain tissue *in vitro*. *Radiat. Res.*, v.92, p.510-520, 1982.



- BLANK, M., KHORKOVA, O., GOODMAN, R. Similarities in the proteins synthesized by *Sciara salivary* gland cells in response to electromagnetic fields and to heat-shock. *Bioelectroch. Bioenerg.*, v.31, p.27-38, 1993.
- BRØGGER, A. Chromosome damage in human mitotic cells after *in vivo* and *in vitro* exposure to mutagens. In: BERG, K. (Ed.). *Genetic damage in man caused by environmental agents*. New York: Academic Press, 1979. p.87-99.
- 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, n.10, p.1385-1389, 1987.
- CARRANO, A.V., THOMPSON, L.H., LINDL, P.A., MINKLER, J.L. Sister chromatid exchange as an indicator of mutagenesis. *Nature*, v.271, p.551-553, 1978.
- CARRANO, A.V., MINKLER, J.L., DILLEHAY, L.E., THOMPSON, L.H. Incorporated bromodeoxyuridine enhances the sister-chromatid exchange and chromosomal aberration frequencies in an EMS-sensitive Chinese hamster cell line. *Mutat. Res.*, v.162, p.133-239, 1986.
- CARRANO, A.V., NATARAJAN, A.T. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat. Res.*, v.204, p.379-406, 1988.
- CHAMLA, Y., ROUMY, M., LASSÈGUES, M., BATTIN, J. Altered sensibility to colchicine and PHA in human cultured cells. *Hum Genet.*, v.53, p.249-253, 1980.
- CHAMLA, Y. C-anaphase revised. *Hum. Genet.*, v.90, n.1/2, p.187, 1992.



COHEN, M., KUNSKA, A., ASTEMBORSKI, J., McCULLOCH, D. Effect of low-level 60-hertz electromagnetics fields on human lymphoid cell lines. II. Sister chromatid exchanges in peripheral lymphocytes and lymphoblastoid cell lines. *Mutat. Res.*, v.172, p.172-184, 1986a.

COHEN, M., KUNSKA, A., ASTEMBORSKI, J., *et al.* Effect of low-level 60-hertz electromagnetics fields on human lymphoid cell lines. I. Mitotic rate and chromosomal breakage in human peripheral lymphocytes. *Bioelectromagnetics*, v.7, p.415-423, 1986b.

COLEMAN, M.P., BELL, C.M.J., SKEET, R. Leukemia incidence in electrical workers. (Letter). *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.7, n.1, p.1-13, 1988.

COPELAND, K.T., CHECKOWAY, H., McMICHAEL, A.J., *et al.* Bias due to misclassification in the estimation of relative risk. *Amer. J. Epidemiol.*, v.105, p.408-495, 1979.

CROSSEN, P.E., MORGAN, W.F. Sister chromatid exchange in cigarette smokers. *Hum. Genet.*, v.53, p.425-426, 1980.

D'AMBROSIO, G., SCAGLIONE, A., BERARDINO, D. *et al.* Chromosomal aberrations induced by ELF electric fields. *J. Bioelectricity*, v.4, n.1, p.279-284, 1985.



DEADMAN, J.E., CAMUS, M., ARMSTRONG, B.G., *et al.* Occupational and residential 60-Hz electromagnetic fields and high-frequency transients: exposure assessment using a new dosimeter. *Amer. Indust. Hyg. Assoc.*, v.49, n.8, 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. *Amer. J. Epidemiol.*, v.134, n.4, p.340-347, 1991.

DOMINGUEZ, M.G., RIVERA, H. C-anaphase: a mitotic variant. *Ann. Génét.*, v.35, n.3, p.183-185, 1992.

EVANS, H.J. Molecular mechanisms in the induction of chromosome aberrations. In: *Progress in genetic toxicology*. SCOTT, D., BRIDGES, B.A., SOBELS, F.H. (Eds.). North-Holland Biomedical Press, 1977.

EVANS, H.J. The induction of aberrations in human chromosomes following exposure to mutagens/carcinogens. IN: EMMELOT, P., KRIEK, E. (Eds.). *Environmental carcinogens*. Amsterdam: Elsevier, 1979. p.57-74.

FARNDAL, M., MURRAY, S. Pulsed electromagnetic field promote collagen production in bone marrow fibroblasts via athermal mechanisms. *Calcif. Tissue Int.*, v.37, p.178-182, 1985.

FITZGERALD, P.H., PICKERING, A.F., MERCER, J.M., MEITHKE, P.M. Premature centromere division: a mechanism of non-disjunction causing X chromosome aneuploidy in somatic cells of man. *Ann. Hum. Genet.*, v.38, p.417-428, 1975.

FITZGERALD, P.H., ARCHER, S.A., MORRIS, C.M. Evidence for the repeated primary non-disjunction of chromosome 21 as a result of premature centromere division (PCD). *Hum. Genet.*, v.72, p.58-62, 1986.

FITZGERALD, P.H. Premature centromere division. *Hum. Genet.*, v.90, n.1/2, p.190-191, 1992.

FREIRE-MAIA, N. *Radiogenética Humana*. São Paulo: Edgard Blücher, 1972. 196p.

FROES, N.D.T. *Avaliação de mutagenicidade pelo corante da beterraba (Beta vulgaris) em sistemas de testes in vitro*. S. J. Rio Preto: Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas. UNESP, 1988. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas. UNESP, 1988.

FULTON, J.P., COBB, S., PREBLE, L. *et al.* Electrical wiring configurations and childhood leukemia in Rhode Island. *Amer. J. Epidemiol.*, v.111, p.292-296, 1980.

GABARRÓN, J., JIMENEZ, A., GLOVER, G. Premature centromere division dominantly inherited in a subfertile family. *Cytogenet. Cell Genet.*, v.43, p.69-71, 1986.

GALLOWAY, S.M., BUCKTON, K.E. Aneuploidy and ageing: chromosome studies on a random sample of the population using G-banding. *Cytogenet. Cell Genet.*, v.20, p.78-95, 1978.

GAMMON, M.D., JOHN, E.M. Recent etiologic hypothesis concerning breast cancer. *Epidemiol Rev.*, v.15, n.1, p.163-168, 1993.



- GARLAND, F.C., SHAW, E., GORHAM, E.D. *et al.* Incidence of leukemia in occupations with potential electromagnetic field exposure in United States navy personnel. *Amer. J. Epidemiol.*, v.132, n.2, p.293-303, 1990.
- GEBHART, E. Sister chromatid exchange (SCE) and structural chromosome aberration in mutagenicity testing. *Hum. Genet.*, v.58, p.235-254, 1981.
- GHOSH, R., GHOSH, P.K. The effect of tobacco smoking on the frequency of sister chromatid exchanges in human lymphocyte chromosomes. *Cancer Genet. Cytogenet.*, v.27, p.15-19, 1987.
- GOODMAN, R., BASSET, C.A., HENDERSON, A. Pulsing electromagnetic fields induce cellular transcription. *Science*, v.220, p. 1283-1285, 1983.
- GOODMAN, R., ABBOTT, J., HENDERSON, A. Transcriptional patterns in the X chromosome of *Sciara coprophila* following exposure to magnetic fields. *Bioelectromagnetics*, v.8, p.1-7, 1987.
- GOODMAN, R., HENDERSON, A.S. Exposure of salivary gland cells to low frequency electromagnetic fields alters polypeptide synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.85, p.3938-3932, 1988.
- GOODMAN, R., WEI, L.-X., XU, J.-C., HENDERSON, A. Exposure of human cells to low-frequency electromagnetic fields results in quantitative changes in transcripts. *Biochem. Biophys. Acta*, v.1009, p.216-220, 1989.
- GRIFFIN, C.S., TEASE, C., FISHER, G. The effect of low-dose X-irradiation on numerical and structural chromosome anomaly induction in mouse immature oocytes. *Mutat. Res.*, v.231, n.2, p.137-142, 1990.



- GUÉNEL, P., RASKMARK, P., ANDERSEN, J.B., LYNGE, E. Incidence of cancer in persons with occupational exposure to electromagnetic fields in Denmark. *Brit. J. Indust. Med.*, v.50, p.758-764, 1993.
- GUTIERREZ, C., GONZALES-GIL, G., HERNANDEZ, P. Analysis of baseline and BrdU-dependent SCEs at different BrdU concentrations. *Exp. Cell Res.*, v.149, p.461-469, 1983.
- HEDNER, K., HÖGSTEDT, B., KOLNIG, A-M., *et al.* Sister chromatid exchanges and structural chromosome aberrations in relation to age and sex. *Hum. Genet.*, v.62, p.305-309, 1982.
- HUSGAFVEL-PURSIANEN, K., MÄKI-PAKKANEN, J., NORPPA, H., SORSA. Smoking and sister chromatid exchange. *Hereditas*, v.92, p.247-250, 1980.
- HUSUM, B., WULF, H.C., NIEBUHR, E. Sister chromatid exchange frequency correlates with age, sex and cigarette smoking in a 5-year material of 553 healthy adults. *Hereditas*, v.105, p.17-21, 1986.
- JAGETIA, G.C. Frequency of micronucleated cells in the mouse bone marrow after exposure to various doses of gama-radiation. *Mutat. Res.*, v.230, n.1, p.45-48, 1990.
- JOLLEY, W.B., HINSHAW, D.B., KNIERIM, K., KINSHAW, D.B. Magnetic field effects on calcium efflux and insulin secretion in isolated rabbits islets on Langerhans. *Bioelectromagnetics*, v.4, p.103-106, 1983.
- KATO, H., SANDBERG, A.A. The effect of sera on sister chromatid exchanges in vitro. *Exp. Cell Res.*, v.109, p.445-448, 1977.



KELSEY, K.T., CHRISTIANI, D.C., WIENCKE, J.E. Bimodal distribution of sensitivity to SCE induction by diepoxybutane in human lymphocytes. II. Relationship to baseline SCE frequency. *Mutat. Res.*, v.248, n.1, p.27-34, 1991.

KHALIL, A.M., QASSEM, W. Cytogenetics effects of pulsing electromagnetic 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., FREEDLANDER, E.F. Giemsa technique for the detection of sister chromatid exchanges. *Chromosoma*, v.48, p.355-360, 1974.

KUBITSCHKE, H.E. Mutagenesis by near visible light. *Science*, v.155, p.1545-1546, 1967.

LAMBERTI, L., PONZETTO, P.B., ARDITO, G. Cell kinetics and sister chromatid-exchange frequency in human lymphocytes. *Mutat. Res.*, v.120, p.193-199, 1983.

LATT, S.A. Sister chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair: detection by fluorescence and induction by mitomycin C. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v.71, n.8, p.3162-3166, 1974.

LATT, S.A., ALLEN, J., BLOOM, S.E., *et al.* EPA Genotox workshop report: sister chromatid exchange. *Mutat. Res.*, v.87, p.17, 1981.

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.

LIN, R.S., DISCHINGER, P.C., CONDE, J. *et al.* Occupational exposure to electromagnetic fields and the occurrence of brain tumors. *J. Occup. Med.*, v.27, p.413-419, 1985.

LOOMIS, D., SAVITZ, D.A. Mortality from brain cancer and leukaemia among electrical workers. *Brit. J. Ind. Med.*, v.47, p.633-338, 1990.

LÖSCHER, W., MEVISSSEN, M., LEHMACHER, W., STAMM, A. Tumor promotion in a breast cancer model by exposure to a weak alternating magnetic field. *Cancer Let.*, v.71, p.75-81, 1993.

LUBEN, R.A., CAIN, C.D., CHEN, C.Y., *et al.* Effect of electromagnetic stimuli on bone and bone cells in vitro: inhibition of response parathyroid hormone by low-energy-frequency fields. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v.79, p.4180-184, 1982.

LUBS, H., HOSTETTER, T., EWING, L. Paris Conference (1971) Standardization in human cytogenetics. HAMERTON, J., JACOBS, P., KLINGER, H. (Eds.). New York: The National Fundation, 1973.

MADAN, K., LINDHOUT, D., PALAN, A. Premature centromere division (PCD): a dominantly inherited cytogetnet anomaly. *Hum. Genet.*, v.77, p.193-196, 1987.

MATANOSKY, G.M., BREYSSE, P.N., ELLIOTT, E.A. Electromagnetic field exposure and male breast cancer. (Letter). *Lancet*, v.337, p.737, 1991.

McDOWALL, M.E. Leukaemia mortality in electrical workers in England and Wales. (Letter). *Lancet*, v.1, p.246, 1983.

McDOWALL, M.E. Mortality of persons resident in the vicinity of electricity transmission facilities. *Brit. J. Cancer*, v.53, p.271-279, 1986.

McKUSICK, V.A. *Mendelian inheritance in man*. 9. ed. Baltimore: The John Hopkins University Press, 1990.

- McLAUGHLIN, J.K., MALKER, H.S.R., BLOT, W.J. *et al.* Occupational risk for intracranial gliomas in Sweden. *J. Natl. Cancer Inst.*, v.78, p.253-257, 1987.
- MÉHES, K. Non-random anaphase segregation of mitotic chromosomes. *Acta Genet. Med. Gemellol.*, v.24, p.175-176, 1975.
- MÉHES, K. Non-random centromere division: a mechanism of non-disjunction causing aneuploidy? *Hum. Hered.*, v.28, p.255-260, 1978.
- MÉHES, K., KOSZTOLÁNYI, G. A possible mosaic form of delayed centromere separation and aneuploidy. *Hum. Genet.*, v.88, p.477-478, 1992.
- MILHAM, S. Mortality from leukemia in workers exposed to electrical and magnetic fields. (letter). *N. Engl. J. Med.*, v.307, p.249, 1982.
- MILHAM, S. Mortality in workers exposed to electric magnetic fields. *Environ. Health Perspect.*, v.62, p.297-300, 1985.
- MILHAM, S. Increased mortality in amateur radio operators due to lymphatic and hematopoietic malignancies. *Amer. J. Epidemiol.*, v.127, p.50-54, 1988.
- MILLER, K., MÜLLER, W., WINKLER, L., *et al.* Mitotic disturbance associated with mosaic aneuploidies. *Hum. Genet.*, v.84, p.361-364, 1990.
- MILLER, K. Sister-chromatid exchange in human B- and T-lymphocytes exposed to bleomycin, cyclophosphamid, ethyl methanesulfonate. *Mutat. Res.*, v.247, n.1, p.175-182, 1991.
- MOORHEAD, P.S., NOWELL, P.C., MELLMAN, *et al.* Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.*, v.20, p.613-616, 1960.

- MORGAN, W.F., CROSSEN, P.E. The frequency and distribution of sister chromatid exchanges in human chromosomes. *Hum. Genet.*, v.38, p.271-278, 1977.
- MORIMOTO, K., MIURA, K., KANEKO, T., *et al.* Human health situation and chromosome alterations: sister chromatid exchange frequency in lymphocytes from passive smokers and patients with hereditary diseases. In: TICE, R.R., HOLLAENDER, A. (Eds.). *Sister chromatid exchanges*. 1984. p.801-811.
- MÜLLER, H.J. Artificial transmutation of the gene. *Science*, v.66, p.84-87, 1927.
- MUTCHINICK, O., RUZ, L., CASAS, L. Time of first-generation metaphases. I. The effect of various culture media and of fetal calf serum in human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.*, v.72, p.127-134, 1980.
- MYERS, A. CLAYDEN, A.D., CARTWRIGHT, R.A., CARTWRIGHT, S.C. Childhood cancer and overhead powerlines: a case-control study. *Brit. J. Cancer*, v.62, p.1008-1014, 1990.
- NAKANO, M., AWA, A.A. Mitotic activity and SCE frequency in relation to aging in human lymphocytes in vitro. *Jpn. J. Hum. Genet.*, v.27, p.153-154, 1982.
- NATARAJAN, A.T., OBE, G. Mutagenicity testing with cultured mammalian cells: cytogenetic assays. In: HEDDLE, J.A. (Ed.). *Mutagenicity: news horizons in genetic toxicology*. New York: Academic Press, 1982. cap.7, p.172-213.
- NATARAJAN, A.T., ROTTEVEEL, A.H.M., van PIETERSON, J., SCHLIERMANN. Influence of incorporated 5-bromodeoxyuridine on the frequencies of spontaneous and induced sister-chromatid exchanges, detected by immunological methods. *Mutat. Res.*, v.163, p.51-55, 1986.

NATARAJAN, A.T., VYAS, R.C., WIEGANT, J., CURADO, M.P. A cytogenetic follow-up study of the victims of a radiation accident in Goiania (Brazil). *Mutat. Res.*, v.247, n.1, p.103-112, 1991.

NORDENSON, I., MILD, H.K., NORDSTROM, S., SWEINS, A., BIRKE, E. Clastogenic effects in human lymphocytes of power frequency electric fields: in vivo and in vitro studies. *Radiat. Environ. Biophys.*, v.23, p.191-201, 1984.

NORTON, L.A. In vivo bone growth in a controlled electric field. *Ann. N. Y. Sci.*, v.238, p.466, 1975.

NORTON, L.A. Effects of a pulsed electromagnetic field on a mixed chondroblastic tissue culture. *Clin. Orthop. Rel. Res.*, v.167, p.208-289, 1982.

OBE, G., HESHA, J. Chromosomal aberrations in heavy smokers. *Hum. Genet.*, v.41, p.259-263, 1978.

OBE G., BEEK, K. The human leukocyte test system. In: F.J. SERRES, A. HOLLAENDER (Eds.). *Chemical Mutagens*. New York: Plenum, 1982. v.7, p.337-400.

OLSEN, J.H., NIELSEN, A., SCHULGEN, G. Residence near high voltage facilities and risk of cancer in children. *Brit. Med. J.*, v.307, p.891-895, 1993.

PATHAK, S., DHALIWAL, M. K., HOPWOOD, V. L. Genetic susceptibility, somatic mosaicisms and predisposition to human cancer. *Anticancer Res.*, v.9, p.17-20, 1989.

PEARCE, N.E., SHEPPARD, R.A., HOWARD, J.K. *et al.* Leukemia in electrical workers in New Zealand. *Lancet*, p.811-812, 1985.



- PEARCE, N., REIF, J., FRASER, J. Case-control studies of cancer in New Zealand electrical workers. *Int. J. Epidemiol.*, v.18, p.55-59, 1989.
- PHILLIPS, J.L., WINTER, W.D., RUTLEDGE, L. In vitro exposure to electromagnetic fields: changes in tumor cell properties. *Int. J. Radiat. Biol.*, v.49, n.3, p.463-469, 1986.
- POOL, R. Is there an EMF - Cancer connection? *Science*, v.249, n.4973, 1990.
- POOL, R. EMF - Cancer link still murky. *Nature*, v.349, p.554, 1991.
- RAMALHO, A.T., NASCIMENTO, A.C.H., NATARAJAN, A.T. Dose assessment by cytogenetic analysis in the Goiania (Brazil) radiation accident. *Radiat. Prot. Dosim.*, v.25, p.97-100, 1988.
- REESE, J.A., JOSTES, R.F., FRAZIER, M.E. Exposure of mammalian cells to 60-Hz magnetic or electric fields: Analysis for DNA single-strand breaks. *Bioelectromagnetics*, v.9, p.237-247, 1988.
- REIDY, J.A., ANNEST, L.J., CHEN, A.T., *et al.* Increased sister chromatid exchange associated with smoking and coffee consumption. *Environ. Mol. Mutag.*, v.12, p.311-318, 1988.
- RENNARD, S.I., STER, L.E., CRYSTAL, R.G. Intracellular degradation of newly-synthesised collagen. *J. Invest. Dermatol.*, v.79, p.77-82, 1982.
- RICHER, C-L., SENÉCAL-QUEVILLON, M., DUQUETTE, P. Analysis of low concentrations of 5-bromo-2-deoxyuridine on sister chromatid exchanges in human lymphocytes. *Genome*, v.29, p.165-168, 1987.

- RINALDI, R., SHAMOS, M., LAVINE, L. Uptake of tritiated thymidine during electrical stimulation of induced cortical bone defects. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.238, p.397, 1974.
- RIVERA, H., DOMINGUEZ, M.G. C-anaphase versus premature centromere division. *Hum. Genet.*, v.88, p.124, 1991.
- RIVERA, H., DOMINGUEZ, M.G. Replay to the letter by Y. Chamla, C-anaphase revised. *Hum. Genet.*, v.90, n.1/2, p.188, 1992.
- ROSENTHAL, M., OBE, G. Effects of 50-Hertz electromagnetic 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.
- ROTH, H.D. A evaluation of published studies analyzing the association of carcinogenesis with exposure to magnetic fields. California: Palo Alto-Electric Power Research Institute, 1985.
- RUDD, N.L., TESHIMA, H.E., MARTIN, R.H., *et al.* A dominantly inherited cytogenetic anomaly: a possible cell division mutant. *Hum. Genet.*, v.65, p.117-121, 1983.
- SASAKI, M.S. Sister chromatid exchange and chromatid interchange as possible manifestation of different DNA repair processes. *Nature*, v.269, p.623-625, 1977.
- SAVITZ, D.A., CALLE, E.E. Leukaemia and occupational exposure to electromagnetic fields: review of epidemiologic surveys. *J. Occup. Med.*, v. 29, p. 47-51, 1987.



- SAVITZ, D.A., PEARCE, N.E., POOLE, C. Methodological issues in the epidemiology of electromagnetic fields and cancer. *Epidem. Rew.*, v.11, p.59-78, 1989.
- SAVITZ, D.A., JOHN, E.M., KLECKNER, R.C. Magnetic field exposure from electric appliances and childhood cancer. *Amer. J. Epidemiol.*, v.131, n.5., p.763-773, 1990.
- SBRANA, I., CARETTO, S., RINALDI, G., LOPRIENO, N. Induction of chromosomal aberration and SCE chloramphenicol. *Mutat. Res.*, v.248, n.1, p.145-154, 1991.
- SEVERSON, R.K., STEVENS, R.G., KAUNE, W. T., *et al.* Acute nonlymphocytic leukemia and residential exposure to power frequency magnetic fields. *Amer. J. Epidemiol.*, v.128, n.1, p.10-20, 1988.
- SILVA, A.E. S. J. Rio Preto: Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas. UNESP, 1988. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas. UNESP, 1988.
- SINHA, A.K., LINSCOMBE, V.A., GOLLAPUDI, B.B., *et al.* Cytogenetic variability of lymphocytes from phenotypically normal men: influence of age, smoking, season, and sample storage. *J. Toxicol. Environ. Health*, v.17, p.327-345, 1986.
- SOPER, K.A., STOLLEY, P.D., GALLOWAY, S.M. *et al.* Sister-chromatid exchange (SCE) and report on control subjects in a study of occupationally exposed workers. *Mutat. Res.*, v.129, p.77-88, 1984.
- SPEERS, M.A., DOBBINS, J.G., MILLER, V.S. Occupational exposure and brain cancer mortality: a preliminary study of east Texas residents. *Amer. J. Indust. Med.*, v.13, p.629-638, 1988.



- SPITZ, M.R., JOHNSON, C.C. Neuroblastoma and paternal occupation: a case-control analysis. *Amer. J. Epidemiol.*, v.121, p.924-929, 1985.
- STEVENS, R.G. Electric power use and breast cancer: a hypothesis. *Amer. J. Epidemiol.*, v.125, p.556-561, 1987.
- 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.
- TAKAHASHI, K., KANEKO, I., DATE, M., FUKADA, E. Influence of pulsing electromagnetic field on the frequency of sister-chromatid exchanges in cultured mammalian cells. *Experientia*, v.43, p.331-332, 1987.
- TAMARKIN, L., COHEN, M., ROSELLE, D., *et al.* Melatonin inhibition and pinealectomy enhancement of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene- induced mammary tumors in the rat. *Cancer Res.*, v.41, p.4432-4436, 1981.
- TAWN, E.J., EARL, R. The influence of culture media on chromosome aberration levels, sister chromatid exchange frequencies, and the rate of cell proliferation: comparison of Iscove's low folate medium with Eagle's MEM. *J. Med. Genet.*, v.25, p.419-421, 1988.
- THOMAS, D.B. Breast cancer in man. *Epidemiol Rev.*, v.15, n.1, p.220-231, 1993.
- TICE, R.R., CHAILLET, J., SCHNEIDER, E.L. Evidence derived from sister chromatid exchanges of restricted rejoining of chromatid subunits. *Nature*, v.256, p.642-644, 1975.
- TOMENIUS, L. 50-Hz electromagnetic environment and the incidence of childhood tumors in Stockholm County. *Bioelectromagnetics*, v.7, p.191-207, 1986.

THOMPSON, M. W., McINNES, R. R., WILLARD, H. F. Thompson & Thompson: *Genetics in Medicine*. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1991. 5 ed.

TORNQVIST, S., NORELL, S., AHLBOM, A., *et al.* Cancer in the electric power industry. *Brit. J. Indust. Med.*, v.43, p.212-213, 1986.

TUCKER, J.D., CHRISTENSEN, M.L., STROUT, C.L., CARRANO, A.V. Determination of the baseline sister chromatid exchange frequency in human and mouse peripheral lymphocytes using monoclonal antibodies and very low doses of bromodeoxyuridine. *Cytogenet. Cell Genet.*, v.43, p.38-42, 1986.

TYNES, T., ANDERSEN, A. Electromagnetic field and male breast cancer. (Letter). *Lancet*, v.336, p.1596, 1990.

TYNES, T., ANDERSEN, A., LANGMARK, F. Incidence of cancer in Norwegian workers potentially exposed to electromagnetic fields. *Amer. J. Epidemiol.*, v.136, n.1, p.81-88, 1992.

VAGERO, D., AHLBOM, A., OLIN, R., SAHLSTEIN, S. Cancer morbidity among workers in the telecommunication industry. *Brit. J. Ind. Med.*, v.42, p.191-195, 1985.

VALJUS, J. NORPPA, H., JÄRVENTAUUS *et al.* 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.

VARELLA-GARCIA, M. Teste de trocas entre cromátides-irmãs. In: RABELLO-GAY, M.N., RODRIGUES, M.A.R., MONTELELEONE-NETO, R. (Eds.). *Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1991. p.123-140



- VENA, J.E., GRAHAM, S., HELLMANN, R., *et al.* Use of electric blankets and risk of postmenopausal breast cancer. *Amer. J. Epidemiol.*, v.134, n.2., p.180-185, 1991.
- VERKASALO, P.K., PUKKALA, E., HONGISTO, M.Y. *et al.* Risk of cancer in Finnish children living close to power lines. *Brit. Med. J.*, v.307, p.895-899, 1993.
- VERREAULT, R., WEISS, N.S., HOLLENBACH, K.A., *et al.* Use of electric blankets and risk of testicular cancer. *Amer. J. Epidemiol.*, v.131, n.5, p.759-762, 1990.
- VIG, B.K., WODNITZKI, J. Separation of sister centromeres in some chromosomes from cultured human lymphocytes. *J. Hered.*, v.65, p.149-152, 1974.
- VIG, B.K. Out-of-phase separation of a G-group chromosome in a woman with chronic myelogenous leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.*, v.12, p.167-169, 1984.
- VIG, B.K., PAWELETZ, N., SCHROETER, D. The centromere-kinetocore complex in cancer. *Cancer J.*, v.6, n.5., 243-252.
- VOGEL, E., NATARAJAN, A.T. The relation between reaction kinetics and mutagenic action of monofunctional alkylating agents in higher eukariotic systems. *Chem. Mutagens*, v.7, p.295-336, 1981.
- VYAS, R.C., DARPOUDY, F., NATARAJAN, A.T. Radiation-induced chromosomal breakage and rejoining in interphase-metaphase chromosomes of human lymphocytes. *Mutat. Res.*, v.249, n.1, p.29-36, 1991.

- WEBB, R.B., MALINA, M.M. Mutagenesis in *E. coli* by visible light. *Science*, v.156, p.1104-1105, 1967.
- WELKER, H.A., SEMM, P., WILLIG, R.P., *et al.* Effects of an artificial magnetic field on serotonin N-acetyl-transferase activity and melatonin content of the rat pineal gland. *Exp. Brain Res.*, v.50, p.426-432, 1983.
- WERTHEIMER, N., LEEPER, E. Electrical wiring configurations and childhood cancer. *Amer. J. Epidemiol.*, v.109, p.273-284, 1979.
- WERTHEIMER, N., LEEPER, E. Electrical wiring configurations and childhood leukemia in Rhode Island. (Letter). *Amer. J. Epidemiol.*, v.111, p.461-462, 1980.
- WERTHEIMER, N., LEEPER, E. Magnetic field exposure related to cancer subtypes. *Ann. N. Y. Sci.*, v.502, p.43-54, 1987.
- WILSON, B.W., ANDERSON, L.E., HILTON, D.I., *et al.* Chronic exposure to 60-Hz electric fields: effects on pineal function in the rat. *Bioelectromagnetics*, v.2, p.371-380, 1981.
- WOLFF, S., PERRY, P. Differential Giemsa 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). *Lancet*, v.2, p.1160-1161, 1982.
- WULF, H. C., HUSUM, B. & NIEBUHR, E. Cessation of smoking enhances sister chromatid exchanges in lymphocytes. *Hereditas*, 102: 195-198, 1985.



YAMAZAKI, E. MATSUBARA, S., YAMADA, I. Effect of Gd-DTPA and/or magnetic field and radiofrequency exposure on sister chromatid exchange in human peripheral lymphocytes. *Acta Radiol.*, v.34, n.6, p.607-611, 1993.

ZHANG, S. Centromere spreading and out-of-phase chromatid separation in Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Genet. Cytogenet.*, v.12, p.211-217, 1986.



IX- 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



