

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**EFEITO CITOGENÉTICO DO ^{153}Sm -EDTMP EM LINFÓCITOS
PERIFÉRICOS DE PACIENTES COM CÂNCER METASTÁTICO**

MÁRCIA AUGUSTA DA SILVA

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do grau de Doutor
em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear
Básica – Aplicações

Orientadora:

Dra. Kayo Okazaki

São Paulo

2001

A ciência será sempre uma busca, jamais
um descobrimento real. É uma viagem,
nunca uma chegada

Karl Popper

Aos meus pais Orlando Augusto e Erothydes pelo carinho, dedicação, apoio e amor transmitidos de forma a me tornar a pessoa que sou e principalmente por me iluminarem em todos os momentos.

Obrigada por tudo, um dia nos encontraremos novamente

**Ao meu irmão Márcio, minha cunhada
Adriana e meus tesouros Bárbara e
Giovanna que entenderam que eu tinha
que cumprir esta etapa da minha vida
mesmo que isso implicasse na distância
e ausência. Na verdade, meu coração
sempre esteve presente!**

AGRADECIMENTOS

À Dra. Kayo Okazaki, pela orientação, confiança, constante apoio e cuidados dispensados sempre de forma paciente e dedicada.

À Dra. Maria Inês C.C.Guimarães, pela sincera amizade, fornecimento de dados e assistência científica.

Aos pacientes que permitiram a realização deste trabalho e por depositaram em mim toda sua confiança

Às enfermeiras, em especial à Dona Hilda, do Centro de Medicina Nuclear que auxiliaram na coleta de sangue dos pacientes, sempre com muito carinho.

À Dra Carla Rachel Ono do Centro de Medicina Nuclear, sempre muito prestativa no fornecimento dos dados e com muito carinho, na coleta de sangue dos pacientes.

Ao Dr. Orlando Rebelo dos Santos pela amizade, apoio e orientação no início da minha vida acadêmica.

À Dra Marycel Figols de Barbosa pelo fornecimento dos radionuclídeos

Ao Dr Helio Yoriyaz, Dr.Paulo T.D.Siqueira e Dr. Paulo Rogério P.Coelho pelo estimado auxílio no cálculo das doses.

Ao Dr Igor pela sua simplicidade em fornecer informações sobre drogas quimioterápicas

À todos os amigos da Divisão de Radiobiologia, em especial aos amigos Johnny, Paula, Helena, Ieda, Cecília, Paulo, Elaine, Daniella, Paula Koseki, Nanci e Lígia pelo apoio amigo e desinteressado na realização do trabalho experimental.

À Miriam F.Suzuki, pela amizade, constante apoio e toda a assistência dada.

Às amigas Regina Affonso, Maria Helena, Rosangela R.Arkaten pela constante participação e dicas.

À Dra. Maria Aparecida P. Camillo, por todas as sugestões e assistência dada na avaliação dos dados.

Ao Dr. José Roberto Rogero pela amizade e constante incentivo para continuar na vida acadêmica

À Dona Genivalda pelo café sempre fresquinho e ao Luíz Lobo pelo cuidado com a nossa segurança.

À Patrícia Nascimento, mais que uma amiga, uma irmã de coração, pela amizade sincera, confiança e constante carinho.

Ao Dib Karam Júnior que me ensinou a sorrir

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração desse trabalho

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, pela oportunidade de executar esse trabalho

À CAPES pelo apoio financeiro

EFEITO CITOGENÉTICO DO ^{153}Sm - EDTMP EM LINFÓCITOS PERIFÉRICOS DE PACIENTES COM CÂNCER METASTÁTICO

Márcia Augusta da Silva

RESUMO

O ^{153}Sm -EDTMP é um radiofármaco utilizado em medicina nuclear com resultados promissores no alívio da dor metastática. No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos do ^{153}Sm -EDTMP em nível celular. O presente trabalho foi conduzido com o intuito de avaliar os efeitos citogenéticos do ^{153}Sm -EDTMP em linfócitos periféricos de pacientes com metástases ósseas (com e sem radio e/ou quimioterapias anteriores) pela da técnica de detecção de aberrações cromossômicas, tanto *in vivo* como *in vitro*. Para tanto, as amostras sangüíneas foram coletadas antes e 1 hora após a administração endovenosa do ^{153}Sm -EDTMP (atividade média de $42,53 \pm 5,31$ MBq/kg de peso corpóreo), levando-se em consideração o rápido *clearance* sangüíneo. Os principais tipos de aberrações cromossômicas estruturais encontrados foram os *gaps* e quebras, fragmentos acêntricos, anéis cêntricos, *double minutes* e dicêntricos. A análise estatística mostrou que o único grupo de pacientes que apresentou uma diferença significativa na freqüência de aberrações cromossômicas 1 hora após o tratamento foi o que recebeu prévio tratamento radio e quimioterápico antes da terapia com ^{153}Sm -EDTMP. Quanto a averiguação do número modal de cromossomos e da cinética do ciclo celular, a análise estatística mostrou que não houve diferença significativa entre os grupos analisados, sugerindo que o tratamento com ^{153}Sm -EDTMP não influenciou nesses parâmetros. A molécula carreadora, EDTMP, não teve qualquer influência na indução de aberrações cromossômicas. Em relação aos ensaios *in vitro*, os dados obtidos de linfócitos periféricos submetidos às diferentes concentrações radioativas de ^{153}Sm -EDTMP (0,046 – 1,110 MBq/mL) de doadores sadios e de pacientes sem prévio tratamento se ajustaram melhor ao modelo de regressão linear ($Y=A+BX$). O dano cromossômico induzido pelo ^{153}Sm -EDTMP observado *in vitro* foi cerca de 2 vezes maior do que o encontrado *in vivo* para o grupo de pacientes sem prévio tratamento. Os dados obtidos mostraram que a terapia com ^{153}Sm -EDTMP induziu uma pequena quantidade de danos citogenéticos em linfócitos periféricos de pacientes 1 hora após sua administração, embora, teoricamente, um efeito estocástico a longo prazo não possa ser descartado.

CYTOGENETIC EFFECT OF ^{153}Sm - EDTMP IN PERIPHERAL LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH METASTATIC CANCER

Márcia Augusta da Silva

ABSTRACT

The ^{153}Sm -EDTMP is a radiopharmaceutical used in nuclear medicine with promising results for the relief of metastatic pain. Therefore, there are few knowledge about the effects of ^{153}Sm -EDTMP at cellular level. The present study was conducted with the aim of evaluating the cytogenetic effects of ^{153}Sm -EDTMP in peripheral lymphocytes from patients with bone metastasis (with and without previous radio and/or chemotherapy) by the chromosome aberration technique, either *in vivo* or *in vitro*. For that, the blood samples were collected before and one hour after the endovenous administrations of ^{153}Sm -EDTMP (mean activity of 42.53 ± 5.31 MBq/kg body weight), taking into account the rapid blood *clearance*. The principal types of structural chromosome aberrations found *gaps* and breaks, acentric fragments centric rings, *double minutes* and dicentrics. The statistical analysis showed that the group submitted to previous radio and chemotherapy before ^{153}Sm -EDTMP administration showed significant difference in chromosome aberrations frequency one hour after the treatment. The analysis of the chromosome modal number and the kinetics of cellular cycle showed no statistical difference among the groups, suggesting that the treatment with ^{153}Sm -EDTMP, did not influence these parameters. The carrier molecule, EDTMP, did not influence the induction of chromosome aberration. In relation to the *in vitro* assays, the obtained data of peripheral lymphocytes of healthy donors and patients with no previous treatment exposed to different radioactive concentration of ^{153}Sm -EDTMP (0.046 – 1.110 MBq/mL) were better adjusted by linear regression model ($Y=A+BX$). The chromosome damage induced by ^{153}Sm -EDTMP observed *in vitro* was about 2 fold higher than that found *in vivo* for the group of patients with no previous treatment. The obtained data showed that the therapy with ^{153}Sm -EDTMP induced a few quantity of cytogenetic damages in peripheral lymphocytes one hour after its administration in patients, although, theoretically, a long term stochastic effect cannot be disregarded.

SUMÁRIO

	Página
1 – INTRODUÇÃO.....	01
1.1. – Considerações gerais sobre o câncer.....	01
1.2. – Modalidades terapêuticas para o alívio da dor.....	04
1.3. – Considerações gerais sobre o ¹⁵³ Sm-EDTMP.....	06
1.4. – Considerações gerais sobre a radiação ionizante.....	10
1.5. – Métodos utilizados para a avaliação do dano biológico.....	12
1.6. – Considerações gerais sobre aberrações cromossômicas.....	14
1.7. – Radionuclídeos utilizados em medicina nuclear.....	19
2 – OBJETIVOS.....	21
3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	22
3.1. – Doadores.....	22
3.2. – Metodologia.....	26
3.2.1. – Coleta de sangue.....	26
3.2.2. – Ensaio <i>in vivo</i>	26
3.2.3. – Ensaio <i>in vitro</i>	26
3.2.3.1.- Elaboração de curvas dose-resposta.....	26
3.2.3.2.- Tempo de incubação com ¹⁵³ Sm-EDTMP.....	28
3.2.3.3.- Efeito do EDTMP.....	29
3.2.4.–Cultivo de linfócitos para os ensaios <i>in vivo e in vitro</i>	29
3.2.5. – Análise microscópica.....	30
3.2.6. – Cálculo da dose absorvida de ¹⁵³ Sm.....	31
3.2.7. – Análise estatística.....	32
4 – RESULTADOS.....	34
4.1. – Células com aberrações cromossômicas estruturais.....	34
4.2. – Células com número modal e hipomodal de cromossomos.....	39
4.3. – Células nos diferentes ciclos mitóticos.....	41
4.4. – Tempo de incubação com ¹⁵³ Sm-EDTMP.....	45
4.5. – Efeito do EDTMP.....	46
4.6. – Estimativa de dose.....	48
4.6. – Curvas dose – resposta.....	49
5 – DISCUSSÃO.....	58
6 – CONCLUSÃO.....	68
7 - ANEXO.....	70
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

1.1- CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O CÂNCER

O câncer é um dos problemas mais comuns e agravantes da medicina clínica. O câncer é uma doença que compreende uma grande variedade de tumores malignos que se formam pelo mesmo processo básico de crescimento descontrolado. A proliferação celular excessiva pode resultar em uma massa tumoral que pode invadir os tecidos vizinhos saudáveis, levando a formação de metástases. O diagnóstico e tratamento precoces são vitais e a identificação das pessoas com risco aumentado de câncer antes do seu aparecimento é um objetivo importante da pesquisa médica.

Um tumor compõe-se de um parênquima de células em proliferação, com um estroma de tecido conjuntivo e vasos sanguíneos. Há três formas principais: sarcomas, nos quais o tumor origina-se do tecido mesenquimal; carcinomas do tecido epitelial e neoplasias hematopoéticas, como leucemias e linfomas que envolvem o tecido sanguíneo (THOMPSON *et al.*, 1993).

O desenvolvimento neoplásico não ocorre como resultado de um único evento e sim da ocorrência de várias alterações genéticas e epigenéticas em uma dada célula somática (SUGIMURA, 1992). As alterações ocorridas em certos genes ligados ao desenvolvimento neoplásico, como os proto-oncogenes, supressores de tumor e genes envolvidos no mecanismo de reparo do DNA⁽¹⁾,

⁽¹⁾ DNA – ácido desoxirribonucléico – *deoxyribonucleic acid*

podem desencadear uma série de eventos que podem resultar em uma transformação maligna (WEINSTEIN *et al.*, 1995).

Didaticamente, o processo de carcinogênese pode evoluir em três fases: iniciação ou fase celular, promoção ou tecidual e progressão ou sistêmica.

Na fase de iniciação, tanto fatores endógenos como exógenos podem, por um único evento, induzir um dano irreversível ao DNA de uma célula. Contudo, um único evento não é suficiente para induzir uma mudança maligna, necessitando posteriormente da ação de promotores tumorais.

Na fase de promoção, segue à expansão clonal da célula transformada, que sofre inúmeras alterações genéticas e epigenéticas. Frequentemente, os tumores são diagnosticados nesta fase.

Os carcinógenos podem ser agentes iniciadores ou promotores; alguns carcinógenos são classificados como completos porque atuam como iniciadores e promotores tumorais ao mesmo tempo (HARRIS, 1991).

A fase final é a de progressão, onde as células transformadas, adquirem outras alterações genéticas e epigenéticas, entram em um processo proliferativo ilimitado com um aumento do grau de malignidade; o tumor aumenta de tamanho e pode se espalhar formando focos secundários de tumor (metástase). As metástases caracterizam a fase sistêmica das neoplasias (HENDERSON , 1996).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS)⁽²⁾, a cada ano, o câncer atinge pelo menos 9 milhões de pessoas e destes, vão ao óbito cerca de 5 milhões de pessoas, sendo atualmente, a segunda causa de morte por doença na maioria dos países.

No mundo inteiro, o câncer de próstata ocupa o quinto lugar entre as neoplasias malignas que elevam a taxa de mortalidade. No Brasil, para os próximos anos, estima-se que, entre os tumores malignos, no sexo masculino, o câncer de próstata terá a segunda maior taxa de mortalidade e a primeira em incidência (sem se levar em consideração os tumores de pele não melanocíticos). Analogamente ao que ocorre em países desenvolvidos, a magnitude das taxas de mortalidade e incidência estimadas no Brasil, reflete, pelo menos parcialmente, o envelhecimento da população.

Estima-se que o câncer de mama feminina manter-se-á como a primeira causa de morte em mulheres. Para os próximos anos, estima-se que, em mulheres, o câncer de mama terá a mortalidade e a incidência mais altas entre os tumores malignos. Essa tendência é consistente com a de países desenvolvidos, em que a urbanização levou ao aumento da prevalência de fatores de risco para o câncer de mama, como por exemplo, a obesidade e a idade tardia da primeira gravidez (INCA, 2001).

Sabe-se que a morbidade e mortalidade associada ao câncer pode ser atribuída às metástases ósseas. As metástases ósseas podem se originar de

⁽²⁾ OMS – Organização Mundial da Saúde

vários tipos de tumores primários, mas particularmente os de pulmão (36%), de próstata (50%) e de mama (50-75%) representam uma incidência significativa (SINGH *et al.*, 1989).

1.2 – MODALIDADES TERAPÊUTICAS PARA O ALÍVIO DA DOR

As metástases ósseas provocam muita dor, ocasionada pela infiltração do tumor e pela expansão do periósteo, ocasionando também hipercalcemia, perda das funções ósseas, fraturas patológicas e sintomas neurológicos provocados pela compressão da medula espinhal. Esses fatores podem comprometer a qualidade de vida de pacientes com câncer (GAUDIANO, 1994; CANCINO, 1998; GOECKELER, 1998). O tratamento é primeiramente de forma paliativa para aliviar a dor, prevenir fraturas, manter a atividade e mobilidade e, se possível, prolongar a sobrevivência dos pacientes (WATANABE *et al.*, 1998).

Conseqüentemente, qualquer aperfeiçoamento no tratamento eficaz para o alívio da dor óssea metastática, representa uma vantagem significativa no sentido de oferecer uma melhor qualidade de vida aos pacientes com malignidade avançada (LEWINGTON, 1993).

Assim sendo, uma série de tratamentos tem sido usados para controlar a metástase óssea ou para o alívio da dor decorrente desta. Dentre esses, pode-se citar a irradiação externa, porém, essa se torna limitada pela extensão do envolvimento esquelético pelas metástases ósseas e, indesejável por gerar conseqüências patológicas, mielossupressão e efeitos adversos como náusea,

vômito e diarreia dentro de 12-48 horas da sessão de radioterapia (WHELDON & O'DONOGHUE, 1990; TURNER & CLARINGBOLD, 1991; COLLINS *et al.*, 1993; GOECKELER, 1998).

Por outro lado, os analgésicos utilizados para a atenuação da dor óssea apresentam um período de eficácia limitada, além do paciente desenvolver rapidamente tolerância a droga (LEWINGTON, 1993; GOECKELER, 1998).

A utilização de quimioterapia para alívio da dor óssea é bem aceita, mas sua duração é curta e limitada, podendo induzir efeitos colaterais de conseqüências imprevisíveis (SINGH *et al.*, 1989).

Desde a década de 40, vários estudos têm sido realizados sobre a utilização de radionuclídeos para o tratamento da dor provocada pelo câncer metastático, entre eles, pode-se citar o trabalho de PECHER (1942) que usou o $^{89}\text{Sr}^{(3)}$ pela primeira vez em pacientes com câncer ósseo como agente terapêutico. Assim, uma atenção maior tem sido dada à utilização de radionuclídeos para o alívio da dor, ocasionada em decorrência da disseminação de tumores primários que levam à formação de metástases ósseas.

Esses radionuclídeos podem ser classificados em emissores de partículas α , β e de elétron de conversão interna ou elétron *Auger* (LEWINGTON, 1993). Em virtude dos elétrons *Auger* apresentarem um percurso curto, os radionuclídeos necessitam ser incorporados no núcleo da célula (DNA) para ocasionar o efeito.

⁽³⁾ ^{89}Sr – Estrôncio-89 – *Strontium-89*

Os emissores α atingem uma distância relativamente pequena nos tecidos (50 – 90 μm) e possuem uma alta transferência linear de energia (LET)⁽⁴⁾, porém apresentam um complexo esquema de decaimento com a produção de núclídeos-filhos instáveis. Pode-se citar, no entanto, o $^{212}\text{Bi-DOTMP}$ ⁽⁵⁾ um radionuclídeo promissor no tratamento de metástases escleróticas e osteosarcoma osteoblástico (HASSFJELL *et al.*, 1997).

Nesse sentido, os emissores β , são os mais indicados como radionuclídeos terapêuticos em virtude de apresentarem um pequeno poder de penetração nos tecidos vivos (1-12 mm com energia máxima de 0,3 a 2,3 MeV), oferecendo um tratamento específico ao tumor, sem afetar muito os tecidos saudáveis, reduzindo assim a toxicidade (WHELDON & O'DONOGHUE, 1990; ALLEN & BLAGOYEVIC, 1996; McEVAN, 2000).

1.3. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O $^{153}\text{Sm-EDTMP}$

Vários radionuclídeos emissores β têm sido utilizados em medicina nuclear, por exemplo o ^{32}P ⁽⁶⁾, ^{89}Sr , ^{90}Y ⁽⁷⁾, ^{186}Re ⁽⁸⁾ e ^{153}Sm ⁽⁹⁾, para alívio da dor provocada pelas metástases ósseas.

O ^{32}P possui uma meia vida física de 14,2 dias e é um emissor puramente β , o que dificulta o cálculo dosimétrico por cintilografia óssea. Pelo fato do ^{32}P

⁽⁴⁾ LET – Transferência Linear de Energia – *Linear Energy Transfer*

⁽⁵⁾ $^{212}\text{Bi-DOTMP}$ – Bismuto-212 – *Bismuth-212*

⁽⁶⁾ ^{32}P – Fósforo-32 – *Phosphorus-32*

⁽⁷⁾ ^{90}Y – Ítrio-90 – *yttrium-90*

⁽⁸⁾ ^{186}Re – Rênio-186 – *Rhenium-186*

⁽⁹⁾ ^{153}Sm – Samário-153 – *Samarium-153*

ocasionar efeitos colaterais severos, induzindo à uma grande agressividade medular com pancitonia e transtornos gastrointestinais, o seu uso tem sido desestimulado .

O ^{89}Sr ($^{89}\text{SrCl}$)⁽¹⁰⁾ possui uma meia vida relativamente longa (50,5 dias) que impede o tratamento fracionado. Seu principal efeito colateral é a diminuição significativa no número de plaquetas (GAUDIANO, 1994; CANCINO, 1998).

O ^{90}Y é um emissor puramente β , induz à uma alta absorção no fígado e apresenta resultados paliativos em somente 50% dos pacientes (TURNER *et al.*, 1989; SINGH *et al.*, 1989; EARY *et al.*, 1993; SAMARATUNGA *et al.*, 1995; ALLEN & BLAGOYEVIC, 1996).

O ^{186}Re (Sn)-HEDP (hidroxietileno difosfórico)⁽¹¹⁾ possui uma meia vida física de 90,64 horas e é emissor β e γ , com poder de penetração nos tecidos moles cerca de 1 cm e 0,5 cm no tecido ósseo, porém seu complexo ligante (HEDP) não é estável (GAUDIANO, 1994).

O ^{153}Sm -EDTMP (ácido etilenodiaminotetrametileno difosfórico)⁽¹²⁾ foi reportado pela primeira vez em 1986 por SINGH e colaboradores como sendo um radionuclídeo com potencial terapêutico onde os autores avaliaram a localização preferencial do ^{153}Sm -EDTMP no tecido ósseo e compararam seu efeito com

⁽¹⁰⁾ $^{89}\text{SrCl}$ – Cloreto de Estrôncio – *Strontium chloride*

⁽¹¹⁾ ^{186}Re (Sn) – HEDP – Rênio hidroxietileno difosfórico – *Rhenium-186-hydroxyethylidene diphosphate*

⁽¹²⁾ ^{153}Sm -EDTMP – Samário ácido etilenodiaminotetrametileno difosfórico – *Samarium-153-ethylenediaminetetramethylene phosphonate*

outros radionuclídeos (DAHALAN *et al.*,1998). Em 1989, TURNER e colaboradores fizeram um estudo clínico utilizando ^{153}Sm -EDTMP em 28 pacientes com diversos tipos tumorais e que apresentavam dor provocada pelas metástases ósseas e que não respondiam ao tratamento convencional .

O ^{153}Sm é um lantanídeo com uma meia vida física de 46,8 horas o que permite um manuseio mais seguro e possibilita sua administração em doses múltiplas (fracionadas). O ^{153}Sm é um emissor de partículas β com energia média de 0,290 MeV , depositando parte da energia dentro de 3,0 mm de tecido mole e 1,7 mm no osso, induzindo uma citotoxicidade seletiva (ROBINSON, 1990; COLLINS *et al.*, 1993; GAUDIANO, 1994; ALLEN & BLAGOJEVIC, 1996; RESCHE *et al.*,1997; CASTRO & PORTILLA, 1998; O'DUFFY *et al.*, 1999; FISHER, 1999). Emite também raios γ (28%) com 0,103 MeV de energia, que permite uma alta qualidade na cintilografia de imagens e nos cálculos dosimétricos. A meia vida biológica no esqueleto é de 520 horas (21,6 dias) que é cerca de 10 vezes maior que a meia vida física do radionuclídeo (BAYOUTH *et al.*, 1994).

O ^{153}Sm forma um complexo com o ácido etilenodiaminotetrametileno difosfórico (^{153}Sm -EDTMP) que é química e biologicamente estável, localizando-se preferencialmente no osso e concentrando-se nas áreas de maior atividade osteoblástica em associação com a hidroxiapatita (CANCINO, 1998). O complexo permanece no esqueleto por um período de tempo longo, o suficiente para permitir a desintegração do radionuclídeo (SINGH *et al.*, 1989; FARHANGHI *et al.*, 1992; COLLINS *et al.*, 1993; GAUDIANO,1994; BRULAND *et al.*, 1996).

Estudos clínicos têm mostrado alívio de dor em 60-90% dos pacientes com metástase óssea originária de uma variedade de tumores primários (TURNER *et al.*, 1989; EARY *et al.*, 1993).

A melhoria sintomática ocorre dentro de 7 a 14 dias de tratamento e cerca de 65% dos pacientes tratados com $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ permanecem sem dor por um período de 4-35 semanas com duração média de 8 semanas (TURNER *et al.*, 1989; KASI *et al.*, 1991; COLLINS *et al.*, 1993; LEWINGTON, 1993, 1996; GOECKELER, 1998). O tratamento com $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ pode ser repetido mediante toxicidade aceitável e, além disso, existe a possibilidade de tratamento sem a necessidade de internação dos pacientes (ALBERTS *et al.*, 1995; LEWINGTON, 1996)

A administração do $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ está associada à uma mielossupressão passageira. O número de leucócitos e plaquetas diminui em cerca de 40 a 50% dos níveis basais, dentro de 2-4 semanas. Entretanto, a recuperação hematológica ocorre, em média, dentro de 4 a 8 semanas (BAYOUTH *et al.*, 1994; GOECKELER, 1998).

O *clearance* sanguíneo do $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ é relativamente rápido com o mínimo de acúmulo nos tecidos moles e resulta em somente cerca de 10, 5 e 2% da atividade remanescente no sangue total, uma, duas e quatro horas respectivamente, após a injeção (SINGH *et al.*, 1989). Menos que 1% da dose injetada permanece no sangue cinco horas após a administração do radionuclídeo (EARY *et al.*, 1993). O *clearance* é biexponencial com meia vida de 5,5 e 65

minutos. A primeira fase é representada pela absorção óssea e a segunda representa o *clearance* sangue/urina (BAYOUTH *et al.*, 1994; GOECKELER, 1998).

A excreção do ^{153}Sm -EDTMP na urina ocorre dentro de 6 - 8 horas da administração e a atividade remanescente se concentra no esqueleto com captação preferencial nos tecidos de atividade osteoblástica aumentada com pequena captação no tecido mole, como fígado (5%). Assim, a taxa de excreção pode variar dependendo dos pacientes, pois o ^{153}Sm é captado pelas células com maior atividade osteoblástica: quanto maior a quantidade desse tipo celular, menor será a excreção do ^{153}Sm pela urina (SINGH *et al.*, 1989; TURNER *et al.*, 1989; KASI *et al.*, 1991; FARHANGHI *et al.*, 1992; LEWINGTON, 1993; COLLINS *et al.*, 1993; LÁZNÍCEK *et al.*, 1994).

As características físicas e radioquímicas do ^{153}Sm permite considerá-lo como um agente radioterapêutico e um indicador adequado para diagnóstico por imagem e dessa maneira, o complexo ^{153}Sm -EDTMP tem sido apontado como um radiofármaco promissor no tratamento de pacientes com dor óssea resultante de metástases.

1.4- CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A RADIAÇÃO IONIZANTE

A radiação ionizante é uma modalidade terapêutica muito difundida na prática clínica e oncológica.

Na interação da radiação ionizante com o material biológico o que ocorre em termos bastante amplos é a transferência de energia da radiação para as biomoléculas das células. Nesse processo, ocorre a ionização e a excitação dos átomos da matéria viva com a absorção de energia da radiação. Na ionização, o elétron é ejetado do átomo e na excitação, o elétron ganha energia passando para uma camada orbital mais energética (HALL, 1994).

Quando alguma forma de radiação ionizante – eletromagnética ou particulada - é absorvida por um material biológico, há possibilidade que a radiação venha a interagir diretamente com os alvos celulares, como o DNA (ação direta da radiação). É o processo dominante para radiações com alta transferência linear de energia (LET), tais como nêutrons, partículas α e fragmentos de fissão. Por outro lado, a radiação ionizante poderá interagir primeiramente com outras moléculas, principalmente com as de água, produzindo radicais livres ($\text{OH}\cdot$, $\text{e}^-_{\text{aquoso}}$, e $\text{H}\cdot$) que são espécies químicas altamente reativas e estas podem danificar moléculas orgânicas como o DNA, proteínas, lípidos, carboidratos etc (ação indireta da radiação). É um mecanismo dominante para radiações de baixa LET, como os raios X, partículas β e radiação γ . Os efeitos biológicos da radiação resultam de danos ocorridos ao DNA que é considerado ser o alvo preferencial de muitos agentes, tanto físicos como químicos (UNSCEAR, 1993; LEWINGTON, 1993; HALL, 1994).

Os diferentes tipos de radiação ionizante induzem danos biológicos qualitativamente similares porém não quantitativamente, isso porque os efeitos biológicos estão relacionados com o conceito de transferência linear de energia

(LET) que pode ser definido como sendo a energia média transferida ao sistema por unidade de distância percorrida ($\text{keV}/\mu\text{m}$). A LET é influenciada pela velocidade, massa e carga da radiação.

As alterações induzidas pela radiação ao material genético do indivíduo podem resultar em morte celular, mutações, retardo mitótico, envelhecimento precoce, malformações e o desenvolvimento do câncer (HALL, 1994).

1.5- MÉTODOS UTILIZADOS PARA A AVALIAÇÃO DO DANO BIOLÓGICO

Entre vários métodos para a detecção de danos ocorridos ao material genético, o citogenético vem sendo amplamente utilizado em diversos sistemas biológicos. Geralmente, são utilizadas células obtidas de animais ou linfócitos periféricos de indivíduos envolvidos, por serem indicadores extremamente sensíveis à radiação ionizante: apresentam uma vida relativamente longa, circulam por todos os tecidos e são facilmente obtidos. Esse método permite detectar agentes clastogênicos que produzem quebras cromossômicas, agentes aneugênicos que interferem no processo de segregação cromossômica, provocando alteração na distribuição dos cromossomos durante a divisão celular e agentes alquilantes que interagem diretamente com o DNA formando adutos covalentes (técnica de troca de cromátides-irmãs) (LOHMANN, 1995).

Entre os métodos citogenéticos, a técnica do micronúcleo vem sendo muito utilizada juntamente com a técnica convencional de aberrações cromossômicas, por ser uma técnica de boa sensibilidade, requer menor tempo de análise e

apresenta uma boa relação dose-resposta frente à vários agentes genotóxicos. Os micronúcleos são corpos geralmente arredondados encontrados no citoplasma celular próximo ao núcleo principal. Os micronúcleos são decorrentes de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros que não foram incorporados no núcleo das células-filhas durante a divisão celular. As células binucleadas são induzidas pela adição de citocalasina-B que permite a cariocinese mas impede a citocinese e dessa forma, as células tratadas apresentam dois ou mais núcleos, dependendo do número de divisões pelos quais as células passaram. No entanto, a frequência espontânea de micronúcleos é considerada relativamente alta, sendo cerca de 1% das células analisadas (FENECH & MORLEY, 1986; HALL & WELLS, 1988).

A técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH)⁽¹³⁾ associa a metodologia citogenética à técnica de biologia molecular com a utilização de sondas específicas de DNA que permitem identificar genes específicos, parte do cromossomo ou cromossomos inteiros. Uma das vantagens dessa técnica é que permite uma detecção rápida de danos citogenéticos tanto em células metafásicas como em núcleos interfásicos. Essa técnica, além de permitir avaliar aberrações numéricas, possibilita analisar aberrações cromossômicas estruturais instáveis (dicêntricos) e estáveis (translocações). O estudo de translocações cromossômicas é de interesse particular em dosimetria biológica, principalmente para exposições ocorridas no passado (DARROUDI, 2000). Para o estudo de exposições às baixas doses é necessário um número grande de células, e com isso, a técnica do FISH facilita a análise por utilizar sondas específicas para os cromossomos (EDWARDS, 1997; KANDA, 2000).

⁽¹³⁾ FISH – Hidridização *in situ* por fluorescência – *Fluorescence in situ hybridization*

Além do método citogenético, o teste do cometa, também chamado de eletroforese de microgel (*single cell gel assay*) é muito utilizado no estudo do dano e reparo do DNA (ÖSTLING & JOHANSON, 1984; OLIVE *et al.*, 1990). O teste do cometa se baseia no princípio de migração do filamento de DNA quando uma suspensão celular é submetida à corrida eletroforética: a extensão da migração do DNA está relacionada com o dano induzido (ÖSTLING & JOHANSON, 1984). Esse teste é um método relativamente fácil e rápido, apresenta a mesma sensibilidade das técnicas citogenéticas, requer quantidade pequena de células e não necessita de proliferação celular.

1.6.- CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

As aberrações cromossômicas são consideradas como os indicadores biológicos muito sensíveis do dano ocorrido ao DNA. A técnica de aberrações cromossômicas vem sendo amplamente utilizada em vários tipos celulares para diversos fins, por exemplo em genética toxicológica, biomonitoramento e em dosimetria biológica, em virtude da sua sensibilidade, pela riqueza de informações e pela sua taxa espontânea ser relativamente baixa (IAEA, 1986).

As aberrações cromossômicas são resultantes de quebras e rearranjos cromossômicos. A principal lesão responsável pela formação de mudanças cromossômicas estruturais são as quebras na fita dupla do DNA (BAUCHINGER & SCHMID, 1998). Essas lesões induzidas pelos agentes clastogênicos na estrutura cromossômica podem ser reparadas, restabelecendo a configuração original, ou pode ocorrer um erro no reparo, resultando em rearranjos

cromossômicos ou permanecer sem reparo, originando uma deleção cromossômica.

Assim, as aberrações cromossômicas resultam do conjunto da ação de um agente clastogênico e dos eventuais erros causados pelos mecanismos de reparo celular (OKAZAKI,1995). Desta forma, a presença de aberrações cromossômicas é um indicativo de que as células sofreram dano ao DNA decorrente de algum agente indutor.

As aberrações cromossômicas podem ser induzidas em qualquer fase do ciclo celular pela radiação ionizante. No entanto, dependendo do estágio do ciclo celular, diferentes tipos de aberrações podem ser produzidos: se a célula for exposta na fase G_0 ou G_1 do ciclo celular, a aberração resultante será do tipo cromossômico; na fase G_2 , do tipo cromatídico e na fase S, haverá uma mistura dos dois tipos de aberrações (CARRANO & NATARAJAN,1987).

As aberrações cromossômicas estruturais podem ser classificadas basicamente em dois tipos: instáveis e estáveis. As aberrações instáveis são representadas pelos fragmentos acêntricos, dicêntricos, *double minute*, anéis cêntricos e acêntricos, pois podem ser perdidas durante a divisão celular. Os fragmentos acêntricos são impossibilitados de se orientarem no fuso mitótico durante a divisão celular, visto que não apresentam centrômero. Já os dicêntricos geralmente resultam na formação de pontes na anáfase, podendo interferir na separação física das duas células-filhas. Dessa forma, esses tipos de aberrações

podem ser eliminados seletivamente da população de células proliferativas (BRASELMANN *et al.*,1986).

Os dicêntricos são decorrentes de danos causados em dois cromossomos não replicados, onde ocorreram rearranjos entre as extremidades quebradas. Se as extremidades quebradas estiverem à uma distância muito pequena (menor que 0,1 μ m) e a quebra ocorrer dentro de um intervalo finito de tempo, tais extremidades poderão se unir formando uma configuração anormal, que é o cromossomo dicêntrico, acompanhado de fragmento acêntrico. Em situações mais raras, três ou mais cromossomos podem estar envolvidos (SACHS & BRENNER,1993; EDWARDS *et al.*,1996).

Os fragmentos acêntricos são estruturas em pares sem a presença de centrômero, resultantes de quebras ocorridas nos cromossomos ou nas cromátides à partir de um único ou de dois eventos ionizantes (SCHMID & BAUCHINGER, 1980).

Os *double minute* são estruturas que se apresentam aos pares, menores que os fragmentos acêntricos e são produzidos por duas quebras ocorridas no mesmo braço de um cromossomo, ou seja, decorrentes de uma deleção intersticial (IAEA,1986).

Os anéis cêntricos são resultantes de duas quebras ocorridas nos dois braços do mesmo cromossomo, que se unem originando uma estrutura em forma de anel com um centrômero acompanhado por um fragmento acêntrico (figura 2).

As aberrações estáveis são assim chamadas, pois são tipos de alterações na estrutura cromossômica que não causam dificuldades mecânicas na divisão celular e dessa maneira podem se perpetuar por várias gerações. As aberrações estáveis podem ser representadas por translocações recíprocas e inversões.

A presença de vários tipos de aberrações cromossômicas foi verificada em células tumorais, em sobreviventes de bombas nucleares (YUNIS,1983), em abortos espontâneos, em malformações congênitas e em indivíduos expostos acidental ou ocupacionalmente à radiação (UNSCEAR,1986; EDWARDS, 1997). Uma relação entre a presença de aberrações cromossômicas e a predisposição genética ao câncer tem sido verificado em síndromes de fragilidade cromossômica como ataxia telangiectasia, síndrome de Bloom e anemia de Fanconi (DHILLON & DHILLON, 1998).

Estudos citogenéticos têm revelado a ocorrência de anomalias cromossômicas tanto numéricas como estruturais em vários tipos de tumores. (TALLON *et al.*, 1998). Ganhos ou perdas de cromossomos são eventos comuns em células tumorais.

A radiação ionizante induz à formação de aberrações cromossômicas estruturais, mas também, há relatos de que a mesma pode causar alterações numéricas, tanto *in vivo* como *in vitro* (TALLON *et al.*, 1998). O termo ***aneuploidia*** é usado para designar cariótipos anormais com perda ou ganho de cromossomos inteiros (KÖNIG *et al.*, 1998).

A manutenção da estabilidade do genoma é dependente, entre outros fatores, do funcionamento coordenado dos ciclos de divisão celular. Desvios no funcionamento normal do processo de divisão celular podem ocorrer espontaneamente ou resultar da exposição à certos agentes ambientais. Esses podem induzir à uma má-segregação cromossômica e a produção de células com números alterados de cromossomos. Diferentemente da indução de mutações nos genes ou de aberrações cromossômicas onde o alvo é preferencialmente a molécula de DNA, a aneuploidia pode resultar de dano ocorrido à uma variedade de alvos celulares. Na mitose, os eventos aneugênicos podem resultar da interação de mutagênicos com os centrômeros, cinetócoros, centríolos, tubulinas, proteínas associadas a microtúbulos, proteínas ligadas às cromátides-irmãs, entre outros. A organização e a disponibilidade dos alvos envolvidos na indução da aneuploidia podem variar conforme a fase do ciclo celular (TALLON *et al.*, 1998).

A radiação ionizante pode interferir também na cinética do ciclo celular, causando retardo mitótico. Existem poucos trabalhos sobre a influência da radiação no ciclo celular, porém, pode-se citar o de TALLON e colaboradores (1998) que verificaram que os linfócitos humanos expostos à radiação ionizante, nas fases G₁ e G₂ do ciclo celular, mostraram um atraso mitótico dose-dependente, sendo mais pronunciado na fase G₂ do ciclo celular.

Vários estudos têm reportado uma íntima associação entre o bloqueio na fase G₁ e o gene p53⁽¹⁴⁾. Em geral, quando linhagens celulares que expressam o p53 são irradiadas, essas podem apresentar um bloqueio na fase G₁, sugerindo

⁽¹⁴⁾ p53 – gene supressor tumoral

um importante papel do gene p53 no controle do *checkpoint* permitindo um tempo maior para o reparo do dano induzido ao DNA antes da replicação do material genético (ZIEGLER *et al.*, 1994; BERNHARD, *et al.*, 1995; TALLON *et al.*, 1998).

1.7.-RADIONUCLÍDEOS UTILIZADOS EM MEDICINA NUCLEAR

Existe uma quantidade considerável de trabalhos publicados sobre os danos cromossômicos induzidos pelos raios X (DURANTE *et al.*, 1995; BARQUINERO *et al.*, 1997), γ (BAUCHINGER *et al.*, 1993; CATENA *et al.*, 1997), partículas α (PURROT *et al.*, 1980; EDWARDS *et al.*, 1980; BAUCHINGER *et al.*, 1997) e nêutrons (GOOCH *et al.*, 1964; POHL-RÜLING *et al.*, 1986; TANAKA *et al.*, 1999) em células humanas. No entanto, os trabalhos publicados sobre os efeitos da radiação β (LLOYD *et al.*, 1986; HALL & WELLS, 1988; TANAKA *et al.*, 1994; OLIVEIRA *et al.*, 2001), particularmente sobre os radionuclídeos emissores β utilizados em medicina nuclear em nível celular, não são numerosos.

Pode-se citar, entre outros, o trabalho de M'KACHER e colaboradores (1996) que analisaram aberrações cromossômicas induzidas em linfócitos periféricos de 30 pacientes com carcinoma de tireóide, expostos a 3,7GBq de $^{131}\text{I}^{(15)}$. Um aumento significativo na frequência de micronúcleos foi observado em amostras sanguíneas de 28 pacientes com hipertireoidismo tratados com 582,49 MBq de ^{131}I , 1 e 3 meses após à sua administração (GUTIÉRREZ *et al.*, 1997).

⁽¹⁵⁾ ^{131}I – Iodo-131 – *Iodine-131*

Também foi verificado um aumento significativo na freqüência de aberrações cromossômicas em 30 pacientes com sinovite crônica no joelho submetidos a 5 mCi de ^{90}Y , 3 meses após o tratamento (DOYLE *et al.*, 1977). STEVENSON e colaboradores (1973) verificaram um aumento na freqüência de aberrações cromossômicas em amostras sangüíneas de 70 pacientes que receberam injeções intra articular de ^{90}Y e $^{198}\text{Au}^{(16)}$ como tratamento para sinovite crônica no joelho. WATANABE e colaboradores (1998) avaliaram a freqüência de micronúcleos em amostras sangüíneas de 8 pacientes submetidos ao ^{89}Sr (111MBq) para o tratamento da dor provocada por metástases ósseas e verificaram uma gradual recuperação de células contendo danos citogenéticos 6 meses após o tratamento.

Pela sua importância médica e social, estudos com ^{153}Sm -EDTMP têm tratado diversos aspectos, por exemplo, aplicações clínicas (BRULAND *et al.*, 1996), farmacocinética (FARHANGHI *et al.*, 1992), toxicidade (ALBERTS *et al.*, 1995), biodistribuição (EARY *et al.*, 1993) e enfoque dosimétrico (HEGGIE, 1991). No entanto, no que diz respeito ao efeito do ^{153}Sm em nível celular pouco tem sido estudado. Só constam na literatura, o trabalho desenvolvido por O'DUFFY e colaboradores (1999) que analisaram citogeneticamente o efeito do ^{153}Sm -PHYP⁽¹⁷⁾ em pacientes submetidos a sinovectomia e o de SHOU-PENG e colaboradores (1997) que reportaram a ocorrência de apoptose em células tumorais ósseas de ratos, induzidos pelo ^{153}Sm -EDTMP.

⁽¹⁶⁾ ^{198}Au – Ouro-198 – *Gold-198*

⁽¹⁷⁾ ^{153}Sm -PHYP – Samário Hidroxiapatita particulado – *Samarium-153-particulate hydroxyapatite*

2.- OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo, analisar os efeitos citogenéticos do $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ em linfócitos periféricos de pacientes com metástase óssea (com e sem tratamentos prévios radio e/ou quimioterápicos) por meio da técnica de aberrações cromossômicas e, comparar o grau de danos citológicos encontrados em sistemas *in vivo* com os *in vitro* por meio da construção de curvas dose-resposta.

3.- PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1.- DOADORES:

Foram analisadas amostras sangüíneas de 29 doadores, sendo 21 pacientes com câncer e 8 doadores sadios , de ambos os sexos.

Para a averiguação de uma possível influência do tratamento prévio a que os pacientes foram submetidos quando da terapia com $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ foram analisados os seguintes grupos de doadores:

O **grupo A** foi representado por indivíduos sadios, sem história de irradiação, não fumantes e sem ingestão de qualquer medicamento na ocasião da coleta de sangue.

Grupo B: pacientes que não receberam quimio e/ou radioterapias anteriores.

Grupo C: pacientes que receberam somente radioterapia externa. A radioterapia envolveu doses fracionadas de 1,8 a 2,0 Gy/dia, num acelerador linear de elétrons, com duração de 5 a 6 semanas, recebendo uma dose total de 50 a 70 Gy, antes do tratamento com $^{153}\text{Sm-EDTMP}$. O intervalo de tempo entre o final da radioterapia e o início do tratamento com $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ variou de 1 mês a 5 anos.

Grupo D: pacientes que receberam quimio e radioterapias antes do tratamento com $^{153}\text{Sm-EDTMP}$. As substâncias quimioterápicas utilizadas foram doxorubicina (60 mg/m^2) e ciclofosfamida (600 mg/m^2) ou ciclofosfamida (600 mg/m^2), metotrexato (60 mg/m^2) e 5-fluorouracila (600 mg/m^2) com intervalos de 21 dias para as pacientes com câncer de mama que receberam de 2 a 8 ciclos de quimioterapia. O paciente com câncer de próstata recebeu 3 ciclos de ciclofosfamida (100 mg/m^2) com intervalos de 21 dias. O intervalo de tempo entre o final do tratamento convencional e o início do tratamento com $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ variou de 1 mês a 2 anos. Todos os pacientes receberam primeiramente a radioterapia e depois a quimioterapia, com exceção de uma paciente com câncer de mama que recebeu o tratamento inverso.

Todos os pacientes foram submetidos ao tratamento com $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ cuja atividade média injetada foi $42,54 \pm 5,31 \text{ MBq/kg}$ de peso corpóreo (33 a 56 MBq/kg). Os dados individuais dos doadores (grupos A, B, C e D) podem ser visualizados na tabela I. O volume de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ injetado nos pacientes variou de 1,0 a 3,5 mL.

Todos os doadores foram submetidos a um questionário para a coleta de dados complementares como, estilo de vida, natureza do câncer, entre outros (anexo).

Os critérios utilizados pelo Hospital das Clínicas da FMUSP para a inclusão dos pacientes para o tratamento com ^{153}Sm foram:

- 1) Pacientes com lesões metastáticas ósseas comprovadas por cintilografia óssea;
- 2) Dor de origem óssea considerada insuportável (graus entre 8 e 10);
- 3) Números de leucócitos e de plaquetas acima de $4.500/\text{mm}^3$ e $100.000/\text{mm}^3$, respectivamente.

As amostras sanguíneas, os hemogramas, os leucogramas (atualizados) e as taxas de excreção renal de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ de cada paciente foram fornecidos pelo Centro de Medicina Nuclear da FMUSP. O leucograma e o hemograma são importantes, visto que pode ocorrer uma redução do número de plaquetas e leucócitos decorrente do tratamento com $^{153}\text{Sm-EDTMP}$.

Esse trabalho foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares sob nº 006/CEP-IPEN/SP em 12 de novembro de 1998 e pela Comissão de Ética para análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da diretoria clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob nº 698/98 de 10 de março de 1999.

Tabela I- Dados individuais dos doadores sadios e dos pacientes com câncer metastático

Grupo	Doador	Idade (anos)	Sexo	Tipo de tumor primário	Peso (kg)	Atividade total injetada (MBq)	Atividade/kg (MBq)	% excretada
Grupo A (sadios)	EMO	25	F	-	50	-	-	-
	RRA	39	F	-	65	-	-	-
	COL	23	F	-	49	-	-	-
	MAPC	41	F	-	56	-	-	-
	PCAP	25	M	-	90	-	-	-
	JEO	35	M	-	58	-	-	-
	MPF	27	M	-	100	-	-	-
	MFS	36	F	-	64	-	-	-
Grupo B (sem tratamento prévio)	JBS	87	M	Próstata	60,0	2220	37,0	33,30
	WG	67	M	Próstata	61,0	2257	37,0	05,14
	JJG	52	M	Próstata	76,0	2960	38,9	24,60
	GN	82	M	Próstata	43,0	2035	47,3	ND
	JCO	66	M	Próstata	61,5	2812	45,7	03,30
	AS	78	M	Próstata	70,0	2886	41,2	11,80
	JJC	76	M	Próstata	49,5	2146	43,4	ND
	PD	57	M	Próstata	55,5	2664	48,0	11,38
Grupo C (com radioterapia)	MV	88	M	Próstata	60,0	2220	37,0	20,72
	JG	65	M	Próstata	40,0	1628	40,7	04,77
	DAV	64	M	Fígado	77,0	2590	33,6	28,57
	ETC	69	M	Próstata	69,0	2960	42,9	16,62
	MJG	64	M	Próstata	60,0	2405	40,1	17,46
	JS	60	M	Próstata	80,0	2775	34,7	12,50
	JPS	76	M	Próstata	68,0	2923	43,0	11,64
	ID	63	M	Próstata	47,0	2116	45,0	18,00
TH	75	F	Ovário	78,0	3238	41,5	ND	
Grupo D (com radio e quimioterapias)	VP	74	F	Mama	62,0	2960	47,7	10,75
	ES	63	F	Mama	38,0	1710	45,0	13,30
	JAT	83	M	Próstata	55,0	3071	55,8	07,00
	SI	50	F	Mama	59,0	2812	47,7	14,86

ND= Não determinado

3.2.- METODOLOGIA

3.2.1.- COLETA DO SANGUE

As amostras sangüíneas foram coletadas por punção venosa em seringas estéreis descartáveis, previamente heparinizadas. O volume coletado foi 5 mL para os ensaios *in vivo* e 10 mL para os ensaios *in vitro*.

3.2.2.- ENSAIO *in vivo*

Para os ensaios *in vivo*, as amostras sangüíneas dos pacientes com e sem tratamento prévio foram coletadas por punção venosa antes e 1 hora após a administração do $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ (atividade média injetada de $42,54 \pm 5,31$ MBq/kg de peso corpóreo) para a análise de aberrações cromossômicas numéricas e estruturais. O tempo de coleta de 1 hora foi escolhido levando-se em consideração o *clearance* sangüíneo relativamente rápido do ^{153}Sm (SINGH *et al.*, 1989).

3.2.3. ENSAIO *in vitro*

3.2.3.1. ELABORAÇÃO DE CURVAS DOSE-RESPOSTA

Para a elaboração de curvas dose-resposta para a indução de aberrações cromossômicas foram utilizadas amostras sangüíneas de todos os indivíduos sadios do grupo A e 4 pacientes do grupo B.

Para tanto, 1 mL de sangue de cada doador e 3 mL de meio de cultura Meio Mínimo de Eagle – MEM⁽¹⁸⁾ (Cultilab) foram submetidos às diferentes concentrações radioativas de ¹⁵³Sm-EDTMP (0,046 a 1,110 MBq/mL), mantidos por 1 hora a 37° C em tubos Falcon de plásticos de fundo cônico com 2 cm de diâmetro e com capacidade para 15 mL. A faixa de atividades de ¹⁵³Sm-EDTMP utilizada para a construção de curvas dose-resposta incluiu àquelas atividades que um *homem referência* com 70 kg de peso corpóreo e com 5.200 mL de sangue (ICRP, 1974) receberia quando da administração endovenosa de ¹⁵³Sm-EDTMP *in vivo* (33 a 56 MBq/kg).

Após 1 hora em contato com o ¹⁵³Sm-EDTMP, todas as amostras sangüíneas foram lavadas 3 vezes por centrifugações (10 minutos a 1500 rpm) com meio MEM para a remoção do ¹⁵³Sm-EDTMP e o sobrenadante foi coletado para análise.

O sobrenadante foi analisado no Cintilador Líquido (Capintec CRC 15R) e após a terceira lavagem, verificou-se que a atividade do ¹⁵³Sm-EDTMP remanescente era desprezível .

O número de amostras sangüíneas dos doadores (grupos A e B) processadas para a análise citogenética para cada concentração radioativa de ¹⁵³Sm-EDTMP variou de 3 a 8, como pode ser visto na figura 1.

⁽¹⁸⁾ MEM – Meio mínimo de Eagle – *minimum Eagle's medium*

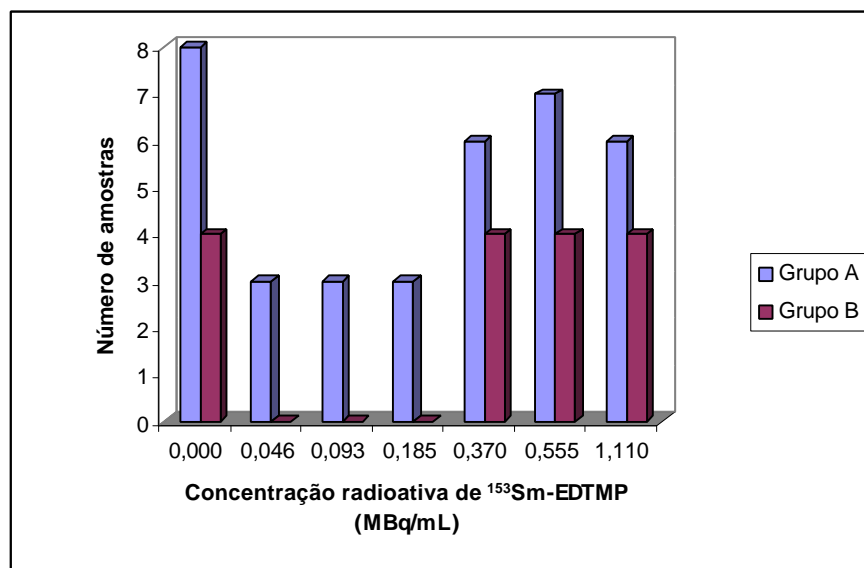


Figura 1. Histograma mostrando o número de amostras sangüneas analisadas para cada concentração radioativa de ¹⁵³Sm-EDTMP nos ensaios *in vitro*.

3.2.3.2. TEMPO DE INCUBAÇÃO COM ¹⁵³Sm-EDTMP

Para a avaliação dos possíveis danos cromossômicos induzidos em função do tempo de incubação com ¹⁵³Sm-EDTMP, amostras sangüneas de um indivíduo sadio do grupo A foram expostas a 4,440 MBq de ¹⁵³Sm-EDTMP (1,110 MBq/mL). Para tanto, 1 mL de sangue total mais 3 mL de meio MEM ficaram em contato com o ¹⁵³Sm-EDTMP por período de 1 a 5 horas a 37° C. A cada hora, uma amostra foi retirada e lavada três vezes por centrifugação (10 minutos a 1500 rpm) com meio MEM para a retirada do sobrenadante. Após esse processo todas as amostras foram cultivadas pela técnica convencional de aberrações cromossômicas (PERRY & WOLFF, 1974).

3.2.3.3. EFEITO DO EDTMP

Para a avaliação de uma possível influência do EDTMP na indução de danos cromossômicos, amostras sanguíneas de dois indivíduos sadios do grupo A foram processadas para a análise citogenética. Para tanto, foram adicionados 200 µL de ¹⁵²Sm-EDTMP (forma não radioativa) à mistura composta de 1 mL de sangue mais 3 mL de meio MEM que corresponderam ao volume utilizado quando da administração de 1,110 MBq/mL de ¹⁵³Sm-EDTMP permanecendo por 1 hora a 37° C. As amostras foram lavadas por três vezes com meio MEM e processadas conforme descrito anteriormente.

3.2.4.- CULTIVO DE LINFÓCITOS PARA OS ENSAIOS *in vivo* E *in vitro*

Cerca de 0,5 mL de sangue total (ensaio *in vivo*) ou suspensão celular (ensaio *in vitro*) de cada doador foi cultivado em meio MEM (Cultilab), suplementado com 20% de soro fetal bovino (Cultilab), 100 µL de fitohemaglutinina (5 µg/mL - PHA-M - Gibco) e 60 µL de BrdU (5-bromo-2'deoxiuridina)⁽¹⁹⁾ (5 µg/mL - Sigma), por 48 h em estufa a 37°C. Após 46 h do início do cultivo foram adicionadas 40 µL de colchicina (0,7 µg/mL - Sigma) para a obtenção de um número maior de metáfases para a análise das aberrações cromossômicas. Após mais 2 horas de cultivo, as células foram hipotonizadas com 0,075 M de KCl⁽²⁰⁾ (Merck) e 1% de Citrato de Sódio (Merck) (3:1), fixadas com metanol e ácido acético (3 : 1) e gotejadas em lâminas histológicas pré-

⁽¹⁹⁾ BrdU - 5-bromo-2'deoxiuridina – *5-bromo-2'deoxy-uridine*

⁽²⁰⁾ KCl – Cloreto de potássio – *Potassium chloride*

aquecidas (65° C) em atmosfera úmida. As lâminas foram coradas com 1 mL de Hoechst 33258 (Sigma) em 200 mL de água destilada (5 µg/mL), cobertas com 0,5 mL de tampão Mc Ilvaine (pH 8,0) e expostas à luz ultra violeta (254 nm) por 20 minutos em placa aquecida a 60°C. Após esse período, as lâminas foram lavadas em água destilada e coradas com 5% de Giemsa (Sigma) em tampão fosfato (pH 6,8).

3.2.5.- ANÁLISE MICROSCÓPICA

Foram analisadas cerca de 14 a 517 metáfases para cada doador no microscópico óptico CARL ZEISS, utilizando objetiva de imersão (100 x). Para a identificação de diferentes tipos de aberrações cromossômicas estruturais foram utilizados os critérios adotados pela IAEA (1986). Somente metáfases contendo número diplóide de até $2n-2$ cromossomos foram consideradas. Foram anotadas células com aberrações cromossômicas estruturais, tipos de alterações estruturais, células nos diferentes ciclos da divisão mitótica e números de cromossomos.

As metáfases foram fotografadas utilizando filmes AGFA - ASA 25 e KODAK COLOR ASA 100.

3.2.6.- CÁLCULO DA DOSE ABSORVIDA DE ^{153}Sm

Para a estimativa de dose absorvida para amostras sanguíneas submetidas às diferentes concentrações radioativas de ^{153}Sm -EDTMP (0,046 a 1,110 MBq/mL) foi utilizado o programa MCNP⁽²¹⁾ (*Monte Carlo N - Particle Transport Code*) versão 4B. Este programa utiliza o método Monte Carlo na execução dos cálculos pela sua grande potencialidade tanto na riqueza de detalhamento do sistema como na confiabilidade dos dados obtidos. É um método estatístico, onde o processo físico de interação da radiação com a matéria é simulado por meio de geração de números aleatórios, ou seja, as situações são geradas e seus eventos são acompanhados simulando-se um experimento. Consequentemente, associado à cada resultado apresentado pelo MCNP, existe uma incerteza estatística que é inversamente proporcional ao número de situações geradas.

A estimativa de dose absorvida foi feita para amostras compostas por 1 mL de sangue e 3 mL de meio de cultura MEM, às quais foram adicionadas a solução de ^{153}Sm -EDTMP, diluídas (1:10 e 1:100 com meio MEM), ou não, em volumes que variaram de 3,5 a 493 μL , de tal forma que se obtivessem as atividades de ^{153}Sm -EDTMP correspondentes a 0,184 a 4,440 MBq. Os cálculos foram realizados, fazendo-se simulações para três vertentes, a saber, tipos de radiação envolvidos e seu espectro de energia, volume final e a composição atômica da amostra. Para abranger toda a faixa de volume da solução de ^{153}Sm com EDTMP

⁽²¹⁾ MCNP – *Monte Carlo N – Particle Transport Code*

adicionado à amostra de sangue em meio de cultura, foram simuladas situações para os volumes de 1, 10, 50, 100 e 500 μL .

Esses cálculos foram realizados pelo Centro de Engenharia Nuclear - Divisão de Física de Reatores pelos pesquisadores Dr. Hélio Yoriyaz, Dr. Paulo de Tarso D. Siqueira e Dr. Paulo Rogério P. Coelho.

3.2.7.- ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas dos dados obtidos foram realizadas com o auxílio do programa SPSS 9.0. As comparações entre os quatro grupos (A, B, C e D) (valores basais) e entre os três grupos (B, C e D) (valores de 1 hora) foram realizadas por análise de variância, seguida do teste de comparações múltiplas (LSD)⁽²²⁾ entre cada dois grupos.

As comparações entre os dados basais e os de 1 hora foram realizadas pelo teste t emparelhado, para cada grupo separadamente.

As curvas dose-resposta obtidas para a indução de aberrações cromossômicas foram ajustadas pelo modelo de regressão linear, segundo a equação,

⁽²²⁾ LSD = Teste estatístico de comparações múltiplas

$$Y=A+BX$$

onde:

Y: número de aberrações cromossômicas por célula

A e B: constantes do modelo

X: concentração radioativa de ^{153}Sm em MBq/mL

A comparação entre as curvas dose-respostas obtidas dos grupos A e B foi realizada pelo teste não paramétrico *Mann Whitney* com intervalo de confiança de 95%. A comparação dos dados obtidos *in vivo* e *in vitro* dos pacientes do grupo B foi feita utilizando o teste t. Ambas as análises foram realizadas com o auxílio do programa de computação *GraphPad Prism*.

4 - RESULTADOS

4.1.- CÉLULAS COM ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS ESTRUTURAIS

Foram analisadas ao todo 14.188 metáfases. Os principais tipos de aberrações cromossômicas estruturais observados em linfócitos sangüíneos periféricos foram os *gaps* e quebras cromatídicos e cromossômicos, fragmentos acêntricos, anéis cêntricos, *double minute* e os dicêntricos. Estes dois últimos foram os mais freqüentes.

A figura 2 mostra os diferentes tipos de aberrações cromossômicas observados em células sangüíneas submetidas ao ^{153}Sm -EDTMP.

Como pode ser visto na tabela II, os pacientes (grupos B, C e D) mostraram valores basais de aberrações cromossômicas mais altos em relação aos indivíduos sadios (grupo A) e, entre os pacientes, os grupos C e D apresentaram freqüências mais altas que a do grupo B, tanto nas amostras basais como nas de 1 hora.

No entanto, a análise estatística (tabela III) mostrou que as diferenças encontradas nos valores basais entre os grupos B e C ($p=0,074$) e entre os grupos B e D ($p=0,173$) bem como entre os grupos C e D ($p=0,942$) não foram significativas. As médias dos grupos C e D foram significativamente mais altas somente em relação ao grupo sadio (grupo A) ($p=0,011$ e $0,054$). O grupo D apresentou valores basais relativamente altos em relação ao grupo A, porém o

valor de p ficou no limiar de significância ($p=0,054$). Por esse motivo, foi realizado, em paralelo, o teste t entre esses dois grupos, onde o valor de t foi 8,85 e o valor de $p < 0,001$, apresentando assim, diferença significativa entre os grupos.

Nas amostras de 1 hora, foi verificado um aumento no número de aberrações cromossômicas por célula nos grupos B e D, permanecendo praticamente com o mesmo valor no grupo C. A análise estatística mostrou que o número de aberrações cromossômicas por célula difere nos 3 grupos quando analisados em conjunto ($p=0,007$).

A análise de comparações múltiplas (LSD) realizada após a análise de variância mostrou que o grupo D apresentou média significativamente maior que os grupos C e B ($p=0,044$ e $p=0,002$, respectivamente). Não houve diferença significativa entre os grupos B e C ($p=0,412$).

Quando os valores basais e os de 1 hora foram comparados para cada grupo separadamente, o teste t emparelhado mostrou que a única diferença significativa encontrada foi no grupo D ($p=0,048$).

Além do número de aberrações cromossômicas por célula, as porcentagem de células com aberrações cromossômicas foram mais altas nos grupos C e D em relação aos grupos de indivíduos sadios (grupo A) e de pacientes sem prévio tratamento (grupo B) tanto nas amostras basais como nas de 1 hora.

Figura 2. Fotomicrografias mostrando metáfases com aberrações: (a) dicêntrico e tricêntrico, (b) *double minute* e fragmento acêntrico, (c) anel cêntrico, (d) gap cromatídico, (e) trirradial, (f) 2ª divisão mitótica

TABELA II: Frequências de aberrações cromossômicas estruturais observadas em linfócitos periféricos dos doadores sadios (grupo A) e dos pacientes com metástases ósseas (grupos B, C e D) analisadas antes e após a administração do $^{153}\text{Sm-EDTMP}$

Grupo	Amostra	Número de células analisadas	Aberrações cromossômicas estruturais						Número de aberrações/célula	Porcentagem de células com aberrações
			Dice.	Anel	Ace.	Dm.	Gap	Queb		
A	Basal	1337	0	0	1	4	0	1	$0,007 \pm 0,010$	$0,4 \pm 0,8$
	1 hora	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	Basal	1181	16	0	6	12	0	7	$0,031 \pm 0,026$	$3,0 \pm 2,5$
	1 hora	1068	37	4	7	11	3	16	$0,054 \pm 0,035$	$5,2 \pm 3,3$
C	Basal	953	28	6	6	29	5	15	$0,098 \pm 0,134$	$7,7 \pm 9,7$
	1 hora	1153	45	0	14	25	4	11	$0,099 \pm 0,067$	$8,8 \pm 5,1$
D	Basal	199	9	1	1	4	2	2	$0,094 \pm 0,024$	$9,0 \pm 2,6$
	1 hora	234	18	0	4	10	3	2	$0,165 \pm 0,019$	$14,8 \pm 3,1$

Dice= Dicêntrico; Anel= Anel cêntrico e acêntrico; Ace= Fragmento acêntrico; Dm= *Double minute*; Gap= *Gap* cromossômico ou cromatídico; Queb= Quebras cromossômicas ou cromatídicas

TABELA III– Análises estatísticas dos dados obtidos antes e após a administração do ¹⁵³Sm-EDTMP nos 4 grupos de doadores

Parâmetro	Grupos	Amostras		Teste de comparações múltiplas		Teste t emparelhado
		Basal	1 hora	Basal	1 hora	Basal X 1 hora
Frequência de aberrações/célula	A	0,008 ± 0,011	-	A x B (p=0,502)		B (p=0,101)
	B	0,031 ± 0,026	0,054 ± 0,035	A < C (p=0,011) *		C (p=0,953)
	C	0,098 ± 0,134	0,099 ± 0,067	A < D (p=0,054) *		D (p=0,048) *
	D	0,094 ± 0,029	0,165 ± 0,019	B x C (p=0,074)	B x C (p=0,078)	
Porcentagem hipomodal de cromossomos	A	5,37 ± 4,49	-	B x D (p=0,173)		
	B	8,02 ± 7,39	5,82 ± 5,46	C x D (p=0,942)		C < D (p=0,044) *
	C	9,90 ± 8,24	9,17 ± 8,52	A x B (p=0,410)		B (p=0,378)
	D	11,12 ± 7,57	7,13 ± 7,02	A x C (p=0,151)		C (p=0,742)
Porcentagem de células em 2° e 3° ciclo celular	A	4,55 ± 7,80	-	A x D (p=0,160)		D (p=0,232)
	B	1,68 ± 2,09	0,93 ± 1,30	B x C (p=0,575)		B x C (p=0,354)
	C	3,70 ± 4,23	3,25 ± 4,15	B x D (p=0,464)		B x D (p=0,771)
	D	5,24 ± 4,97	12,00 ± 12,01	C x D (p=0,768)		C x D (p=0,645)

* significativo (p<0,05)

4.2. -CÉLULAS COM NÚMERO MODAL E HIPOMODAL DE CROMOSSOMOS

Com o intuito de averiguar uma possível interferência do tratamento com $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ no número de cromossomos das células (aberração cromossômica numérica) foi levado em consideração a frequência de metáfases com número modal e hipomodal de centrômeros (tabela IV).

Em amostras basais, os pacientes (grupos B, C e D) mostraram as porcentagens de células com número hipomodal de cromossomos mais altas em relação aos indivíduos saudáveis.

Porém, a análise de comparações múltiplas (LSD) realizada após a análise de variância mostrou que não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados, tanto nos valores basais ($p=0,383$) como nos de 1 hora ($p=0,639$) bem como entre basais e 1 hora para cada um dos grupos B, C e D ($p>0,05$).

TABELA IV: Freqüências de células com número modal e hipomodal de cromossomos e nos diferentes ciclos mitóticos observadas em linfócitos periféricos de doadores sadios (grupo A) e de pacientes com metástases ósseas (grupos B, C e D), antes e após a administração do $^{153}\text{Sm-EDTMP}$

Grupo	Amostra	Número de células analisadas	Número de cromossomos(%)		Ciclo Celular (%)	
			46	44 e 45	1ª divisão	2ª e 3ª divisões
A	Basal	1337	95,0 ± 4,1	5,0 ± 4,1	94,1 ± 8,9	5,9 ± 8,9
	1 hora	-	-	-	-	-
B	Basal	1181	92,0 ± 7,4	8,0 ± 7,4	98,3 ± 2,1	1,7 ± 2,1
	1 hora	1068	94,2 ± 5,5	5,8 ± 5,5	99,1 ± 1,3	0,9 ± 1,3
C	Basal	953	90,1 ± 8,2	9,9 ± 8,2	96,3 ± 4,2	3,8 ± 4,3
	1 hora	1153	90,8 ± 8,5	9,2 ± 8,5	96,7 ± 4,2	3,3 ± 4,2
D	Basal	199	88,9 ± 7,6	11,1 ± 7,6	94,8 ± 7,0	5,2 ± 5,0
	1 hora	234	92,9 ± 7,0	7,1 ± 7,0	88,0 ± 1,2	12,0 ± 1,2

4.3.- CÉLULAS NOS DIFERENTES CICLOS MITÓTICOS

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa nos valores basais dos 4 grupos ($p= 0,655$) (tabela IV). No entanto, nas amostras de 1 hora, os 3 grupos diferiram significativamente ($p=0,017$) quando analisados conjuntamente. A análise de comparações múltiplas (LSD) realizada após a análise de variância mostrou que o grupo D apresentou uma média significativamente mais alta que as dos grupos B ($p=0,005$) e grupo C ($p=0,020$) que não diferiram entre si ($p=0,421$). Pode-se observar que o grupo D apresentou “aparentemente”, uma cinética celular mais acelerada após o tratamento com $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ em relação aos outros grupos de pacientes. O teste t emparelhado mostrou que não houve diferença significativa entre os valores basais e 1 hora, nos 3 grupos ($p>0,05$).

As tabelas V, VI e VII apresentam valores individuais dos pacientes dos grupos B, C e D, respectivamente, quanto à frequência de aberrações cromossômicas estruturais, número modal e hipomodal de cromossomos e células nos diferentes ciclos mitóticos, antes e após a administração do $^{153}\text{Sm-EDTMP}$.

TABELA V : Dados individuais referentes às freqüências de aberrações cromossômicas estruturais, números modais de cromossomos e linfócitos nos diferentes ciclos mitóticos obtidos de pacientes sem prévio tratamento (grupo B), antes e após a administração do $^{153}\text{Sm-EDTMP}$

Doador	Amostra	Número de células analisadas	Dice.	Anel	Ace.	Dm.	Gap	Queb	células com 46 centrômeros	células com 44 e 45 centrômeros	células na 1ª divisão mitótica	células na 2ª e 3ª divisão mitótica
JBS	Basal	517	7	0	4	6	0	0	517	0	517	0
	1 hora	185	12	2	2	0	1	0	185	0	185	0
WG	Basal	116	1	0	0	0	0	1	116	0	116	0
	1 hora	274	7	2	0	0	1	3	274	0	274	0
JJG	Basal	183	3	0	1	2	0	5	180	3	179	4
	1 hora	318	12	0	4	8	0	11	301	17	309	9
GN	Basal	106	0	0	0	0	0	0	89	17	106	0
	1 hora	72	2	0	0	1	0	0	65	7	72	0
JCO	Basal	129	3	0	0	2	0	1	110	19	123	6
	1 hora	14	0	0	0	0	0	0	14	0	14	0
AS	Basal	58	1	0	1	2	0	0	56	2	57	1
	1 hora	89	3	0	1	1	0	1	80	9	87	2
JJC	Basal	41	1	0	0	0	0	0	36	5	39	2
	1 hora	42	1	0	0	1	0	0	39	3	41	1
PD	Basal	31	0	0	0	0	0	0	26	5	31	0
	1 hora	84	0	0	0	0	1	1	72	12	84	0

Dice= Dicêntrico; Anel= Anel cêntrico e acêntrico; Ace= Fragmento acêntrico; Dm= *Double minute*; Gap= *Gap* cromossômico ou cromatídico; Queb= Quebras cromossômicas ou cromatídicas

TABELA VI : Dados individuais referentes às freqüências de aberrações cromossômicas estruturais, números modais de cromossomos e linfócitos nos diferentes ciclos mitóticos obtidos de pacientes submetidos a radioterapia (grupo C) analisadas antes e após a administração do ¹⁵³Sm-EDTMP

Doador	Amostra	Número de células analisadas	Dice.	Anel	Ace.	Dm.	Gap	Queb	células com 46 centrômeros	células com 44 e 45 centrômeros	células na 1ª divisão mitótica	Células na 2ª e 3ª divisão mitótica
MV	Basal	300	1	1	0	1	0	8	300	0	300	0
	1 hora	410	13	0	0	1	2	7	410	0	410	0
JG	Basal	220	11	2	1	13	0	2	211	9	194	26
	1 hora	180	7	0	4	4	2	0	174	6	158	22
DAV	Basal	22	0	0	0	0	0	0	19	3	22	0
	1 hora	15	1	0	0	0	0	0	15	0	15	0
ETC	Basal	33	0	0	0	0	0	1	32	1	31	2
	1 hora	89	1	0	0	1	0	3	82	7	89	0
MJG	Basal	54	8	1	3	8	2	1	51	3	51	3
	1 hora	69	7	0	3	7	0	1	65	4	64	5
JS	Basal	112	6	2	1	6	2	1	106	6	109	3
	1 hora	136	4	0	3	5	0	0	123	13	132	4
JPS	Basal	83	1	0	1	0	0	1	72	11	77	6
	1 hora	81	5	0	0	1	0	0	69	12	80	1
ID	Basal	43	0	0	0	0	0	1	34	9	43	0
	1 hora	90	3	0	0	2	0	0	66	24	86	4
TH	Basal	86	1	0	0	1	1	0	66	20	86	0
	1 hora	83	4	0	4	4	0	0	71	12	82	1

Dice= Dicêntrico; Anel= Anel cêntrico e acêntrico; Ace= Fragmento acêntrico; Dm= *Double minute*; Gap= *Gap* cromossômico ou cromatídico; Queb= Quebras cromossômicas ou cromatídicas

TABELA VII : Dados individuais referentes às frequências de aberrações cromossômicas estruturais, números modais de cromossomos e linfócitos nos diferentes ciclos mitóticos obtidos de pacientes submetidos a radioterapia e quimioterapia (grupo D) analisadas antes e após a administração do ¹⁵³Sm-EDTMP

Doador	Amostra	Número de células analisadas	Dice.	Anel	Ace.	Dm.	Gap	Queb	células com 46 centrômeros	células com 44 e 45 centrômeros	células na 1ª divisão mitótica	células na 2ª e 3ª divisão mitótica
VP	Basal	32	1	0	1	0	0	1	30	2	32	0
	1 hora	26	0	0	2	0	1	1	25	1	26	0
ES	Basal	27	2	0	0	1	0	0	26	1	26	1
	1 hora	45	5	0	0	3	0	0	43	2	38	7
JAT	Basal	56	0	0	0	1	2	0	48	8	53	3
	1 hora	38	3	0	1	1	2	0	37	1	36	2
SI	Basal	84	6	1	0	2	0	1	67	17	74	10
	1 hora	125	10	0	1	6	0	1	103	22	91	34

Dice= Dicêntrico; Anel= Anel cêntrico e acêntrico; Ace= Fragmento acêntrico; Dm= *Double minute*; Gap= *Gap* cromossômico ou cromatídico; Queb= Quebras cromossômicas ou cromatídicas

4.4. -TEMPO DE INCUBAÇÃO COM $^{153}\text{Sm-EDTMP}$

Para a avaliação dos possíveis danos cromossômicos induzidos em linfócitos sanguíneos em função do tempo de incubação com $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ realizou-se um experimento utilizando amostra sanguínea de um doador sadio do grupo A que permaneceu em contato com 4,440 MBq de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ por um período de 1 a 5 horas.

Como pode ser visto na figura 3, a frequência de aberrações cromossômicas aumentou gradativamente até o tempo de 3 horas e nas horas seguintes houve uma redução no número de aberrações cromossômicas por célula.

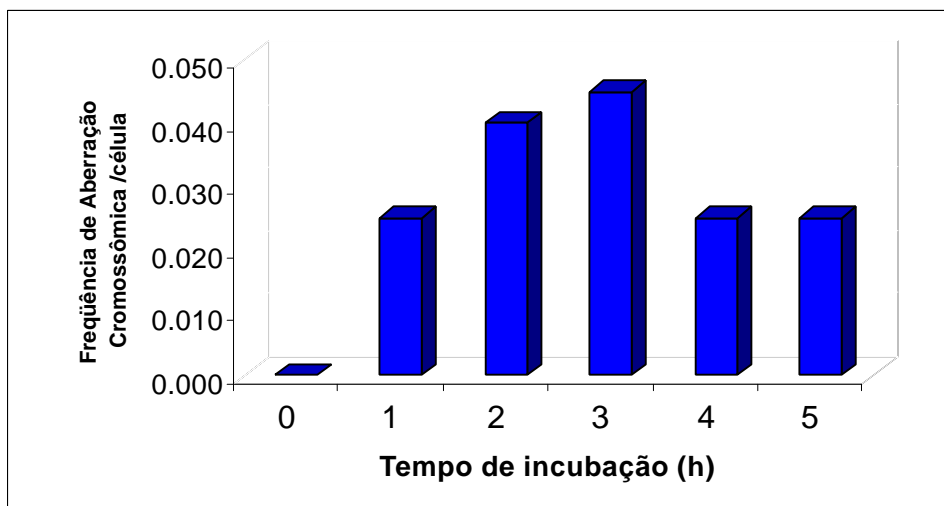


Figura 3. Histograma mostrando as frequências de aberrações cromossômicas encontradas em amostras sanguíneas em função do tempo de incubação com $^{153}\text{Sm-EDTMP}$

4.5.- EFEITO DO EDTMP

Para a avaliação da influência do EDTMP nos cromossomos foram analisadas amostras sanguíneas de dois indivíduos sadios do grupo A submetidas ao ^{152}Sm -EDTMP (forma não radioativa). Como pode ser visto na tabela VIII, não houve diferença na quantidade de danos cromossômicos antes e após o tratamento com EDTMP, o que significa que a molécula carreadora não teve qualquer ação clastogênica sobre os cromossomos.

TABELA VIII: Frequências de aberrações cromossômicas estruturais observadas em linfócitos periféricos de doadores sadios (grupo A) com e sem $^{152}\text{Sm-EDTMP}$

Doador	Amostra	Número de células analisadas	Aberrações cromossômicas estruturais						Número de aberrações/célula	Porcentagem de células com aberrações
			Dice.	Anel	Ace.	Dm.	Gap	Queb		
1	Sem EDTMP	200	0	0	0	1	1	0	0,010	1,00
	Com EDTMP	189	0	0	1	1	0	0	0,011	1,06
2	Sem EDTMP	200	0	0	0	1	0	1	0,010	1,00
	Com EDTMP	192	0	0	0	0	0	3	0,016	1,56
Média	Sem EDTMP	400	0	0	0	2	1	1	0,010 \pm 0,000	1,00 \pm 0,00
	Com EDTMP	381	0	0	1	1	0	3	0,013 \pm 0,004	1,31 \pm 0,36

Dice= Dicêntrico; Anel= Anel cêntrico e acêntrico; Ace= Fragmento acêntrico; Dm= *Double minute*; Gap= *Gap* cromossômico ou cromatídico; Queb= Quebras cromossômicas ou cromatídicas

4.6.- ESTIMATIVA DE DOSE

A tabela IX sintetiza os resultados obtidos referentes às doses absorvidas recebidas pela amostra (1 mL de sangue mais 3 mL de meio MEM mais solução A composta por ^{153}Sm + EDTMP + solução tampão fosfato) e a quantidade de energia depositada ao sistema para diferentes volumes da solução A.

Tabela IX: Estimativa de doses absorvidas recebidas pela amostra composta por 1 mL de sangue mais 3 mL de meio MEM em função do volume da solução A (^{153}Sm + EDTMP + solução tampão fosfato) acrescido ao sistema

Volume adicionado (μL)	Energia depositada (keV/Bq.s)	Dose (Gy/Bq.s)	Dose integrada em 1 hora (Gy/3,7. 10^{-2} MBq)	Incerteza Relativa (%)
1	259,717	$1,0641 \times 10^{-11}$	$1,3441 \times 10^{-3}$	$1,7 \times 10^{-3}$
10	259,732	$1,0615 \times 10^{-11}$	$1,3412 \times 10^{-3}$	$1,7 \times 10^{-3}$
50	259,759	$1,0511 \times 10^{-11}$	$1,3281 \times 10^{-3}$	$1,7 \times 10^{-3}$
100	259,770	$1,0383 \times 10^{-11}$	$1,3119 \times 10^{-3}$	$1,7 \times 10^{-3}$
500	260,095	$9,4726 \times 10^{-12}$	$1,1968 \times 10^{-3}$	$1,7 \times 10^{-3}$

Pode-se verificar que a energia depositada na solução final (260 keV/Bq.seg.) não dependeu dos volumes da solução A adicionados à amostra. As doses, contudo, apresentaram variações entre $1,06 \times 10^{-11}$ a $0,95 \times 10^{-11}$ Gy/Bq.seg. decorrentes da adição de massa à amostra.

A tabela X mostra a correlação entre a dose absorvida estimada e a atividade de ^{153}Sm -EDTMP em amostras sanguíneas expostas *in vitro* após 1 hora.

Tabela X: Correlação entre a atividade e a dose absorvida de ^{153}Sm em 1 hora.

Concentração radioativa de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ (MBq/mL)	Atividade de ^{153}Sm em 4 mL da solução (MBq)	Dose absorvida em 1 hora (Gy)
0,046	0,184	0,007
0,093	0,372	0,013
0,185	0,740	0,027
0,370	1,480	0,053
0,555	2,220	0,079
1,110	4,440	0,157

4.7.- CURVAS DOSE-RESPOSTA

As tabelas XI e XII mostram as freqüências de aberrações cromossômicas encontradas em linfócitos periféricos de pacientes com câncer sem tratamento prévio (grupo B) e de indivíduos sadios (grupo A), respectivamente, em função da concentração radioativa de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ *in vitro*. Pode-se observar que houve uma tendência ao aumento no número de células contendo aberrações cromossômicas estruturais bem como no número de aberrações cromossômicas por célula em função da concentração radioativa de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ nos 2 grupos.

O modelo que melhor se ajustou aos dados obtidos foi o de regressão linear tanto para o grupo A como para o grupo B.

$$\text{Grupo A: } Y = 2,06 \pm 0,70 \times 10^{-2} + 6,34 \pm 1,30 \times 10^{-2} X \quad (r^2 = 0,4113)$$

$$\text{Grupo B: } Y = 3,52 \pm 2,24 \times 10^{-2} + 11,15 \pm 3,46 \times 10^{-2} X \quad (r^2 = 0,4257)$$

A representação gráfica da relação dose-resposta para a indução de aberrações cromossômicas está ilustrada na figura 4. Os pacientes com câncer responderam mais acentuadamente à ação do $^{153}\text{Sm-EDTMP}$, apresentando mais danos cromossômicos que os indivíduos sadios (4a). O teste de comparação entre as duas retas obtidas pelo modelo de regressão linear mostrou que elas diferem significativamente entre si ($p < 0,001$). Na figura 4b, pode-se observar a frequência de aberrações cromossômicas por célula em linfócitos dos indivíduos do grupo A em função da concentração radioativa de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$. Na figura 4c pode-se observar a distribuição de valores individuais dos pacientes do grupo B na curva dose-resposta, obtidos 1 hora após a administração de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$. Para a comparação da incidência de aberrações cromossômicas em linfócitos periféricos irradiados *in vivo* e *in vitro* com $^{153}\text{Sm-EDTMP}$, levou-se em consideração a atividade média de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ injetada ($42,54 \pm 5,31$ MBq/kg) e estimou-se a concentração radioativa ($0,572$ MBq/mL) baseando-se em um homem referência de 70 kg e com $5,2$ L de sangue (ICRP, 1974). O dano citogenético observado em células expostas *in vivo* ($0,054 \pm 0,035$) pode ser considerado equivalente ao dano induzido com $0,170$ MBq/mL de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ *in vitro*. Analogamente, a frequência de aberrações cromossômicas calculada segundo o modelo de regressão linear ($0,101 \pm 0,042$) foi cerca de 2 vezes maior do que o obtido *in vivo*, correspondendo à uma dose estimada de $0,082$ Gy. A análise estatística mostrou que há diferença significativa entre os valores obtidos *in vivo* e *in vitro* ($p = 0,019$).

As tabelas XIII e XIV apresentam os valores individuais referentes às frequências de aberrações estruturais encontradas em amostras sangüíneas de

doadores sadios e de pacientes do grupo B, respectivamente, em função da concentração radioativa de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ *in vitro*.

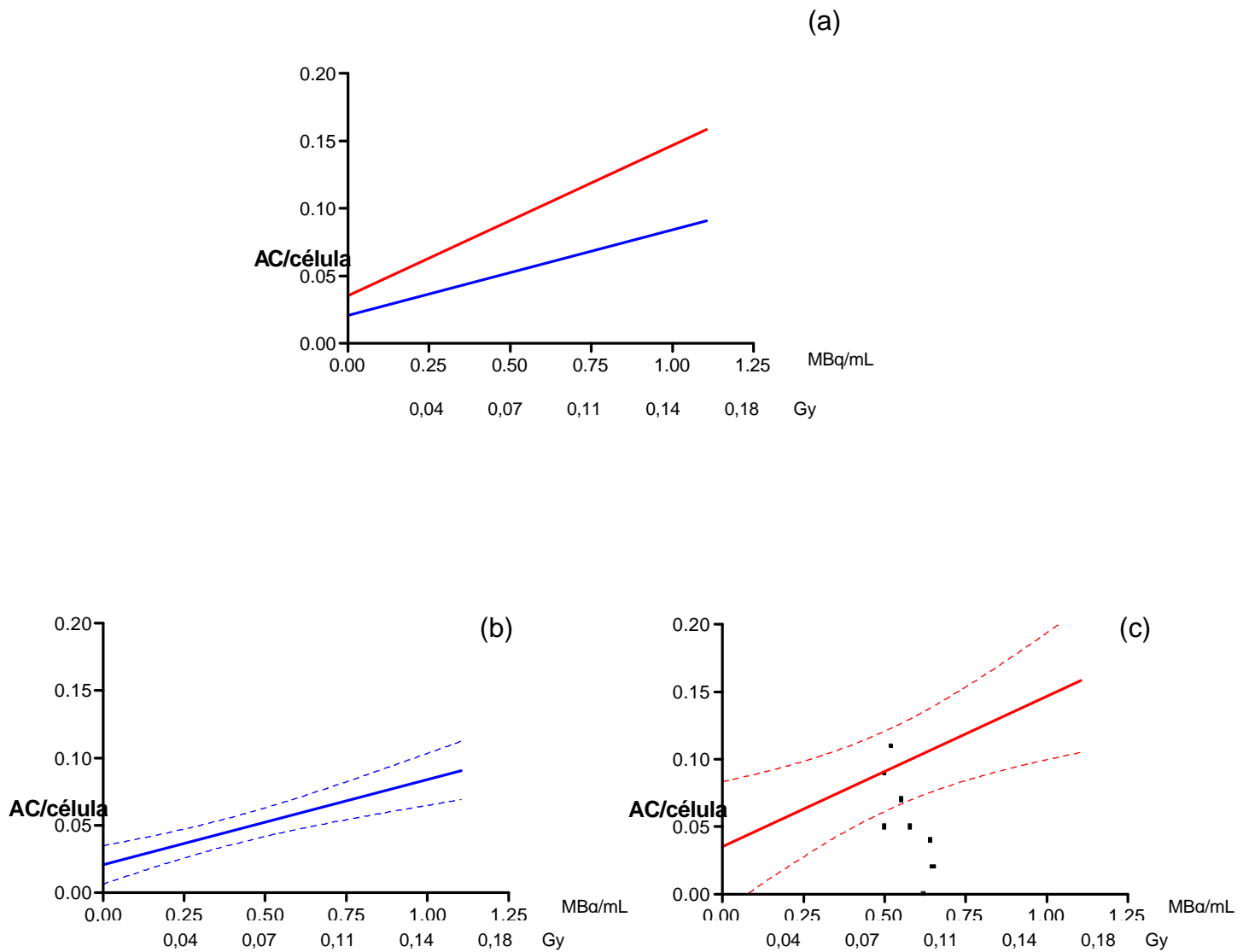


Figura 4. (a) Curvas dose-resposta para indução de aberrações cromossômicas ajustadas pelo modelo de regressão linear obtidas de amostras sanguíneas de doadores sadios (—) e de pacientes com câncer (—), expostas a diversas concentrações radioativas de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ *in vitro*. (b) Curva dose-resposta obtida de indivíduos sadios com 95% de intervalo de confiança. (c) Curva dose-resposta obtida de pacientes com câncer com 95% de intervalo de confiança mostrando dados individuais

TABELA XI : Freqüências de aberrações cromossômicas estruturais observadas em linfócitos periféricos de pacientes com metástases ósseas (grupo B) expostos a diferentes concentrações radioativas de ¹⁵³Sm-EDTMP

Concentrações Radioativas (MBq/mL)	Número de células analisadas	Aberrações cromossômicas estruturais						Número de aberrações/célula	Porcentagem de células com aberrações
		Dice.	Anel	Ace.	Dm.	Gap	Queb		
0	837	10	0	5	8	0	5	0,023 ± 0,029	2,1 ± 2,6
0,370	358	13	0	3	6	7	2	0,082 ± 0,056	7,3 ± 4,3
0,555	393	19	0	5	13	7	4	0,113 ± 0,053	10,5 ± 4,6
1,110	249	10	0	4	8	6	6	0,149 ± 0,082	13,9 ± 6,6

Dice= Dicêntrico; Anel= Anel cêntrico e acêntrico; Ace= Fragmento acêntrico; Dm= *Double minute*; Gap= *Gap* cromossômico ou cromatídico; Queb= Quebras cromossômicas ou cromatídicas

TABELA XII : Freqüências de aberrações cromossômicas estruturais observadas em linfócitos periféricos de doadores sadios (grupo A) expostos a diferentes concentrações radioativas de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$

Concentrações Radioativas (MBq/mL)	Número de células analisadas	Aberrações cromossômicas estruturais						Número de aberrações/célula	Porcentagem de células com aberrações
		Dice.	Anel	Ace.	Dm.	Gap	Queb		
0	1337	0	0	1	4	0	1	0,007 ± 0,010	0,4 ± 0,8
0,046	414	4	0	0	5	0	1	0,018 ± 0,018	1,8 ± 1,7
0,093	384	7	0	1	4	4	3	0,043 ± 0,027	4,3 ± 2,7
0,185	356	5	0	2	2	1	3	0,044 ± 0,008	4,1 ± 1,2
0,370	1095	16	0	2	14	10	5	0,045 ± 0,033	3,9 ± 3,0
0,555	1055	20	2	11	25	14	9	0,080 ± 0,042	7,8 ± 4,2
1,110	1046	26	1	6	26	10	13	0,077 ± 0,027	7,5 ± 2,6

Dice= Dicêntrico; Anel= Anel cêntrico e acêntrico; Ace= Fragmento acêntrico; Dm= *Double minute*; Gap= *Gap* cromossômico ou cromatídico; Queb= Quebras cromossômicas ou cromatídicas

Tabela XIII: Dados individuais referentes às freqüências de diferentes tipos de aberrações cromossômicas estruturais, observados em linfócitos periféricos de doadores sadios (grupo A) expostos a diferentes concentrações radioativas de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ *in vitro*.

Doador	Concentração Radioativa (MBq/mL)	Número de células analisadas	Dice.	Anel	Ace.	Dm.	Gap	Queb
EMO	Basal	132	0	0	1	2	0	0
	0,046	-	-	-	-	-	-	-
	0,093	-	-	-	-	-	-	-
	0,185	-	-	-	-	-	-	-
	0,370	152	2	0	0	0	3	1
	0,555	201	4	0	2	16	0	3
	1,110	300	7	0	2	8	5	4
RRA	Basal	266	0	0	0	1	0	1
	0,046	-	-	-	-	-	-	-
	0,093	-	-	-	-	-	-	-
	0,185	-	-	-	-	-	-	-
	0,370	197	4	0	1	3	2	0
	0,555	76	3	0	3	1	3	1
	1,110	203	8	1	2	5	1	2
COL	Basal	132	0	0	0	0	0	0
	0,046	-	-	-	-	-	-	-
	0,093	-	-	-	-	-	-	-
	0,185	-	-	-	-	-	-	-
	0,370	211	7	0	0	9	1	2
	0,555	171	3	0	0	2	4	1
	1,110	140	5	0	0	4	2	1
MAPC	Basal	115	0	0	0	0	0	0
	0,046	-	-	-	-	-	-	-
	0,093	-	-	-	-	-	-	-
	0,185	-	-	-	-	-	-	-
	0,370	119	0	0	0	0	0	0
	0,555	119	1	0	0	0	0	2
	1,110	154	1	0	0	2	0	1

Continuação da tabela XIII

PCAP	Basal	268	0	0	0	0	0	0	0
	0,046	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,093	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,185	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,370	292	1	0	1	1	0	2	
	0,555	147	4	1	0	1	0	1	
	1,110	127	3	0	0	2	2	2	
JEO	Basal	124	0	0	0	1	0	0	
	0,046	148	1	0	0	2	0	0	
	0,093	81	0	0	0	1	0	0	
	0,185	100	2	0	0	0	1	1	
	0,370	124	2	0	0	1	4	0	
	0,555	-	-	-	-	-	-	-	
	1,110	-	-	-	-	-	-	-	
MPF	Basal	100	0	0	0	0	0	0	
	0,046	66	0	0	0	0	0	0	
	0,093	103	2	0	0	1	2	1	
	0,185	56	1	0	0	1	0	1	
	0,370	-	-	-	-	-	-	-	
	0,555	141	4	1	1	2	4	0	
	1,110	-	-	-	-	-	-	-	
MFS	Basal	200	0	0	0	0	0	0	
	0,046	200	3	0	0	3	0	1	
	0,093	200	5	0	1	2	2	2	
	0,185	200	2	0	2	1	0	1	
	0,370	-	-	-	-	-	-	-	
	0,555	200	1	0	5	3	3	1	
	1,110	122	2	0	2	5	0	3	

Dice= Dicêntrico; Anel= Anel cêntrico e acêntrico; Ace= Fragmento acêntrico; Dm= *Double minute*; Gap= *Gap* cromossômico ou cromatídico; Queb= Quebras cromossômicas ou cromatídicas

Tabela XIV : Dados individuais referentes às freqüências de diferentes tipos de aberrações cromossômicas estruturais, observados em linfócitos periféricos de pacientes com metástases ósseas sem prévio tratamento (grupo B) expostos a diferentes concentrações radioativas de ¹⁵³Sm-EDTMP

Doador	Concentração Radioativa (MBq/mL)	Número de células analisadas	Dice.	Anel	Ace.	Dm.	Gap	Queb
JBS	Basal	517	7	0	4	6	0	0
	0,370	134	7	0	0	0	0	0
	0,555	153	12	0	4	0	2	0
	1,110	24	3	0	0	1	2	1
JJG	Basal	183	3	0	1	2	0	5
	0,370	102	5	0	3	6	3	0
	0,555	123	5	0	0	9	3	2
	1,110	94	7	0	2	5	2	1
GN	Basal	106	0	0	0	0	0	0
	0,370	81	1	0	0	0	3	1
	0,555	54	1	0	0	0	1	0
	1,110	57	0	0	2	0	1	1
PD	Basal	31	0	0	0	0	0	0
	0,370	41	0	0	0	0	1	1
	0,555	63	1	0	1	4	1	2
	1,110	74	0	0	0	2	2	3

Dice= Dicêntrico; Anel= Anel cêntrico e acêntrico; Ace= Fragmento acêntrico; Dm= *Double minute*; Gap= *Gap* cromossômico ou cromatídico; Queb= Quebras cromossômicas ou cromatídicas

5 - DISCUSSÃO

Nos últimos anos, uma atenção especial tem sido dada sobre a utilização de radionuclídeos emissores beta como uma modalidade de radioterapia interna no alívio da dor óssea metastática. O acúmulo preferencial de radiofármacos nos sítios de lesão metastática aponta uma vantagem significativa no sentido de limitar a dose aos tecidos/órgãos alvos, minimizando a exposição de tecidos circunvizinhos saudáveis.

No presente trabalho foram analisados os efeitos citogenéticos do ^{153}Sm -EDTMP em células sanguíneas de pacientes com câncer metastático, tanto *in vivo* como *in vitro*, utilizando a técnica convencional de aberrações cromossômicas.

As aberrações estruturais observadas em linfócitos periféricos dos pacientes foram essencialmente do tipo cromossômico, incluindo *gaps* e quebras, fragmentos acêntricos, anéis, *double minute* e os dicêntricos. Os mesmos tipos de alterações cromossômicas foram encontrados por O'DUFFY e colaboradores (1999) em pacientes submetidos à sinovectomia com ^{153}Sm -PHYP e também por outros autores para partículas alfa (PURROT *et al.*, 1980; BAUCHINGER *et al.*, 1997), beta (LLOYD *et al.*, 1986; TANAKA *et al.*, 1994; O'DUFFY *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2001), nêutrons (GOOCH *et al.*, 1964; POHL-RÜLING *et al.*, 1986; TANAKA *et al.*, 1999), raios X (LLOYD *et al.*, 1992; DURANTE *et al.*, 1995; BARQUINERO *et al.*, 1997) e gama (LLOYD *et al.*, 1975; BAUCHINGER *et al.*, 1993; KOKSAL *et al.*, 1995).

A análise citogenética de amostras sanguíneas submetidas à ação de EDTMP mostrou que a molécula carreadora não teve qualquer ação clastogênica sobre os cromossomos.

Os valores basais mais altos encontrados nos pacientes dos grupos C e D em relação aos indivíduos saudáveis (grupo A) podem ser explicados como consequência dos tratamentos prévios quimio e radioterápico submetidos antes da administração do ^{153}Sm -EDTMP.

Em relação ao grupo B que não recebeu quaisquer tratamentos antes da terapia com ^{153}Sm -EDTMP, a taxa basal de aberrações cromossômicas foi mais elevada ($0,031 \pm 0,026$) que a dos doadores saudáveis ($0,007 \pm 0,010$), embora estatisticamente essa diferença não seja significativa. A presença de dicêntricos em células de indivíduos aparentemente sem tratamento prévio pode ser decorrente de uma exposição a algum tipo de mutagênico, capaz de induzir esse tipo de aberração cromossômica (VENKATACHALAN *et al.*, 1999). Uma outra hipótese poderia ser atribuída a uma maior fragilidade genômica dos pacientes em relação aos indivíduos saudáveis.

A instabilidade genômica pode ser expressa em nível celular pela alta taxa de quebras cromossômicas espontâneas ou pelo aumento da sensibilidade à ação de vários agentes genotóxicos, tanto endógenos como exógenos (MOTHERSILL & SEYMOUR, 1998; DHILLON & DHILLON, 1998; NAKANISHI *et al.*, 1999; JAGETIA *et al.*, 2001). Uma íntima relação entre as quebras cromossômicas e a predisposição genética ao câncer tem sido verificada nas

síndromes de instabilidade cromossômica como a ataxia telangiectasia, anemia de Falconi e síndrome de Bloom (DHILLON & DHILLON, 1998; RIBAS *et al.*, 1999). Vários autores (SUGIMURA, 1992; KONIG *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 2000) observaram uma maior fragilidade cromossômica em indivíduos portadores de vários tipos de câncer em relação aos indivíduos saudáveis, embora outros autores (GIL *et al.*, 2000) não tenham encontrado diferença significativa entre os 2 grupos.

Um outro fator que deve ser levado em consideração, além do estado de malignidade do tumor e a variabilidade interindividual é a idade mais avançada dos pacientes (idade média de 70 anos) em relação aos doadores saudáveis (idade média de 31 anos).

Segundo alguns dados da literatura, a frequência espontânea de aberrações cromossômicas estruturais pode aumentar em função da idade dos doadores em ambos os sexos (HALL & WELL, 1988; GANGULY, 1993; HANDO *et al.*, 1994; MILL *et al.*, 1996; JOHNSON *et al.*, 1999). Por outro lado, outros autores não verificaram qualquer associação entre a idade e o nível de danos cromossômicos espontâneos (BENDER *et al.*, 1989; BAUCHINGER, 1995; DUFFAUD *et al.*, 1997; JAGETIA *et al.*, 2001).

Verificou-se que somente o grupo D mostrou um aumento significativo na frequência de aberrações 1 hora após a administração do $^{153}\text{Sm-EDTMP}$. Esse resultado pode ser interpretado, em parte, como decorrência de uma maior fragilidade cromossômica desses pacientes (grupo D) ocasionada pelos tratamentos prévios, respondendo com maior intensidade à ação do $^{153}\text{Sm-}$

EDTMP em relação a outros grupos de pacientes (grupos B e C). Cabe mencionar que, uma paciente (SI) do grupo apresentou uma quantidade relativamente grande de danos cromossômicos (10 dicêntricos) o que elevou a média do grupo. A paciente foi submetida aos sucessivos tratamentos de radio e quimioterapia e ao ^{153}Sm -EDTMP, o que provavelmente resultou em uma maior vulnerabilidade das células frente à ação dos genotóxicos.

Os resultados obtidos podem ser atribuídos também ao número de amostragem relativamente pequeno ($n=4$) em relação à outros grupos de indivíduos. Esse fato pode ser explicado pela baixa atividade mitótica dos linfócitos dos pacientes, principalmente dos que receberam duplos tratamentos, quimio e radioterapia. As drogas antineoplásicas administradas nos pacientes, que interferem na síntese e na replicação do DNA (doxorubicina, metotrexato, 5-fluorouracila, ciclofosfamida), provavelmente refletiram no baixo índice mitótico das células sanguíneas dos pacientes (GEBHART *et al.*, 1980). Uma fragilidade dos linfócitos ocasionada pelos tratamentos pode induzir uma redução na capacidade para responder à estimulação pela fitohemaglutinina ou propiciar a morte celular seletiva (RIGAUD *et al.*, 1990).

Experimentos realizados com diferentes tempos de incubação com ^{153}Sm -EDTMP (1 a 5 horas) mostraram que o tempo de 1 hora pode ser considerado adequado para a avaliação dos níveis de danos cromossômicos induzidos pelo tratamento. Um aumento inicial e gradual no número de células contendo aberrações cromossômicas foi acompanhado por uma queda nos tempos subseqüentes de incubação, estabilizando-se no mesmo nível do de 1 hora.

Segundo FENECH e colaboradores (1990), o declínio observado no número de células contendo danos citogenéticos pode ser decorrente, em parte, da morte celular, da substituição pelos linfócitos não danificados e possivelmente, do reparo do dano induzido. SHOU-PENG e colaboradores (1997) mostraram por meio da microscopia eletrônica que o $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ (0,37 MBq/mL) pode induzir apoptose em células tumorais ósseas de ratos. A indução de apoptose por agentes genotóxicos em linfócitos humanos tem sido documentada tanto *in vivo* como *in vitro* (BOREHAM *et al.*, 1996; BLANK *et al.*, 1997).

Outros autores também observaram uma diminuição gradual na frequência de células que carregam danos citogenéticos (micronúcleos, aberrações cromossômicas) após a terapia com radiofármacos em linfócitos periféricos. WATANABE e colaboradores (1998) reportaram que 2 meses após a terapia com $^{89}\text{SrCl}$ (111 MBq) em pacientes com câncer metastático, a frequência de células contendo micronúcleos voltou praticamente ao nível basal, sugerindo que o dano citológico observado em linfócitos expostos ao ^{89}Sr possa ser muito pequeno com recuperação gradual dentro de alguns meses após a terapia. GUTIÉRREZ e colaboradores (1999) verificaram um aumento na frequência de micronúcleos em linfócitos de pacientes com câncer da tireóide, uma semana após o tratamento com ^{131}I ($4,07 \pm 0,06$ GBq) com um declínio gradual com o tempo (6 meses e 1 ano), embora os valores encontrados 1 ano após o tratamento com ^{131}I sejam significativamente mais altos do que os valores basais. Todavia, M'KACHER e colaboradores (1996) mostraram que o dano citogenético persistiu por 2 anos após a terapia com ^{131}I (3,7 GBq) em pacientes com carcinoma da tireóide, usando o método convencional de aberrações cromossômicas e a técnica de

hibridização *in situ* por fluorescência. Já os autores como O'DUFFY e colaboradores (1999) não verificaram aumento significativo na taxa de anomalias cromossômicas, 1 e 3 meses após a sinovectomia com ^{153}Sm -PHYP em linfócitos de pacientes com sinovite crônica.

Embora a radiação ionizante seja conhecida pelo seu potencial clastogênico, há evidências de que ela pode causar também mudanças numéricas dos cromossomos em células de eucariotos. A indução de perdas cromossômicas pelos raios X e gama de $^{137}\text{Cs}^{(23)}$ em linfócitos humanos cultivados foi demonstrada por meio da técnica do micronúcleo utilizando anticorpo anticinetócero (EASTMOND & TUCKER, 1989) e pela técnica de hibridização *in situ* por fluorescência com sonda centromérica do DNA (TALLON *et al.*, 1998).

A aneuploidia está freqüentemente associada com abortos espontâneos, malformações congênitas, retardo mental, processo de envelhecimento (EASTMOND & TUCKER, 1989; BROWN *et al.*, 1983; HANDO *et al.*, 1994) e carcinogênese (DEVILEE *et al.*, 1988; ALCARAZ *et al.*, 1994). Evidências molecular e citogenética indicam que além das anomalias cromossômicas estruturais, ganhos ou perdas cromossômicas são eventos comuns em células tumorais. No entanto, pouco se conhece como essas alterações podem estar relacionadas com a iniciação e/ou progressão tumoral.

⁽²³⁾ ^{137}Cs – Césio-137 – *Caesium-137*

No presente trabalho, a análise cromossômica das preparações citológicas não mostrou a presença de aneuploidias em linfócitos periféricos de pacientes pela técnica convencional de aberrações cromossômicas. O tratamento com $^{153}\text{Sm-EDTMP}$, aparentemente, não ocasionou alteração no número modal de cromossomos, pelo menos na faixa de exposições terapêuticas: cerca de 90% das células apresentaram número modal de 46 cromossomos. A presença de metáfases com 44 ou 45 cromossomos pode ser atribuída aos problemas inerentes da técnica citogenética na preparação das lâminas (HANDO *et al.*, 1994).

Entretanto, se faz necessária uma análise mais acurada das células submetidas à ação do ^{153}Sm , utilizando, por exemplo, sondas específicas para centrômeros pela técnica de hibridização *in situ* por fluorescência.

A técnica citogenética utilizando BrdU, um análogo de timidina permite identificar as células nos diferentes ciclos mitóticos após o tratamento. A frequência de células na segunda divisão mitótica é considerada relativamente baixa (< 10%) em linfócitos sangüíneos humanos cultivados por 48 horas (IAEA, 1986).

Os dados obtidos no presente trabalho estão dentro dessa faixa de valores, isto é, o tratamento com radiofármaco não induziu qualquer alteração na proliferação celular, com exceção do grupo D que, aparentemente, mostrou uma cinética celular mais acelerada em relação a outros grupos de pacientes. Igualmente, este fato pode ser decorrente de uma paciente (SI) que apresentou

cerca de 27% de linfócitos na segunda divisão celular o que contribuiu para o aumento da média do grupo. Esse valor mais elevado pode ser resultante do conjunto de tratamentos que a paciente foi submetida num espaço de tempo relativamente curto, o que provavelmente, interferiu de alguma maneira na cinética do ciclo celular.

A radiação ionizante pode induzir uma inibição ou retardo na progressão de células através de diferentes fases do ciclo celular. O bloqueio em G₂ pode ocorrer em todas as células de eucariotos, independentemente da dose, enquanto que o bloqueio em G₁ parece depender do tipo celular e é controlado pelo gene supressor p53 (BERNHARD *et al.*, 1995).

O p53, em resposta ao dano ocorrido no DNA, permitiria um tempo maior na fase G₁ para que ocorra o reparo necessário antes da célula entrar na fase de replicação do DNA. Esse controle do *checkpoint* não ocorreria em células com a forma mutada de p53, freqüentemente encontrada em células tumorais. Essas continuariam através do ciclo celular passando pelos *checkpoints*, acumulando mais erros genéticos. Os pacientes com ataxia telangiectasia não mostram um aumento no nível da proteína p53 após a exposição, não apresentando um bloqueio na fronteira G₁/S do ciclo celular após a irradiação (KEARSLEY & FLAVIN, 1994).

Essas informações nos leva a supor que uma possível mutação no p53 nessa paciente não pode ser descartada.

Quando se comparou a incidência de danos cromossômicos induzidos pelo ^{153}Sm em linfócitos irradiados *in vivo* e *in vitro* para o mesmo grupo de pacientes (grupo B), verificou-se que o dano citogenético observado ($0,054 \pm 0,035$) foi significativamente menor do que o calculado pelo ajuste linear ($0,101 \pm 0,042$). A freqüência de aberrações/célula obtida *in vivo* pode ser considerada equivalente ao dano induzido após à exposição com $0,170 \text{ MBq/mL}$ de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ por 1 hora *in vitro*, que corresponde a uma dose estimada de $0,024 \text{ Gy}$.

Um dos fatores que pode estar influenciando no valor obtido *in vivo* seria a eliminação do $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ do compartimento vascular para os sítios metastáticos e para a bexiga urinária durante o período de 1 hora. A análise da urina coletada dos pacientes na primeira hora após a administração endovenosa de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ mostrou uma variação na excreção de 3 a 33% da atividade de ^{153}Sm injetada. Aparentemente, não houve uma correlação entre o grau de dano citogenético e a taxa de excreção de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ nos pacientes, o que faz supor uma maior captação do radiofármaco nos sítios metastáticos com maior atividade osteoblástica. Já o mesmo não ocorre em sistema *in vitro*, uma vez que o $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ permanece exposto por 1 hora em contato direto com todas as células da amostra sangüínea.

O radionuclídeo $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ é um emissor beta com uma mistura de raios gama que apresenta uma meia vida física de aproximadamente 46,8 horas. Cerca de 82% (comunicação pessoal - Dr. Helio Yoriyaz, Dr. Paulo T.D.Siqueira, Dr. Paulo R.P.Coelho, Centro de Engenharia Nuclear – Dept^o Física de Reatores – IPEN/CNEN-SP) dos efeitos da radiação são provenientes de partículas beta

que tem um poder de penetração nos tecidos moles de cerca de 3 mm. Esse alcance relativamente curto do radionuclídeo, pode indicar que a irradiação de outros tecidos quando da sua administração endovenosa é mínima e, por conseguinte, os seus efeitos colaterais também pequenos em nível celular.

Com base nessas observações, pode-se sugerir que a terapia com ^{153}Sm -EDTMP para o alívio da dor metastática dos pacientes envolve uma quantidade pequena de danos citogenéticos, embora, teoricamente, a ocorrência de efeitos estocásticos tardios não possa ser descartada.

Os resultados obtidos mostraram também que a análise de aberrações cromossômicas em linfócitos periféricos de pacientes com câncer metastático é bastante sensível, capaz de detectar possíveis efeitos genotóxicos associados com a exposição terapêutica de ^{153}Sm -EDTMP.

6 – CONCLUSÃO

Os dados obtidos sobre o estudo citogenético realizado em linfócitos periféricos de pacientes com metástase óssea antes e 1 hora após a administração endovenosa de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ ($42,53 \pm 5,31$ MBq/kg) permitiram concluir que :

- ✓ Os pacientes com câncer metastático (grupos C e D) apresentaram valores basais de aberrações cromossômicas mais altos que os de indivíduos sadios (grupo A);
- ✓ Somente os pacientes do grupo D apresentaram taxas de aberrações cromossômicas significativamente mais altas 1 hora após a administração de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$;
- ✓ O $^{153}\text{Sm-EDTMP}$, aparentemente, não influenciou no número modal de cromossomos bem como na cinética do ciclo celular nos 3 grupos de pacientes;
- ✓ A molécula carreadora, EDTMP, não mostrou qualquer efeito clastogênico sobre os cromossomos;
- ✓ Houve uma relação dose-resposta entre a concentração radioativa de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ (0,046 a 1,110 MBq/mL) e a frequência de aberrações cromossômicas em linfócitos periféricos exposto *in vitro*. O modelo que melhor se ajustou aos

dados obtidos foi o de regressão linear ($Y = A + BX$), tanto para os doadores saudáveis como para os pacientes (grupo B), os quais diferiram entre si;

✓ O dano cromossômico induzido pelo $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ observado *in vivo* foi menor do que o encontrado *in vitro* para o mesmo grupo de pacientes (grupo B);

✓ A dose absorvida estimada pelo programa MCNP (*Monte Carlo – Particle Transport Code*), versão 4B, variou de 0,0067 a 0,157 Gy para amostras sanguíneas expostas às atividades de 0,184 a 4,440 MBq de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ por 1 hora *in vitro*;

✓ A terapia com $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ utilizada no alívio da dor metastática óssea envolveu uma quantidade pequena de danos citogenéticos, não significativo, em linfócitos periféricos de pacientes 1 hora após a sua administração, com exceção dos pacientes do grupo D.

✓ A utilização de outras metodologias e o biomonitoramento dos pacientes em diferentes intervalos de tempo após a terapia com $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ são necessários para uma avaliação mais precisa dos riscos biológicos envolvidos para a otimização de uma estratégia terapêutica adequada.

INFORMAÇÕES SOBRE O DOADOR

Nome.....
Idade.....anos
Peso.....kg
Fumante: () sim () não Quantidade/dia.....

AUTORIZAÇÃO

Eu.....autorizo a coleta de amostras sangüíneas (10 mL) para estudos citogenéticos a serem realizados no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP) Departamento de Radiobiologia, cujo resultado será utilizado na tese de Doutorado de Márcia Augusta da Silva.

São Paulo, dede

Assinatura

INFORMAÇÕES SOBRE O DOADOR

Nome:.....
Idade:.....anos
Peso:Kg
Fumante: () SIM () NÃO Quantidade/dia.....
Raça:
Tipo de anomalia:

ADMINISTRAÇÃO DO ¹⁵³ Sm-EDTMP			
	DATA	QUANTIDADE (mL)	ATIVIDADE (mCi)
BASAL			
1ª DOSE			
2ª DOSE			
3ª DOSE			

Radioterapia

Período:.....
Fonte: () Cobalto () Césio () Acelerador de elétrons
Taxa de dose:
Número de sessões:..... Dose fracionada:

Quimioterapia

Período:.....
Droga:.....
Via de administração:
Dosagem:.....

Hormonoterapia

Período:.....
Droga:.....
Via de administração:
Dosagem:.....

Analgesia

Período:.....
Droga:.....
Via de administração:
Dosagem:.....

AUTORIZAÇÃO

Eu.....autorizo a coleta de amostras sanguíneas (5 mL) para estudos citogenéticos a serem realizados no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP) Departamento de Radiobiologia, cujo resultado será utilizado na tese de Doutorado de Márcia Augusta da Silva.

São Paulo, dede

Assinatura

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS,A.S.; BRINGTON,S.W.; KEMPF,P.; LOUW,W.K.; BEEK,A.V.; KRITZINGER,V.; WESTERINK, H.P.; Van RENSBERG, A.J. Samarium-153-EDTMP for palliation of Ankylosing Spondylitis, Paget's disease and rheumatoid Arthritis. **J.Nucl.Med.**, v.36, p.1417-1420, 1995.
- ALCARAZ, A.; TAKAHASHI, S.; BROWN, J.A.; HERATH, J.F.; BERGSTRALH, E.J.; LARSON-KELLER, J.J.; LIEBER, M.M.; JENKINS, R.B. Aneuploidy and aneusomy of chromosome 7 by Fluorescence in situ hybridization are markers of poor prognosis in prostate cancer. **Cancer Res.**, v.54, p.3998-4002, 1994.
- ALLEN, B.J.; BLAGOYEVIC, N. Alpha and beta emitting radiolanthanides in targeted cancer therapy: The potential role of terbium-149. **Nuclear Medicine Communications**, v.17, p.40-47, 1996.
- BARQUINERO,J.F.; BARRIOS,L.; CABALLIN,M.R.; MIRÓ,R.; RIBAS,M.; EGOZCUE,J. Biological dosimetry in simulated *in vitro* partial irradiations. **Int.J.Radiat.Biol.**, v.71; n.4, p.435-440, 1997.
- BAUCHINGER, M.; SCHMID, E.; ZITZELSBERGER, H.; BRASELMANN, H.; NAHRSTEDT, U. Radiation- induced chromosome aberrations analysed by two-colour fluorescence in situ hybridization with composite whole chromosome-specific DNA probes and a pancentromeric DNA probe. **Int.J.Radiat.Biol.**, v.64, n.2, p.179-184, 1993.
- BAUCHINGER, M. Quantification of low-level radiation exposure by conventional chromosome aberration analysis. **Mutat. Res.**, v.339, p.177-189, 1995.
- BAUCHINGER, M.; SCHMID, E.; BRASELMANN, H. Cytogenetic evaluation of occupational exposure to external γ rays and internal ^{241}Am contamination. **Mutat. Res.**, v.395, p.173-178, 1997.
- BAUCHINGER, M.; SCHMID, E. LET dependence of radiation-induced intra- and interchromosomal aberrations in human lymphocytes. **Int.J.Radiat.Biol.**, v.74, n.1, p.17-25, 1998.

- BAYOUTH, J.E.; MACEY, D.J.; KASI, L.P.; FOSSELA, F.V. Dosimetry and toxicity of Samarium 153 EDTMP administered for bone pain due to skeletal metastases. **J. Nucl. Med.**, v.35, n.1, p.63-69, 1994.
- BENDER M.A.; PRESTON, R.J.; LEONARD, R.C.; PYATT, B.E.; GOOCH, C. Chromosomal aberrations and sister-chromatid exchange frequencies in peripheral blood lymphocytes of a large human population sample. II-extension of age range. **Mutat. Res.**, v.212, p.149-154, 1989.
- BERNHARD, E.J.; MAITY, A.; MUSCHEL, R.J.; McKENNA, W.G. Effects of ionizing radiation on cell cycle progression. A review. **Radiat. Environ. Biophys.**, v.34, p.79-83, 1995.
- BLANK, K.R.; RUDOLTZ, M.S.; KAO, G.D.; MUSCHEL, R.J. McKENNA, W.G. The molecular regulation of apoptosis and implications for radiation oncology. **Int.J.Radiat.Biol.**, v.71, n.5, p.455-466, 1997.
- BOREHAM, D.R.; GALE, K.L.; MAVES, S.R.; WALKER, J.A.; MORRISON, D.P. Radiation-induced apoptosis in human lymphocytes: potential as a biological dosimeter. **Health Physics**, v.71, n.5, p.685-691, 1996.
- BRASELMANN, H.; BAUCHINGER, M.; SCHIMID, E. Cell survival and radiation induced chromosome aberrations. I. Derivation of formulae for determination of transmission and survival parameters of aberrations. **Radiat. Environ. Biophys.**, v.25, p.243-251, 1986.
- BROWN, T.; FOX, D.P.; ROBERTSON, F.W.; BULLOCK, I. Non-random chromosome loss in PHA-stimulated lymphocytes from normal individuals. **Mutat. Res.**, v.122, p.403-406, 1983.
- BRULAND, O. S.; SKRETTING, A.; SOLHEIM, O., P.; AAS, M. Targeted radiotherapy of osteosarcoma using ¹⁵³Sm-EDTMP. **Acta Oncol.**, v. 35, n. 3, p. 381-384, 1996.

- CANCINO, A.I.B. Desarrollo de una formulación de ^{186}Re -HEDP y comparación radiofarmacocinética con el ^{153}Sm -EDTMP. Tese para obtenção de título de Química Farmacéutica Bióloga. Universidad Nacional Autónoma de México – Facultad de Química, 1998.
- CARRANO, A.V.; NATARAJAN, A.T. Considerations for populations monitoring using cytogenetic techniques. In: **International Commission for protection against environmental mutagens and carcinogens**. ICPENC pub.14, p.1-28, 1987.
- CASTRO, M.; PORTILLA, A. Sm-153-EDTMP – a new palliative therapy agent against pain in cases of bone metastases. In: **Modern trends in radiopharmaceuticals for diagnosis and therapy** – Proceedings of a symposium held in Lisbon, Portugal, p.619-626, 1998.
- CATENA, C.; PARASACCHI, P.; CONTI, D.; SGURA, A.; TRENTA, G.; RIGHI, E.; TRINCI, M.M.; TRINCI, M. Peripheral blood lymphocytes decrease and micronucleus yields during radiotherapy. *Int.J.Radiat.Biol.*, v.72, n.5, p.575-585, 1997.
- COLLINS, C.; EARY, J.F.; DONALDSON, G.; VERNON, C.; BUSH, N.E.; PETERSDORF, S.; LIVINGSTON, R.B.; GORDON, E.E.; CHAPMAN, C.R.; APPELBAUM, F.R. Samarium-153-EDTMP in bone metastases of hormone refractory prostate carcinoma: A phase I/II trial. *J.Nucl.Med.*, v.34, p.1839-1844, 1993.
- DAHALAN, R.; AWANG, W.A.W.A.; KASSIM, W.H.B.W.K.S.; MUSTAFFA, R.; ISMAIL, H. Sm-153 EDTMP (Ethylene Diamine Tetramethylene Phosphonic Acid) A bone seeking radiotherapeutic agent. *J.S.N.M.*, v.16, n.2, p.127-137, 1998.
- DARROUDI, F. Use of FISH translocations analyses for retrospective biological dosimetry: How stable are stable chromosome aberrations? *Radiation Protection Dosimetry*, v.88, n.1, p.101-109, 2000.

- DEVILLEE, P.; THIERRY, R.F.; KIEVITS, T.; KOLLUR, R.; HOPMAN, A.H.N.; WILLARD, H.F.; PEARSON, P.L.; CORNELISSE, C.J. Detection of chromosome aneuploidy in interphase nuclei from human primary breast tumors using chromosome-specific repetitive DNA probes. **Cancer Res.** v,48, p.5825-5830, 1988.
- DHILLON, V.S.; DHILLON, I. Chromosome aberrations and sister chromatid exchange studies in patients with prostate cancer: possible evidence of chromosome instability. **Cancer Genet. Cytogenet.** V.100, p.143-147, 1998.
- DOYLE D.V.; GLASS, J.S.; GOW, P.J.; DAKER, M.; GRAHAME, R. A clinical and prospective chromosomal study of yttrium-90 synovectomy. **Rheumatology and rehabilitation**, v.16, n.4, p.217-222, 1977
- DUFFAUD, F.; ORSIÉRE, T.; VILLANI, P.; PELISSIER, A.L.; VOLOT, F.; FAVRE, R.; BOTTA, A. Comparison between micronucleated lymphocytes rates observed in healthy subjects and cancer patients. **Mutagenesis**, v.12, n.4, p.227-231, 1997.
- DURANTE,M.; GROSSI, G.F.; GIALANELLA,G.; PUGLIESE,M.; NAPPO,M.; YANG, T.C. Effects of α -particles on survival and chromosomal aberrations in human mammary epithelial cells. **Radiat. Environ. Biophys.**, v.34, p.195-204, 1995.
- EARY,J.F.; COLLINS, C.; STABIN, M.; VERNON,C.; PETERSDORF,S.; BAKER,M.; HARTNETT, S.; FERENCY, S.; ADDISON, S.J.; APPELBAUM, F.R.; GORDON,E.E. Samarium-153 - EDTMP biodistribution and dosimetry estimation. **J. Nucl. Med.**, v.34, p. 1031-1036, 1993.
- EASTMOND, D.A.; TUCKER, J.D. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody. **Environm.Molec.Mutagenesis**, v.13, p.34-43, 1989.
- EDWARDS, A.A.; PURROT, R.J.; PROSSER, J.S.; LLOYD, D.C. The induction of chromosome aberrations in human lymphocytes by alpha-radiation. **Int.J.Radiat.Biol.**, v.38, n.1, p.83-91, 1980.

- EDWARDS, A.A.; MOISEENKO, V.V.; NIKJOO, H. On the mechanism of the formation of chromosomal aberrations by ionising radiation. ***Radiat. Environ. Biophys.***, v.35, p.25-30, 1996.
- EDWARDS, A.A. The use of chromosomal aberrations in human lymphocytes for biological dosimetry. ***Radiat. Res.***, v.148, p.539-544, 1997.
- FARHANGHI, M.; HOLMES, R.A.; VOLKERT, W.A.; LOGAN, K.W.; SINGH, A. Samarium-153-EDTMP: Pharmacokinetic, toxicity and pain response using an escalating dose schedule in treatment of metastatic bone cancer. ***J. Nucl. Med.***, v.33, n.8, p. 1451-1458, 1992.
- FENECH, M.; MORLEY, A.A. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. ***Mutat. Res.***, v. 161, n.2, p.193-198, 1986.
- FENECH, M.; DENHAM, J.; FRANCIS, W.; MORLEY, A. Micronuclei in cytokinesis-blocked lymphocytes of cancer patients following fractionated partial-body radiotherapy. ***Int. J. Radiat. Biol.***, v.57, n.2, p.373-383, 1990.
- FISCHER, M. New aspects of radionuclide therapy of bone and joint diseases. In: **International Agency Energy Atomic**, p.144-145, 1999.
- GANGULY, B.B. Cell division, chromosomal damage and micronucleus formation in peripheral lymphocytes of healthy donors: related to donor's age. ***Mutat. Res.***, v.295, p. 135-148, 1993.
- GAUDIANO, J. Radiofarmacos para terapia paliativa del dolor. Curso Regional de capacitacion sobre la practica de la radiofarmacia hospitalaria- Universidad de la republica Montevideo-uruguay. 1994.
- GEBHART, E.; LÖSING, J.; WOPFNER, F. Chromosome studies on lymphocytes of patients under cytostatic therapy. I: Conventional chromosome studies in cytostatic interval therapy. ***Hum. Genet.***, v.55, p.53-63, 1980.

- GIL, O.M.; OLIVEIRA, N.G.; RODRIGUES, A.S.; LAIRES, A.; FERREIRA, T.C.; LIMBERT, E.; RUEFF, J. No evidence of increase chromosomal aberrations and micronuclei in lymphocytes from nonfamilial thyroid cancer patients prior to radiotherapy. **Cancer Genet.Cytogen.**, v.123, p.55-60, 2000.
- GOECKELER, W.F. Samarium Sm 153 Lexidronam for the palliation of painful bone metastases. **ANZ Nuclear Medicine**, v. 29, n.4, p. 69-71, 1998.
- GOOCH, P.C.; BENDER, M.A.; RANDOLPH, M.L. Chromosome aberrations induced in human somatic cells by neutrons. In: **Biological effects of neutrons and protons irradiation** – IAEA, v.1, p.325-341, 1964.
- GUTIÉRREZ, S.; CARBONELL, E.; GALOFRÉ, P.; CREUS, A.; MARCOS, R. Micronuclei induction by ¹³¹I exposure: study in hyperthyroidism patients. **Mutat. Res.**, v.373, p.39-45, 1997.
- HALL,S.C.; WELLS,J. Micronuclei in human lymphocytes as a biological dosimeter: preliminary data following beta irradiation *in vitro*. **J.Radiol.Prot.**, v.8, n.2, p.97-102, 1988.
- HALL, E.J. **Radiobiology for the radiologist**. J.B.Lippincott Company – Philadelphia, 4^a edition, 1994.
- HANDO,J.C., NATH, J. TUCKER, J.D. Sex chromosomes, micronuclei and aging in women. **Chromosoma**, v.103, p.186-192, 1994.
- HARRIS, C.C. Chemical and Physical Carcinogenesis: Advances and perspectives for the 1990s'. **J.Cancer Research Suppl.**, v.51, p.5013s- 5044, 1991.
- HASSFJELL,S.P.; BRULAND, O.S.;HOFF,P. 212Bi-DOTMP: na alpha particle emitting bone-seeking agent for targeted radiotherapy. **Nucl.Med.Biol.**,v.24, n.3, p.231-237, 1997.
- HEGGIE, J.C.P. Radiation Absorbed dose calculations for Samarium-153-EDTMP localized in bone. **J.Nucl.Med.**, v.32, n.5, p.840-844, 1991.

- HENDERSON, I.C. Câncer de mama. In: MURPHY, G.P.; LAWRENCE, W.Jr.; LENHARD, R.E.Jr. ***Oncologia Clínica – Manual de la American cancer society***. Washington: Organización Panamericana de La salud, p.224-248, 1996.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA/PRO-ONCO) - MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 2001. Rio de Janeiro, 2001.
- INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Biological dosimetry chromosomal aberrations analysis for dose assessment. Technical Report Series nº 260, Vienna, IAEA, 1986 STI/PUB/10/260.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION. Report of the task group on reference man. n.23, Pergamon Press, New York, 1974.
- JAGETIA, G.C.; JAYAKRISHNAN, A.; FERNANDES, D.; VIDYASAGAR, M.S. Evaluation of micronuclei frequency in the cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients before and after radiation treatment. ***Mutat.Res.***, v.491, p.9-16, 2001.
- JOHNSON, K.L.; NATH, J.; BRENNER, D.J.; GEARD, C.R.; TUCKER, J.D. Chromosome aberrations of clonal origin in irradiated and unexposed individuals: assessment and implications. ***Radiat. Res.***, v.152, p.1-5, 1999.
- KANDA, R. Improvement of accuracy of chromosome aberrations analysis for biological radiation dosimetry. ***J.Radiat.Res.***, v.41, p.1-8, 2000.
- KASI,L.P.; FOSSELLA,F.; HOLOYE,P.; PODOLOFF,D.; KIM,E.; CRANE,J.; GORDON,E.E. Evaluation of multiple dose ¹⁵³Sm-EDTMP for bone pain palliation in cancer patients. ***Proc.7th International Symposium of Radiopharmacology***. Boston,Mass, p.11, 1991.
- KEARSLEY, J.H.; FLAVIN, M. Molecular biology and the radiation oncologist. ***Australasian Radiobiology***, v.38, p.215-220, 1994.

- KÖKSAL, G.; PALA, F.S.; DALCI, D.Ö. In vitro dose-response curve for chromosome aberrations unduced in human lymphocytes by ^{60}Co γ -irradiation. ***Mutat. Res.***, v.329, p.57-61, 1995.
- KÖNIG, J.J.; TEUBEL, W.;KAMST, E.; ROMMIJN, J.C.; SCHRÖDER, F.H.; HAGEMEIJER, A. Cytogenetic analysis of 39 prostate carcinomas and evaluation of short term tissue culture techniques ***Cancer Genet. Cytogenet.*** V.101, p.116-122, 1998.
- LÁZNÍCEK,M.; LÁZNÍCKOVÁ, A.; BUDSKY,F.; PROKOP,J.; KOPIČKA, K. Comparison of biological characteristics of EDTMP complexes with $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In and ^{153}Sm in rats. ***Appl.Radiat.Isot.***, v.45, n.9, p.949-953, 1994.
- LEE T-K-; O'BRIEN, K.F.; NAVES, J.L.; CHRISTIE, K.I.; ARASTU, H.H.; EAVES, G.S.;WILEY JR., A.L.; KARLSSON, U.L.;SALEHPOUR, M.R. Micronuclei in lymphocytes of prostate cancer patients undergoing radiation therapy. ***Mutat.Res.***, v.469, p.63-70, 2000.
- LEWINGTON, V. J. Targeted radionuclide therapy for bone metastases. ***Eur. J. Nucl. Med.*** , v. 20, p. 66-74, 1993.
- LEWINGTON, V. J. Cancer therapy using bone-seeking isotopes. ***Phys. Med.Biol.*** , v. 41, p. 2027-42, 1996.
- LLOYD, D.C.; PURROT, R.J.; DOLPHIN, G.W.; BOLTON, D. ; EDWARDS, A.A.The relationship between chromosome aberrations and low LET radiation dose to human lymphocytes. ***Int.J.Radiat.Biol.***, v.28, n.1, p.75-90, 1975.
- LLOYD, D.C.; EDWARDS, A.A.; PROSSER, J.S., AUFDERMAUR, A.; ETZWEILWR, A.; WEICKHARDT, U.; GÖSSI, U.; GEIGER, L.;NOELPP, U.; RÖSLER, H. Accidental intake of tritiated water: a report of two cases. ***Radiation Protection Dosimetry***, v.15, n.3, p.191-196, 1986.

- LLOYD, D.C. EDWARDS, A.A.; LEONARD, A.; DEKNUDT, G.L.; VERSCHAEVE, L.; NATARAJAN, A.T.; DARROUDI, F.; OBE, G.; PALITTI, E.; TANZARELLA, C.; TAWN, E.J. Chromosomal aberrations in human lymphocytes induced in vitro by very low doses of X-rays. *Int.J.Radiat.Biol.*, v.61, n.3, p.335-343, 1992.
- LOHMANN, T.H.O. Análise da radiosensibilidade de linfócitos periféricos de pacientes com câncer de pele e de indivíduos sadios por meio do método do micronúcleo. Dissertação para obtenção do título de mestre. IPEN/CNEN-SP, p.1-71, 1995.
- McEWAN, A.J.B. Use of radionuclides for the palliation of bone metastases. *Seminars in Radiat. Oncol.*, v.10, n.2, p.103-114, 2000.
- M'KACHER, R.; LEGAL, J.D.; SCHLUMBERGER, M.; VOSSIN, P.; AUBERT, B.; GAILLARD, N.; PARMENTIER. Biological dosimetry in patients treated with iodine 131 for differentiated thyroid carcinoma. *J. Nucl. Med.*, v.37, n.11, p.1860-1864, 1996.
- MILL, A.J.; WELLS, J.; HALL, S.C.; BUTLER, A. Micronucleus induction in human lymphocytes: comparative effects of X rays, alpha particles, beta particles and neutrons and implications for biological dosimetry. *Radiat.Res.*, v.145, p.575-585, 1996.
- MOTHERSILL, C.; SEYMOUR, C.B. Mechanisms and implications of genomic instability and other delayed effects of ionizing radiation exposure. *Mutagenesis*, v. 13, n.5, p.421-426, 1998.
- NAKANISHI, M.; TANAKA, K. SHINTANI, J.; TAKAHASHI, T. KAMADA, N. Chromosomal instability in acute myelocyte leukemia and myelodysplastic syndrome patients among Atomic Bomb survivors. *J.Radiat.Res.*, v.40, p.159-167, 1999.

- O'DUFFY, E.K.; OLIVER, F.J.; CHATTERS, S.J.; WALKER, H.; LLOYD, D.C.; EDWARDS, J.C.; ELL, P.J. Chromosomal analysis of peripheral lymphocytes of patients before and after radiation synovectomy with samarium 153 particulate hidroxyapatite. *Rheumatolog (oxford)*, v.38, n.4, p.316-320, 1999.
- OKAZAKI, K. Efeitos da radiação ionizante em células: Noções básicas, IPEN-Pub-399, 1995.
- OLIVE,P.L.; BANÁTH, J.P.; DURAND, R.E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat. Res.*, v.122, p.86-94, 1990.
- OLIVEIRA, E.M.; SUZUKI, M.F.; NASCIMENTO, P.A., SILVA, M.A., OKAZAKI, K. Evaluation of the effect of ⁹⁰Sr β-radiation on human blood cells by chromosome aberration and single cell gel electrophoresis (comet assay) analysis. *Mutat. Res.*, v.476, p.109-121, 2001.
- ÖSTLING, O.; JOHANSON, K.J.. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.123, p.291-295, 1984.
- PECHER,C. Biological investigations with radioactive calcium and strontium: preliminary report on the use of radioactive strontium in treatment of metastatic bone cancer. *U.Cal.Public Pharmacol*, v.11, p.117-149, 1942.
- PERRY, P.; WOLFF, S. new Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* (London), v.251, n.13, p.156-158, 1974.
- POHL-RÜLING, J.; FISCHER, P.; LLOYD, D.C.; EDWARDS, A.A.; NATARAJAN, A.T.; OBE, G.; BUCKTON, K.E.; BIANCHI, N.O.; van BUUL, P.W.; DAS, D.C.; DASCHIL, F.; FABRY, L.; KUCEROVÁ, M.; LÉONARD, A.; MUKHERJEE, R.N.; MUKHERJEE, U.; NOWOTNY, R.; PALITTI, P.; POLÍVKOVÁ, Z.; SHARMA, T.; SCHMIDT,W. Chromosomal damage induced in human lymphocytes by low doses of D-T neutrons. *Mutat. Res.*, v.173, p.267-272, 1986.

- PURROT, R.J.; EDWARDS, A.A.; LLOYD, D.C.; STATHER, J.W. The induction of chromosome aberrations in human lymphocytes by in vitro irradiation with α particles from plutonium-239. *Int.J.Radiat.Biol.*, v.38, n.3, p.277-284, 1980.
- RESCHE, I.; CHATAL, I-F.; PECKING, A.; ELL, P.; DUCHESNE, G.; RUBENS, R.; FOGELMAN, I.; HOUSTON, S.; FAUSTER, A.; DISCHER, M.; WILKINS, D. A Dose-controlled study of ^{153}Sm -Ethylenediaminetetramethylenephosphonate (EDTMP) in the treatment of patients with painful bone metastases. *European Journal of Cancer*, v.33, n.10, p.1583-1591, 1997.
- RIBAS M.; MIRÓ, R.; GELABERT, A.; EGOZCUE, J. Chromosome instability lymphocytes from two patients affected by three sequential primary cancers: the role of fragile sites. *Cancer Genet. Cytogenet.*, v.110, p.133-135, 1999.
- RIGAUD, O.; GUEDENEY, G.; DURANTON, I.; LEROY, A.; DOLOY, M.T.; MAGDELENAT, H. Genotoxic effects of radiotherapy and chemotherapy on the circulating lymphocytes of breast cancer patients. II – Alteration on DNA repair and chromosome radiosensitivity. *Mutat. Res.*, v.242, p.25-35, 1990.
- ROBINSON, R.G. Systemic radioisotopic therapy of primary and metastatic bone cancer. *J. Nucl. Med.*, v. 31,n.8, p. 1326-1327, 1990.
- SACHS, R.K.; BRENNER, D.J. Effect of LET on chromosomal aberrations yield I- Do long-lived, exchange-prone double strand breaks play a role? *Int.J.Radiat.Biol.*, v.64, p.677-688, 1993.
- SAMARATUNGA, R.C.; THOMAS,S.R.; HINNEFELD, J.D.; von KUSTER, L.C.; HYANS, D.M.; MOULTON, J.S.; SPERLING, M.I.; MAXON III, H.R. A monte carlo simulation model for radiation dose to metastatic skeletal tumor from Rhenium-186 (Sn)-HEDP. *J. Nucl. Med.*, v. 36, p. 336-350, 1995.
- SCHMID, E.; BAUCHINGER, M. Analysis of primary processes in the formation of acentric fragments. *Radiat.Environ.Biophys.*, v.17, p.143-149, 1980.

- SINGH, A.; HOLMES, R. A.; FARHANGI, M.; VOLDERT, A. W.; WILLIAMS, A.; STRINGHAM, L. M. ; KETRING, A. R. Human pharmacokinetics of Samarium-153 EDTMP in metastatic cancer. **J. Nucl. Med.**, v. 30, p. 1814-1818, 1989.
- SHOU-PENG, Z.; DONG, X.; XIAO-FENG, H. Electron microscopic observations and DNA chain fragmentation studies on apoptosis in bone tumor cells induced by ¹⁵³Sm-EDTMP. **Nuclear Science and Techniques**, v.8, n.3, p.163-165, 1997.
- STEVENSON, A.C.; BEDFORD, J.; DOLPHIN, G.W., PURROTT, R.J.; LLOYD, D.C.; HILL, A.G.S.; HILL, H.F.H.; GUMPEL, J.M.; WILLIAMS, D.; SCOTT, J.T.; RAMSEY, N.W.; BRUCKNER, F.E.; FEARN, C.B.D.A. Cytogenetic and scanning study of patients receiving intra-articular injection of gold 198 and yttrium 90. **Ann. Rheum.Dis.**, v.32; p.112-123, 1973.
- SUGIMURA, T. Multistep carcinogenesis: A 1992 perspective. **Science**, v.258; p.603-607, 1992.
- TALLON, I.; VERSCHAEVE, L.; KIRSCH-VOLDERS, M. Cell cycle dependent aneuploidy induction by X-rays in vitro in human lymphocytes. **Microscopy Res. And Techn.** V.40, p.344-353, 1998.
- TANAKA,K.; SAWADA, S.; KAMADA,N. Relative biological effectiveness and dose rate effect of tritiated water on chromosomes in human lymphocytes and bone marrow cells **Mutat.Res.**, v.323, p.53-61, 1994.
- TANAKA,K.; GAJENDIRAN, N.; ENDO, S.; KENSHI, K.; HOSHI, M.; KAMADA,N. Neutron energy-dependent initial DNA damage and chromosomal exchange. **J. Radiat.Res.**, v.40,suppl. 36, p.36-44, 1999.
- THOMPSON, M.W.; McINNES, R.R.; WILLARD, H.F. **Genética Médica**, 5ª edição, ed.Guanabara Koogan, cap.16, p.250-254, 1993.

TURNER, J.H.; MARTINDALE,A.A.; SORBY,P.; HETHERINGTON,E.L.; FLEAY,R.F.; HOFFMAN, R.F.; CLARINGBOLD, P.G. Samarium-153-EDTMP therapy of disseminated skeletal metastasis. *Eur.J.Med.*, v.15, p.784-795, 1989.

TURNER, J.H.; CLARINGBOLD, P.G. A phase II study of treatment of painful multifocal skeletal metastases with single and repeated dose Samarium-153 Ethylenediaminetetramethylene phosphonate *Eur.J.Cancer.*, v.27, n.9, p.1084-1086, 1991.

UNSCEAR – UNITED NATIONS SCIENTIFIC COMMITTEE ON THE EFFECTS OF ATOMIC RADIATION. **Genetic and somatic effects of ionizing radiation:** report to general assembly on the effects of atomic radiation, New York, 1986.

UNSCEAR – UNITED NATIONS SCIENTIFIC COMMITTEE ON THE EFFECTS OF ATOMIC RADIATION. **Sources and effects of ionizing radiation:** report to general assembly on the effects of atomic radiation, New York, p.1-30, 1993.

VENKATACHALAM, P.; SOLOMON, F.D.P.; MOHANKUMAR, M.N.; PRABHU, B.K.; GAJENDIRAN, N.; KATHIRESAN, A.; JEEVANRAM, R.K. Higher frequency of dicentrics and micronuclei in peripheral blood lymphocytes of cancer patients. *Mutat. Res.*, v.425, p.1-8, 1999.

WATANABE, N.; YOKOYAMA, K.; KINUYA, S.; SHUKE, N.; SHIMIZU, M.; MICHIGISHI, T.; TONAMI, N.; SETO, H.; GOODWIN, D.A. Radiotoxicity after strontium 89 therapy for bone metastases using the micronucleus assay *J. Nucl. Med.*, v.39, n.12, p.2077-2079, 1998.

WEISTEIN, I.B.; CAROTHERS, A.M.; SANTELLA, R.M.; PERERA, F.P.; Molecular mechanisms of mutagenesis and multistage carcinogenesis. In: MENDELSON, J.; HOWLEY, P.M.; ISRAEL, M.A.; LIOTTA, L.A. **The Molecular Basis of Cancer.** Philadelphia:Saunders Company, p.59-85, 1995.

WHELDON, T.E.; O'DONOGHUE, J.A. the radiobiology of targeted radiotherapy. *Int. J.Radiat.Biol.* v.58, n.1, p.1-21, 1990.

YUNIS, J.J. The chromosomal basis of human neoplasia. **Science**, v.221, p.227-236, 1983.

ZIEGLER, A.; JONANSON, A.S.; LEFFELL, D.J.; SIMON, J.A.; SHARMA, H.W.; KIMMELMAN, J.; REMINGTON, L.; JACKS, T.; BRASH, D.E. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. **Nature**, v.372, p.773-776, 1994.