

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICO E CITOTÓXICO DO
¹⁵³Sm-EDTMP EM LINFÓCITOS PERIFÉRICOS DE PACIENTES COM
METÁSTASE ÓSSEA**

MIRIAM FUSSAE SUZUKI

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear – Aplicações.**

**Orientadora:
Dra. Kayo Okazaki**

**SÃO PAULO
2003**

"A vida é bela"
Roberto Benigni

**Dedicado à grande família
Suzuki e Hattori**

AGRADECIMENTOS

À Dra. Kayo Okazaki, pela orientação, confiança, constante apoio e incentivo.

À Dra. Márcia Augusta da Silva, pela constante participação e colaboração na realização dos experimentos.

À Dra. Maria Inês Calil Cury Guimarães, pelo incentivo e cálculo dos dados relativos às doses dos pacientes.

Às colegas do Instituto de Radioterapia, Dra. Regina Godoy Lopes, Dra. Mary Teixeira, enfermeira Geralda, pela assistência e coleta das amostras sanguíneas dos pacientes.

Aos colegas Dr. Helio Yoriyaz, Dr. Paulo T. D. Siqueira e Dr. Paulo Rogério P. Coelho, pelos cálculos das doses absorvidas *in vitro*.

Às colegas do Grupo de Dosimetria Biológica e Mutagênese, Lenita Tallarico e Daniella Murakami, pela participação nas discussões sobre as técnicas citogenéticas e bioquímicas.

Aos pesquisadores doutores do Centro de Biologia Molecular, Paolo Bartolini, Olga Zazuco Higa, Maria Aparecida P. Camilo, Nanci do Nascimento, Patrick Jack Spencer, Ligia E. F. Dias, Regina Affonso, Carlos Roberto Soares, Mônica Beatriz Mather, Maria Helena, Cibele e Luiz Guilherme Stark Laroeira, pelo incentivo e colaboração para o desenvolvimento do senso crítico e científico.

Aos amigos, técnicos, bolsistas e ex-bolsistas do Centro de Biologia Molecular, Patrícia Alves do Nascimento, Elaine Mendes Oliveira, Helena Costa, Malvina Boni Mitake, Shizue Ota Rogero, Paulo César de Arruda Paes, José Maria, Rosângela, Paula, Janaína B. Alves, Fernanda Mendonça, Fernanda Izilda, Johnny, Murilo, Alberto, Leonardo, Patrícia, Arlete, Andréa, Fátima, Genivalda e Junqueira, por compartilharem suas idéias, opiniões e dúvidas.

Aos professores da pós-graduação, especialmente aos professores Dr. Heitor Franco de Andrade Júnior, Dr. José Roberto Rogero, Dr. Afonso Rodrigues de Aquino e Dr. Osvaldo Augusto Sant'Anna, pela mostra de carinho, pela empolgação em busca do conhecimento e amor à pesquisa.

Ao Centro de Radiofarmácia, Dra. Constância e Dra. Marycel, pelo apoio constante e pela atenção dedicada ao grupo.

Aos técnicos da Proteção Radiológica, Fábio Fumio Suzuki, José Roberto, Estanislau, Evandro, Eduardo e Olavo, pelo acompanhamento e monitoração dos equipamentos e áreas onde foram realizados os experimentos com radioisótopos.

Aos amigos do Centro de Metrologia das Radiações, Dra. Linda Caldas, Dra. Letícia C. Rodrigues, Janete, Laura, Orlando, David, Flávio, Vítor, Tereza, Ana Maria, Filomena, Marcos Xavier, Sueli, Waldir e Luiz pelo incentivo, auxílio e manutenção dos laboratórios.

À Comissão de Pós-Graduação, especialmente a Ilze, Vera e Ana Maria, pela competência e presteza na condução dos programas.

Às bibliotecárias do IPEN, pela dedicação e presteza na obtenção dos artigos científicos.

Às amigas do Instituto Butantan, Dra. Toshie Kawano e Dra. Eliana Nakano, pelo carinho, incentivo e atenção.

Aos amigos do Instituto de Ciências Biomédicas, Dr. Carlos Menck e Dr. Alysso Renato Muotri, pelo incentivo à busca das respostas para as questões científicas e afins.

A todos os doadores de amostras sanguíneas, pela colaboração anônima a esta pesquisa.

À Beth, Elizabeth K. Gimbo-Vianna, *in memoriam*.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo apoio financeiro para a participação em congressos e publicação dos trabalhos.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, pelo apoio a esta linha de pesquisa.

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICO E CITOTÓXICO DO ^{153}Sm -EDTMP EM LINFÓCITOS PERIFÉRICOS DE PACIENTES COM METÁSTASE ÓSSEA

Miriam Fussae Suzuki

RESUMO

Neste estudo, foi determinado o dano celular em linfócitos periféricos após exposição ao ^{153}Sm -EDTMP (Samário-153 etilenodiaminotetrametileno fosfonato) por meio da técnica de análise de micronúcleos e coloração diferencial. O ^{153}Sm -EDTMP é um radiofármaco utilizado para alívio da dor em pacientes com metástase óssea. A análise da frequência de micronúcleos em amostras sanguíneas de pacientes obtidas uma hora após a administração endovenosa do radiofármaco (41 MBq/kg) mostrou que não houve diferença estatística em relação aos valores basais em células binucleadas. Porém, a análise da distribuição do dano em células mononucleadas mostrou que os pacientes sem tratamento radioterápico prévio apresentaram um aumento significativo na frequência de células com um micronúcleo e aqueles com tratamento radioterápico prévio, nas células com dois ou mais micronúcleos. Os experimentos *in vitro* realizados com exposição de sangue total a três concentrações radioativas de ^{153}Sm -EDTMP (0,370; 0,555 e 1,110 MBq/mL) por uma hora mostraram um aumento na frequência de micronúcleos e de células necróticas e apoptóticas com o aumento da dose de radiação. Foram construídas curvas dose-resposta para os indivíduos sadios e para os pacientes com metástases óssea sem prévio tratamento radioterápico. A comparação das curvas mostrou que os pacientes apresentaram uma radiosensibilidade mais alta que os indivíduos sadios tanto quanto a porcentagem de células com micronúcleos como de células mortas (necróticas e apoptóticas).

**EVALUATION OF GENOTOXIC AND CYTOTOXIC EFFECTS
OF ¹⁵³Sm-EDTMP IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES OF BONE
METASTASIS PATIENTS**

Miriam Fussae Suzuki

ABSTRACT

In this study the cellular damage in peripheral lymphocytes after exposure to ¹⁵³Sm-EDTMP (Samarium-153 ethylenediaminetetrametylenephosphonate) was determined using the technique of micronuclei analysis and differential coloration. ¹⁵³Sm-EDTMP is a radiopharmaceutical used for pain relief in patients with bone metastases. The analysis of the frequency of micronuclei in patient blood samples obtained one hour after endovenous administration of radiopharmaceutical (41 MBq/kg) showed no statistical difference in relation to basal values in binucleated cells. However the analysis of damage distribution in mononucleated cells, showed that the patients without previous radiotherapeutic treatment presented a significant increase in the frequency of cells with one micronucleus and in those who had taken previous radiotherapeutic treatment, in cells with two or more micronuclei. The *in vitro* experiments conducted with the exposition of total blood to three radiation concentrations of ¹⁵³Sm-EDTMP (0.370, 0.555 and 1.110 MBq/mL) during one hour showed an increase in the frequency of micronuclei and necrotic and apoptotic cells with increasing radiation dose. Dose-response curves for healthy donors and patients with bone metastasis without previous radiotherapeutic treatment were constructed. The comparison of the curves showed that patients presented higher radiosensitivity, either micronuclei or dead cell (necrotic or apoptotic) percentages, than healthy donors.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Câncer: incidência e tratamentos	1
1.2 Samário-153-EDTMP	2
1.3 Técnica do micronúcleo	6
1.4 Morte celular	12
1.5 Instabilidade genética	14
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Doadores	18
3.2 Coleta de amostra sanguínea	19
3.3 Ensaio <i>in vivo</i>	19
3.4 Ensaio <i>in vitro</i>	21
3.5 Cultura de linfócitos e técnica do micronúcleo	22
3.6 Coloração diferencial	23
3.7 Cálculo da dose absorvida <i>in vitro</i>	24
3.8 Análise estatística	25
4. RESULTADOS	26
4.1 Efeito genotóxico do ¹⁵³ Sm-EDTMP <i>in vivo</i>	28
4.1.1 Frequência de micronúcleos basal	28
4.1.2 Frequência de micronúcleos basal em função da idade	38
4.1.3 Frequência de micronúcleos induzido pelo ¹⁵³ Sm-EDTMP	39
4.1.4 Índice de proliferação celular	42
4.2 Estimativa de dose absorvida do ¹⁵³ Sm-EDTMP <i>in vitro</i>	44
4.3 Efeito genotóxico do ¹⁵³ Sm-EDTMP <i>in vitro</i>	44
4.3.1 Curva dose-resposta para indução de micronúcleos	44
4.3.2 Influência do EDTMP na indução de micronúcleos	53
4.3.3 Índice de proliferação celular	54
4.4 Efeito citotóxico do ¹⁵³ Sm-EDTMP <i>in vitro</i>	56
5. DISCUSSÃO	66
6. CONCLUSÕES	74
ANEXO 1: Modelo do termo de consentimento do paciente/doador	75
ANEXO 2: Modelo da ficha de dados do paciente/doador	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer: incidência e tratamentos

A incidência do câncer tem aumentado consideravelmente tanto nos países desenvolvidos como em desenvolvimento. Nesses, o número de casos, que era da ordem de dois milhões em 1985, passou para cinco milhões em 2000 e projeta-se um número de dez milhões para 2015. Nos países desenvolvidos, os programas nacionais de combate ao câncer incluem medidas de prevenção e detecção precoce, além de acesso a tratamentos cirúrgicos, radio e quimioterápicos, resultando em cura de aproximadamente 45% dos cânceres detectados (Levin e col., 2001).

No Brasil, a incidência de câncer tem sido acompanhada pelo Ministério da Saúde e consolidados pelo Programa de Avaliação e Vigilância do Câncer e seus Fatores de Risco (PAV). Para 2002, estimou-se que ocorreriam no Brasil 337.535 casos novos e 122.600 óbitos por câncer. Os principais tipos que acometeriam a população seriam o de pele não melanoma (62.190 casos), mama feminina (36.090 casos), próstata (25.600 casos), pulmão (21.425 casos) e estômago (20.420 casos).

Entre os homens, estimou-se para o ano de 2002, com base numa série histórica de 20 anos, que a taxa de mortalidade seria maior entre os portadores de câncer de pulmão, seguida dos de próstata, estômago, esôfago, cólon e reto. Enquanto que, entre as mulheres, a mortalidade seria maior entre os casos de câncer de mama, seguido do de pulmão, cólon e reto, colo do útero e estômago (INCA, 2002).

Os tratamentos curativos e paliativos desta enfermidade incluem a cirurgia, a quimioterapia, a radioterapia e, mais recentemente, o uso de radionuclídeos não selados associados ou não a carreadores ou peptídeos. Uma das preocupações mais frequentes é quanto a analgesia em pacientes com metástases. No caso das metástases ósseas, a dor leva a uma alteração do humor (irritabilidade, depressão), imobilidade e dependência para a realização das tarefas diárias.

As metástases ósseas ocorrem com maior frequência nos casos de câncer primário de pulmão (36%), de próstata (50%) e de mama (50-75%) (Singh e col., 1989).

A dor aguda ou crônica é decorrente, em 70% dos casos, de infiltração tumoral em estruturas sensíveis, como músculos, vísceras, nervos periféricos e ossos. No caso da dor óssea, ela está frequentemente relacionada com a compressão e invasão do periósteo, a instabilidade secundária a fraturas e ao desencadeamento de fenômenos inflamatórios em estruturas adjacentes.

Além do emprego de analgésicos para o alívio da dor metastática, há, ainda, a radioterapia local de lesões isoladas e hemicorporal nas disseminadas e a quimio e hormonioterapias de tumores que respondam a esses métodos.

Os fármacos utilizados para o alívio da dor indicados segundo a Organização Mundial da Saúde estão divididos em três classes: os anti-inflamatórios não hormonais, os opiáceos fracos e os fortes. Essas três classes não agem sobre a evolução das metástases e seus efeitos são transitórios, o que leva a freqüentes alterações nos esquemas de medicação e administração de doses crescentes. A cirurgia feita com fins de analgesia pela ressecção de ramos nervosos tem o inconveniente de determinar paralisia, incontinência urinária e fecal, mas é indicada em alguns casos, muito embora tenha sido observada uma redução em sua aplicação a medida que novos fármacos entram no mercado. (Hospital do Câncer, 2002).

Radiofármacos como o $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ (Samário-153 etilenodiaminotetrametileno fosfonato) são indicados quando a dor é decorrente de metástases ósseas em múltiplos sítios, confirmado por cintilografia com $^{99\text{m}}\text{Tc-MDP}$ (Tecnécio-99 metaestável metileno difosfonato), principalmente quando a radioterapia externa atinge grande extensão de tecidos sadios com resultados pouco eficientes e de curta duração.

1.2 Samário-153-EDTMP

Muitos radionuclídeos emissores de radiação gama e partículas beta são utilizados na medicina nuclear tanto para diagnóstico como para terapia (O'Mara e col., 1969, Wheldon & O'Donoghue, 1990; Allen & Blagoyevic, 1996).

As características desejáveis para uso em medicina nuclear no tratamento da dor metastática óssea são: afinidade biológica pela metástase, meia-vida física de acima de 12 horas e inferior a cinco dias, energia beta média entre 100 a 1000 keV, poder de penetração em tecidos biológicos da ordem de 0,2 a 5,0 mm, energia gama suficiente para a obtenção de imagens da distribuição corporal, formar um composto estável, não tóxico e com alto grau de pureza química e radioquímica, eliminação rápida da corrente sanguínea, pouca

deposição em tecidos moles e excreção por via urinária (Lewington, 1993; Srivastava, 2002).

O ^{153}Sm é um radioisótopo que emite partículas beta de $E_{\text{méd}}$ 0,29 MeV e $E_{\text{máx}}$ 0,81 MeV, raios gama de 103 keV (28% de abundância) e decai para o Európio-153, ^{153}Eu , um elemento químico estável, não-radioativo. O ^{153}Sm foi utilizado pela primeira vez por O'Mara e col. (1969) para a obtenção de imagens de tumores há três décadas e proposto para ser usado em imagens ósseas (Ftacnikova, 1996). Atualmente tem sido aplicado no tratamento paliativo da dor resultante de metástase óssea e se acumula preferencialmente nas regiões onde há atividade osteoblástica (Goeckeler, 1998). A indicação para a aplicação da dose de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ é no período anterior ao da administração de opiáceos fortes, ou seja, quando a dor passa do nível considerado moderado para intenso.

As metástases ósseas estão associadas à formação e destruição de tecido ósseo mediado por osteoclastos. À medida que ocorre o crescimento do tumor, essas células secretam fatores humorais que estimulam a proliferação local de osteoclastos (Galasko, 1976).

No Brasil, o $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ tem sido produzido e comercializado em frascos contendo 3700 MBq (100 mCi) em 2mL de solução estéril, pH 7,0 a 7,5, desde 1993, pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN - CNEN/SP). Na Europa, tem sido utilizado desde 1998 e nos Estados Unidos, desde 1999, com o nome comercial de Quadramet® (Samarium Sm 153 Lexidronan injection, DuPont) (Brasil Nuclear, 2002).

O $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ tem apresentado bons resultados no alívio da dor em pacientes com metástase óssea (Collins e col., 1993; Bayouth e col., 1994; Alberts e col., 1995; Bruland e col., 1996; Resche e col., 1997). Uma única dose apresenta efeito analgésico por períodos que duram de 3 meses a um ano (Collins e col., 1993). O mecanismo de ação do $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ não é descrito na literatura mas estudos *in vitro* mostraram que a energia das radiações gama e beta do $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ pode causar lesões às células ósseas adjacentes ao sítio de deposição e ao eliminá-las por apoptose (Shou-Peng e col., 1997, 1999).

Atualmente, o $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ é utilizado somente quando o paciente se mostra refratário ao tratamento com analgésicos.

De acordo com o trabalho realizado por Bayouth e col. (1994), o paciente deve apresentar plaquetas em quantidade superior a $100.000/\text{mm}^3$, pois, após a administração do

^{153}Sm -EDTMP, ocorre diminuição no número de plaquetas ao redor da segunda semana e outra mais acentuada na terceira semana, sendo que os níveis normais são recuperados após aproximadamente seis semanas.

A aplicação do Samário-153 é promissora, pois apresenta vantagens frente a outros radionuclídeos (TAB. 1 e 2) como o Iodo-131, Ytrium-90, Fósforo-32, Estrôncio-89 e o Rhenium-186 (Lewington, 1993).

O ^{153}Sm apresenta uma meia-vida física mais curta (1,9 dias) que os outros radionuclídeos de uso terapêutico e o efeito da radiação aliviando a dor ocorre durante a meia-vida biológica que é de 22 dias (Bayouth e col., 1994). Além disso, o tempo de isolamento da área e de equipamentos no caso de uma eventual contaminação será menor. A baixa energia beta garante que não haverá prejuízo dos tecidos sadios adjacentes ao sítio metastático. Já, a energia gama de 103 keV permite realizar a cintilografia após a sua administração e acompanhar a deposição nos diversos sítios metastáticos.

TABELA 1. Propriedades físicas dos radionuclídeos de uso terapêutico.

Radionuclídeo	Meia-vida física $T_{1/2}$ (dias)	Energia beta $E_{\text{máx}}$ (MeV)	Energia beta E_{med} (MeV)	Energia gama (keV)	Alcance médio (mm)
^{153}Sm	1,9	0,8	0,3	103	0,5
^{131}I	8,1	0,6	-	365, 637	0,4
^{186}Re	3,7	1,1	0,3	137	1,0
^{32}P	14,3	1,7	0,7	-	3,0
^{89}Sr	50,5	1,5	0,6	-	2,4
^{90}Y	2,7	2,3	-	-	-

Fonte: Atkins, 1998; Srivastava, 2002.

Um aspecto positivo da utilização do ^{153}Sm -EDTMP em relação ao $^{89}\text{SrCl}$ está no tempo de resposta mais rápido. Em relação ao ^{186}Re -HEDP a vantagem está na possibilidade de tratamento sem a necessidade de internação, representando uma diminuição no custo do tratamento. O $^{89}\text{SrCl}$ não permite que haja o acompanhamento por cintilografia pois este não emite raios γ (Lewington, 1993).

Do ponto de vista clínico, o ^{32}P apresenta o inconveniente de que 87% dos pacientes apresentam, entre 5 e 6 semanas após a terapia, uma supressão da medula óssea com pancitopenia. A meia-vida de 50,6 dias do ^{89}Sr impede o tratamento fracionado. Já o ^{186}Re -HEDP leva a uma mielossupressão dentro de 4 semanas e o complexo ligante é pouco estável. No caso do ^{90}Y há alta absorção no fígado e no do ^{131}I , os resultados paliativos duram de uma a oito semanas em 50% dos pacientes (Lewington, 1996).

TABELA 2 - Comparação entre os radiofármacos de uso corrente para o alívio da dor causada por metástase óssea.

	$^{89}\text{Sr-Cl}$	$^{153}\text{Sm-EDTMP}$	$^{186}\text{Re-HEDP}$
Terapia sem internação	sim	sim	não
Possibilita imagem	não	sim	sim
Tempo de resposta	após 14 d	após 2 d	após 2 d
Porcentagem de pacientes com resposta positiva ao tratamento	75	61-90	80-90

Fonte: Lewington, 1993.

O $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ pode se depositar nos tecidos moles, mas é encontrado em maior quantidade nas regiões de alta atividade osteoblástica (de 10 a 85%) e é rapidamente excretado pela urina (depuração de 12 a 14 horas) (Farhanghi e col., 1992; Lewington, 1993; Goeckeler e col., 1993; Bayouth e col., 1994). É possível acompanhar a quantidade de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ excretada recolhendo-se o volume de urina eliminado nas horas subsequentes à administração e medindo-se a atividade (Bayouth e col., 1994). A eliminação depende da absorção ocorrida nos sítios metastáticos e da função renal do paciente.

A depuração do compartimento sangüíneo é exponencial e praticamente total ao final de aproximadamente duas horas (Singh e col., 1989; Bayouth e col., 1994).

Estudos clínicos, farmacocinéticos e de biodistribuição em coelhos (Goeckeler e col., 1987), ratos (Logan e col., 1987), cães (Lattimer e col., 1990) e em pacientes (Logan e col., 1987; Singh e col., 1989; Farahanghi e col., 1992; Eary e col., 1993; Resche e col., 1997) já foram realizados e os resultados mostraram que o $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ nas atividades utilizadas não apresentava efeitos colaterais significativos.

Porém, pouco se sabe sobre os efeitos de radiofármacos utilizados em medicina nuclear, entre eles o do $^{153}\text{Sm-EDTMP}$, em nível celular. O conhecimento dos efeitos em células é importante para avaliar o potencial genotóxico, ou seja, como e quanto o material genético é afetado e quais seriam as conseqüências a curto e longo prazos.

Os efeitos da radiação gama de vários radioisótopos já foram descritos em vários tipos celulares (Hall & Wells, 1988), porém, poucos são os estudos a respeito dos efeitos da partícula beta. Podemos citar a avaliação de dano citogenético do radionuclídeo Cerium-144 em células hepáticas de hamsters (Brooks, 1974), da água triciada em linfócitos (Vulpis, 1984) e do Estrôncio/Ytrium-90 em linfócitos humanos (Vulpis & Scarpa, 1986; Oliveira e col., 2001).

Estudos comparativos mostraram que a radiação alfa de alta transferência linear de energia (LET) é mais eficiente que a beta e a gama de baixa transferência linear de energia na produção de danos cromossômicos (Rosin & Ochs, 1986).

Em relação ao $^{153}\text{Sm-EDTMP}$, há quatro trabalhos: os de Shou-Peng e colaboradores (1997, 1999) que analisaram células tumorais ósseas de ratos quanto à ocorrência de apoptose *in vitro*, os de da Silva (2001) e da Silva e colaboradores (2002) que analisaram linfócitos periféricos de pacientes com metástase óssea quanto à ocorrência de aberrações cromossômicas *in vivo* e *in vitro*.

Consta ainda o trabalho de O'Duffy e colaboradores (1999) que analisaram o efeito citogenético em linfócitos de pacientes submetidos a sinovectomia, ou seja, aplicação localizada de $^{153}\text{Sm-PHYP}$ (hidroxiapatita).

1.3 Técnica do micronúcleo

O dano ao DNA, tanto por agentes químicos como físicos, pode ser avaliado em vários tipos celular por meio de análises citogenéticas (aberrações cromossômicas, troca entre cromátides irmãs, micronúcleo) e bioquímico (teste do cometa), associado ou não a técnicas moleculares como a hibridização *in situ* fluorescente (FISH).

Entre as técnicas citogenéticas, o teste do micronúcleo pelo método do bloqueio citocinético utilizando a citocalasina-B em células interfásicas foi desenvolvido por Fenech & Morley em 1986. Contando-se os micronúcleos somente nas células binucleadas, é possível analisar o efeito nas células que entraram em divisão celular por ação da fitohemaglutinina e passaram por uma divisão do núcleo (Högstedt, 1984). Anterior à utilização da Citocalasina-B, a contagem de micronúcleos era subestimada, uma vez que

mesmo as células que não passaram por uma divisão celular também eram contadas (Fenech, 2000).

A FIGURA 1 mostra esquematicamente a formação de micronúcleos em células mononucleadas sem a utilização de citocalasina B e em células binucleadas com citocalasina-B.

Essa técnica apresenta várias vantagens frente à análise convencional de aberrações cromossômicas: maior facilidade na identificação de dano (diminuição do tempo de análise) e a possibilidade de diferenciação entre agentes clastogênicos e aneugênicos (em combinação com sondas centroméricas e teloméricas).

O teste do micronúcleo também é utilizado em biomonitoramento humano, ecotoxicologia e dosimetria biológica, pois apresenta uma relação dose dependente frente a vários agentes genotóxicos (Miller e col., 1998).

Os micronúcleos (MN) são corpos esféricos encontrados no citoplasma com forma e coloração semelhante ao do núcleo principal. Os fragmentos acêntricos ou cêntricos e cromossomos inteiros podem se perder durante a divisão nuclear, dando origem a micronúcleos (Fenech & Neville, 1992). A perda de cromossomos inteiros pode se dar quando há alteração na formação do fuso mitótico (centríolos, tubulina, microtúbulos) ou quando há alterações complexas na estrutura do cromossomo (centrômeros, cinetócoros), resultando em células filhas com um dos núcleos aneuplóide.

Quando um agente causa quebra na fita de DNA dando origem a fragmentos, o agente é chamado clastogênico. Quando um agente causa perda de cromossomos inteiros é chamado aneugênico. A radiação é tanto clastogênica quanto aneugênica e o teste do micronúcleo é capaz de detectar ambos os fenômenos (Eastmond & Tucker, 1989).

Analisando-se o número de micronúcleos por célula binucleada em linfócitos periféricos humanos expostos a radiações tanto de baixa (Countryman & Heddle, 1976; Streffer e col., 1998) quanto de alta (Huber e col., 1994; Vral e col., 1994) transferência linear de energia (LET) *in vitro*, observou-se uma relação crescente em função da dose absorvida cuja unidade de medida é o gray (Gy). Essa unidade de medida substituiu o rad, sendo que 1Gy equivale a 100 rad.

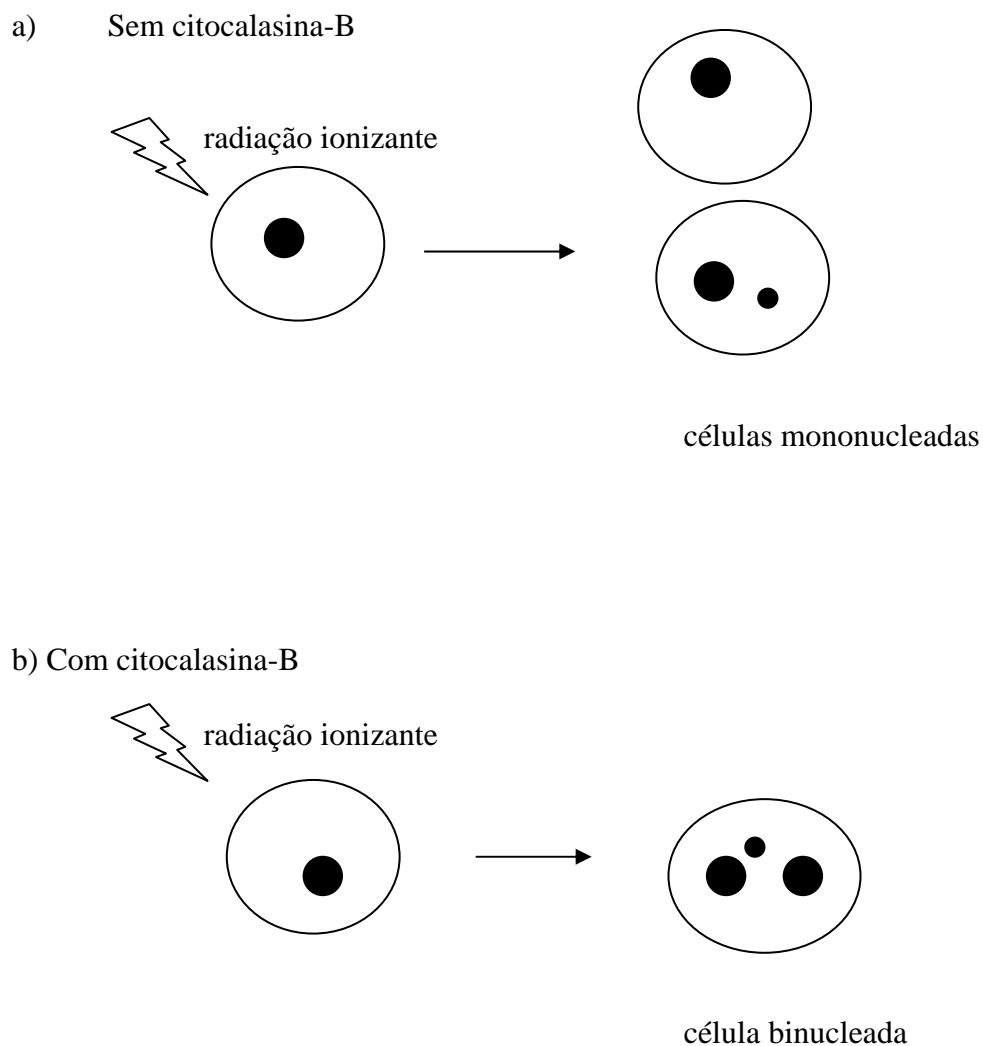


FIGURA 1 - Esquema da formação de micronúcleos após uma divisão celular sem e com citocalasina-B. O método de bloqueio com uso da citocalasina-B permite a análise de micronúcleos em células binucleadas, ou seja, nas células que passaram por apenas uma divisão nuclear após o tratamento.

A utilização de linfócitos sanguíneos apresenta vantagens frente a outros tipos celulares, pois esses apresentam uma maior radiosensibilidade e são de fácil obtenção por punção venosa, além de circular por todos os tecidos do corpo.

Quanto à utilização do teste para avaliação do dano celular induzido por radionuclídeos de uso na medicina nuclear, podemos citar estudos sobre a ação do ^{131}I em pacientes com hipertireoidismo e carcinoma de tireóide (Wuttke e col., 1996; Gutierrez e col., 1997; Watanabe e col., 1998a) e do ^{89}Sr em linfócitos de pacientes com metástase óssea (Watanabe e col., 1998b).

O estudo expondo o sangue de pacientes com câncer à radiação ionizante *in vitro* pode revelar diferenças no número de radiolesões não reparadas (micronúcleos) quando comparados com amostras de indivíduos saudáveis (Ochi-Lohmann e col., 1996; Le Roux e col., 1998).

A obtenção do valor basal antes da irradiação e a construção de curvas dose-resposta individuais são úteis para se avaliar a resposta dos pacientes antes, durante e após o tratamento (Fenech e col., 1990; Gantenberg e col., 1991). Estudos têm sido conduzidos também em células imortalizadas, tanto normais quanto originadas de tumores, assim como de indivíduos com deficiências relacionadas a enzimas de reparo do DNA (Ban e col., 2001).

O dano ao DNA não reparado ou reparado erroneamente pode ser transmitido para células filhas ou levar a célula à morte por apoptose (morte celular programada) ou necrose. Esses dois fenômenos podem ser analisados na mesma preparação utilizada para quantificar os micronúcleos (Vral e col., 1998). Os critérios morfológicos utilizados para reconhecer células apoptóticas são a presença de núcleo picnótico ou fragmentado e membranas nuclear e citoplasmática preservadas.

O teste do micronúcleo em linfócitos periféricos humanos é uma das técnicas indicadas pela Agência Internacional de Energia Atômica para estimar a dose absorvida em casos de suspeita de exposição a fonte de radiação externa de forma acidental ou ocupacional (IAEA, 2001). Outra técnica utilizada é a análise de aberrações cromossômicas, com e sem hibridização *in situ* com fluorescência (FISH).

Para a estimativa de dose absorvida, ressalta-se a necessidade da obtenção de curvas dose-resposta para as diferentes qualidades de radiação (Mill e col., 1996), reprodutíveis em laboratórios diferentes e apresentando uma sensibilidade entre 0,05 e 0,10 Gy.

Há dados *in vitro* obtidos para radiação gama que comprovam a aplicabilidade do teste para fins dosimétricos (Fenech & Morley, 1986; Prosser e col., 1988; Barquinero e col., 1995), confirmando a ocorrência de diferenças na radiosensibilidade entre indivíduos (Rosin & Ochs, 1986).

Quanto à sensibilidade do teste do micronúcleo, se a frequência basal individual é conhecida, exposições de 0,05 Gy ou 5 rad podem ser detectadas; caso contrário, sem esta informação, o nível de detecção passa a ser de 0,10 Gy ou 10 rad (Prosser e col., 1988).

Estudo feito em radioacidentados de Chernobyl revelou que índices de MN obtidos *in vivo* correlacionaram-se aos valores de dose absorvida obtidos *in vitro* (Livingston e col., 1997). Variações podem ocorrer devido às condições de cultivo *in vitro* por não mimetizarem totalmente as condições *in vivo*. Embora os meios de cultura em termos de mistura de vitaminas sejam adequados, outros fatores séricos considerados antioxidantes potentes, como o ácido úrico e a albumina, estão em concentrações mais baixas que aquelas observadas *in vivo* (Kirsch-Volders & Fenech, 2001).

A avaliação do efeito genotóxico por meio da técnica do micronúcleo pode ser complementada com a avaliação do efeito citotóxico. Uma célula com o DNA danificado pode reparar corretamente esse dano ou expressá-lo na forma de micronúcleo ou ainda, iniciar um processo de apoptose (morte celular programada) ou necrose (FIG. 2) (Fenech, 1998; Fenech e col, 1999a).

Boreham e colaboradores (1996) mostraram que a indução da apoptose é proporcional à dose de radiação em linfócitos periféricos humanos expostos à radiação gama de ^{60}Co e raios X *in vitro*, sendo que a resposta máxima foi alcançada após 72h.

Portanto, é importante analisar não somente os efeitos genotóxicos como também os citotóxicos para uma melhor compreensão dos eventos biológicos envolvidos na resposta celular frente a um agente agressor.

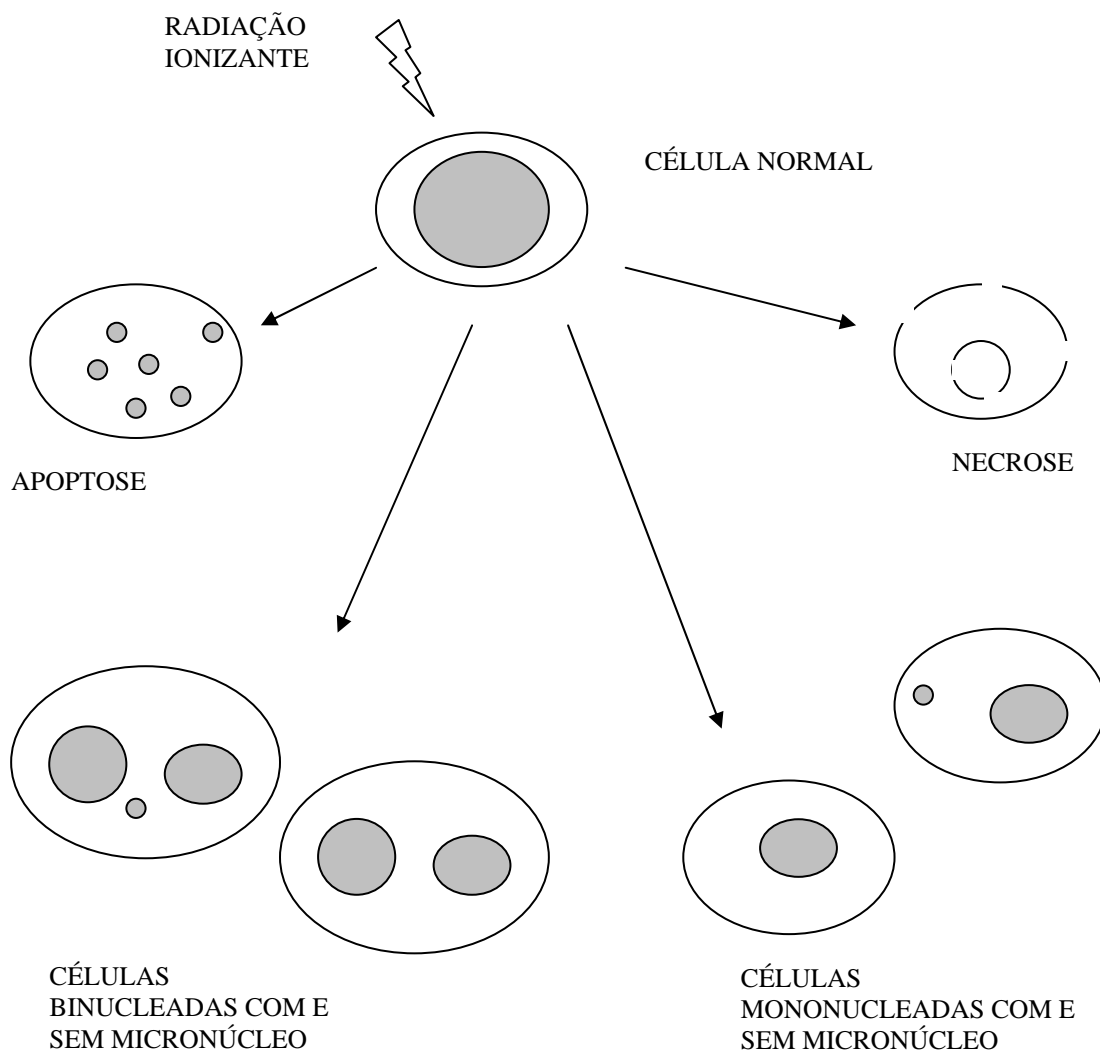


FIGURA 2 - Esquema do efeito citotóxico (apoptose e necrose) e genotóxico (células mono e binucleadas com e sem micronúcleos) após a célula ser atingida pela radiação ionizante. As células binucleadas são obtidas com a adição de citocalasina B à cultura celular.

1.4 Morte celular

Há duas formas de morte celular: a interfásica e a reprodutiva. Na morte interfásica, a célula perde sua função metabólica por processo necrótico ou apoptótico (TAB. 3). Na morte reprodutiva, a célula mantém suas funções, mas perde a capacidade de se dividir.

A necrose resulta de dano externo com colapso do metabolismo celular e perda da homeostase iônica. A célula necrótica libera seu conteúdo intracelular com o rompimento da membrana, provocando uma resposta inflamatória que afeta as células vizinhas de forma a causar dano ao tecido.

A apoptose ou morte celular programada é mediada geneticamente por sinais internos e externos que estimulam a produção de enzimas que causam a morte. A célula apoptótica perde contato com as células vizinhas, se destacando do tecido, diminui de tamanho e condensa a cromatina (Kerr e col., 1972). O DNA é degradado em regiões internucleossomais gerando fragmentos múltiplos de 180 pares de base. Os fragmentos de DNA são envolvidos por membranas e formam os corpos apoptóticos. Os macrófagos fagocitam estes corpos evitando que se inicie uma resposta imune.

A apoptose ocorre durante a embriogênese e a organogênese, e em animais adultos pluricelulares é um processo importante na manutenção da homeostase tecidual e na destruição de células infectadas e tumorais.

O descontrole dos mecanismos apoptóticos está presente em doenças como a AIDS, algumas doenças neurodegenerativas, doenças renais e câncer, tanto na transformação maligna como na progressão tumoral (Harrington e col, 1994).

Vários estímulos podem induzir a apoptose, entre eles estão a radiação (Szumiel, 1994), certos medicamentos quimioterápicos, falta de fatores de crescimento, hipertermia e glucocorticóides (Fisher, 1994).

A radiação pode induzir tanto apoptose quanto atraso do ciclo celular. Isto ocorre devido à cascata enzimática que se inicia com a ativação de vários genes. Os estudos realizados com células tumorais têm mostrado que genes supressores de tumor, como o p53, e alguns oncogenes estão envolvidos no processo que iniciam a apoptose em detrimento de um atraso no ciclo celular (*checkpoint*) para o reparo de danos ao DNA. Outros genes como o Bax, Bad, Bcl-X, Mcl-1, A1, p21 e GADD45, também estão envolvidos.

TABELA 3 - Diferenças entre apoptose e necrose.

Apoptose	Necrose
Membrana citoplasmática com evaginações, núcleo picnótico apresentando condensação da cromatina, formação de corpos apoptóticos com organelas intactas sem liberação de enzimas tóxicas.	Perda da integridade da membrana citoplasmática, entrada de íons no citoplasma e mitocôndrias, lise de organelas e liberação de enzimas tóxicas.
Processo ativo com ativação de cascata de enzimas como as caspases e fragmentação do DNA com tamanho múltiplo de 180 pares de base.	Processo passivo, sem gasto de energia, perda da regulação da homeostase iônica, fragmentação aleatória do DNA.
Dependendo do tipo de indução a apoptose pode ocorrer rapidamente via membrana ou citoesqueleto após 15 minutos ou quando ocorre dano direto ao DNA em 24 horas.	Não há correlação clara entre tipo de dano e tempo.
Ocorre em condições fisiológicas normais e pode ser iniciado por estímulos específicos via membrana (Fas, TNF, ceramide, MEKK1, caspases), microtúbulos (Ras, MEKK1, Bax, caspases) e dano ao DNA (Bax, caspases).	Ocorre quando as células são irreversivelmente danificadas por extremos de temperatura, pH, hipoxia, agentes tóxicos variados ou indutores de dano à membrana ou trauma físico (manipulação).
Morte de células isoladas, sem resposta inflamatória ou dano ao tecido. Fagocitose dos corpos apoptóticos por macrófagos próximos.	Morte de grupo de células com resposta inflamatória e dano ao tecido.

Fonte: Blank e col., 1997; Kirsch-Volders & Fenech, 2001.

O gene p53 quando expresso em grande quantidade causa atraso do ciclo celular em G1. A apoptose p53 dependente ocorre em vários tipos celulares como resposta ao dano radioinduzido ou a ação de muitas drogas quimioterápicas, por alterações na permeabilidade das membranas (Ramakrishnan e col., 1993) ou por quebras na fita dupla do DNA (revisado por Hall, 1994).

Durante o atraso em G1, a célula ativa o sistema de reparo do dano ao DNA e caso não seja reparado corretamente, a célula entra em apoptose. A apoptose pode ocorrer de uma forma p-53 dependente ou independente (Olive & Durand, 1997; Pouget & Mather, 2001). As mutações no gene p53 têm sido observadas em tumores de estômago, pulmão e bexiga que respondem muito pouco ao tratamento radioterápico ou por quimioterápicos que induzem quebras na fita dupla do DNA. Por outro lado, tumores como o de Wilms, carcinoma testicular e leucemia linfoblástica aguda apresentam alto índice de apoptose como resposta a tratamentos radioterápicos e apresentam o p53 selvagem. A resistência à apoptose pode ser entendida como sendo uma das causas de grande parte das falhas no tratamento de tumores (Fisher, 1994).

A apoptose pode ser observada em células irradiadas com doses tão baixas quanto 0,05 Gy quando analisadas após 24h, 48h ou 72h (Boreham e col., 1996; Menz e col., 1997).

1.5 Instabilidade genética

A associação entre rearranjo cromossômico e câncer sugere que a instabilidade cromossômica pode estar de alguma forma envolvida neste fenômeno (Machado & Menck, 1997; Lengauer e col., 1998; Toncheva & Nacheva, 1998; Ribas e col., 1999; Ban e col., 2001; Fenech, 2002). A importância das alterações genômicas na progressão dos tumores justifica a relevância dos estudos dos mecanismos envolvidos no aparecimento da instabilidade cromossômica. Uma pequena parcela dos tumores apresenta instabilidade em nível de nucleotídeos (substituição, deleção ou inserção). Na maioria dos cânceres, a alteração ocorre em nível cromossômico com perda ou ganho de cromossomos inteiros ou parte de um cromossomo (Lengauer, 1998). Por exemplo, a perda do cromossomo 10 em glioblastomas (Wang, 1997) e ganho do cromossomo 7 em carcinoma renal (Zhuang, 1998).

A exposição à radiação tem sido relacionada com o aumento da incidência de câncer de tireóide e leucemias (Chernobyl, Hiroshima, Nagasaki) uma vez que a radiação

induz mutações gênicas, aberrações cromossômicas e morte celular. As células irradiadas apresentam ainda uma tendência ao aumento ou diminuição do número de cromossomos (aneuploidia). Os efeitos da radiação em nível celular são decorrentes de mudanças ocorridas durante a duplicação ou no reparo de danos do DNA. As células filhas podem apresentar atraso na morte reprodutiva e aberrações cromossômicas. Portanto, a radiação ionizante pode induzir instabilidade cromossômica transmissível, resultando em efeitos variados mesmo depois de vários ciclos mitóticos (Sabatier e col., 1995).

A transformação oncogênica é um processo com várias etapas sendo a frequência de mutações da ordem de 100 a 1000 vezes mais alta nas células irradiadas que em células não irradiadas (Watanabe e col., 1997). A instabilidade tem sido observada como retardo na expressão de mutações letais, taxa aumentada de acúmulo de alterações hereditárias sub-letais e progressiva heterogeneidade cromossômica intraclonal (Kronenberg, 1994).

Uma grande variedade de células tumorais apresenta múltiplas anormalidades cromossômicas. Pacientes com leucemia e linfomas apresentam anormalidades no cariótipo, sendo vários com translocações específicas. Os portadores de síndromes de quebra cromossômica relacionadas com a perda da função de enzimas de reparo apresentam uma alta incidência de câncer, como o xeroderma pigmentosum (alta sensibilidade à radiação UV), ataxia telangectasia (alta sensibilidade à radiação ionizante), síndrome de Bloom (alta sensibilidade à radiação) e anemia de Fanconi (alta sensibilidade a agentes químicos que formam ligações cruzadas) (Machado & Menck, 1997).

Em algumas situações, a predisposição genética pode acelerar o processo tumorigênico. A perda do gene p53 selvagem está relacionada com a instabilidade cromossômica e a amplificação gênica, pois inibe o atraso em G1, permitindo a passagem para a fase S sem reparo dos danos radioinduzidos e também inibe a iniciação do processo apoptótico em células danificadas (Livingstone e col., 1992). Outros genes podem também influir no processo da instabilidade; entre eles podemos citar o hMSH2, hMLH1, RAD52, bcl2.

A variabilidade interindividual na expressão da instabilidade radioinduzida pode ser avaliada pela medida da frequência de micronúcleos em pacientes com câncer. A influência de genes alterados de reparo ou a presença de alguns genes relacionados à instabilidade cromossômica têm sido consideradas fatores importantes para o aumento do número de micronúcleos em células tumorais (Ban e col., 2001). Embora alguns autores tenham observado um aumento de micronúcleos em linfócitos de pacientes com câncer de

pele (Fenech e col., 1990) e portadores de genes alterados de BRCA1 (Rothfuss e col., 2000), outros como Gil e col. (2000) e Slonina & Gasinska (1997) não observaram diferença entre os pacientes com câncer e os controles. Venkatachalam e col. (1999a) verificaram que os pacientes com câncer apresentavam uma frequência espontânea de MN mais alta que os indivíduos saudáveis ao realizarem um estudo com 23 pacientes sem prévio tratamento quimio ou radioterápico e 21 saudáveis.

A instabilidade genética depende do tipo celular em estudo, da localização do tumor primário e da influência hereditária (Brooks, 1999; Fenech, 2002).

2. OBJETIVOS

Considerando-se os poucos estudos referentes aos efeitos de radionuclídeos utilizados em medicina nuclear, particularmente em nível celular, o presente trabalho foi realizado, focalizando os seguintes aspectos:

a) avaliar efeitos citogenéticos do $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ em linfócitos periféricos de pacientes com metástase óssea, uma hora após a administração endovenosa do radiofármaco por meio do teste do micronúcleo;

b) analisar as frequências de micronúcleos em linfócitos periféricos de pacientes com metástase óssea submetidos a diferentes concentrações radioativas de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ *in vitro*, comparando com as de indivíduos sadios por meio da elaboração de curvas dose-resposta.

c) averiguar os efeitos citotóxicos do $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ em células sanguíneas de pacientes com metástase óssea submetidas a diferentes concentrações radioativas de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ *in vitro*, por meio da análise de células apoptóticas e necróticas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Doadores

Para a análise de indução de micronúcleo pelo $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ *in vivo* e *in vitro*, foram processadas amostras sanguíneas de 31 doadores, sendo 11 indivíduos sadios (grupo A) e 20 pacientes com metástase óssea. Desses, 10 eram sem prévio tratamento radioterápico (grupo B) e 10 com tratamento radioterápico (grupo C).

As informações dos doadores quanto a idade, grupo, sexo, atividades injetadas de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$, porcentagem da atividade excretada na urina, tipo do tumor primário, peso e atividade por massa corpórea encontram-se na TABELA 4.

O grupo A foi composto por 11 doadores, seis homens e cinco mulheres, idade média de 32 ± 8 anos, sem histórico de irradiação (diagnóstico ou terapêutico) e sem ingestão de qualquer droga (medicamento) por ocasião da coleta de sangue. A ingestão de algumas drogas pode induzir o aparecimento de micronúcleos.

O grupo B foi constituído de 10 pacientes, nove homens e uma mulher, com idade média de 69 ± 10 anos, sem tratamento radioterápico prévio, sendo oito com câncer de próstata, uma de mama e um de pulmão.

Já o grupo C, composto de sete homens e três mulheres, apresentou idade média de 65 ± 11 anos, cinco com câncer de próstata, uma com câncer de mama, uma de ovário, um de fígado, um de pulmão e uma de sarcoma. Todos já haviam sido submetidos a radioterapia externa com doses fracionadas de 1,8 a 2,0 Gy/dia, em acelerador linear de elétrons, com duração de 5 a 6 semanas, resultando em dose cumulativa de 50 a 70 Gy. O intervalo entre o final da radioterapia e a administração do $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ variou de um mês a cinco anos.

Para a avaliação do efeito citotóxico do radiofármaco (indução de células necróticas e apoptóticas) foram analisadas amostras sanguíneas de quatro indivíduos sadios, dois do sexo masculino (40 e 42 anos) e dois do sexo feminino (28 e 38 anos), e três pacientes, duas com câncer de mama (56 e 67 anos) e outra com câncer de colo do útero (57 anos), sem prévio tratamento radioterápico (TAB. 5).

Todos os doadores foram esclarecidos sobre o tema da pesquisa e assinaram o termo de consentimento. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do

IPEN - CNEN/SP, sob número 006, 12/11/1998, e também pela Comissão de Ética para Análise de Projeto de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da FM - USP, sob no. 698/98, 10/03/1999.

3.2 Coleta de amostra sangüínea

Foram coletados 5 mL de sangue dos doadores sadios e dos pacientes, utilizando-se seringas e agulhas estéreis descartáveis ou tubos vacutainer contendo heparina como anticoagulante (Liquemine[®], Roche).

As amostras dos pacientes com metástase óssea foram coletadas por enfermeiras do Centro de Medicina Nuclear da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (São Paulo – SP). Para o ensaio de citotoxicidade, as amostras sangüíneas das pacientes foram fornecidas pelo Instituto de Radioterapia São Paulo (São Paulo – SP).

3.3 Ensaio *in vivo*

Para a averiguação do efeito citogenético do ¹⁵³Sm-EDTMP foram processadas amostras sangüíneas de 10 pacientes dos grupos B (sem prévio tratamento radioterápico) e 10 do grupo C (com prévio tratamento radioterápico). As amostras foram coletadas antes e uma hora após a administração endovenosa do radiofármaco. O tempo de uma hora foi considerado adequado pois apenas 10 % da atividade injetada de ¹⁵³Sm-EDTMP permanece no sangue após este período (Singh e col., 1989).

A atividade administrada no grupo B variou de 26 a 48 MBq/kg sendo a média do grupo de $42,0 \pm 6,5$ MBq/kg e no grupo C, variou de 34 a 50 MBq/kg, sendo a média de $41,1 \pm 5,1$ MBq/kg.

TABELA 4 - Dados individuais dos doadores para a análise do efeito genotóxico do $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ por meio da técnica do micronúcleo. Grupo A: sadios, Grupo B: pacientes sem tratamento radioterápico prévio e Grupo C: pacientes com tratamento radioterápico prévio.

Grupo	Doador	Idade	Sexo	Tipo de tumor primário	Peso (kg)	Atividade e injetada (MBq)	Atividade na urina (%)	Atividade por peso (MBq/kg)
A	A1	38	F					
	A2	25	M					
	A3	23	F					
	A4	27	M					
	A5	25	M					
	A6	35	M					
	A7	39	F					
	A8	36	F					
	A9	39	M					
	A10	41	F					
	A11	20	M					
		Média (d.p.)	32,8 (7,0)	5F 6M				
B	B1	62	F	Mama	142	3700	11	26
	B2	52	M	Próstata	76	2960	25	39
	B3	57	M	Próstata	56	2664	11	48
	B4	68	M	Pulmão	67	2664	21	40
	B5	71	M	Próstata	73	3034	31	42
	B6	66	M	Próstata	61	2812	n.d.	46
	B7	76	M	Próstata	70	3330	n.d.	48
	B8	82	M	Próstata	43	2035	n.d.	47
	B9	76	M	Próstata	49	2146	n.d.	44
	B10	78	M	Próstata	70	2886	n.d.	41
		Média (d.p.)	68,8 (9,7)	1F 9M		70,6 (27,3)	2823,1 (497,0)	19,8 (8,6)
C	C1	65	M	Próstata	40	1628	5	41
	C2	64	M	Fígado	77	2590	29	34
	C3	57	M	Próstata	70	2960	6	42
	C4	50	F	Mama	59	2812	15	48
	C5	60	M	Próstata	80	2775	13	35
	C6	73	M	Próstata	74	3145	n.d.	43
	C7	80	F	Sarcoma	50	2498	n.d.	50
	C8	76	M	Próstata	70	2812	n.d.	40
	C9	46	M	Pulmão	106	4033	n.d.	38
	C10	75	F	Ovário	78	3256	n.d.	42
		Média (d.p.)	64,6 (11,5)	3F 7M		70,4 (8,1)	2850,5 (610,7)	13,5 (9,6)

(n.d. - não determinado)

TABELA 5 - Dados individuais dos doadores para a análise do efeito citotóxico do ^{153}Sm -EDTMP por meio da técnica de coloração diferencial. Grupo A: sadios e Grupo B: pacientes sem tratamento radioterápico prévio

Grupo	Doador	Idade	Sexo	Câncer primário
A	A12	28	F	-
	A13	38	F	-
	A14	40	M	-
	A15	42	M	-
Média (d.p.)		37,0 (6,2)	2F 2M	
B	B11	67	F	Mama
	B12	56	F	Mama
	B13	57	F	Colo do útero
Média (d.p.)		60,0 (6,1)	3F	

3.4 Ensaio *in vitro*

Para averiguar a formação de micronúcleos induzidos pelo ^{153}Sm -EDTMP *in vitro* foram analisadas amostras sangüíneas de seis doadores do grupo A (indivíduos A1 - A6) e cinco do grupo B (indivíduos B1 - B5). Para a análise de indução de morte celular foram utilizadas amostras coletadas de quatro doadores do grupo A (indivíduos A12 - A15) e três do grupo B (indivíduos B11 - B13).

O ensaio consistiu em adicionar em tubos plásticos (Falcon) com fundo cônico, diâmetro de 1,5 cm e capacidade para 15 mL, 1 mL de sangue total, 3 mL de meio de cultura MEM e ^{153}Sm -EDTMP nas concentrações radioativas de 0,370; 0,555 e 1,110 MBq/mL por uma hora a 37°C.

O valor de 0,555 MBq/mL corresponde àquele que um homem referência com 70 kg de massa corpórea e 5200 mL de sangue (ICRP, 1974) receberia quando da administração de 37 MBq/kg de ^{153}Sm -EDTMP - atividade indicada segundo o protocolo do Centro de Medicina Nuclear - FMUSP/SP.

Após 1 hora de exposição, as células foram centrifugadas (1500 rpm, por 10 minutos), lavadas três vezes com 1 mL de meio de cultura MEM e centrifugadas (1500 rpm, por 10 minutos), recolhendo-se o sobrenadante. Ao final das lavagens, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio de cultura.

O sobrenadante foi recolhido e a atividade foi medida em contador (Capintec CRC 15R) devidamente calibrado para o ^{153}Sm . Após três lavagens com meio de cultura,

observou-se que toda a atividade adicionada ao sangue havia sido removida. A manipulação do sangue após as lavagens foi, portanto, livre de qualquer risco de contaminação com o radionuclídeo.

As áreas onde houve manipulação de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ foram monitoradas após o uso e quando da necessidade de descontaminação de bancada, a operação foi realizada por técnicos da Proteção Radiológica com a utilização de algodão e detergente. Todos os instrumentos, pipetas, tubos e frascos que entraram em contato com o $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ foram mantidos em área devidamente sinalizada (área supervisionada) para decaimento radioativo por 10 meias-vidas físicas (aproximadamente 20 dias), monitoradas e liberadas para uso novamente ou descarte em lixo hospitalar.

O radiofármaco utilizado $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ para o estudo *in vitro* foi fornecido pelo Centro de Radiofarmácia (CR - IPEN – CNEN/SP).

3.5 Cultura de linfócitos e técnica do micronúcleo

Neste estudo, foi utilizada a técnica descrita por Fenech & Morley (1985) com algumas modificações, para avaliar a ação do $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ em linfócitos periféricos humanos. A estimulação da proliferação dos linfócitos com fitohemaglutinina foi feita após a ação da radiação, já que os linfócitos circulantes estão na fase G_0 e precisam de um estímulo para que ocorra a transformação blástica e a divisão celular (mitose).

A citocalasina-B foi adicionada à cultura após 44 horas. Essa substância permite que ocorra a cariocinese (divisão do núcleo) e impede a citocinese (divisão do citoplasma). Dessa forma, as células apresentam dois ou mais núcleos dependendo da quantidade de divisões pelas quais passaram.

O sangue total no volume de 500 μL foi cultivado por 72 horas a 37°C em tubos de cultura de vidro com capacidade para 50 mL, contendo 4 mL de meio RPMI 1640 com sulfato de gentamicina e anfotericina B (Cultilab, Campinas -SP), enriquecido com 25% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas - SP) e 1,5% de fitohemaglutinina (Gibco BRL, Grand Island, EUA).

Decorridas 44 horas do início da cultura, adicionou-se citocalasina-B (Sigma, Saint Louis, EUA) na concentração final de 10 $\mu\text{g/mL}$ para bloqueio da citocinese e formação de células binucleadas.

Após 72 horas do início da cultura, as células foram transferidas para tubos plásticos de fundo cônico com capacidade de 15 mL, centrifugadas, ressuspensas em

solução isotônica de NaCl (0,85%), fixadas com metanol e ácido acético (3:1), gotejadas com pipeta Pasteur sobre lâminas histológicas sob vapor a 65°C e secas à temperatura ambiente por uma noite.

As lâminas foram coradas com Giemsa 5% em tampão Sorensen (pH = 6,8) por 20 minutos, enxaguadas duas vezes em água destilada e secas novamente à temperatura ambiente por uma noite. Procedeu-se, então, a montagem das lâminas com Permout para análise e arquivamento.

Seguindo o critério de Countryman & Heddle (1976) os micronúcleos foram quantificados em células binucleadas com citoplasma preservado, com tamanho menor que 30% dos núcleos filhos, com coloração igual ou mais tênue que o núcleo principal e que não estejam em contato com os núcleos principais.

As células mononucleadas (CM), binucleadas (CB) e multinucleadas (CMU) foram quantificadas para o cálculo do índice de proliferação (Surrallés e col., 1992): $I.P. = (CM + 2.CB + 3.CMU) / \text{total de células}$.

As contagens das células foram realizadas até completar no mínimo 450 células binucleadas, observando-se também as células mononucleadas, com ou sem micronúcleos (Kirsch-Volders & Fenech, 2001; Fenech e col., 2003). Todas as lâminas foram identificadas e serão mantidas no laboratório por 5 anos. A coloração das lâminas esmaece acima deste período e uma recoloração é inviável devido a adesão da lamínula com Permout. Os registros dos resultados das análises serão mantidos por 30 anos.

O aumento de 400 vezes (objetiva de 40x e ocular de 10x) foi utilizado para a análise das células em microscópio óptico (Carl Zeiss, modelo AXIOLAB) e a objetiva de imersão 100x para o registro fotográfico (filme Kodak colorido, ASA 100).

3.6 Coloração diferencial (células viáveis, necróticas e apoptóticas)

A técnica de coloração diferencial consistiu em adicionar dois corantes fluorescentes: alaranjado de acridine (Sigma, 1mg/mL) e brometo de etídio (Sigma, 1mg/mL) no volume de 1 µL (v/v 1:1) a 25 µL de sangue, gotejar em uma lâmina histológica, cobrir com lamínula e analisar ao microscópio de epifluorescência, com filtro triplo de excitação DAPI/FOTC/Texas red (400/495/570) e de barreira TBP (410, 505, 585).

As células viáveis coram-se em verde, as necróticas em laranja e as apoptóticas em verde (apoptose precoce) ou laranja (apoptose tardia) mas com condensações nucleares (Gorman e col., 1996).

As membranas citoplasmáticas e nucleares são permeáveis ao alaranjado de acridine. As células contendo o alaranjado de acridine são observados na cor verde. As membranas são impermeáveis ao brometo de etídio. As células com membranas danificadas são observadas na cor laranja. Assim sendo, as membranas das células viáveis e apoptóticas precoces, que permanecem íntegras, permitem a passagem somente do alaranjado de acridine e se coram em verde. As necróticas e apoptóticas tardias, que apresentam perda da integridade da membrana, permitem a passagem de ambos os corantes, sendo observadas na cor laranja.

Os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis, necróticas e apoptóticas no total de no mínimo 500 células por dose.

3.7 Cálculo da dose absorvida de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ na exposição *in vitro*

Os cálculos de dose absorvida para os experimentos realizados com $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ *in vitro* levaram em consideração as interações que ocorrem dentro da geometria do tubo plástico cilíndrico de fundo cônico, em células sanguíneas expostas por uma hora, associado ao cálculo do decaimento radioativo do $^{153}\text{Sm-EDTMP}$, utilizando códigos do programa Monte Carlo MCNP (versão 4B).

Estes cálculos foram realizados pelos pesquisadores Dr. Paulo R. P. Coelho, Dr. Paulo T. D. Siqueira e Dr. Helio Yoriyaz do Centro de Engenharia Nuclear (CEN - IPEN - CNEN/SP) para as concentrações de 0,370; 0,555 e 1,110 MBq/mL.

A utilização de dosímetros termoluminescentes (TLD) externos aos tubos que continham as amostras sanguíneas com 0,555 MBq/mL de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ não resultaram em doses acima do nível normal de radiação detectado no ambiente (*background*).

3.8 Análise estatística

Para verificar as diferenças entre os valores basais dos grupos A, B e C, aplicou-se a análise de variância (ANOVA Kruskal-Wallis) seguida do teste de comparações múltiplas de Dunn's dois a dois (Harvey, 1995).

O coeficiente de correlação de Pearson (r) foi calculado para verificar se havia influência da idade na frequência de micronúcleos.

Foi utilizado o teste t de Student emparelhado para as amostras obtidas antes e após o tratamento com $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ a fim de averiguar se houve alteração significativa com o tratamento.

Já as curvas dose-resposta para indução de micronúcleos e morte celular pelo $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ foram ajustadas pelo modelo de regressão linear segundo a equação: $Y = a + bD$, onde: Y = frequência de micronúcleos ou morte celular; a e b = coeficientes do modelo e D = dose de radiação em gray (Gy). Para a comparação das curvas obtidas, foi utilizado o teste t não emparelhado.

Todos os cálculos foram realizados utilizando-se o programa Prism 2.0 (GraphPad Software Inc., San Diego - CA, EUA).

4. RESULTADOS

Neste estudo, foram realizadas análises citogenéticas *in vivo* e *in vitro* utilizando-se a técnica do micronúcleo pelo método de bloqueio citocinético com citocalasina-B em linfócitos periféricos de doadores sadios e pacientes. As análises foram realizadas em células mono e binucleadas anotando-se o número de células sem e com micronúcleos (FIG. 3).

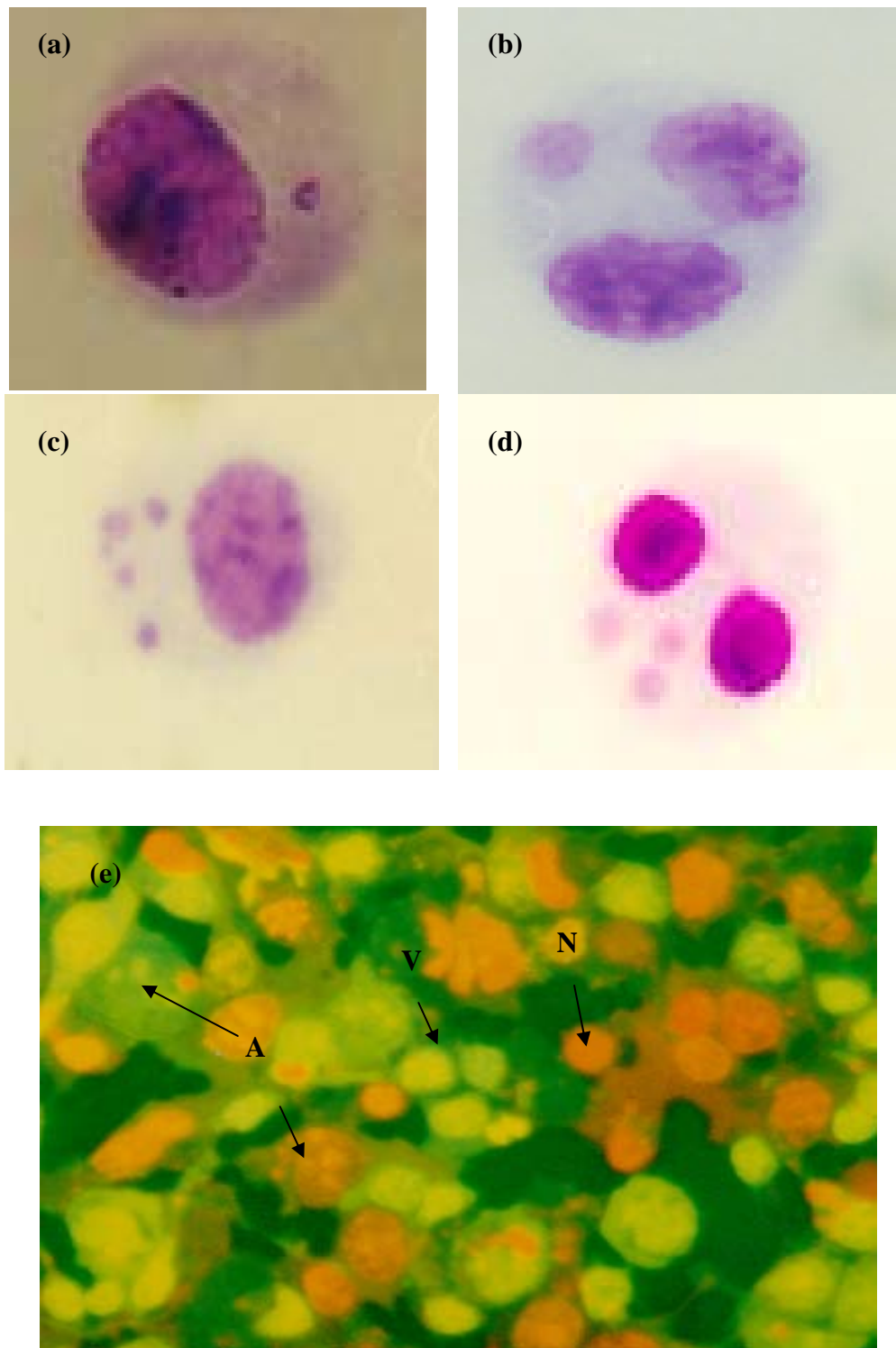


FIGURA 3 - Fotomicrografias de linfócitos humanos corados com Giemsa. (a) Célula mononucleada com um micronúcleo; (b) Célula binucleada com um micronúcleo; (c) Célula mononucleada com cinco micronúcleos; (d) Célula binucleada com três micronúcleos; (e) Coloração diferencial com alaranjado de acridine e brometo de etídio: V = célula viável (núcleo verde), N = célula necrótica (núcleo laranja) e A = célula apoptótica (núcleo laranja ou verde com condensações).

4.1 Efeito genotóxico do $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ *in vivo*

Os valores médios de micronúcleos em células mononucleadas e binucleadas obtidos nos ensaios *in vivo* estão apresentados nas TABELAS 6 e 7. Já os valores individuais das frequências de MN em células mononucleadas e binucleadas estão apresentados nas TABELAS 8 a 13.

4.1.1 Frequência de micronúcleos basal

A frequência basal de células micronucleadas (células contendo micronúcleos) em linfócitos binucleados (TAB. 7) foi mais alta nos pacientes (grupos B e C) que nos indivíduos saudáveis (grupo A). O mesmo ocorreu quando analisamos a distribuição do dano nas células binucleadas, ou seja, aquelas que apresentam pouco dano (um micronúcleo) e aquelas com dano mais severo (dois ou mais micronúcleos).

Do mesmo modo, quando verificamos a intensidade do dano, ou seja, o número de micronúcleos por célula binucleada (MN/CB), observamos que os indivíduos saudáveis (grupo A) apresentaram valores mais baixos ($0,025 \pm 0,015$) que os pacientes (grupo B) sem prévio tratamento radioterápico ($0,030 \pm 0,016$). Porém, a análise estatística (ANOVA) mostrou que não há diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) quanto à frequência basal entre os grupos A e B. Todavia, ambos diferem do grupo C ($P < 0,01$), cujo valor médio foi de $0,135 \pm 0,052$. Os pacientes que receberam tratamento radioterápico (RT) anterior ao $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ apresentaram frequência aumentada de micronúcleos.

O mesmo comportamento foi observado quando analisados em células mononucleadas (TAB. 6). O grupo A apresentou valor médio de MN/CM de $0,005 \pm 0,004$ e o grupo B, $0,007 \pm 0,003$, enquanto que o grupo C apresentou valores da ordem de cinco a sete vezes mais altos de MN/CM ($0,035 \pm 0,015$). Aplicando-se o teste estatístico ANOVA, observamos que o grupo A não difere do B ($P > 0,05$), mas o grupo C difere do grupo B ($P < 0,01$) e também do grupo A ($P < 0,001$).

TABELA 6 – Frequências de micronúcleos (MN) em células mononucleadas (CM) antes e uma hora após a administração de ¹⁵³Sm-EDTMP *in vivo* dos três grupos de doadores.

Grupo	Amostra	Total de CM	CM com nMN					Número total de CM com MN (%)	Número de CM com 1MN (%)	Número de CM com 2 ou mais MN (%)	Número total de MN (MN/CM)
			1	2	3	4	5				
A	Basal	122252	472	26	8	1	0	507 (0,51 ± 0,32)	472 (0,48 ± 0,29)	35 (0,03 ± 0,04)	552 (0,005 ± 0,004)
	1 hora	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	Basal	77945	470	49	8	1	1	529 (0,62 ± 0,25)	470 (0,54 ± 0,23)	59 (0,08 ± 0,04)	601 (0,007 ± 0,003)
	1 hora	88927	631	59	7	2	2	701 (0,85 ± 0,34)	631 (0,76 ± 0,32)	70 (0,09 ± 0,05)	788 (0,010 ± 0,004)
	Teste t emparelhado basal x 1 hora							P = 0,07 (n.s.)	P = 0,04 (*)	P = 0,56 (n.s.)	P = 0,10 (n.s.)
C	Basal	68497	1542	205	33	8	2	1790 (2,95 ± 1,28)	1542 (2,52 ± 1,10)	248 (0,43 ± 0,20)	2093 (0,035 ± 0,015)
	1 hora	80397	2197	300	57	9	3	2566 (3,76 ± 1,77)	2197 (3,18 ± 1,55)	369 (0,58 ± 0,30)	3019 (0,045 ± 0,021)
	Teste t emparelhado basal x 1 hora							P = 0,08 (n.s.)	P = 0,11 (n.s.)	P = 0,03 (*)	P = 0,06 (n.s.)

Teste t emparelhado: n.s. = não significativo, * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

TABELA 7 - Frequências de micronúcleos (MN) em células binucleadas (CB) antes e uma hora após a administração de ¹⁵³Sm-EDTMP *in vivo* dos três grupos de doadores.

Grupo	Amostra	Total de CB	CB com nMN					Número total de CB com MN (%)	Número de CB com 1MN (%)	Número de CB com 2 ou mais MN (%)	Número total de MN (MN/CB)
			1	2	3	4	5				
A	Basal	5619	118	7	2	0	0	127 (2,28 ± 1,34)	118 (2,12 ± 1,24)	9 (0,16 ± 0,21)	138 (0,025 ± 0,015)
	1 hora	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	Basal	7803	189	19	2	0	0	210 (2,74 ± 1,54)	189 (2,48 ± 1,47)	21 (0,26 ± 0,16)	233 (0,030 ± 0,016)
	1 hora	8455	205	24	4	1	1	235 (3,05 ± 1,25)	205 (2,69 ± 1,23)	30 (0,37 ± 0,24)	274 (0,035 ± 0,013)
	Teste t emparelhado basal x 1 hora							P = 0,43 (n.s.)	P = 0,52 (n.s.)	P = 0,47 (n.s.)	P = 0,34 (n.s.)
C	Basal	5510	491	83	24	4	1	603 (10,74 ± 3,91)	491 (8,70 ± 3,32)	112 (2,04 ± 1,32)	750 (0,135 ± 0,052)
	1 hora	5650	592	154	37	4	1	788 (14,10 ± 7,15)	592 (10,53 ± 4,76)	196 (3,58 ± 2,81)	1032 (0,185 ± 0,101)
	Teste t emparelhado basal x 1 hora							P = 0,07 (n.s.)	P = 0,15 (n.s.)	P = 0,08 (n.s.)	P = 0,07 (n.s.)

Teste t emparelhado: n.s. = não significativo, * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

TABELA 8 – Dados individuais referentes às frequências de micronúcleos (MN) em células mononucleadas (CM) dos doadores sadios (grupo A).

Grupo	Doador	Total de CM analisadas	CM com nMN					Número total de CM com MN (%)	Número de CM com 1MN (%)	Número de CM com 2 ou mais MN (%)	Número total de MN (MN/CM)
			1	2	3	4	5				
	A1	6945	54	2	0	0	0	56 (0,81)	54 (0,78)	2 (0,03)	58 (0,008)
	A2	19876	57	3	1	0	0	61 (0,31)	57 (0,29)	4 (0,02)	66 (0,003)
	A3	38274	78	8	1	0	0	87 (0,23)	78 (0,20)	9 (0,02)	97 (0,003)
	A4	15800	40	1	0	0	0	41 (0,26)	40 (0,25)	1 (0,01)	42 (0,003)
	A5	3016	12	0	0	0	0	12 (0,40)	12 (0,40)	0 (0,00)	12 (0,004)
A	A6	2062	4	0	0	0	0	4 (0,19)	4 (0,19)	0 (0,00)	4 (0,002)
	A7	6450	22	1	0	0	0	23 (0,36)	22 (0,34)	1 (0,02)	24 (0,004)
	A8	9931	38	3	0	0	0	41 (0,41)	38 (0,38)	3 (0,03)	44 (0,004)
	A9	4778	31	1	1	0	0	33 (0,69)	31 (0,65)	2 (0,04)	36 (0,008)
	A10	6799	44	1	1	0	0	46 (0,68)	44 (0,65)	2 (0,03)	49 (0,007)
	A11	8321	92	6	4	1	0	103 (1,24)	92 (1,11)	11 (0,13)	120 (0,014)
Totais basal (média ± d.p.)		122252	472	26	8	1	0	507 (0,51 ± 0,32)	472 (0,48 ± 0,29)	35 (0,03 ± 0,04)	559 (0,005 ± 0,004)

TABELA 9 - Dados individuais referentes às frequências de micronúcleos (MN) em células binucleadas (CB) dos doadores sadios (grupo A).

Grupo	Doador	Total de CB analisadas	CB com nMN					Número total de CB com MN (%)	Número de CB com 1MN (%)	Número de CB com 2 ou mais MN (%)	Número total de MN (MN/CB)
			1	2	3	4	5				
A	A1	502	17	0	0	0	0	17 (3,39)	17 (3,39)	0 (0,00)	17 (0,034)
	A2	507	8	1	1	0	0	10 (1,97)	8 (1,58)	2 (0,39)	13 (0,026)
	A3	503	17	0	0	0	0	17 (3,38)	17 (3,38)	0 (0,00)	17 (0,034)
	A4	504	12	0	0	0	0	12 (2,38)	12 (2,38)	0 (0,00)	12 (0,024)
	A5	503	7	1	0	0	0	8 (1,59)	7 (1,39)	1 (0,20)	9 (0,018)
	A6	544	2	0	0	0	0	2 (0,37)	2 (0,37)	0 (0,00)	2 (0,004)
	A7	513	7	0	0	0	0	7 (1,36)	7 (1,36)	0 (0,00)	7 (0,014)
	A8	513	10	1	0	0	0	11 (2,14)	10 (1,95)	1 (0,19)	12 (0,023)
	A9	516	3	0	0	0	0	3 (0,58)	3 (0,58)	0 (0,00)	3 (0,006)
	A10	509	13	2	0	0	0	15 (2,95)	13 (2,55)	2 (0,39)	17 (0,033)
	A11	505	22	2	1	0	0	25 (4,95)	22 (4,36)	3 (0,59)	29 (0,057)
Totais basal (média ± d.p.)		5619	118	7	2	0	0	127 (2,28 ± 1,34)	118 (2,12 ± 1,24)	9 (0,16 ± 0,21)	138 (0,025 ± 0,015)

TABELA 10 – Dados individuais referentes às frequências de micronúcleos (MN) em células mononucleadas (CM), antes e uma hora após administração de ¹⁵³Sm-EDTMP *in vivo* dos pacientes sem prévio tratamento radioterápico (grupo B).

Grupo	Amostra	Total de CM analisadas	CM com nMN					Número total de CM com MN (%)	Número de CM com 1MN (%)	Número de CM com 2 ou mais MN (%)	Número total de MN (MN/CM)
			1	2	3	4	5				
B1	Basal	6497	37	3	0	0	0	40 (0,62)	37 (0,57)	3 (0,05)	43 (0,007)
	1 hora	5463	54	5	1	1	0	61 (1,12)	54 (0,99)	7 (0,13)	71 (0,013)
B2	Basal	2126	8	0	1	0	1	10 (0,47)	8 (0,38)	2 (0,09)	16 (0,008)
	1 hora	4272	20	0	0	0	0	20 (0,47)	20 (0,47)	0 (0,00)	20 (0,005)
B3	Basal	8302	51	7	0	0	0	58 (0,70)	51 (0,61)	7 (0,08)	65 (0,008)
	1 hora	6959	63	6	0	0	0	69 (0,99)	63 (0,91)	6 (0,09)	75 (0,011)
B4	Basal	2648	22	2	0	0	0	24 (0,91)	22 (0,83)	2 (0,08)	26 (0,010)
	1 hora	4804	48	2	0	0	1	51 (1,06)	48 (1,00)	3 (0,06)	57 (0,012)
B5	Basal	2917	12	3	1	0	0	16 (0,55)	12 (0,41)	4 (0,14)	21 (0,007)
	1 hora	3822	18	3	3	0	1	25 (0,65)	18 (0,47)	7 (0,18)	38 (0,010)
B6	Basal	4723	8	1	1	0	0	10 (0,21)	8 (0,17)	2 (0,04)	13 (0,003)
	1 hora	4596	20	5	0	0	0	25 (0,54)	20 (0,44)	5 (0,11)	30 (0,007)
B7	Basal	19635	93	4	1	0	0	98 (0,50)	93 (0,47)	5 (0,03)	104 (0,005)
	1 hora	15681	98	6	1	0	0	105 (0,67)	98 (0,62)	7 (0,04)	113 (0,007)
B8	Basal	11215	60	8	2	1	0	71 (0,63)	60 (0,53)	11 (0,10)	86 (0,008)
	1 hora	23289	99	9	0	1	0	109 (0,47)	99 (0,43)	10 (0,04)	121 (0,005)
B9	Basal	16355	163	19	2	0	0	184 (1,13)	163 (1,00)	21 (0,13)	207 (0,013)
	1 hora	14227	133	15	2	0	0	150 (1,05)	133 (0,93)	17 (0,12)	169 (0,012)
B10	Basal	3527	16	2	0	0	0	18 (0,51)	16 (0,45)	2 (0,06)	20 (0,006)
	1 hora	5814	78	8	0	0	0	86 (1,48)	78 (1,34)	8 (0,14)	94 (0,016)
Totais basal (média ± d.p.)		77945	470	49	8	1	1	529 (0,62 ± 0,25)	470 (0,54 ± 0,23)	59 (0,08 ± 0,04)	601 (0,007 ± 0,003)
Totais 1 hora (média ± d.p.)		88927	631	59	7	2	2	701 (0,85 ± 0,34)	631 (0,76 ± 0,32)	70 (0,09 ± 0,05)	788 (0,010 ± 0,004)

TABELA 11 - Dados individuais referentes às freqüências de micronúcleos (MN) em células binucleadas (CB), antes e uma hora após administração de ¹⁵³Sm-EDTMP *in vivo* dos pacientes sem prévio tratamento radioterápico (grupo B).

Grupo	Amostra	Total de CB analisadas	CB com nMN					Número total de CB com MN (%)	Número de CB com 1MN (%)	Número de CB com 2 ou mais MN (%)	Número total de MN (MN/CB)
			1	2	3	4	5				
B1	Basal	1030	18	1	0	0	0	19 (1,84)	18 (1,75)	1 (0,10)	20 (0,019)
	1 hora	1011	19	0	0	1	0	20 (1,98)	19 (1,88)	1 (0,10)	23 (0,023)
B2	Basal	1135	17	5	0	0	0	22 (1,94)	17 (1,50)	5 (0,44)	27 (0,024)
	1 hora	1575	16	4	1	0	0	21 (1,33)	16 (1,02)	5 (0,32)	27 (0,017)
B3	Basal	514	10	2	0	0	0	12 (2,33)	10 (1,95)	2 (0,39)	14 (0,027)
	1 hora	534	12	2	0	0	0	14 (2,62)	12 (2,25)	2 (0,37)	16 (0,030)
B4	Basal	1588	47	6	0	0	0	53 (3,34)	47 (2,96)	6 (0,38)	59 (0,037)
	1 hora	1648	49	4	0	0	1	54 (3,28)	49 (2,97)	5 (0,30)	62 (0,038)
B5	Basal	1011	26	0	1	0	0	27 (2,67)	26 (2,57)	1 (0,10)	29 (0,029)
	1 hora	1103	23	5	2	0	0	30 (2,72)	23 (2,09)	7 (0,63)	39 (0,035)
B6	Basal	504	5	0	0	0	0	5 (0,99)	5 (0,99)	0 (0,00)	5 (0,010)
	1 hora	508	10	2	0	0	0	12 (2,36)	10 (1,97)	2 (0,39)	14 (0,028)
B7	Basal	501	12	1	0	0	0	13 (2,59)	12 (2,40)	1 (0,20)	14 (0,028)
	1 hora	515	24	3	1	0	0	28 (5,44)	24 (4,66)	4 (0,78)	33 (0,064)
B8	Basal	506	10	1	1	0	0	12 (2,37)	10 (1,98)	2 (0,40)	15 (0,030)
	1 hora	508	12	3	0	0	0	15 (2,95)	12 (2,36)	3 (0,59)	18 (0,035)
B9	Basal	504	32	2	0	0	0	34 (6,75)	32 (6,35)	2 (0,40)	36 (0,071)
	1 hora	509	25	0	0	0	0	25 (4,91)	25 (4,91)	0 (0,00)	25 (0,049)
B10	Basal	510	12	1	0	0	0	13 (2,55)	12 (2,35)	1 (0,20)	14 (0,027)
	1 hora	544	15	1	0	0	0	16 (2,94)	15 (2,76)	1 (0,18)	17 (0,031)
Totais basais (média ± d.p.)		7803	189	19	2	0	0	210 (2,74 ± 1,54)	189 (2,48 ± 1,47)	21 (0,26 ± 0,16)	233 (0,030 ± 0,016)
Totais 1 hora (média ± d.p.)		8455	205	24	4	1	1	235 (3,05 ± 1,25)	205 (2,69 ± 1,23)	30 (0,37 ± 0,24)	274 (0,035 ± 0,013)

TABELA 12 - Dados individuais referentes às frequências de micronúcleos (MN) em células mononucleadas (CM), antes e uma hora após administração de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ *in vivo* dos pacientes com prévio tratamento radioterápico (grupo C).

Doador	Amostra	Total de CM analisadas	CM com nMN					Número total de CM com MN (%)	Número de CM com 1MN (%)	Número de CM com 2 ou mais MN (%)	Número total de MN (MN/CM)
			1	2	3	4	5				
C1	Basal	11186	234	33	2	3	0	272 (2,43)	234 (2,09)	38 (0,34)	318 (0,028)
	1 hora	12516	297	35	4	0	0	336 (2,68)	297 (2,37)	39 (0,31)	379 (0,030)
C2	Basal	15156	190	15	4	1	0	210 (1,39)	190 (1,25)	20 (0,13)	236 (0,016)
	1 hora	22583	311	48	8	1	2	370 (1,64)	311 (1,38)	59 (0,26)	445 (0,020)
C3	Basal	5564	221	28	5	2	0	256 (4,60)	221 (3,97)	35 (0,63)	300 (0,054)
	1 hora	7910	192	26	4	2	0	224 (2,83)	192 (2,43)	32 (0,40)	264 (0,033)
C4	Basal	7935	189	35	10	0	2	236 (2,97)	189 (2,38)	47 (0,59)	299 (0,038)
	1 hora	3642	93	25	6	1	1	126 (3,46)	93 (2,55)	33 (0,91)	170 (0,047)
C5	Basal	2981	53	7	2	1	0	63 (2,11)	53 (1,78)	10 (0,34)	77 (0,026)
	1 hora	4869	203	17	4	0	0	224 (4,60)	203 (4,17)	21 (0,43)	249 (0,051)
C6	Basal	7057	296	36	1	0	0	333 (4,72)	296 (4,19)	37 (0,52)	371 (0,053)
	1 hora	10543	543	59	7	2	0	611 (5,80)	543 (5,15)	68 (0,64)	690 (0,065)
C7	Basal	2172	76	13	2	0	0	91 (4,19)	76 (3,50)	15 (0,69)	108 (0,050)
	1 hora	2786	167	24	8	0	0	199 (7,14)	167 (5,99)	32 (1,15)	239 (0,086)
C8	Basal	4721	111	20	3	0	0	134 (2,84)	111 (2,35)	23 (0,49)	160 (0,034)
	1 hora	4365	113	24	4	2	0	143 (3,28)	113 (2,59)	30 (0,69)	181 (0,041)
C9	Basal	8279	76	7	0	1	0	84 (1,01)	76 (0,92)	8 (0,10)	94 (0,011)
	1 hora	6036	84	14	2	0	0	100 (1,66)	84 (1,39)	16 (0,27)	118 (0,020)
C10	Basal	3446	96	11	4	0	0	111 (3,22)	96 (2,79)	15 (0,44)	130 (0,038)
	1 hora	5147	194	28	10	1	0	233 (4,53)	194 (3,77)	39 (0,76)	284 (0,055)
Totais basal (média ± d.p.)		68497	1542	205	33	8	2	1790 (2,95 ± 1,28)	1542 (2,52 ± 1,10)	248 (0,43 ± 0,20)	2093 (0,035 ± 0,015)
Totais 1 hora (média ± d.p.)		80397	2197	300	57	9	3	2566 (3,76 ± 1,77)	2197 (3,18 ± 1,55)	369 (0,58 ± 0,30)	3019 (0,045 ± 0,021)

TABELA 13 - Dados individuais referentes às freqüências de micronúcleos (MN) em células binucleadas (CB), antes e uma hora após administração de ¹⁵³Sm-EDTMP *in vivo* dos pacientes com prévio tratamento radioterápico (grupo C).

Doador	Amostra	Total de CB analisadas	CB com nMN					Número total de CB com MN (%)	Número de CB com 1MN (%)	Número de CB com 2 ou mais MN (%)	Número total de MN (MN/CB)
			1	2	3	4	5				
C1	Basal	1004	104	21	2	0	0	127 (12,65)	104 (10,36)	23 (2,29)	152 (0,151)
	1 hora	1005	97	12	6	2	0	117 (11,64)	97 (9,65)	20 (1,99)	147 (0,146)
C2	Basal	431	20	11	5	1	0	37 (8,58)	20 (4,64)	17 (3,94)	61 (0,142)
	1 hora	562	50	13	3	0	0	66 (11,74)	50 (8,90)	16 (2,85)	85 (0,151)
C3	Basal	526	62	3	2	0	0	67 (12,74)	62 (11,79)	5 (0,95)	74 (0,141)
	1 hora	501	32	9	1	0	0	42 (8,38)	32 (6,39)	10 (2,00)	53 (0,106)
C4	Basal	502	51	10	6	1	1	69 (13,75)	51 (10,16)	18 (3,59)	98 (0,195)
	1 hora	509	51	18	5	0	0	74 (14,54)	51 (10,02)	23 (4,52)	102 (0,200)
C5	Basal	502	34	0	0	0	0	34 (6,77)	34 (6,77)	0 (0,00)	34 (0,068)
	1 hora	500	41	8	2	0	1	52 (10,40)	41 (8,20)	11 (2,20)	68 (0,136)
C6	Basal	504	56	9	2	0	0	67 (13,29)	56 (11,11)	11 (2,18)	80 (0,159)
	1 hora	500	79	5	2	1	0	87 (17,40)	79 (15,80)	8 (1,60)	99 (0,198)
C7	Basal	511	65	13	3	0	0	81 (15,85)	65 (12,72)	16 (3,13)	100 (0,196)
	1 hora	535	114	49	7	1	0	171 (31,96)	114 (21,31)	57 (10,65)	237 (0,443)
C8	Basal	513	53	9	2	1	0	65 (12,67)	53 (10,33)	12 (2,34)	81 (0,158)
	1 hora	507	59	23	4	0	0	86 (16,96)	59 (11,64)	27 (5,33)	117 (0,231)
C9	Basal	515	15	2	0	0	0	17 (3,30)	15 (2,91)	2 (0,39)	19 (0,037)
	1 hora	514	28	3	3	0	0	34 (6,61)	28 (5,45)	6 (1,17)	43 (0,084)
C10	Basal	502	31	5	2	1	0	39 (7,77)	31 (6,18)	8 (1,59)	51 (0,102)
	1 hora	517	41	14	4	0	0	59 (11,41)	41 (7,93)	18 (3,48)	81 (0,157)
Totais basal (média ± d.p.)		5510	491	83	24	4	1	603 (10,74 ± 3,91)	491 (8,70 ± 3,32)	112 (2,04 ± 1,32)	750 (0,135 ± 0,052)
Totais 1 hora (média ± d.p.)		5650	592	154	37	4	1	788 (14,10 ± 7,15)	592 (10,53 ± 4,76)	196 (3,58 ± 2,81)	1032 (0,185 ± 0,101)

A FIGURA 4 expressa os valores basais individuais de MN/CM e MN/CB de cada grupo (TAB. 8 a 13) em forma de histograma, mostrando a variação interindividual entre eles. A oscilação foi mais acentuada no grupo C (pacientes com tratamento radioterápico prévio), tanto em células mono como em binucleadas. Pode ser verificado que os indivíduos A11 e B9 mostraram uma taxa basal acima da média para cada um dos grupos (A e B).

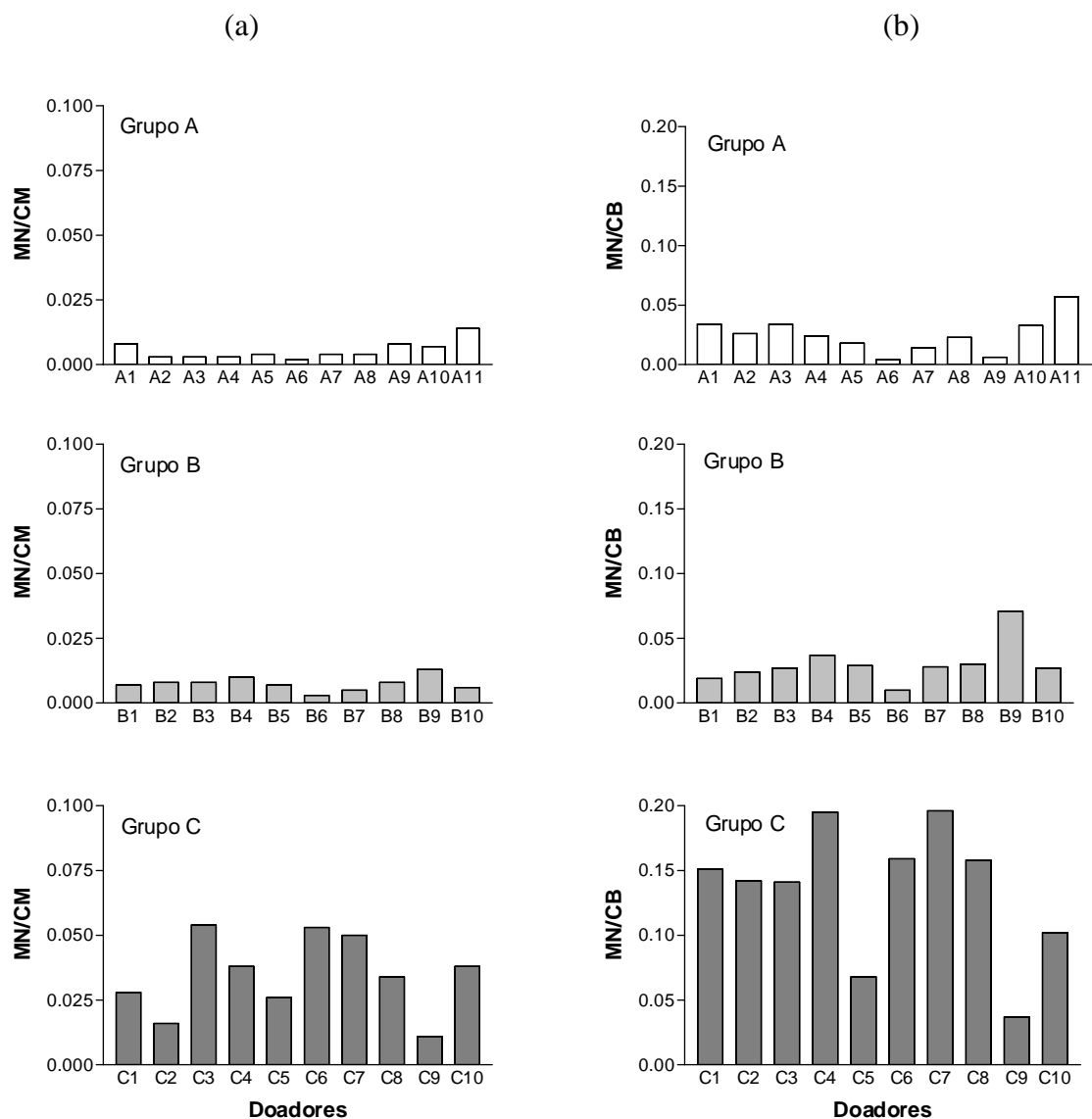


FIGURA 4 – Histogramas dos valores individuais basais de MN/CM (a) e MN/CB (b) dos grupos A (sadios), B (pacientes sem tratamento radioterápico prévio) e C (pacientes com tratamento radioterápico prévio).

4.1.2 Frequência de micronúcleos basal em função da idade

Para averiguar a influência da idade dos doadores na indução de micronúcleos antes de qualquer exposição à radiação ionizante, foram levados em consideração somente os indivíduos dos grupos A (sadios, $n = 11$) e B (pacientes sem prévio tratamento radioterápico, $n = 10$).

A FIGURA 5 mostra o histograma de valores individuais basais de MN/CB (TAB. 9 e 11) em função da idade dos doadores dos grupos A ($32,8 \pm 7,0$ anos) e B ($68,8 \pm 9,7$ anos), levando em consideração a taxa espontânea no intervalo entre 0,002 e 0,036, relatada pela Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA, 2001).

O indivíduo de 76 anos do sexo masculino (B9), fumante, apresentou valor elevado de MN/CB (0,071) em relação à média do grupo B ($0,030 \pm 0,016$) e o indivíduo sadio de 20 anos do sexo masculino (A11), também fumante, apresentou um valor de MN/CB elevado (0,057) em relação ao valor médio do grupo A ($0,025 \pm 0,015$).

A análise estatística mostrou que não há correlação entre frequência de micronúcleos e idade dos doadores, tanto em indivíduos sadios como em portadores de câncer (coeficiente de Pearson, $r = 0,09$ e $P = 0,69$, n.s.).

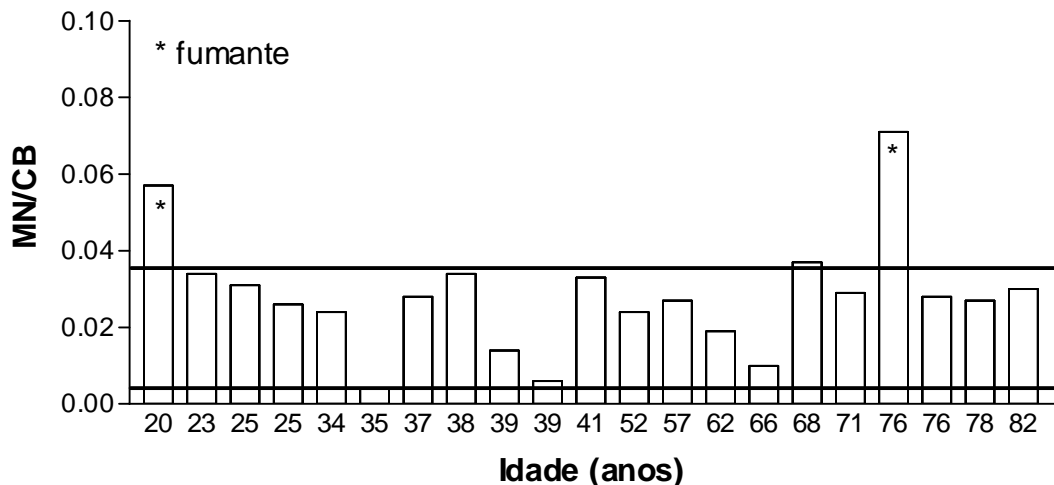


FIGURA 5 – Valores de MN/CB em função da idade dos indivíduos dos grupos A e B. Barras representam limites inferior (0,002) e superior (0,036) segundo a Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA, 2001).

4.1.3 Frequência de micronúcleos induzido pelo $^{153}\text{Sm-EDTMP}$

Em relação a indução de micronúcleos pelo $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ *in vivo*, houve um aumento nas frequências de células micronucleadas, bem como nas frequências de células contendo somente um ou vários micronúcleos (isto é, células menos ou mais severamente danificadas), uma hora após a administração, tanto em linfócitos mono como em binucleados (TAB. 6 e 7).

Os dados individuais (TAB. 10 a 13) obtidos da análise de linfócitos expostos ao $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ *in vivo* para os grupos B e C estão apresentados nas FIGURAS 6 e 7. Nestas figuras podemos observar que todos os doadores apresentaram um aumento tanto na proporção de células danificadas expressas em forma de MN bem como na extensão de dano induzido pela análise de distribuição de MN, uma hora após a administração do $^{153}\text{Sm-EDTMP}$, com exceção do indivíduo C3 do grupo C e dos indivíduos B2, B8 e B9 do grupo B. Por outro lado, os indivíduos C7 e B7 mostraram um aumento, por exemplo, no número de MN/CB, cerca de 2,3 vezes maior 1h após o tratamento com $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ em relação ao valor basal.

No entanto, a análise estatística (teste t pareado) mostrou que não há diferenças antes e após o tratamento em células binucleadas, tanto no grupo B quanto no grupo C (TAB. 7). Já em relação às mononucleadas (TAB. 6), o teste estatístico mostrou que há diferença na frequência de células contendo somente um micronúcleo no grupo B (teste t pareado, $P = 0,04 *$) e de linfócitos mais severamente danificados, contendo dois ou mais micronúcleos, no grupo C (teste t pareado, $P = 0,03 *$).

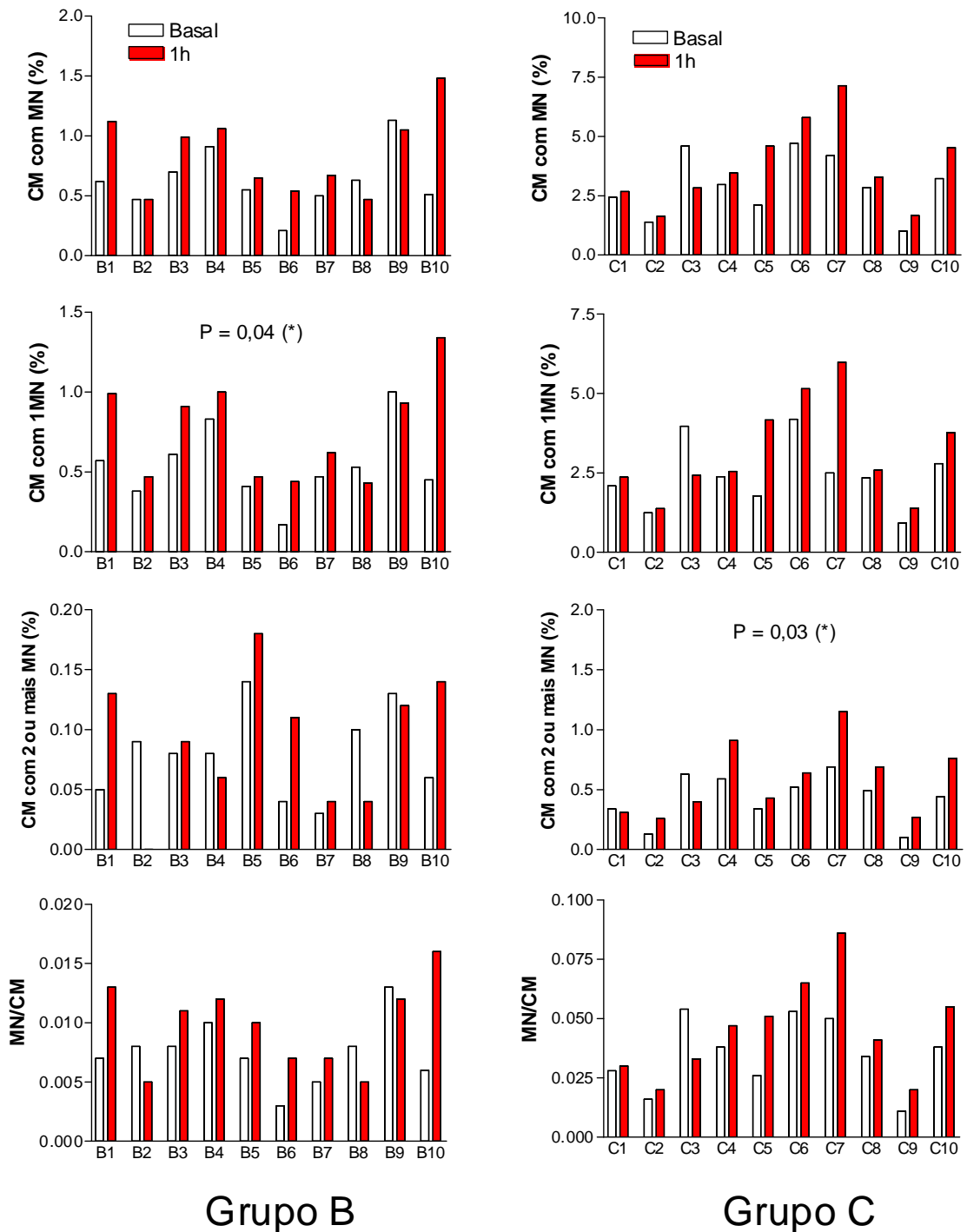


FIGURA 6 - Valores individuais de micronúcleos (MN) em células mononucleadas (CM) dos pacientes dos grupos B e C, observadas em amostras sanguíneas coletadas antes e uma hora após a administração endovenosa de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ *in vivo*. Valores de P do teste t emparelhado resultado da comparação entre os valores antes e após o tratamento: $P < 0,05$ (*).

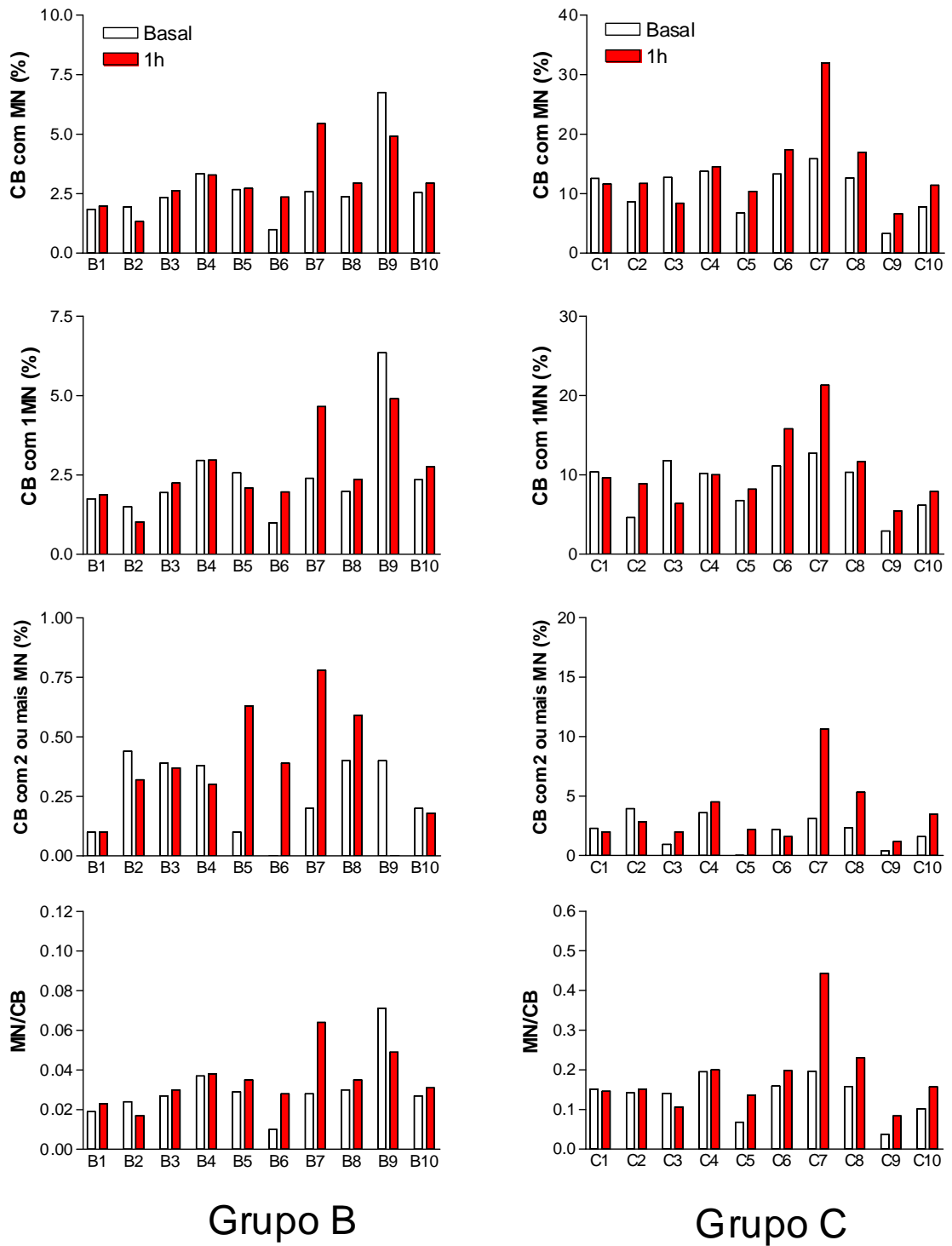


FIGURA 7 - Valores individuais de micronúcleos (MN) em células binucleadas (CB) dos pacientes dos grupos B e C, observadas em amostras sanguíneas coletadas antes e uma hora após a administração endovenosa de ¹⁵³Sm-EDTMP *in vivo*.

4.1.4 Índice de proliferação celular

A TABELA 14 mostra as taxas de células mono, bi e multinucleadas utilizadas para a determinação do índice de proliferação celular. A FIGURA 8 representa graficamente os valores médios e os desvios-padrão dos índices de proliferação celular basais (grupos A, B e C) e uma hora após administração endovenosa de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ *in vivo* (grupos B e C).

Não foram observadas diferenças entre os índices basais de proliferação celular (ANOVA) dos grupos A, B e C ($P = 0,21$), assim como entre os valores antes e uma hora após o tratamento com o $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ (teste t emparelhado) nos grupos B ($P = 0,11$) e C ($P = 0,30$).

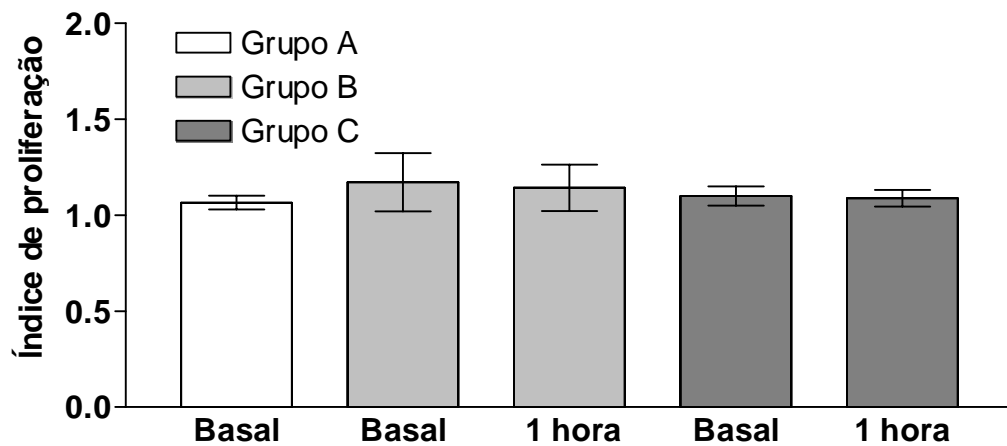


FIGURA 8 – Valores médios e desvios-padrão dos índices de proliferação celular de amostras basais (grupos A, B e C) e de uma hora após a administração endovenosa de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ *in vivo* (grupos B e C).

TABELA 14 - Número de células mononucleadas (CM), binucleadas (CB), multinucleadas (CMU) e índice de proliferação celular, antes e uma hora após a administração de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ *in vivo* dos três grupos de doadores.

Grupo	Amostra	Total de células	Número de CM (%)	Número de CB (%)	Número de CMU (%)	Índice de proliferação celular
A	Basal	123107	117947 (93,44 ± 3,84)	5089 (6,47 ± 3,82)	71 (0,09 ± 0,10)	1,07 ± 0,04
	1 hora	-	-	-	-	-
B	Basal	85671	77382 (84,12 ± 13,90)	7803 (14,76 ± 12,62)	486 (1,12 ± 1,37)	1,17 ± 0,15
	1 hora	97923	88927 (86,81 ± 10,29)	8455 (12,29 ± 9,24)	541 (0,90 ± 1,15)	1,14 ± 0,11
Teste t emparelhado basal x 1 hora						P = 0,11 (n.s.)
C	Basal	74204	68497 (90,33 ± 4,98)	5510 (9,37 ± 4,76)	197 (0,30 ± 0,39)	1,10 ± 0,05
	1 hora	86175	80397 (91,33 ± 3,93)	5650 (8,53 ± 3,90)	128 (0,14 ± 0,17)	1,09 ± 0,04
Teste t emparelhado basal x 1 hora						P = 0,30 (n.s.)

Teste t emparelhado: n.s. = não significativo.

Índice de proliferação celular = $(\text{CM} + 2 \times \text{CB} + 3 \times \text{CMU}) / \text{total de células}$

4.2 Estimativa de dose absorvida de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ *in vitro*

Os cálculos foram realizados para amostras compostas de 1 mL de sangue total, 3 mL de meio MEM e $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ em tampão fosfato para volumes de 1 a 500 μL . A energia depositada não variou com o volume adicionado mas as doses apresentaram variações de $0,95 \times 10^{-11}$ a $1,06 \times 10^{-11}$ Gy/MBq.s. As doses absorvidas calculadas utilizando-se os códigos do programa Monte Carlo MCNP (versão 4B) para as concentrações radioativas de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ de 0,370; 0,555 e 1,110 MBq/mL, atividades de 1,480; 2,220 e 4,440 MBq em 4 mL de solução, foram de 0,053; 0,079 e 0,157 Gy, respectivamente.

4.3 Efeito genotóxico do $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ *in vitro*

4.3.1 Curva dose-resposta para indução de micronúcleos

O ensaio *in vitro* para a avaliação do efeito genotóxico do $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ foi realizado com amostras sangüíneas de seis doadores sadios (indivíduos A1 a A6) e de cinco pacientes sem prévio tratamento radioterápico (indivíduos B1 a B5).

As doses absorvidas de 0,053; 0,079 e 0,157 Gy foram estimadas para as concentrações radioativas de 0,370; 0,555 e 1,110 MBq/mL, respectivamente, utilizando-se os códigos do programa Monte Carlo NP (versão 4B).

As TABELAS 15 e 16 expressam as freqüências de MN induzidos pelo $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ em diferentes concentrações radioativas em células mono e binucleadas, respectivamente, de dois grupos, sadios e pacientes. Os dados individuais desses grupos estão apresentados nas TABELAS 17 a 20.

A representação gráfica da relação dose-resposta para a indução de MN pelo $^{153}\text{Sm-EDTMP}$, utilizando vários parâmetros está ilustrada na FIGURA 9, tanto para as células mononucleadas como para as binucleadas. Os dados foram mais bem ajustados ao modelo de regressão linear ($Y = a + bD$).

Quando se analisaram as curvas ajustadas pelo modelo de regressão linear, verificou-se que os coeficientes (TAB. 21) de inclinação das retas (coeficiente b) foram mais altos nos pacientes (grupo B) que nos sadios (grupo A), tanto para células mononucleadas como para as binucleadas. A análise estatística mostrou que as curvas dos pacientes diferem das dos sadios em todos os parâmetros estudados ($P < 0,001$, teste t não emparelhado).

TABELA 15 – Frequências de micronúcleos (MN) em células mononucleadas (CM) submetidas a diferentes concentrações radioativas de ¹⁵³Sm-EDTMP *in vitro* (grupos A e B).

Grupo	Concentração radioativa (MBq/mL)	Dose estimada (Gy)	Total de CM	CM com nMN					Número total de CM com MN (%)	Número de CM com 1MN (%)	Número de CM com 2 ou mais MN (%)	Número total de MN (MN/CM)
				1	2	3	4	5				
A	0	0	85973	245	14	2	0	0	261 (0,36 ± 0,23)	245 (0,35 ± 0,22)	16 (0,01 ± 0,01)	279 (0,004 ± 0,002)
	0,370	0,053	55847	255	19	2	0	1	277 (0,49 ± 0,25)	255 (0,46 ± 0,23)	22 (0,03 ± 0,03)	304 (0,005 ± 0,003)
	0,555	0,079	49104	387	24	3	0	3	417 (0,85 ± 0,27)	387 (0,80 ± 0,27)	30 (0,05 ± 0,05)	459 (0,009 ± 0,003)
	1,110	0,157	44565	418	31	3	0	1	453 (1,00 ± 0,37)	418 (0,92 ± 0,36)	35 (0,08 ± 0,05)	494 (0,011 ± 0,004)
B	0	0	22490	130	15	2	0	1	148 (0,65 ± 0,17)	130 (0,56 ± 0,18)	18 (0,09 ± 0,03)	171 (0,008 ± 0,001)
	0,370	0,053	27152	212	16	3	1	0	232 (0,93 ± 0,47)	212 (0,86 ± 0,46)	20 (0,07 ± 0,05)	257 (0,010 ± 0,005)
	0,555	0,079	22891	219	14	3	0	0	236 (0,98 ± 0,47)	219 (0,91 ± 0,47)	17 (0,07 ± 0,07)	256 (0,011 ± 0,005)
	1,110	0,157	26584	376	33	1	2	0	412 (2,02 ± 1,05)	376 (1,83 ± 0,96)	36 (0,19 ± 0,10)	453 (0,022 ± 0,012)

TABELA 16 - Frequências de micronúcleos (MN) em células binucleadas (CB) submetidas a diferentes concentrações radioativas de ¹⁵³Sm-EDTMP *in vitro* (grupos A e B).

Grupo	Concentração radioativa (MBq/mL)	Dose estimada (Gy)	Total de CB	CB com nMN					Número total de CB com MN (%)	Número de CB com 1MN (%)	Número de CB com 2 ou mais MN (%)	Número total de MN (MN/CB)
				1	2	3	4	5				
A	0	0	3063	63	2	1	0	0	66 (2,38 ± 0,84)	63 (2,28 ± 0,92)	3 (0,10 ± 0,17)	70 (0,025 ± 0,008)
	0,370	0,053	3296	81	4	1	1	0	87 (2,64 ± 0,60)	81 (2,46 ± 0,72)	6 (0,19 ± 0,25)	96 (0,029 ± 0,006)
	0,555	0,079	3273	93	5	3	0	0	101 (3,10 ± 1,26)	93 (2,85 ± 1,19)	8 (0,25 ± 0,17)	112 (0,035 ± 0,014)
	1,110	0,157	3141	119	9	4	0	0	132 (4,24 ± 1,20)	119 (3,82 ± 1,22)	13 (0,42 ± 0,35)	149 (0,048 ± 0,013)
B	0	0	5278	118	14	1	0	0	133 (2,43 ± 0,61)	118 (2,14 ± 0,60)	15 (0,28 ± 0,17)	149 (0,027 ± 0,007)
	0,370	0,053	3843	121	17	6	1	0	145 (4,06 ± 1,02)	121 (3,37 ± 0,65)	24 (0,70 ± 0,58)	177 (0,049 ± 0,015)
	0,555	0,079	5415	156	23	0	2	0	181 (4,15 ± 2,24)	156 (3,58 ± 1,91)	25 (0,57 ± 0,46)	210 (0,048 ± 0,027)
	1,110	0,157	3791	237	21	5	1	0	264 (6,94 ± 2,04)	237 (6,28 ± 1,61)	27 (0,66 ± 0,50)	298 (0,078 ± 0,026)

TABELA 17 – Dados individuais referentes às frequências de micronúcleos (MN) em células mononucleadas (CM) após exposição a três concentrações radioativas de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ *in vitro* dos doadores sadios (grupo A).

Grupo	Doador	Concentração radioativa (MBq/mL)	Dose Estimada (Gy)	Total de CM analisadas	CM com nMN					Número de CM com MN (%)	Número de CM com 1MN (%)	Número de CM com 2 ou mais MN (%)	Número total de MN (MN/CM)
					1	2	3	4	5				
A	A1	0	0	6945	54	2	0	0	0	56 (0,81)	54 (0,78)	2 (0,03)	58 (0,008)
		0,370	0,053	13663	34	2	0	0	0	36 (0,26)	34 (0,25)	2 (0,01)	38 (0,003)
		0,555	0,079	10247	46	11	0	0	1	58 (0,57)	46 (0,45)	12 (0,12)	73 (0,007)
		1,110	0,157	6711	46	2	0	0	0	48 (0,72)	46 (0,69)	2 (0,03)	50 (0,007)
	A2	0	0	19876	57	3	1	0	0	61 (0,31)	57 (0,29)	4 (0,02)	66 (0,003)
		0,370	0,053	10797	58	4	2	0	1	65 (0,60)	58 (0,54)	7 (0,06)	77 (0,007)
		0,555	0,079	12383	66	2	0	0	2	70 (0,57)	66 (0,53)	4 (0,03)	80 (0,006)
		1,110	0,157	9647	51	3	1	0	0	55 (0,57)	51 (0,53)	4 (0,04)	60 (0,006)
	A3	0	0	38274	78	8	1	0	0	87 (0,23)	78 (0,20)	9 (0,02)	97 (0,003)
		0,370	0,053	18037	81	8	0	0	0	89 (0,49)	81 (0,45)	8 (0,04)	97 (0,005)
		0,555	0,079	12631	136	9	1	0	0	146 (1,16)	136 (1,08)	10 (0,08)	157 (0,012)
		1,110	0,157	11301	114	8	2	0	0	124 (1,10)	114 (1,01)	10 (0,09)	136 (0,012)
	A4	0	0	15800	40	1	0	0	0	41 (0,26)	40 (0,25)	1 (0,01)	42 (0,003)
		0,370	0,053	6929	56	4	0	0	0	60 (0,87)	56 (0,81)	4 (0,06)	64 (0,009)
		0,555	0,079	9062	101	2	2	0	0	105 (1,16)	101 (1,11)	4 (0,04)	111 (0,012)
		1,110	0,157	11089	161	11	0	0	0	172 (1,55)	161 (1,45)	11 (0,10)	183 (0,017)
	A5	0	0	3016	12	0	0	0	0	12 (0,40)	12 (0,40)	0 (0,00)	12 (0,004)
		0,370	0,053	4128	22	1	0	0	0	23 (0,56)	22 (0,53)	1 (0,02)	24 (0,006)
		0,555	0,079	3178	24	0	0	0	0	24 (0,76)	24 (0,76)	0 (0,00)	24 (0,008)
		1,110	0,157	4408	29	6	0	0	1	36 (0,82)	29 (0,66)	7 (0,16)	46 (0,010)
	A6	0	0	2062	4	0	0	0	0	4 (0,19)	4 (0,19)	0 (0,00)	4 (0,002)
		0,370	0,053	2293	4	0	0	0	0	4 (0,17)	4 (0,17)	0 (0,00)	4 (0,002)
		0,555	0,079	1603	14	0	0	0	0	14 (0,87)	14 (0,87)	0 (0,00)	14 (0,009)
		1,110	0,157	1409	17	1	0	0	0	18 (1,28)	17 (1,21)	1 (0,07)	19 (0,013)
Total (média ± d.p.)	0	0	85973	245	14	2	0	0	261 (0,36 ± 0,23)	245 (0,35 ± 0,22)	16 (0,01 ± 0,01)	279 (0,004 ± 0,002)	
	0,370	0,053	55847	255	19	2	0	1	277 (0,49 ± 0,25)	255 (0,46 ± 0,23)	22 (0,03 ± 0,03)	304 (0,005 ± 0,003)	
	0,555	0,079	49104	387	24	3	0	3	417 (0,85 ± 0,27)	387 (0,80 ± 0,27)	30 (0,05 ± 0,05)	459 (0,009 ± 0,003)	
	1,110	0,157	44565	418	31	3	0	1	453 (1,00 ± 0,37)	418 (0,92 ± 0,36)	35 (0,08 ± 0,05)	494 (0,011 ± 0,004)	

TABELA 18 - Dados individuais referentes às frequências de micronúcleos (MN) em células mononucleadas (CM) após exposição a três concentrações radioativas de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ *in vitro* dos doadores sem prévio tratamento radioterápico (grupo B).

Grupo	Doador	Concentração radioativa (MBq/mL)	Dose estimada (Gy)	Total de CM analisadas	CM com nMN					Número de CM com MN (%)	Número de CM com 1MN (%)	Número de CM com 2 ou mais MN (%)	Número total de MN (MN/CM)
					1	2	3	4	5				
B	B1	0	0	6497	37	3	0	0	0	40 (0,62)	37 (0,57)	3 (0,05)	43 (0,007)
		0,370	0,053	5985	74	6	0	0	0	80 (1,34)	74 (1,24)	6 (0,10)	86 (0,014)
		0,555	0,079	6866	70	6	2	0	0	78 (1,14)	70 (1,02)	8 (0,12)	88 (0,013)
		1,110	0,157	5324	104	11	0	1	0	116 (2,18)	104 (1,95)	12 (0,23)	130 (0,024)
	B2	0	0	2126	8	0	1	0	1	10 (0,47)	8 (0,38)	2 (0,09)	16 (0,008)
		0,370	0,053	4878	27	4	2	0	0	33 (0,68)	27 (0,55)	6 (0,12)	41 (0,008)
		0,555	0,079	3248	22	5	1	0	0	28 (0,86)	22 (0,68)	6 (0,18)	35 (0,011)
		1,110	0,157	1393	40	3	1	0	0	44 (3,16)	40 (2,87)	4 (0,29)	49 (0,035)
	B3	0	0	8302	51	7	0	0	0	58 (0,70)	51 (0,61)	7 (0,08)	65 (0,008)
		0,370	0,053	4558	65	3	0	0	0	68 (1,49)	65 (1,43)	3 (0,07)	71 (0,016)
		0,555	0,079	5537	87	2	0	0	0	89 (1,61)	87 (1,57)	2 (0,04)	91 (0,016)
		1,110	0,157	5993	151	12	0	1	0	164 (2,74)	151 (2,52)	13 (0,22)	179 (0,030)
	B4	0	0	2648	22	2	0	0	0	24 (0,91)	22 (0,83)	2 (0,08)	26 (0,010)
		0,370	0,053	1788	14	0	0	0	0	14 (0,78)	14 (0,78)	0 (0,00)	14 (0,008)
		0,555	0,079	2679	26	1	0	0	0	27 (1,01)	26 (0,97)	1 (0,04)	28 (0,010)
		1,110	0,157	2036	27	4	0	0	0	31 (1,52)	27 (1,33)	4 (0,20)	35 (0,017)
	B5	0	0	2917	12	3	1	0	0	16 (0,55)	12 (0,41)	4 (0,14)	21 (0,007)
		0,370	0,053	9943	32	3	1	1	0	37 (0,37)	32 (0,32)	5 (0,05)	45 (0,005)
		0,555	0,079	4561	14	0	0	0	0	14 (0,31)	14 (0,31)	0 (0,00)	14 (0,003)
		1,110	0,157	11838	54	3	0	0	0	57 (0,48)	54 (0,46)	3 (0,03)	60 (0,005)
Total (média ± d.p.)	0	0	22490	130	15	2	0	1	148 (0,65 ± 0,17)	130 (0,56 ± 0,18)	18 (0,09 ± 0,03)	171 (0,008 ± 0,001)	
	0,370	0,053	27152	212	16	3	1	0	232 (0,93 ± 0,47)	212 (0,86 ± 0,46)	20 (0,07 ± 0,05)	257 (0,010 ± 0,005)	
	0,555	0,079	22891	219	14	3	0	0	236 (0,98 ± 0,47)	219 (0,91 ± 0,47)	17 (0,07 ± 0,07)	256 (0,011 ± 0,005)	
	1,110	0,157	26584	376	33	1	2	0	412 (2,02 ± 1,05)	376 (1,83 ± 0,96)	36 (0,19 ± 0,10)	453 (0,022 ± 0,012)	

TABELA 19 - Dados individuais referentes às frequências de micronúcleos (MN) em células binucleadas (CB) após exposição a três concentrações radioativas de ¹⁵³Sm-EDTMP *in vitro* dos doadores sadios (grupo A).

Grupo	Doador	Concentração radioativa (MBq/mL)	Dose Estimada (Gy)	Total de CB analisadas	CB com nMN					Número de CB com MN (%)	Número de CB com 1MN (%)	Número de CB com 2 ou mais MN (%)	Número total de MN (MN/CB)
					1	2	3	4	5				
A	A1	0	0	502	17	0	0	0	0	17 (3,39)	17 (3,39)	0 (0,00)	17 (0,034)
		0,370	0,053	502	10	2	1	0	0	13 (2,59)	10 (1,99)	3 (0,60)	17 (0,034)
		0,555	0,079	489	14	0	2	0	0	16 (3,27)	14 (2,86)	2 (0,41)	20 (0,041)
		1,110	0,157	500	13	3	2	0	0	18 (3,60)	13 (2,60)	5 (1,00)	25 (0,050)
	A2	0	0	507	8	1	1	0	0	10 (1,97)	8 (1,58)	2 (0,39)	13 (0,026)
		0,370	0,053	504	18	0	0	0	0	18 (3,57)	18 (3,57)	0 (0,00)	18 (0,036)
		0,555	0,079	613	21	1	0	0	0	22 (3,59)	21 (3,43)	1 (0,16)	23 (0,038)
		1,110	0,157	517	19	0	0	0	0	19 (3,68)	19 (3,68)	0 (0,00)	19 (0,037)
	A3	0	0	503	17	0	0	0	0	17 (3,38)	17 (3,38)	0 (0,00)	17 (0,034)
		0,370	0,053	744	19	1	0	0	0	20 (2,69)	19 (2,55)	1 (0,13)	21 (0,028)
		0,555	0,079	508	25	1	1	0	0	27 (5,31)	25 (4,92)	2 (0,39)	30 (0,059)
		1,110	0,157	505	24	1	0	0	0	25 (4,95)	24 (4,75)	1 (0,20)	26 (0,051)
	A4	0	0	504	12	0	0	0	0	12 (2,38)	12 (2,38)	0 (0,00)	12 (0,024)
		0,370	0,053	500	15	0	0	0	0	15 (3,00)	15 (3,00)	0 (0,00)	15 (0,030)
		0,555	0,079	510	9	2	0	0	0	11 (2,16)	9 (1,76)	2 (0,39)	13 (0,025)
		1,110	0,157	501	29	2	1	0	0	32 (6,39)	29 (5,79)	3 (0,60)	36 (0,072)
	A5	0	0	503	7	1	0	0	0	8 (1,59)	7 (1,39)	1 (0,20)	9 (0,018)
		0,370	0,053	515	9	1	0	1	0	11 (2,14)	9 (1,75)	2 (0,39)	15 (0,029)
		0,555	0,079	644	14	1	0	0	0	15 (2,33)	14 (2,17)	1 (0,16)	16 (0,025)
		1,110	0,157	616	18	1	1	0	0	20 (3,25)	18 (2,92)	2 (0,32)	23 (0,037)
	A6	0	0	544	2	0	0	0	0	2 (0,37)	2 (0,37)	0 (0,00)	2 (0,004)
		0,370	0,053	531	10	0	0	0	0	10 (1,88)	10 (1,88)	0 (0,00)	10 (0,019)
		0,555	0,079	509	10	0	0	0	0	10 (1,96)	10 (1,96)	0 (0,00)	10 (0,020)
		1,110	0,157	502	16	2	0	0	0	18 (3,59)	16 (3,19)	2 (0,40)	20 (0,040)
Totais		0	0	3063	63	2	1	0	0	66 (2,38 ± 0,84)	63 (2,28 ± 0,92)	3 (0,10 ± 0,17)	70 (0,025 ± 0,008)
(média ± d.p.)		0,370	0,053	3296	81	4	1	1	0	87 (2,64 ± 0,60)	81 (2,46 ± 0,72)	6 (0,19 ± 0,25)	96 (0,029 ± 0,006)
		0,555	0,079	3273	93	5	3	0	0	101 (3,10 ± 1,26)	93 (2,85 ± 1,19)	8 (0,25 ± 0,17)	112 (0,035 ± 0,014)
		1,110	0,157	3141	119	9	4	0	0	132 (4,24 ± 1,20)	119 (3,82 ± 1,22)	13 (0,42 ± 0,35)	149 (0,048 ± 0,013)

TABELA 20 - Dados individuais referentes às frequências de micronúcleos (MN) em células binucleadas (CB) após exposição a três concentrações radioativas de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ *in vitro* avaliados nos pacientes sem prévio tratamento radioterápico (grupo B).

Grupo	Doador	Concentração radioativa (MBq/mL)	Dose estimada (Gy)	Total de CB analisadas	CB com nMN					Número de CB com MN (%)	Número de CB com 1MN (%)	Número de CB com 2 ou mais MN (%)	Número total de MN (MN/CB)
					1	2	3	4	5				
B	B1	0	0	1030	18	1	0	0	0	19 (1,84)	18 (1,75)	1 (0,10)	20 (0,019)
		0,370	0,053	1295	37	3	3	0	0	43 (3,32)	37 (2,86)	6 (0,46)	52 (0,040)
		0,555	0,079	1768	43	7	0	0	0	50 (2,83)	43 (2,43)	7 (0,40)	57 (0,032)
		1,110	0,157	1003	74	10	2	0	0	86 (8,57)	74 (7,38)	12 (1,20)	100 (0,100)
	B2	0	0	1135	17	5	0	0	0	22 (1,94)	17 (1,50)	5 (0,44)	27 (0,024)
		0,370	0,053	1008	25	3	1	1	0	30 (2,98)	25 (2,48)	5 (0,50)	38 (0,038)
		0,555	0,079	2095	44	6	0	1	0	51 (2,43)	44 (2,10)	7 (0,33)	60 (0,029)
		1,110	0,157	1009	48	4	1	1	0	54 (5,35)	48 (4,76)	6 (0,59)	63 (0,062)
	B3	0	0	514	10	2	0	0	0	12 (2,33)	10 (1,95)	2 (0,39)	14 (0,027)
		0,370	0,053	504	19	2	0	0	0	21 (4,17)	19 (3,77)	2 (0,40)	23 (0,046)
		0,555	0,079	520	11	1	0	0	0	12 (2,31)	11 (2,12)	1 (0,19)	13 (0,025)
		1,110	0,157	514	23	0	0	0	0	23 (4,47)	23 (4,47)	0 (0,00)	23 (0,045)
	B4	0	0	1588	47	6	0	0	0	53 (3,34)	47 (2,96)	6 (0,38)	59 (0,037)
		0,370	0,053	518	20	1	1	0	0	22 (4,25)	20 (3,86)	2 (0,39)	25 (0,048)
		0,555	0,079	513	26	7	0	0	0	33 (6,43)	26 (5,07)	7 (1,36)	40 (0,078)
		1,110	0,157	540	44	5	1	0	0	50 (9,26)	44 (8,15)	6 (1,11)	57 (0,106)
	B5	0	0	1011	26	0	1	0	0	27 (2,67)	26 (2,57)	1 (0,10)	29 (0,029)
		0,370	0,053	518	20	8	1	0	0	29 (5,60)	20 (3,86)	9 (1,74)	39 (0,075)
		0,555	0,079	519	32	2	0	1	0	35 (6,74)	32 (6,17)	3 (0,58)	40 (0,077)
		1,110	0,157	725	48	2	1	0	0	51 (7,03)	48 (6,62)	3 (0,41)	55 (0,076)
Totais (média ± d.p.)	0	0	5278	118	14	1	0	0	133 (2,43 ± 0,61)	118 (2,14 ± 0,60)	15 (0,28 ± 0,17)	149 (0,027 ± 0,007)	
	0,370	0,053	3843	121	17	6	1	0	145 (4,06 ± 1,02)	121 (3,37 ± 0,65)	24 (0,70 ± 0,58)	177 (0,049 ± 0,015)	
	0,555	0,079	5415	156	23	0	2	0	181 (4,15 ± 2,24)	156 (3,58 ± 1,91)	25 (0,57 ± 0,46)	210 (0,048 ± 0,027)	
	1,110	0,157	3791	237	21	5	1	0	264 (6,94 ± 2,04)	237 (6,28 ± 1,61)	27 (0,66 ± 0,50)	298 (0,078 ± 0,026)	

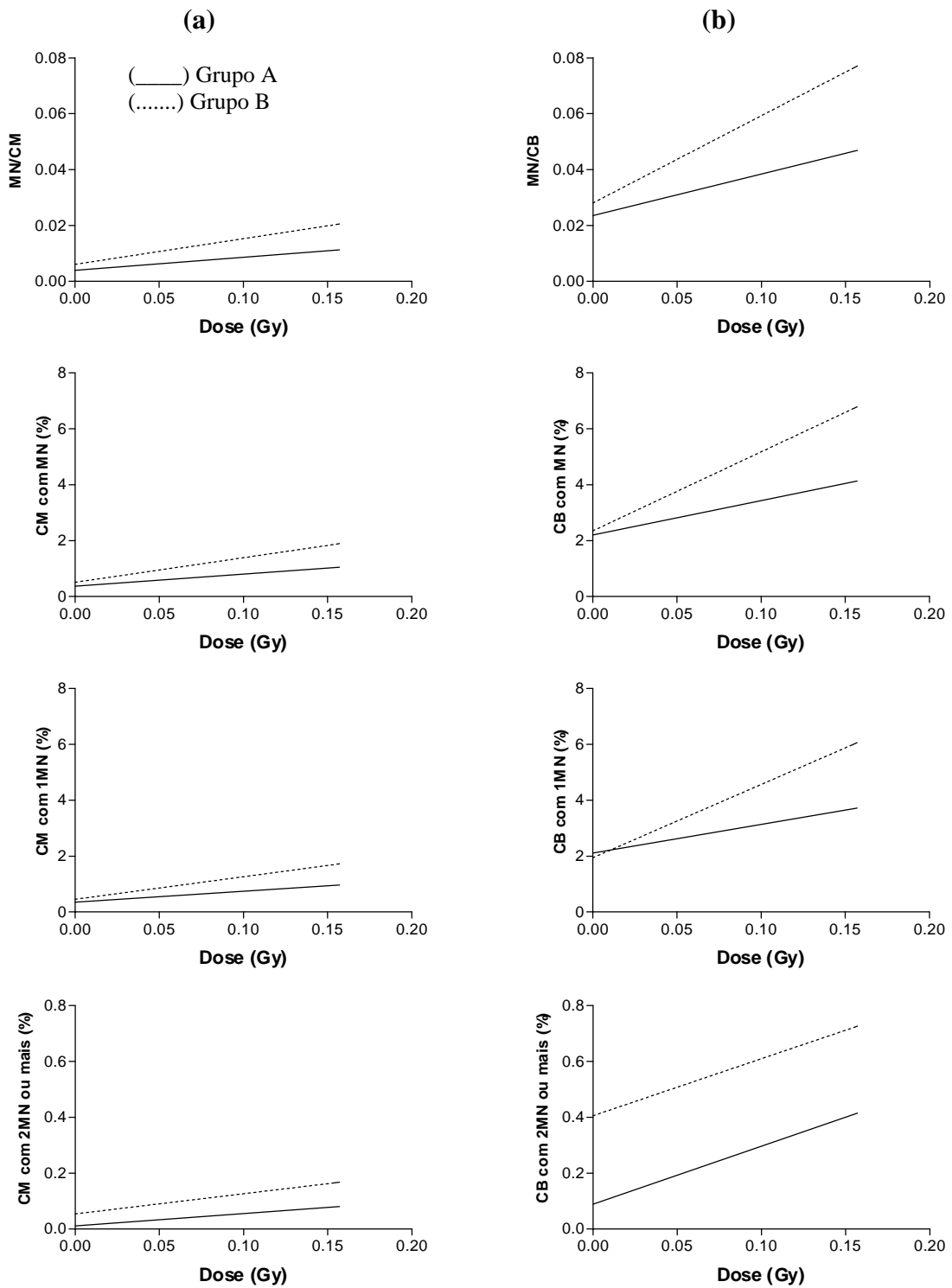


FIGURA 9 - Curvas ajustadas pelo modelo de regressão linear ($Y = a + b.D$) para indução de micronúcleos (MN) em linfócitos de doadores dos grupos A (sadios, $n = 6$) e B (pacientes sem prévio tratamento radioterápico, $n = 5$) após exposição de sangue total ao $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ *in vitro*, por uma hora a 37°C . A análise foi realizada após cultura celular de 72h a 37°C , em células monucleadas (a) e binucleadas (b).

TABELA 21 - Coeficientes das curvas ajustadas pelo modelo de regressão linear ($Y = a + b.D$) para os dados de micronúcleos (MN) após a exposição de amostras de sangue de doadores dos grupos A (sadios, $n = 6$) e B (pacientes sem tratamento radioterápico prévio, $n = 5$) ao $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ *in vitro*, por uma hora a 37°C . A análise foi realizada em células mononucleadas (CM) e binucleadas (CB) após cultura celular de 72h.

Parâmetro	Grupo	a	b
MN/CM	A	0.004 ± 0.001	0.047 ± 0.011
	B	0.006 ± 0.002	0.092 ± 0.026
% CM com MN	A	0.37 ± 0.09	4.30 ± 1.04
	B	0.51 ± 0.22	8.78 ± 2.42
% CM com 1MN	A	0.35 ± 0.09	3.88 ± 1.01
	B	0.45 ± 0.21	8.10 ± 2.25
% CM com 2 ou mais MN	A	0.01 ± 0.01	0.44 ± 0.12
	B	0.05 ± 0.03	0.72 ± 0.28
MN/CB	A	0.024 ± 0.004	0.149 ± 0.038
	B	0.028 ± 0.007	0.312 ± 0.077
% CB com MN	A	2.20 ± 0.32	12.33 ± 3.53
	B	2.35 ± 0.56	28.28 ± 6.15
% CB com 1MN	A	2.11 ± 0.33	10.25 ± 3.60
	B	1.95 ± 0.46	26.23 ± 5.06
% CB com 2 ou mais MN	A	0.10 ± 0.08	2.07 ± 0.84
	B	0.41 ± 0.16	2.04 ± 1.77

4.3.2 Influência do EDTMP na indução de micronúcleos

Para averiguar a influência da molécula carreadora EDTMP na indução de MN, foram realizados experimentos com amostras sanguíneas de dois doadores saudáveis (A8 e A9). Para tanto, utilizou-se um volume de 200 μL de EDTMP que foi o volume máximo adicionado de ^{153}Sm -EDTMP nos ensaios *in vitro*. Como mostram a TABELA 22 e a FIGURA 10, não houve alteração na frequência tanto de MN/CM como de MN/CB, com ou sem EDTMP, o que indica que a molécula carreadora não interfere na indução de MN em linfócitos humanos.

TABELA 22 - Valores médios e desvio-padrão da frequência de MN em CM e CB, com e sem EDTMP, nos doadores saudáveis A8 e A9.

Amostra	Total de CB analisadas	Número total de MN por CB (MN/CB)	Total de CM analisadas	Número total de MN por CM (MN/CM)
Sem EDTMP	1032	20 (0,015 \pm 0,006)	16009	55 (0,003 \pm 0,002)
Com EDTMP	1033	18 (0,016 \pm 0,003)	18309	88 (0,004 \pm 0,003)

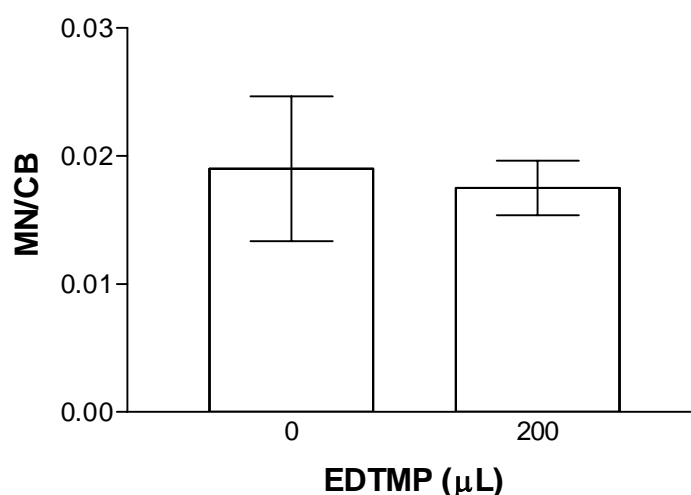


FIGURA 10 - Frequência de MN/CB em amostras com e sem EDTMP, incubadas por uma hora a 37°C.

4.3.3 Índice de proliferação celular

O índice de proliferação não sofreu alteração com o aumento da dose absorvida (0,053 a 0,157 Gy) após exposição ao $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ *in vitro* por uma hora a 37°C (TAB. 23, FIG.11), tanto nas amostras sanguíneas do grupo A (ANOVA, P = 0,87) quanto nas do grupo B (ANOVA, P = 0,79).

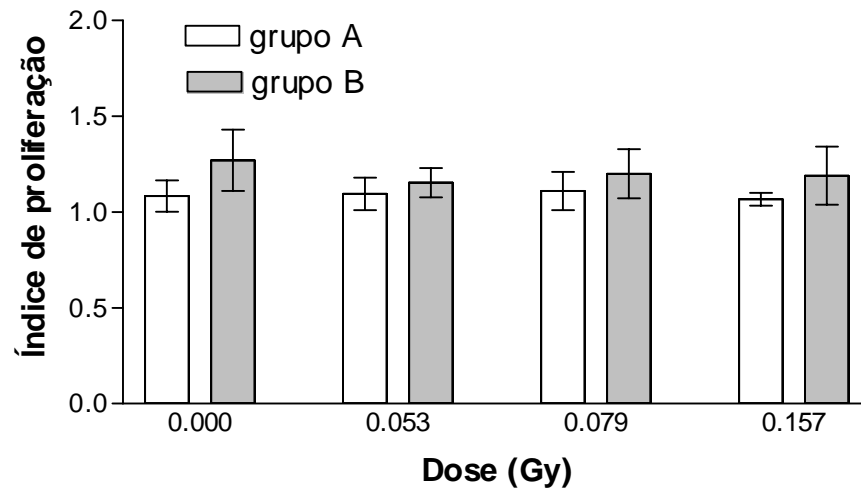


FIGURA 11 – Valores médios e desvios-padrão dos índices de proliferação em função da dose absorvida após exposição de amostras sanguíneas dos grupos A e B ao $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ *in vitro* por uma hora a 37°C

TABELA 23 - Frequências de células mononucleadas (CM), binucleadas (CB), multinucleadas (CMU) e índice de proliferação celular (IP) antes e após exposição a três concentrações radioativas de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ *in vitro*, avaliadas nos grupos A e B.

Grupo	Concentração radioativa (MBq/mL)	Dose estimada (Gy)	Total de células analisadas	Número de CM (%)	Número de CB (%)	Número de CMU (%)	Índice de proliferação celular
A	0	0	93060	89989 (93,99 ± 4,81)	3038 (5,96 ± 4,81)	33 (0,05 ± 0,06)	1,06 ± 0,05
	0,370	0,053	59204	56029 (92,04 ± 6,25)	3296 (8,08 ± 5,92)	61 (0,15 ± 0,13)	1,09 ± 0,06
	0,555	0,079	52457	49104 (89,88 ± 8,72)	3273 (9,86 ± 8,44)	80 (0,26 ± 0,34)	1,10 ± 0,09
	1,110	0,157	47808	44565 (89,84 ± 8,91)	3141 (9,79 ± 8,45)	102 (0,38 ± 0,48)	1,11 ± 0,09
B	0	0	28163	22490 (75,17 ± 14,47)	5278 (22,90 ± 13,05)	395 (1,92 ± 1,52)	1,27 ± 0,16
	0,370	0,053	31143	27152 (85,07 ± 7,33)	3843 (14,35 ± 6,85)	148 (0,59 ± 0,53)	1,13 ± 0,08
	0,555	0,079	28471	22891 (80,69 ± 12,48)	5415 (18,78 ± 12,15)	165 (0,53 ± 0,41)	1,20 ± 0,13
	1,110	0,157	30463	26584 (81,17 ± 14,72)	3791 (18,37 ± 14,32)	88 (0,47 ± 0,43)	1,19 ± 0,15

4.4 Efeito citotóxico do $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ *in vitro*

A análise de morte celular foi realizada 48h e 72h após as exposições ao $^{153}\text{Sm-EDTMP}$, utilizando-se a técnica de coloração diferencial em amostras sanguíneas de doadores do grupo A e B, cujos valores médios se encontram nas TABELAS 24 e 25. Os dados individuais após 48h estão apresentados nas TABELAS 26 e 27, e após 72h nas TABELAS 28 e 29.

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos A e B (teste t não emparelhado, $P > 0,05$) quanto às frequências basais de células viáveis, necróticas e apoptóticas, tanto 48h quanto 72h após a exposição ao $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ *in vitro* (TAB. 30). Também não foram observadas diferenças intragrupo entre 48h e 72h na frequência basal (teste t emparelhado, $P > 0,05$).

A FIGURA 12 mostra a representação gráfica das curvas dose-resposta ajustadas pelo modelo de regressão linear para células viáveis, necróticas e apoptóticas, 48h e 72h após a exposição com diferentes concentrações radioativas de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$. Pode-se observar que a necrose foi a principal modalidade de morte observada nos dois grupos de indivíduos. A frequência de células necróticas aumentou em função da dose de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$, tanto para doadores sadios como para pacientes, 48h e 72h após as exposições, com concomitante diminuição do número de células viáveis.

Em relação às células apoptóticas, somente os indivíduos portadores de câncer mostraram uma tendência ao aumento em função da dose de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$. Os dados obtidos mostraram que os indivíduos portadores de câncer apresentaram uma taxa mais alta de morte celular em relação aos indivíduos sadios.

Os valores dos coeficientes do modelo de regressão linear utilizados para o ajuste das curvas estão expressos na TABELA 31.

TABELA 24 - Frequência de células viáveis, apoptóticas e necróticas avaliadas pela coloração diferencial em amostras sanguíneas de doadores sadios (grupo A) e de pacientes com metástase óssea (grupo B) expostas a três concentrações de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ *in vitro* e analisadas após 48 horas.

Grupo	Concentração radioativa (MBq/mL)	Dose estimada (Gy)	Total de células analisadas	Número de células viáveis (%)	Número de células necróticas (%)	Número de células apoptóticas (%)
A	0	0	2000	1526 (76,30 ± 3,19)	239 (11,95 ± 4,11)	235 (11,75 ± 1,75)
	0,370	0,053	2499	1719 (66,05 ± 13,25)	516 (23,47 ± 10,73)	264 (10,47 ± 4,51)
	0,555	0,079	2101	1389 (65,60 ± 7,81)	568 (27,27 ± 6,49)	146 (7,25 ± 5,07)
	1,110	0,157	2100	1303 (61,85 ± 12,02)	568 (27,47 ± 14,28)	229 (10,67 ± 6,82)
B	0	0	1589	1109 (70,50 ± 10,91)	316 (19,27 ± 9,12)	164 (10,20 ± 1,93)
	0,370	0,053	1500	815 (54,33 ± 4,10)	448 (29,87 ± 3,05)	237 (15,80 ± 0,53)
	0,555	0,079	1500	807 (53,80 ± 5,94)	496 (33,07 ± 7,76)	197 (13,07 ± 7,22)
	1,110	0,157	1500	713 (47,53 ± 1,84)	550 (36,67 ± 6,40)	237 (15,80 ± 1,97)

TABELA 25 - Frequência de células viáveis, apoptóticas e necróticas avaliadas pela coloração diferencial em amostras sanguíneas de doadores sadios (grupo A) e de pacientes com metástase óssea (grupo B) expostas a três concentrações de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ *in vitro* e analisadas após 72 horas.

Grupo	Concentração radioativa (MBq/mL)	Dose estimada (Gy)	Total de células analisadas	Número de células viáveis (%)	Número de células necróticas (%)	Número de células apoptóticas (%)
A	0	0	2101	1548 (73,42 ± 6,48)	366 (17,67 ± 3,59)	187 (8,92 ± 4,04)
	0,370	0,053	2500	1649 (68,80 ± 12,74)	675 (24,70 ± 9,96)	176 (6,50 ± 3,05)
	0,555	0,079	2030	1378 (68,02 ± 12,65)	503 (24,72 ± 9,46)	149 (7,25 ± 5,31)
	1,110	0,157	2200	1363 (62,22 ± 13,91)	658 (29,27 ± 9,55)	179 (8,47 ± 6,42)
B	0	0	1500	925 (61,65 ± 14,53)	424 (28,30 ± 14,73)	151 (10,05 ± 3,43)
	0,370	0,053	1500	708 (47,20 ± 10,47)	585 (39,00 ± 15,18)	207 (13,80 ± 4,85)
	0,555	0,079	1500	652 (43,50 ± 12,44)	686 (45,70 ± 12,38)	162 (10,77 ± 3,98)
	1,110	0,157	1500	722 (48,13 ± 6,50)	556 (37,07 ± 4,50)	222 (14,80 ± 2,25)

TABELA 26 – Valores individuais referentes às frequências de células viáveis, necróticas e apoptóticas avaliadas pela coloração diferencial, 48h após a exposição de amostras sanguíneas de doadores sadios (grupo A) a três concentrações de ¹⁵³Sm-EDTMP.

Grupo	Doador	Concentração radioativa (MBq/mL)	Dose Estimada (Gy)	Total de células analisadas	Número de células viáveis (%)	Número de células necróticas (%)	Número de células apoptóticas (%)
A	A12	0	0	500	384 (76,8)	46 (9,2)	70 (14,0)
		0,370	0,053	500	370 (74,0)	107 (21,4)	23 (4,6)
		0,555	0,079	600	458 (76,3)	135 (22,5)	7 (1,2)
		1,110	0,157	500	356 (71,2)	132 (26,4)	12 (2,4)
	A13	0	0	500	402 (80,4)	42 (8,4)	56 (11,2)
		0,370	0,053	999	797 (79,8)	93 (9,3)	109 (10,9)
		0,555	0,079	500	318 (63,6)	148 (29,6)	34 (6,8)
		1,110	0,157	500	330 (66,0)	86 (17,2)	84 (16,8)
	A14	0	0	500	376 (75,2)	64 (12,8)	60 (12,0)
		0,370	0,053	500	254 (50,8)	168 (33,6)	78 (15,6)
		0,555	0,079	501	325 (64,9)	108 (21,6)	68 (13,6)
		1,110	0,157	600	396 (66,0)	110 (18,3)	94 (15,7)
A15	0	0	500	364 (72,8)	87 (17,4)	49 (9,8)	
	0,370	0,053	500	298 (59,6)	148 (29,6)	54 (10,8)	
	0,555	0,079	500	288 (57,6)	177 (35,4)	37 (7,4)	
	1,110	0,157	500	221 (44,2)	240 (48,0)	39 (7,8)	
Totais (médias ± d.p.)		0	0	2000	1526 (76,30 ± 3,19)	239 (11,95 ± 4,11)	235 (11,75 ± 1,75)
		0,370	0,053	2499	1719 (66,05 ± 13,25)	516 (23,47 ± 10,73)	264 (10,47 ± 4,51)
		0,555	0,079	2101	1389 (65,60 ± 7,81)	568 (27,27 ± 6,49)	146 (7,25 ± 5,07)
		1,110	0,157	2100	1303 (61,85 ± 12,02)	568 (27,47 ± 14,28)	229 (10,67 ± 6,82)

TABELA 27 - Valores individuais referentes às frequências de células viáveis, necróticas e apoptóticas avaliadas pela coloração diferencial, 48h após a exposição de amostras sanguíneas de pacientes com metástase óssea (grupo B) a três concentrações de ¹⁵³Sm-EDTMP.

Grupo	Doador	Concentração radioativa (MBq/mL)	Dose Estimada (Gy)	Total de células analisadas	Número de células viáveis (%)	Número de células necróticas (%)	Número de células apoptóticas (%)
B	B11	0	0	500	393 (78,6)	60 (12,0)	47 (9,4)
		0,370	0,053	500	286 (57,2)	136 (27,2)	78 (15,6)
		0,555	0,079	500	245 (49,0)	193 (38,6)	62 (12,4)
		1,110	0,157	500	268 (53,6)	161 (32,2)	71 (14,2)
	B12	0	0	589	342 (58,1)	174 (29,5)	73 (12,4)
		0,370	0,053	500	257 (51,4)	166 (33,2)	77 (15,4)
		0,555	0,079	500	287 (57,4)	182 (36,4)	31 (6,2)
		1,110	0,157	500	255 (51,0)	169 (33,8)	76 (15,2)
	B13	0	0	500	374 (74,8)	82 (16,3)	44 (8,8)
		0,370	0,053	500	272 (54,4)	146 (29,2)	82 (16,4)
		0,555	0,079	500	275 (55,0)	121 (24,2)	104 (20,6)
		1,110	0,157	500	190 (38,0)	220 (44,0)	90 (18,0)
Totais (médias ± d.p.)		0	0	1589	1109 (70,50 ± 10,91)	316 (19,27 ± 9,12)	164 (10,20 ± 1,93)
		0,370	0,053	1500	815 (54,33 ± 4,10)	448 (29,87 ± 3,05)	237 (15,80 ± 0,53)
		0,555	0,079	1500	807 (53,80 ± 5,94)	496 (33,07 ± 7,76)	197 (13,07 ± 7,22)
		1,110	0,157	1500	713 (47,53 ± 1,84)	550 (36,67 ± 6,40)	237 (15,80 ± 1,97)

TABELA 28 - Valores individuais referentes às frequências de células viáveis, necróticas e apoptóticas avaliadas pela coloração diferencial, 72h após a exposição de amostras sanguíneas de doadores sadios (grupo A) a três concentrações de ¹⁵³Sm-EDTMP.

Grupo	Doador	Concentração radioativa de (MBq/mL)	Dose Estimada (Gy)	Total de células analisadas	Número de células viáveis (%)	Número de células necróticas (%)	Número de células apoptóticas (%)	
A	A12	0	0	500	395 (79,0)	87 (17,4)	18 (3,6)	
		0,370	0,053	500	428 (85,6)	60 (12,0)	12 (2,4)	
		0,555	0,079	500	433 (86,6)	55 (11,0)	12 (2,4)	
		1,110	0,157	500	404 (80,8)	77 (15,4)	19 (3,8)	
	A13	0	0	501	335 (66,9)	101 (20,2)	65 (13,0)	
		0,370	0,053	1000	546 (54,6)	362 (36,2)	92 (9,2)	
		0,555	0,079	524	306 (58,4)	141 (26,9)	77 (14,7)	
		1,110	0,157	500	236 (47,2)	175 (35,0)	89 (17,8)	
	A14	0	0	600	474 (79,0)	76 (12,7)	50 (8,3)	
		0,370	0,053	500	337 (67,4)	133 (26,6)	30 (6,0)	
		0,555	0,079	506	316 (62,5)	165 (32,6)	25 (4,9)	
		1,110	0,157	700	414 (59,1)	253 (36,1)	33 (4,7)	
	A15	0	0	500	344 (68,8)	102 (20,4)	54 (10,8)	
		0,370	0,053	500	338 (67,6)	120 (24,0)	42 (8,4)	
		0,555	0,079	500	323 (64,5)	142 (28,4)	35 (7,0)	
		1,110	0,157	500	309 (61,8)	153 (30,6)	38 (7,6)	
	Totais (médias ± d.p.)		0	0	2101	1548 (73,42 ± 6,48)	366 (17,67 ± 3,59)	187 (8,92 ± 4,04)
			0,370	0,053	2500	1649 (68,80 ± 12,74)	675 (24,70 ± 9,96)	176 (6,50 ± 3,05)
			0,555	0,079	2030	1378 (68,02 ± 12,65)	503 (24,72 ± 9,46)	149 (7,25 ± 5,31)
			1,110	0,157	2200	1363 (62,22 ± 13,91)	658 (29,27 ± 9,55)	179 (8,47 ± 6,42)

TABELA 29 - Valores individuais referentes às frequências de células viáveis, necróticas e apoptóticas avaliadas pela coloração diferencial, 72h após a exposição de amostras sanguíneas de pacientes com metástase óssea (grupo B) a três concentrações de ¹⁵³Sm-EDTMP.

Grupo	Doador	Concentração radioativa (MBq/mL)	Dose Estimada (Gy)	Total de células analisadas	Número de células viáveis (%)	Número de células necróticas (%)	Número de células apoptóticas (%)
B	B11	0	0	500	341 (68,2)	91 (18,2)	68 (13,6)
		0,370	0,053	500	247 (49,4)	171 (34,2)	82 (16,4)
		0,555	0,079	500	233 (46,6)	192 (38,4)	75 (15,0)
		1,110	0,157	500	212 (42,4)	208 (41,6)	80 (16,0)
	B12	0	0	500	225 (45,0)	226 (45,2)	49 (9,8)
		0,370	0,053	500	179 (35,8)	280 (56,0)	41 (8,2)
		0,555	0,079	500	149 (29,8)	300 (60,0)	51 (10,2)
		1,110	0,157	500	234 (46,8)	185 (37,0)	81 (16,2)
	B13	0	0	500	359 (71,7)	107 (21,5)	34 (6,8)
		0,370	0,053	500	282 (56,4)	134 (26,8)	84 (16,8)
		0,555	0,079	500	270 (54,1)	194 (38,7)	36 (7,1)
		1,110	0,157	500	276 (55,2)	163 (32,6)	61 (12,2)
Totais (médias ± d.p.)		0	0	1500	925 (61,65 ± 14,53)	424 (28,30 ± 14,73)	151 (10,05 ± 3,43)
		0,370	0,053	1500	708 (47,20 ± 10,47)	585 (39,00 ± 15,18)	207 (13,80 ± 4,85)
		0,555	0,079	1500	652 (43,50 ± 12,44)	686 (45,70 ± 12,38)	162 (10,77 ± 3,98)
		1,110	0,157	1500	722 (48,13 ± 6,50)	556 (37,07 ± 4,50)	222 (14,80 ± 2,25)

TABELA 30 - Frequências basais de células viáveis (%), necróticas (%) e apoptóticas (%) em função do grupo e do tempo após a exposição ao $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ (média \pm d.p.).

Grupo	Tempo após a exposição ao $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ (h)	Células viáveis (%)	Células necróticas (%)	Células apoptóticas (%)
A	48	76,30 \pm 3,19	11,95 \pm 4,11	11,75 \pm 1,75
B		70,50 \pm 10,91	19,27 \pm 9,12	10,20 \pm 1,93
Teste t não emparelhado (A x B)		P = 0,35 (n.s.)	P = 0,21 (n. s.)	P = 0,32 (n. s.)
A	72	73,42 \pm 6,48	17,67 \pm 3,59	8,92 \pm 4,04
B		61,65 \pm 14,53	28,30 \pm 14,73	10,05 \pm 3,43
Teste t não emparelhado (A x B)		P = 0,20 (n.s.)	P = 0,21 (n. s.)	P = 0,71 (n.s.)

TABELA 31 - Coeficientes das curvas ajustadas pelo modelo de regressão linear ($Y = a + b.D$) para os dados de coloração diferencial após exposição de amostras de sangue total ao $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ *in vitro* para o grupo A (sadios, $n = 3$) e B (pacientes, $n = 3$).

Parâmetro	Tempo após a exposição ao $^{153}\text{Sm-EDTMP}$	Grupo	a	b
viabilidade	48h	A	$73,65 \pm 3,84$	$-85,78 \pm 41,83$
		B	$66,39 \pm 3,57$	$-136,40 \pm 38,90$
	72h	A	$73,17 \pm 4,44$	$-69,95 \pm 48,33$
		B	$55,70 \pm 5,49$	$-77,22 \pm 59,78$
necrose	48h	A	$15,80 \pm 3,94$	$93,40 \pm 42,98$
		B	$22,03 \pm 3,17$	$106,40 \pm 34,52$
	72h	A	$19,05 \pm 3,26$	$69,86 \pm 35,48$
		B	$33,83 \pm 5,93$	$51,05 \pm 64,60$
apoptose	48h	A	$10,58 \pm 1,97$	$-7,56 \pm 21,42$
		B	$11,54 \pm 1,81$	$30,12 \pm 19,72$
	72h	A	$7,80 \pm 1,88$	$-0,22 \pm 20,45$
		B	$10,46 \pm 1,71$	$26,15 \pm 18,66$

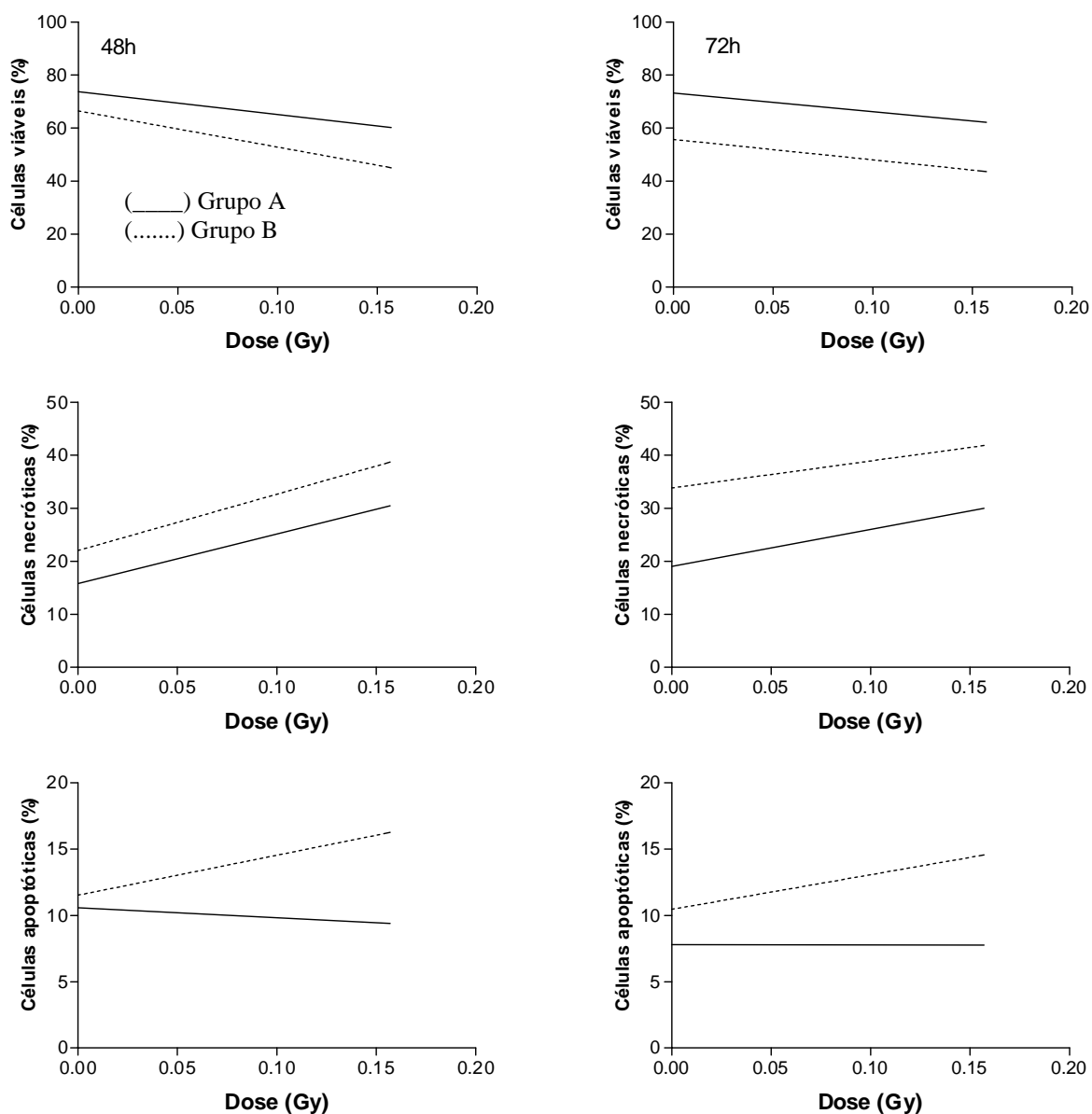


FIGURA 12 - Curvas dose-resposta ajustadas pelo modelo de regressão linear ($Y = a + b.D$) para indução de apoptose e necrose, analisadas após 48h e 72h da exposição de sangue total ao $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ *in vitro* (uma hora a 37°C) para os grupos A (sadios) e B (pacientes sem prévio tratamento radioterápico).

5. DISCUSSÃO

O uso crescente de radiofármacos para fins diagnósticos e terapêuticos tem sido acompanhado de dúvidas quanto aos seus efeitos genotóxicos e citotóxicos. Do ponto de vista clínico, com vista a um melhor acompanhamento da evolução da doença dos pacientes e da eficiência do tratamento, os benefícios superam os riscos.

Com o objetivo de contribuir para uma melhor compreensão dos efeitos genotóxicos e citotóxicos do $^{153}\text{Sm-EDTMP}$, foram realizados experimentos utilizando-se a técnica do micronúcleo e da coloração diferencial com amostras sanguíneas de indivíduos sadios (*in vitro*) e de pacientes com metástase óssea (*in vivo* e *in vitro*).

As análises dos efeitos genotóxicos têm sido amplamente realizadas contando-se os micronúcleos exclusivamente em células binucleadas (Stopper & Müller, 1997; Fenech e col., 1999b; Bonassi e col., 2001). Porém, a análise de micronúcleos também em células mononucleadas pode ser considerada, uma vez que esses dados podem indicar o dano cromossômico que estava presente *in vivo* antes do início do cultivo, em comparação aos micronúcleos em células binucleadas que são decorrentes de danos ocorridos tanto anteriores como posteriores à ação do agente genotóxico (Kirch-Volders & Fenech, 2001). Isto porque existe a possibilidade também de que os micronúcleos observados em células binucleadas sejam originários de células mononucleadas micronucleadas que, sob a ação da citocalasina-B, deram origem às células binucleadas contendo micronúcleos. Assim, a frequência de micronúcleos em células mononucleadas pode estimar a instabilidade genômica acumulada em células tronco (stem cells) e em linfócitos circulantes anterior ao tratamento. As células mononucleadas podem ser resultantes de células que não se dividiram, células com DNA duplicado, mas que não entraram em divisão nuclear, células que se dividiram mas escaparam do bloqueio da citocalasina-B ou células que nunca se dividirão por estarem iniciando um processo de morte celular por apoptose ou necrose (Kirch-Volders & Fenech, 2001).

No presente trabalho, em relação a frequência basal de micronúcleos, tanto em células mononucleadas como binucleadas, os doadores sadios apresentaram valores mais baixos que os pacientes do grupo B e estes mais baixos que os do grupo C. Porém a análise estatística mostrou que os grupos A e B são similares, mas ambos diferem do grupo C, tanto quanto à frequência de células micronucleadas (células com MN), quanto à

intensidade (MN/célula) e também quanto a distribuição do dano (células com um MN, com dois ou mais MN).

A diferença não estatisticamente significativa entre sadios e pacientes antes de qualquer tratamento está de acordo com os dados de outros autores (Fenech e col., 1990; Gantenberg e col., 1991; Gil e col., 2000).

No entanto, alguns autores que estudaram a frequência espontânea de MN/CB em pacientes com câncer observaram valores entre 0,006 e 0,046, para idades entre 17 e 88 anos, valores esses elevados quando comparados com os sadios (Duffaud e col., 1997; Venkatchalam e col., 1999a; Jagetia e col., 2001).

A ampla variação interindividual observada no grupo C de 0,011 a 0,054 em MN/CM e de 0,037 a 0,196 em MN/CB pode ser decorrente das diferenças nas doses cumulativas de radioterapia associada aos diferentes volumes e tecidos irradiados (próstata, mama, fígado, ovário, sarcoma). Porém outros fatores como estilo de vida, exposição a fatores ambientais diversos, estágio da doença, diferente radiosensibilidade, alterações no sistema imune ou na capacidade de reparo do DNA podem estar colaborando na expressão aumentada de MN (Fenech e col., 1990; Livingston e col., 1993; Gutierrez e col., 1997; Chang e col., 1999; Bilban-Jakopin & Bilban, 2001; Tsai e col., 2001).

O valor médio de MN/CB encontrado nos pacientes do grupo C, antes do tratamento com o $^{153}\text{Sm-EDTMP}$, corresponderia a uma dose absorvida equivalente de corpo inteiro de 1,1 Gy substituindo o valor na curva dose-resposta do trabalho de Ochi-Lohmann e colaboradores (1996). Segundo a curva de Lee e colaboradores (2000), este resultado corresponderia a uma dose de aproximadamente 1,0 Gy. Valores semelhantes foram obtidos por Venkatachalam e colaboradores (1999b).

Outros fatores têm sido relacionados com o aumento na frequência basal de micronúcleos da população em geral. Entre eles podemos citar a idade, o sexo, a exposição a agentes clastogênicos (fumo por exemplo) e diferenças na dieta (vegetarianos, consumo de bebidas contendo cafeína) (Fenech, 1993).

Em relação à idade, os dados basais de micronúcleos em células binucleadas (MN/CB) de indivíduos sadios (idade média de 32,8 anos) e de pacientes com metástase óssea sem radioterapia prévia (idade média de 68,8 anos) não diferiram. Isto significa que o fator idade não interferiu na indução de micronúcleos no presente estudo. Estes dados estão de acordo com os de Tomanin e colaboradores (1991) que analisando frequências

basais de micronúcleos em amostras de 45 indivíduos sadios, não encontraram relação com a idade nem com o sexo.

Entretanto, outros estudos mostram que células de indivíduos mais idosos teriam sua capacidade de reconhecimento de dano no DNA e reparo diminuídas (Lindhahl, 1993). Vários autores encontraram aumento da frequência de micronúcleos com o aumento da idade (Radack e col., 1995; Fenech, 1998; Paillole & Voisin, 1998; Thierens e col., 1999b). Vale ressaltar o trabalho de Peace & Succop (1999) que compilou vários dados da literatura de pesquisas envolvendo um número grande de doadores (amostragem maior que 40 indivíduos) de países diferentes, a fim de determinar um valor populacional. Os valores obtidos foram ajustados a um modelo linear extrapolando-se os valores para idades entre 1 e 100 anos, chegando à seguinte equação: $MN/CB = 0,003639 + (0,277 \cdot 10^{-3} \cdot \text{idade})$. O valor basal esperado dos doadores sadios para o intervalo de idade dos doadores do presente estudo (20 a 41 anos) seria de 0,009 a 0,015. Já para os dados de Fenech & Morley (1986), os valores esperados seriam de 0,024 a 0,046. Os valores observados neste estudo foram de 0,006 a 0,057.

Embora fatores como a dieta alimentar e a exposição a agentes genotóxicos sejam diferentes no Brasil em relação aos de outros países onde foram conduzidas as pesquisas (Austrália, Estados Unidos, países da Ásia e Europa), o valor médio encontrado no presente estudo ($0,023 \pm 0,012$; $n = 10$), para os doadores sadios e não fumantes (população urbana da cidade de São Paulo - SP), não diferiu dos outros países.

Vale lembrar que não existe na literatura um estudo com número significativo de doadores para que se possa estabelecer um padrão brasileiro para essa faixa etária. Um estudo populacional seria de interesse para a dosimetria biológica, uma vez que existe interesse em aplicar o teste do micronúcleo para uma avaliação preliminar anterior à análise de aberrações cromossômicas (Fenech, 1991; Miller e col., 1998; Thierens e col., 1999b).

A Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA, 2001) considera como valor normal de MN/CB o intervalo entre 0,002 e 0,036 para linfócitos humanos periféricos, independente da idade, cultivados em meio RPMI 1640 com fitohemaglutinina.

O consumo diário de cigarro pode resultar em aumento no número de micronúcleos em linfócitos periféricos (Larramendy & Knuutila, 1991; Ganguly, 1993; Da Cruz e col., 1994; Piperakis e col., 1998; Au e col., 2001). Os dois indivíduos (A11 e B9) que apresentaram valores elevados de MN/CB em relação à média do grupo neste estudo eram

fumantes (FIG. 3 e 4). Independentemente da idade (um sadio de 20 anos e um paciente de 76 anos), o fumo pode ter sido um fator determinante no aumento da frequência de micronúcleos. Porém há dados na literatura em que os autores não encontraram diferenças entre fumantes e não fumantes (Migliore e col., 1991; Ban e col., 1993; Thierens e col., 1999a).

Um outro fator, além da idade e do fumo, que poderia alterar a frequência de MN é o sexo. Tem sido observado que as mulheres apresentam frequência de MN mais alta que os homens (Bolognesi e col., 1993; Fenech, 1993; Radack e col., 1995; Peace & Succop, 1999). Não foi encontrada diferença na frequência basal entre homens e mulheres, tanto de MN/CB ($17,8 \pm 7,9$ e $27,6 \pm 8,9$) quanto de MN/CM ($4,0 \pm 2,3$ e $5,2 \pm 2,2$), neste trabalho (teste t não emparelhado, $P = 0,22$ - não significativo).

Quanto a avaliação do efeito genotóxico *in vivo*, a comparação entre as amostras sangüíneas antes e após a administração de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ dos dois grupos de pacientes (grupos B e C) mostrou que houve um aumento na frequência de células micronucleadas tanto em células mono quanto em binucleadas.

No entanto, aplicando-se o teste t pareado para os dados obtidos antes e após o tratamento, a diferença não foi significativa para a frequência de micronúcleos em células binucleadas. Porém, para as células mononucleadas houve diferenças estatisticamente significativas. No grupo C, observamos um aumento significativo na frequência de células com dois ou mais MN, uma hora após a administração de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$, enquanto que no grupo B, a diferença foi observada nas células com pouco dano, ou seja, apresentando apenas um micronúcleo. Portanto, o grupo C respondeu com mais intensidade ao tratamento, apresentando a proporção de células mais severamente danificadas mais alta após a exposição. O aumento na frequência de células micronucleadas sugere uma maior instabilidade genômica no grupo C e o tratamento radioterápico anterior pode ter contribuído de alguma forma para uma maior susceptibilidade ao dano ou uma menor capacidade de reparo do DNA (Catena e col., 1997; Watanabe e col., 1998a).

No caso em especial dos indivíduos B7 e C7, verificamos um aumento no número de MN/CB, uma hora após o $^{153}\text{Sm-EDTMP}$, de cerca de 2,3 vezes o valor basal. Esses valores em relação aos valores basais são superiores às médias dos grupos B e C. Uma das hipóteses que poderiam explicar esses aumentos seria o fator idade, no caso da paciente C7 que era a mais idosa (80 anos) do grupo C. No entanto, a idade pode não estar influenciando na resposta ao dano radioinduzido, tendo em vista a não significância

observada. Outra hipótese seria a dose administrada nesses dois pacientes (48 e 50 MBq/kg, a mais alta de cada grupo). Comparando-se os dados obtidos com a curva dose-resposta construída com o sangue exposto *in vitro*, observamos que para 50 MBq/kg espera-se um aumento de aproximadamente 2 vezes o valor basal, caso não haja captação ou depuração nenhuma, ou seja, o sangue em contato com o $^{153}\text{Sm-EDTMP}$, na mesma concentração, por uma hora. Caso tenha ocorrido uma menor taxa de depuração do compartimento sangüíneo para a bexiga urinária, isso resultaria em um maior tempo de exposição dos linfócitos ao $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ e, conseqüentemente, uma maior formação de MN. Infelizmente não pudemos avaliar a quantidade eliminada na urina desses pacientes.

Em relação aos indivíduos B2, B8, B9 e C3, que mostraram uma queda na proporção de células com micronúcleos após a administração do $^{153}\text{Sm-EDTMP}$, pode-se sugerir a interferência de fatores endógenos ou exógenos, relacionados ou não ao estágio da doença, ou mesmo a influência de algum componente genético que contribuíram para uma maior fragilidade dos linfócitos e posterior eliminação dessas células. Assim, a eliminação das células danificadas pode ter levado a uma diminuição na freqüência de células com micronúcleos. O indivíduo B9, por exemplo, apresentou uma taxa de micronúcleos basal elevada, muito provavelmente pelo fato de ser fumante. Assim, podemos supor que estas células já afetadas, ou seja, apresentando micronúcleos, quando atingidas pela radiação ionizante do $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ seriam eliminadas e, em conseqüência disto, uma menor freqüência de células com micronúcleos seria observada.

Na avaliação do efeito genotóxico *in vitro*, verificamos que houve um aumento na freqüência de micronúcleos com o aumento da concentração radioativa de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$, tanto em células binucleadas como também em mononucleadas nos dois grupos estudados, para todos os parâmetros (freqüência de células micronucleadas, intensidade e distribuição do dano).

Os valores dos coeficientes de inclinação das retas observados para as curvas dose-resposta para a indução de micronúcleos foram mais baixos nos sadios que nos pacientes. Isto mostra uma maior sensibilidade dos portadores de câncer. Essa maior radiosensibilidade dos pacientes pode estar relacionada de alguma forma à instabilidade genômica e associada, por sua vez, ao mecanismo de reparo mais lento ou deficiência de alguma enzima de reparo de quebras na fita de DNA (Kovacs e col, 1986; Sanford e col, 1993; Nocentini, 1995; Parshad e col, 1996; McCurdy e col., 1997; Foray e col., 1997; Nascimento e col., 2001). A radiação ionizante se caracteriza pela sua eficácia na indução

de quebras tanto na fita simples quanto na fita dupla do DNA. A quebra na fita simples é reparada mais rapidamente e com maior fidelidade, uma vez que a fita oposta serve como molde. Já a quebra na fita dupla envolve um mecanismo mais complexo de reparo, envolvendo um número maior de enzimas e pode levar até 40 horas para ser concluído (Olive, 1998). As quebras não reparadas ou reparadas erroneamente podem dar origem a micronúcleos que podem estar envolvidos em processos biológicos de grande significado como a morte celular, malformação, envelhecimento e câncer.

Uma maior radiosensibilidade dos pacientes com câncer em relação aos sadios também foi observada por outros autores após irradiação de linfócitos periféricos *in vitro* com doses de 2 e 4 Gy de ^{60}Co (Slonina & Ganinska, 1997), 3,5 Gy de ^{137}Cs (Scott e col., 1998; Scott e col., 1999) e 2,0 Gy de ^{60}Co (Rothfuss e col., 2000).

Não houve influência da molécula carreadora na formação dos micronúcleos e, portanto, o EDTMP (ácido etilenodiaminotetrametilenofosfônico) não apresentou um efeito clastogênico sobre os cromossomos.

A análise da cinética de proliferação celular dos linfócitos em cultura mostrou que não há diferenças entre indivíduos sadios e pacientes. A exposição *in vivo* e *in vitro* ao ^{153}Sm -EDTMP, nas concentrações até 1,110 kBq/mL, não acarretou retardo do ciclo celular em linfócitos sanguíneos. Em cultura de linfócitos humanos, têm sido observado uma relação entre dose de radiação e atraso na divisão celular. O atraso se deve a um bloqueio em G_1 , G_2 ou na fase S. O bloqueio em G_2 ocorre em todas as células eucarióticas independentemente da dose, enquanto que o bloqueio em G_1 parece depender do tipo celular e pode estar relacionado com a atividade da proteína p53: as células que apresentam a forma mutante ou as que não a possuem não apresentam o bloqueio. O aumento do nível da proteína p53, retardaria o ciclo mitótico de forma a permitir um tempo maior para que ocorra o reparo do DNA (*checkpoint control protein*) ou, por outro lado, aumentaria a síntese de outras proteínas relacionadas com a apoptose (Lee e col., 1994). Já o atraso na fase S ocorre com mais frequência nas doses altas (> 5 Gy).

O índice de proliferação não foi alterado com o tratamento, provavelmente devido ao fato da dose aplicada ser baixa. Müller & Rode (2002) observaram uma redução acentuada (50%) na frequência de CB após dose de 5 Gy, reduzindo-se até o valor de 1,5 % na dose de 15 Gy (raio-X, 1Gy/min).

Nossos resultados concordam com os de Tallon e col. (1998). Esses verificaram que linfócitos irradiados com raios X na fase G₁ na dose de 0,5 Gy não apresentaram atraso mitótico.

Quanto à avaliação do efeito citotóxico do ¹⁵³Sm-EDTMP, verificamos que a necrose foi a principal modalidade de morte em linfócitos periféricos tanto de indivíduos sadios quanto de pacientes.

As taxas basais de células necróticas e apoptóticas dos grupos A e B não foram diferentes, bem como entre 48h e 72h, o que mostra que o tempo de incubação não interferiu na indução de morte celular.

A radiação ionizante tem sido considerada um estímulo para apoptose tanto em linfócitos B como T em intérfase (Yamada & Ohyama, 1988), tanto após irradiações com baixa LET como alta LET (Vral e col, 1998).

Radford & Murphy (1994) sugeriram que a indução da apoptose ocorreria após uma ou mais divisões celulares devido a danos cromossômicos não reparados corretamente (aberrações cromossômicas e micronúcleos). Vários estudos sugerem que, tanto em linhagens normais como tumorais, um aumento da resposta apoptótica resulta em radiosensibilidade mais alta (Russel e col., 1995; Story e col., 1994). No presente trabalho foi observada uma resposta apoptótica mais alta dos pacientes em relação aos sadios em linfócitos estimulados por fitohemaglutinina após 48h e 72h. Esse período é suficiente para que ocorra uma divisão celular. Todavia, também há relatos onde a alteração da taxa de apoptose não afetou a radiosensibilidade (Akagi e col., 1993).

Delic e colaboradores (1995) observaram aumento no número de células apoptóticas após exposição de corpo inteiro para transplante de medula óssea. A avaliação *in vivo* diferiria da obtida *in vitro*, pois os corpos apoptóticos seriam rapidamente fagocitados, mas podem ser verificados nas primeiras 24h após irradiação de corpo inteiro com dose de 2 Gy.

Várias técnicas têm sido empregadas na avaliação de células apoptóticas como eletroforese em gel (Delic e col., 1995), teste do cometa (Olive & Banáth, 1993), citômetro de fluxo (Telford e col., 1994; Crompton, 1998) e TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick-end labeling) (Barber e col., 2000). Porém, a observação de critérios morfológicos celulares ainda pode ser considerada a melhor técnica (Olive & Banath, 1995; Vral e col., 1998, Louagie e col., 1998).

A análise das curvas sugere que as células dos pacientes apresentam uma taxa de morte celular por processo apoptótico dose-dependente, diferentemente dos sadios onde não foi observado um aumento na taxa de apoptose com o aumento da dose.

A morte celular, seja por necrose ou por apoptose, após uma dose de radiação, por um lado, evita a propagação de células danificadas, já a presença de células micronucleadas não garante que os danos não sejam propagados.

Os dados obtidos mostraram que os indivíduos portadores de câncer metastático mostraram-se mais susceptíveis à ação genotóxica e citotóxica do $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ *in vitro* em relação aos indivíduos sadios, respondendo com maior intensidade ao radiofármaco.

A baixa frequência de micronúcleos uma hora após a administração do radiofármaco, no intervalo de atividade total de 1628 a 4033 MBq, sugere que o dano genotóxico em linfócitos periféricos dos pacientes com metástase óssea, uma hora após a administração endovenosa de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$, seja mínimo e a dose absorvida tão baixa quanto a sensibilidade do técnica do micronúcleo. No entanto, para uma melhor compreensão dos efeitos citogenéticos posteriores (meses) e tardios (anos) do radiofármaco, seria necessário avaliar um maior número de pacientes coletando amostras sanguíneas por períodos maiores.

6. CONCLUSÕES

Os dados obtidos sobre as análises genotóxicas e citotóxicas do $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ em linfócitos periféricos de indivíduos sadios (grupo A) e de pacientes com metástase óssea (grupos B e C) realizadas tanto *in vivo* (26 a 50 MBq/kg) como *in vitro* (0,370 a 1,110 MBq/mL) por meio das técnicas de análise de micronúcleos e de coloração diferencial permitiram concluir que:

a) Os pacientes com câncer (grupos B e C) apresentaram valores basais de micronúcleos, tanto em mononucleadas quanto em binucleadas, mais altos que os indivíduos sadios (grupo A). No entanto, a análise estatística mostrou que somente o grupo C diferiu do grupo A.

b) Houve diferença significativa nas freqüências de micronúcleos em células mononucleadas de amostras sangüíneas de pacientes, com ou sem tratamento radioterápico anterior, uma hora após a administração do $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ em relação aos valores basais. Porém, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas quando se analisaram as células binucleadas com micronúcleos.

c) O $^{153}\text{Sm-EDTMP}$, nas concentrações radioativas utilizadas tanto nos ensaios *in vivo* como *in vitro*, não interferiu na cinética de proliferação celular.

d) Houve uma correlação positiva entre a concentração radioativa e a freqüência de micronúcleos em linfócitos sangüíneos periféricos expostos ao $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ *in vitro*, sendo o efeito genotóxico mais pronunciado nos pacientes que nos sadios. Os dados obtidos foram melhor ajustados ao modelo de regressão linear ($Y = a + b.D$).

e) A idade não influenciou na freqüência basal de micronúcleos dos indivíduos sadios e dos pacientes sem prévio tratamento radioterápico.

f) A molécula carreadora (EDTMP) não causou aumento na freqüência de micronúcleos, portanto, não teve efeito clastogênico.

g) Houve aumento na freqüência de células necróticas em amostras sangüíneas dos doadores sadios e pacientes, após 48h e 72h da exposição ao $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ *in vitro*, sendo o efeito citotóxico mais acentuado nos pacientes que nos sadios. A necrose foi a principal modalidade de morte celular encontrada nos dois grupos de doadores.

ANEXO 1: Modelo do termo de consentimento do paciente/doador**I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. Nome do Paciente/Doador:		
Documento de Identidade nº	Sexo:	Data de Nascimento: / /
Endereço:		

2. Responsável legal:		
Documento de Identidade nº	Sexo:	Data de Nascimento: / /
Endereço:		
Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc):		

Paciente faz parte de grupo não diferenciado?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
--	------------------------------	------------------------------

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. Título do protocolo de pesquisa: Efeito biológico das radiações ionizantes em linfócitos periféricos humanos		
2. Pesquisador responsável: Miriam Fussae Suzuki		
Cargo/função: Tecnologista	Inscr. Cons. Regional: 20394/01 D	Unidade do IPEN NM
3. Avaliação do risco da pesquisa: (probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo). <input checked="" type="checkbox"/> SEM RISCO <input type="checkbox"/> RISCO MÍNIMO <input type="checkbox"/> RISCO MÉDIO <input type="checkbox"/> RISCO MAIOR		
4. APROVAÇÃO DO PROTOCOLO DE PESQUISA PELA COMISSÃO DE ÉTICA PARA ANÁLISE DE PROJETOS DE PESQUISA EM .12/11/1998		
5. Duração da Pesquisa: 6 anos		

III - EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL

<p>1. justificativa e os objetivos da pesquisa (explicitar): O objetivo da pesquisa é analisar os efeitos da radiação em células sanguíneas. Portanto uma amostra de sangue é coletada e exposta ao radiofármaco em laboratório.</p>
<p>2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais: (explicitar) A amostra sanguínea no volume de 10 mL é coletada por punção venosa em seringa heparinizada e levada ao laboratório. Será exposta à radiação e cultivada em meio apropriado para a análise de micronúcleos e/ou morte celular.</p>
<p>3. desconfortos e riscos esperados: (explicitar) Nenhum. Não precisa estar em jejum.</p>
<p>4. benefícios que poderão ser obtidos: (explicitar) A pesquisa visa esclarecer os efeitos da radiação em linfócitos sanguíneos de pacientes tratados com radiofármacos aplicados por via endovenosa.</p>
<p>5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo: (explicitar) Não há.</p>
<p>6. esclarecimentos sobre a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento, a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa e o tratamento do indivíduo: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não</p>
<p>7. esclarecimentos sobre a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar no estudo, sem que isto traga prejuízo à continuação do seu cuidado e tratamento <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não</p>
<p>8. compromisso sobre a segurança de que não identificará o indivíduo e que se manterá o caráter confidencial da informação relacionada com a sua privacidade. <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não</p>
<p>9. disposição e compromisso de proporcionar informações obtidas durante o estudo, quando solicitada, ainda que possa afetar a vontade do indivíduo em continuar participando <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não</p>
<p>10. disponibilidade de assistência no caso de complicações e danos decorrentes da pesquisa. <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não</p>
<p>11. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES O resultado e as lâminas analisadas estarão disponíveis no laboratório por 5 anos.</p>

IV - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador, conforme registro nos itens 1 a 11, do inciso III, consinto em participar, na qualidade de paciente/doador, do Projeto de Pesquisa referido no inciso II.

São Paulo, / /200_.

Assinatura

ANEXO 2: Modelo da ficha de dados do paciente/doador**INFORMAÇÕES SOBRE O DOADOR**

NOME:
 SEXO: F M IDADE:anos
 PESO:kg RAÇA:
 TIPO DE CÂNCER:

TIPO DE RADIAÇÃO:

RADIONUCLÍDEO:

	DATA	QUANTIDADE (mL)	ATIVIDADE (Bq)
1ª DOSE			
2ª DOSE			
3ª DOSE			

Radioterapia

Período: Fonte: Cobalto Césio
 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:

Observações

.....

 Data: Setor:
 Responsável:

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AKAGI, Y.; ITO, K.; SAWADA, S. Radiation-induced apoptosis and necrosis in Molt-4 cells: a study of dose-effect relationships and their modification. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 64, p. 47-56, 1993.
2. ALBERTS, A. S.; BRINGTON, S. W.; KEMPF, P.; LOUW, W. K.; BEEK, A. V.; KRITZINGER, V.; WESTERINK, H. P.; Van RENSBURG, 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.
3. ALLEN, B. J.; BLAGOYEVIC, N. Alpha and beta emitting radiolanthanides in target cancer therapy: the potential role of Terbium-147. *Nucl. Med. Commun.*, v. 17, p. 40-47, 1996.
4. ATKINS, H. L. Overview of nuclides for bone pain palliation. *Appl. Radiat. Isot.*, v. 49, n. 4, p. 277-283, 1998.
5. AU, W. W.; OH, H. Y.; GRADY, J.; SALAMA, S. A.; HEO, M. Y. Usefulness of genetic susceptibility and biomarkers for evaluation of environmental health risk. *Environ. Mol. Mutagen.*, v. 37, p. 215-225, 2001.
6. BAN, S.; COLOGNE, J. B.; FUJITA, S.; AWA, A. A. Radiosensitivity of atomic bomb survivors as determined with a micronucleus assay. *Radiat. Res.*, v. 134, p. 170-178, 1993.
7. BAN, S.; SHINOHARA, T.; HIRAI, Y.; MORITAKU, Y.; COLOGNE, J.B.; MACPHEE, D.G. Chromosomal instability in BRCA1 or BRCA2-defective human cancer cells detected by spontaneous micronucleus assay. *Mutat. Res.*, v. 474, p. 15-23, 2001.
8. BARBER, J. B.; WEST, C. M.; KILTIE, A. E.; ROBERTS, S. A.; SCOTT, D. Detection of individual differences in radiation-induced apoptosis of peripheral blood lymphocytes in normal individuals, ataxia telangiectasia homozygotes and heterozygotes, and breast cancer patients after radiotherapy. *Radiat. Res.*, v. 153, n. 5, p. 570-578, 2000.
9. BARQUINERO, J. F.; BARRIOS, L.; CALLABIN, M. R.; MIRÓ, R.; RIBAS, M.; EGOZUE, J. Establishment and validation of a dose-effect curve for γ rays by cytogenetic analysis. *Mutat. Res.*, v. 326, p. 65-69, 1995.
10. BAYOUTH, J. E.; MACEY, D. J.; KASI, L. P.; FOSSELLA, F. V. Dosimetry and toxicity of Samarium-153-EDTMP administered for bone pain due to skeletal metastases. *J. Nucl. Med.*, v. 35 (1), p. 63-69, 1994.
11. BILBAN-JAKOPIN, C.; BILBAN, M. Genotoxic effects of radiotherapy and chemotherapy on circulating lymphocytes in patients with Hodgkin's disease. *Mutat. Res.*, v. 497, p. 81-88, 2001.

12. 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. Review.
13. BOLOGNESI, C.; PARRINI, M.; MERLO, F.; BONASSI, S. Frequency of micronuclei in lymphocytes from a group of floriculturists exposed to pesticides. *J. Toxicol. Environ. Health*, v. 40, p. 405-411, 1993.
14. BONASSI, S.; FENECH, M.; LANDO, C.; LIN, Y.; CEPPI, M.; CHANG, W. P.; HOLLAND, N.; BIGATTI, M. P.; BOLOGNESI, C.; JIA, C.; Di GIORGIO, M.; FERGUSON, L. R.; FUCIC, A.; LIMA, O. G.; HRELIA, P.; KRISHNAJA, P.; LEE, T.; MIGLIORE, L.; MIKHALEVICH, L.; MIRKOVA, E.; MOLESSO, P.; MÜLLER, W.; ODAGIRI, Y.; SCARFI, M. R.; SZABTSOVA, I.; VRAL, A.; ZIJMO, A. Human micronucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ. Mol. Mutag.*, v. 37, p. 31-45, 2001.
15. 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 Phys.*, v. 71, n. 5, p. 685-691, 1996.
16. BRASIL NUCLEAR. Alívio para as dores do câncer. Rio de Janeiro: ABEN, v. 9, n. 24, p. 28, 2002.
17. BROOKS, A. L. Biomarkers of exposure, sensitivity and disease. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 75, n. 12, p. 1481-1503, 1999.
18. BROOKS, A. L. Chromosome damage in liver cells from low dose rate alpha, beta and gamma irradiation: derivation of RBE. *Science*, v. 190, p. 1090-1093, 1974.
19. BRULAND, O. S.; SKRETTING, A.; OYVIN, P. S.; AAS, M. Targeted radiotherapy of osteosarcoma using ¹⁵³Sm-EDTMP. *Acta Oncol.*, v. 35, n. 3, p. 381-384, 1996.
20. CATENA, C.; PARASACCHI, P.; CONTI, D.; SGURA, A.; TRENTA, G.; RIGHI, E.; TRINCI, M. M.; TRINCI, M. Peripheral blood lymphocyte decrease and micronucleus yields during radiotherapy. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 72(5), p. 575-585, 1997.
21. CHANG, W. P.; TSAI, M. S.; HWANG, J. S.; LIN, Y. P.; HSICH, W. A.; HUANG, S. Y. Follow-up in the micronucleus frequencies and its subsets in human population with chronic low dose γ irradiation exposure. *Mutat. Res.*, v. 428, p. 99-105, 1999.
22. 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.
23. COUNTRYMAN, P. I.; HEDDLE, J. A. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat. Res.*, v. 41, p. 321-332, 1976.
 24. CROMPTON, N. E. A. Programmed cellular response to ionizing radiation damage. *Acta Oncol.*, v. 37, n. 2, p. 129-142, 1998.
 25. DA CRUZ, A. D.; McARTHUR, A. G.; SILVA, C. C.; CURADO, M. P.; GLICKMAN, B. W. Human micronucleus counts are correlated with age, smoking, and cesium-137 dose in the Goiânia (Brazil) radiological accident. *Mutat. Res.*, v. 313, p. 57-68, 1994.
 26. DA SILVA, M. A. *Efeito citogenético do ¹⁵³Sm-EDTMP em linfócitos periféricos de pacientes com câncer metastático*, 2001. Tese (doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
 27. DA SILVA, M. A.; SUZUKI, M. F.; GUIMARÃES, M. I. C. C.; BUCHIPIGUEL, C. A.; ROGERO, J. R.; YORIYAZ, H.; SIQUEIRA, P. T. D.; COELHO, P. R. P.; OKAZAKI, K. Comparative in vivo and in vitro study of the cytogenetic effects of ¹⁵³Sm-EDTMP in lymphocytes of patients with bone metastasis. *Cell. Mol. Biol.*, v. 48, n. 5, p. 493-499, 2002.
 28. DELIC, J. MAGDELÉNAT, H.; BARBAROUX, C.; CHAILLET, M-P; DUBRAY, B.; GLUCKMAN, E.; FOURQUET, A.; GIRINSKY, T.; COSSET, J. M. *In vivo* induction of apoptosis in human lymphocytes by therapeutic fractionated total body irradiation. *Br. J. Radiol.*, v. 68, p. 997-1003, 1995.
 29. DUFFAUD, F.; ORSIÈRE, T.; VILLANI, P.; PELISSIER, A. L.; VOLOT, F.; FAVRE, R.; BOTTA, A. Comparison between micronucleated lymphocyte rates observed in healthy subjects and cancer patients. *Mutagenesis*, v. 12, n. 4, p. 227-231, 1997.
 30. 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.
 31. EASTMOND, D.A.; TUCKER, J.D. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environ. Mol. Mutagen.*, v. 13, p. 34-43, 1989.
 32. 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.

33. FENECH, M. Optimisation of micronucleus assays for biological dosimetry. New Horizons. In: *Biological Dosimetry*. Wiley - Liss Inc., 1991. p. 373-386.
34. FENECH, M. The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat. Res.*, v. 285, p. 35-44, 1993.
35. FENECH, M. Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes – a biomarker for DNA damage in human populations. *Mutat. Res.*, v. 404, p. 155-165, 1998.
36. FENECH, M. A mathematical model of the *in vitro* micronucleus assay predicts false negative results if micronuclei are not specifically scored in binucleated cells or in cells that have completed one nuclear division. *Mutagenesis*, v. 15, n. 4, p. 329-336, 2000.
37. FENECH, M. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. *Drug Disc. Tod.*, v. 7, n. 22, p. 1128-1137, 2002. Review.
38. FENECH, M.; CHANG, W. P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.*, v. 534, p. 65-75, 2003.
39. FENECH, M.; CROTT, J.; TURNER, J.; BROWN, S. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. *Mutagenesis*, v. 14, n. 6, p. 605-612, 1999a.
40. 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.
41. FENECH, M.; HOLLAND, N.; CHANG, W. P.; ZEIGER, E.; BONASSI, S. The Human MicroNucleus Project – An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat. Res.*, v. 428, p. 271 – 283, 1999b.
42. FENECH, M.; MORLEY, A. A. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in vivo* ageing and low dose X-irradiation. *Mutat. Res.*, v. 161, p. 193-198, 1986.
43. FENECH, M.; MORLEY, A. A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res.*, v. 147, p. 29-36, 1985.
44. FENECH, M.; NEVILLE, S. Conversion of excision-repairable DNA lesions to micronuclei within one cell cycle in human lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.*, v. 19; p. 27-36, 1992.

45. FISHER, D. E. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell*, v. 78, p. 539-542, 1994.
46. FORAY, N.; PRISTLEY, A.; ALSBEIH, G.; BADIE, C.; CAPULAS, E. P.; ARLETT, C. F.; MALAISE, E. P. Hypersensitivity of ataxia telangiectasia fibroblasts to ionizing radiation is associated with a repair deficiency of DNA double-strand breaks. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 72, n. 3, p. 271-183, 1997.
47. FTACNIKOVA, S. Radiopharmaceuticals in nuclear medicine diagnostic procedures and the problem of radiation protection. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, v. 209, p. 355-360, 1996.
48. GALASKO, C.S.B. Mechanisms of bone destruction in the development of skeletal metastases. *Nature*, v. 263, p. 507-508, 1976.
49. 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.
50. GANTENBERG, H. W.; WUTTKE, K.; STREFFER, C.; MÜLLER, W. U. Micronuclei in human lymphocytes irradiated *in vitro* or *in vivo*. *Radiat. Res.*, v. 128, p. 276-281, 1991.
51. GIL, O. M.; OLIVEIRA, N.G.; RODRIGUES, A. S.; LAIRES, A.; FERREIRA, T. C.; LIMBERT, E.; RUEFF, J. No evidence of increased chromosomal aberrations and micronuclei in lymphocytes from nonfamilial thyroid cancer patients prior to radiotherapy. *Cancer Genet. Cytogen.*, v. 123, p. 55-60, 2000.
52. GOECKELER, W. F. Samarium Sm 153 Lexidronam for the palliation of painful bone metastases. *ANZ Nucl. Med.*, v. 29, n. 4, p. 69-71, 1998.
53. GOECKELER, W. F.; EDWARDS, B.; VOLKERT, W. A.; HOLMES, R. A.; SIMON, J.; WILSON, D. Skeletal localization of Samarium-153 chelates: potential therapeutic bone agents. *J. Nucl. Med.*, v.28, p. 495-504, 1987.
54. GOECKELER, W. F.; STONEBURNER, L. K.; KASI, L. P.; FOSSELLA, F. V.; PRICE, D. R.; FORDYCE, W. A. Analysis of urine samples from metastatic bone cancer patients administered ¹⁵³Sm-EDTMP. *Nucl. Med. Biol.*, v. 20, p. 657-661, 1993.
55. GORMAN, A.; McCARTHY, J.; FINUCANE, D.; REVILLE, W.; COTTER, T. Morphological assessment of apoptosis. In: COTTER, T. G.; MARTIN, S. G.; ABRAMS, J. *Techniques in apoptosis - a user's guide*. 1996. p. 8-9.
56. GUTIERREZ, 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.

57. HALL, C.; WELLS, J. Micronuclei in human lymphocytes as a biological dosimeter: preliminary data following beta irradiation *in vitro*. **J. Radiol. Prot.**, v. 8, p. 97-102, 1988.
58. HALL, E. J. **Radiobiology for the radiologist**. Philadelphia, J.B. Lippincott, 1994. cap. 2. p. 15-27.
59. HARRINGTON, E.A.; FANIDI, A.; EVAN, G. I. Oncogenes and cell death. **Current Opinion Genet. Devel.**, v. 4, p. 120- 129, 1994.
60. HARVEY, M. Choosing a test. Oxford. In: **Intuitive Biostatistic**. Oxford University Press, 1995. P. 297-302.
61. HÖGSTEDT, B. Micronuclei in lymphocytes with preserved cytoplasm. A method for assessment of cytogenetic damage in man. **Mutat. Res.**, v. 130, p. 63-72, 1984.
62. HOSPITAL DO CÂNCER, Centro de Tratamento e Pesquisa, Central da Dor, Medicina Nuclear, Terapia Radioisotópica da dor óssea metastática. banco de dados. Disponível em <<http://www.hospitaldocancer.org.br>>. Acesso em: 30 jun. 2002.
63. HUBER, R.; SCHRAUBE, H.; NAHRSTEDT, U.; BRASELMANN, H.; BAUCHINGER, M. Dose-response relationships of micronuclei in human lymphocytes induced by fission neutrons and by low LET radiations. **Mutat. Res.**, v. 306, p. 135-141, 1994.
64. IAEA – INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Technical report series, Cytogenetics analysis for radiation dose assessment - a manual, Micronucleus Assay, IAEA, Viena, n. 405, p. 81-89, 2001.
65. ICRP – INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION, Report of the task group on reference man, Pergamon Press, New York, n. 23, p. I-39, 1974.
66. INCA, Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. Estimativa da incidência e mortalidade por Câncer no Brasil: banco de dados. Disponível em <<http://www.inca.org.br/cancer/epidemiologia/estimativa2002/estimativas.html>>. Acesso em: 10 fev. 2003.
67. 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.
68. KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, v. 26, p. 239-257, 1972.
69. KIRSCH-VOLDERS, M.; FENECH, M. Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more

- comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. *Mutagenesis*, v. 16, n. 1, p. 51-58, 2001. Review.
70. KOVACS, E.; STUCKI, D.; WEBER, W.; MÜLLER, H-U. Impaired DNA-repair synthesis in lymphocytes of breast cancer patients. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, v. 22, n. 7, p. 863-869, 1986.
 71. KRONENBERG, A. Radiation-induced genomic instability. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 66, n.5, p. 603-609, 1994.
 72. LARRAMENDY, M. L.; KNUUTILA, S. Increased frequency of micronuclei in B and T8 lymphocytes from smokers. *Mutat. Res.*, v. 259, p. 189-195, 1991.
 73. LATTIMER, J.C.; CORWIN JR., L. A.; STAPLETON, J.; VOLKERT, W. A. ; EHRHARDT, G. J.; KETRING, A. R.; ANDERSON, S. K.; SIMON, J.; GOECKELER, W.F. Clinical and clinicopathologic response of canine bone tumor patients to treatment with Smarium-153 EDTMP. *J. Nucl. Med.*, v. 31, p. 1316-1325, 1990.
 74. LE ROUX, J.; SLABBERT, J.; SMIT, B.; BLEKKENHORST, G. Assessment of the micronucleus assay as a biological dosimeter using cytokinesis-blocked lymphocytes from cancer patients receiving fractionated partial body-radiotherapy. *Strahlenther. Onkol.*, v. 174, p. 75-81, 1998.
 75. LEE, J. M.; ABRAHAMSON, J. L. A.; BERSTEIN, A. DNA damage, oncogenesis and the p53 tumour-suppressor gene. *Mutat. Res.*, v. 307, p. 573-581, 1994.
 76. LEE, T.; 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.
 77. LENGAUER, C.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, v. 396, p. 643-649, 1998.
 78. LEVIN, V.; MEGHZIFENE, A.; IZEWSKA, J.; TATSUZAKI, H. Improving cancer care – increased need for radiotherapy in developing countries. *IAEA Bulletin*, v. 43, n. 2, p. 25-32, 2001.
 79. LEWINGTON, V. J. Targeted radionuclide therapy for bone metastases. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 20, p. 66-74, 1993.
 80. LEWINGTON, V. J. Cancer therapy using bone-seeking isotopes. *Phys. Med. Biol.*, v. 41, p. 2027-2042, 1996.
 81. LINDAHL, T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, v. 362, p. 709-715, 1993. Review.

82. LIVINGSTON, G. K.; FOSTER, A. E.; ELSON, H. R. Effect of in vivo exposure to iodine-131 on the frequency and persistence of micronuclei in human lymphocytes. *J. Tox. Environ. Health*, v. 40, p. 367-375, 1993.
83. LIVINGSTON, G. K.; JENSEN, R. H.; SILBERSTEIN, E. B.; HINNEFELD, J. D.; PRATT, G.; BIGBEE, W. L.; LANGLOIS, R. G.; GRANT, S. G.; SHUKLA, R. Radiobiological evaluation of immigrants from the vicinity of Chernobyl. *Int. J. Radiat. Res.*, v. 72, p. 703-713, 1997.
84. LIVINGSTONE, L. R.; WHITE, A.; SPROUSE, J.; LIVANOS, E.; JACKS, T.; TLSTY, T. D. Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell*, v. 70, p. 923-935, 1992.
85. LOGAN, K. W.; VOLKERT, W. A.; HOLMES, R. A. Radiation dose calculations in persons receiving injection of Samarium-153 EDTMP. *J. Nucl. Med.*, v. 28, p. 505-509, 1987.
86. LOUAGIE, H.; CORNELISSEN, M.; PHILIPPE, J.; VRAL, A.; THIERENS, H.; De RIDDER, L. Flow cytometric scoring of apoptosis compared to electron microscopy in gamma irradiated lymphocytes. *Cell Biol. Int.*, v. 22, n. 4, p. 277-283, 1998.
87. MACHADO, C. R.; MENCK, C. F. M. Human DNA repair diseases: from genome instability to cancer. *Braz. J. Genet.*, v. 20, n. 4, p. 755-762, 1997.
88. McCURDY, D.; TAI, L-Q.; FRIAS, S.; WANG, Z. Delayed repair of DNA damage by ionizing radiation in cells from patients with juvenile systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Radiat. Res.*, v. 147, p. 48-54, 1997.
89. MENZ, R.; ANDRES, R.; LARSSON, B.; OZSAHIN, M.; TROTT, K.; CROMPTON, N. E. A. Biological dosimetry: the potential use of radiation-induced apoptosis in human T-lymphocytes. *Radiat. Environ. Biophys.*, v. 36, p. 175-181, 1997.
90. MIGLIORE, L.; GUIDOTTI, P.; FAVRE, C.; NARDI, M.; SESSA, M. R.; BRUNORI, E. Micronuclei in lymphocytes of young patients under antileukemic therapy. *Mutat. Res.*, v. 263, p. 243-248, 1991.
91. MILL, A. J., WELLS, J.; HALL, S. C.; BUTLER, A. Micronucleus induction in human lymphocytes: comparative effect of X rays, alpha particles, beta particles and neutrons and implication for biological dosimetry. *Radiat. Res.*, v. 145, p. 575-585, 1996.
92. MILLER, B.; PÖTTER-LOCHER, F.; SEELBACH, A.; STOPPER, H.; UTESCH, D.; MADLE, S. Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM working group on the *in vitro* micronucleus test. *Mutat. Res.*, v. 410, p. 81-116, 1998.
93. MÜLLER, W.; RODE, A. The micronucleus assay in human lymphocytes after high radiation doses (5 - 15 Gy). *Mutat. Res.*, v. 502, p. 47-51, 2002.

94. NASCIMENTO, P. A.; SILVA, M. A.; OLIVEIRA, E. M.; SUZUKI, M. F.; OKAZAKI, K. Evaluation of radioinduced damage and repair capacity in blood lymphocytes of breast cancer patients. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 34, p. 165-176, 2001.
95. NOCENTINI, S. Comet assay analysis of repair of DNA strand breaks in normal and deficient human cells exposed to radiations and chemicals. Evidence for a repair pathway specificity of DNA ligation. *Radiat. Res.*, v. 144, p. 170-180, 1995.
96. OCHI-LOHMANN, T. A.; OKAZAKI, K.; MADRUGA, M. R.; PEREIRA, C. A. de B., RABELLO-GAY, M. N. Radiosensitivity of blood lymphocytes from basocellular carcinoma patients, as detected by the micronucleus assay. *Mutat. Res.*, v. 357, p. 97-106, 1996.
97. 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. *Rheumatology* (Oxford), v. 38, n. 4, p. 316-320, 1999.
98. OLIVE, P. L. The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation. *Radiat. Res.*, v. 150, p. S42-S51, 1998.
99. OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P. Detection of DNA double-strand breaks through the cell cycle after exposure to X-rays, bleomycin, etoposide and ¹²⁵I dUrd. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 64, n. 4, p. 349-358, 1993.
100. OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P. Sizing highly fragmented DNA in individual apoptotic cells using the comet assay and a DNA crosslinking agent. *Exp. Cell Res.*, v. 221, p. 19-26, 1995.
101. OLIVE, P. L.; DURAND, R. E. Apoptosis: an indicator of radiosensitivity *in vitro*? *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 71, n. 6, p. 695-707, 1997.
102. 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.
103. O'MARA, R. E.; MCAFEE, J. G.; SUBRAMANIAN, G. Rare earth nuclides as potential agents for skeletal imaging. *J. Nucl. Med.*, v. 10, p. 49-51, 1969.
104. PAILLOLE, M.; VOISIN, P. Is micronuclei yield variability a problem for overexposure dose assessment to ionizing radiation? *Mutat. Res.*, v. 413, p. 47-56, 1998.
105. PARSHAD, R.; PRICE, F. M.; BOHR, V. A.; COWANS, K. H.; ZUJEWSKI, J. A.; SANFORD, K. K. Deficient DNA repair capacity, a predisposing factor in breast cancer. *Br. J. Cancer*, v. 74, p. 1-5, 1996.

106. PEACE, B. E.; SUCCOP, P. Spontaneous micronucleus frequency and age: what are normal values? *Mutat. Res.*, v. 425, p. 225-230, 1999.
107. PIPERAKIS, S. M.; VISVARDIS, E. –E.; SAGNOU, M.; TASSIOU, A. M. Effects of smoking and aging on oxidative DNA damage of human lymphocytes. *Carcinogenesis*, v. 19, n. 4, p. 695-698, 1998.
108. POUGET, J.; MATHER, S. J. General aspects of the cellular response to low- and high-LET radiation. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 28, n. 4, p. 541-561, 2001. Review.
109. PROSSER, J. S.; MOQUET, J. E.; LLOYD, D. C.; EDWARDS, A. A. Radiation induction of micronuclei in human lymphocytes. *Mutat. Res.*, v. 199, p. 37-45, 1988.
110. RADACK, K.L.; PINNEY, S.M.; LIVINGSTON, G. K. Sources of variability in the human lymphocyte micronucleus assay: a population-based study. *Environ. Mol. Mutag.*, v. 26, p. 26-36, 1995.
111. RADFORD, I. R.; MURPHY, T. K. Radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines. Part 3. Different signals can lead to apoptosis and may influence sensitivity to killing by DNA double strand breakage. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 65, p. 229-239, 1994.
112. RAMAKRISHNAN, N.; McCLAIN, D. E.; CATRAVAS, G. N. Membranes as sensitive targets in thymocyte apoptosis. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 63, p. 693-701, 1993.
113. RESCHE, I., CHATAL, J. –F.; PECKING, A.; ELL, P.; DUCHESNE, G.; RUBENS, R.; FOGELMAN, I.; HOUSTON, S.; FAUSER, A.; FISCHER, M.; WILKINS, D. A dose-controlled study of ¹⁵³Sm- ethylene diaminetetramethylenephosphonate (EDTMP) in treatment of patients with painful bone metastases. *Eur. J. Cancer*, v. 33, p. 1583-1591, 1997.
114. RIBAS, M.; MIRÓ, R.; GELABERT, A.; EGOZCUE, J. Chromosome instability in lymphocytes from two patients affected by three sequential primary cancers: the role of fragile sites. *Cancer Genet. Cytogenet.*, v. 110, p. 133-135, 1999.
115. ROSIN, M. P.; OCHS, H. D. *In vivo* chromosomal instability in ataxia-telangiectasia homozygotes and heterozygotes. *Human Genet.*, v. 74, p. 335-340, 1986.
116. ROTHFUSS, A.; SCHUTZ, P.; BOCHUM, S. BOLM, T.; EBERHARDT, E.; KREIENBERG, R.; VOGEL, W.; SPEIT, G. Induced micronucleus frequencies in peripheral lymphocytes as a screening test for carriers of a BRCA1 mutation in breast cancer families. *Cancer Res.*, v. 60, p. 390-394, 2000.
117. RUSSEL, J.; WHELDON, T. E.; STANTON, P. A radioresistant variant derived from a human neuroblastoma cell line is less prone to radiation-induced apoptosis. *Cancer Res.*, v. 55, p. 4915-4921, 1995.

118. SABATIER, L.; LEBEAU, J.; DUTRILLAUX, B. Radiation-induced carcinogenesis: individual sensitivity and genomic instability. *Radiat. Environ. Biophys.*, v. 34, n. 4, p. 293-232, 1995. Review.
119. SANFORD, K. K.; PARSHAD, R.; PRICE, F. M.; TARONE, R. E.; SCHAPIRO, M. B. X-ray-induced chromatid damage in cells from Down syndrome and Alzheimer disease patients in relation to DNA repair and cancer proneness. *Cancer Genet. Cytogenet.*, v. 70, p. 25-30, 1993.
120. SCOTT, D.; BARBER, J. B. P.; LEVINE, E. L.; BURRIL, W.; ROBERTS, S. A. Radiation-induced micronucleus induction in lymphocytes identifies a high frequency of radiosensitive cases among breast cancer patients: a test for predisposition? *Br. J. Cancer*, v. 77, n. 4, p. 614-620, 1998.
121. SCOTT, D.; BARBER, J. B. P.; SPREADBOROUGH, A. R.; BURRIL, W.; ROBERTS, S. A. Increased chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients: a comparison of two assays. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 75, n. 1, p. 1–10, 1999.
122. SHOU-PENG, Z.; DONG, X.; XIAO-FENG, H. Electron microscopic observations and DNA fragmentation studies on apoptosis in bone tumor cells induced by ¹⁵³Sm-EDTMP. *Nucl. Sci. Tech.*, v. 8, n. 3, p. 163-165, 1997.
123. SHOU-PENG, Z.; DONG, X.; XIAO-FENG, H. DNA gel electrophoretic and microautoradiographic studies on apoptosis in bone tumor cells after exposure with ¹⁵³Sm-EDTMP. *Nucl. Sci. Tech.*, v. 10, n. 1, p. 5-7, 1999.
124. SINGH, A.; HOLMES, R. A.; FARHANGI, M.; VOLKERT, W. A.; 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.
125. SLONINA, D.; GASINSKA, A. Intrinsic radiosensitivity of healthy donors and cancer patients as determined by the lymphocyte micronucleus assay. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 72, p. 693-701, 1997.
126. SRIVASTAVA, S. C. Bone-seeking therapeutic radiopharmaceuticals. *Braz. Arquiv. Biol. Tech.*, v. 45, p. 45-55, 2002.
127. STOPPER, H.; MÜLLER, S. O. Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: a minireview. *Toxic. in vitro*, v. 11, p. 661-667, 1997.
128. STORY, M. D.; VOEHRINGER, D. W.; MALONE, C. G.; HOBBS, M. L.; MEYN, R. E. Radiation-induced apoptosis in sensitive and resistant cells isolated from a mouse lymphoma. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 66, p. 659-668, 1994.
129. STREFFER, C.; MÜLLER, W. -U.; KRYSCIO, A.; BÖECKER, W. Micronuclei – biological indicator for retrospective dosimetry after exposure to ionizing radiation. *Mutat. Res.*, v. 404, p. 101-105, 1998.

130. SURRALLÉS, J.; CARBONELL, E.; MARCOS, R.; DEGRASSI, F.; ANTOCCIA, A.; TANZARELLA, C. A collaborative study on the improvement of the micronucleus test in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis*, v. 7, n. 6, p. 407-410, 1992.
131. SZUMIEL, I. Review: ionizing radiation induced cell death. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 66, p. 329-341, 1994.
132. TALLON, I.; VERSCHAEVE, L.; KIRSCH-VOLDERS, M. Cell cycle dependent aneuploidy induction by X-rays in vitro in human lymphocytes. *Microsc. Res. Tech.*, v. 40, p. 344-353, 1998.
133. TELFORD, W. G.; KING, L. E.; FRAKER, P. J. Rapid quantitation of apoptosis in pure and heterogeneous cell populations using flow cytometry. *J. Immun. Methods*, v. 172, p. 1-16, 1994.
134. THIERENS, H.; VRAL, A.; BARBÉ, M.; AOUSALAH, B.; De RIDDER, L. A cytogenetic study of nuclear power plant workers using the micronucleus-centromere assay. *Mutat. Res.*, v. 445, p. 105-111, 1999a.
135. THIERENS, H.; VRAL, A.; DE RIDDER, L.; TOUIL, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; LAMBERT, V.; LAURENT, C. Inter-laboratory comparison of cytogenetic endpoints for the biomonitoring of radiological workers. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 75, n. 1, p. 23-34, 1999b.
136. TOMANIN, R.; BALLARIN, C.; NARDINI, B.; MASTRANGELO, G.; SARTO, F. Influence of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes by the cytokinesis block method. *Mutagenesis*, v. 6, n. 2, p. 123-126, 1991.
137. TONCHEVA, D.; NACHEVA, M. Chromosomal instability in cancer patients. *Hum. Genet.*, v. 103, p. 367-369, 1998.
138. TSAI, M-H.; HWANG, J-S.; CHEN, K-C.; LIN, Y-P.; HSIEH, W. A.; CHANG, Q. P. Dynamics of changes in micronucleus frequencies in subjects post cessation of chronic low-dose radiation exposure. *Mutagenesis*, v. 16, n. 3, p. 251-255, 2001.
139. VENKATACHALAM, P.; SOLOMON, F. D. P.; MOHANKUMAR, M.N.; PHABHU, 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 a.
140. VENKATACHALAM, P.; SOLOMON, F. D. P.; PHABHU, B.K.; MOHANKUMAR, M.N.; GAJENDIRAN, N.; JEEVANRAM, R.K. Estimation of dose in cancer patients treated with fractionated radiotherapy using translocation, dicentrics and micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes. *Mutat. Res.*, v. 429, p. 1-12, 1999 b.
141. VRAL, A.; CORNELISSEN, M.; THIERENS, G.; LOUAGIE, H.; PHILIPPÉ, J.; STRIJCKMANS, K.; DE RIDDER, L. Apoptosis induced by fast neutrons versus

- ^{60}Co γ rays in human peripheral blood lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 73, p. 289-295, 1998.
142. VRAL, A.; VERHAEGEN, F.; THIERENS, H.; DE RIDDER, L. Micronuclei induced by fast neutrons versus ^{60}Co γ -rays in human peripheral blood lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 65, n. 3, p. 321-328, 1994.
 143. VULPIS, N. The induction of chromosome aberrations in human lymphocytes by *in vitro* irradiation with β particles from tritiated water. *Radiat. Res.*, v. 97, p. 511-518, 1984.
 144. VULPIS, N.; SCARPA, G. Induction of chromosome aberrations by ^{90}Sr β particles in cultured human lymphocytes. *Mutat. Res.*, v. 163, p. 277-283, 1986.
 145. WANG, S. I.; PUC, J.; LI, J.; BRUCE, J. N.; CAIRNS, P.; SIDRANSKY, D.; PARSONS, R. Somatic mutation of PTEN in glioblastoma multiforme. *Cancer Res.*, v. 57, p. 4183-4186, 1997.
 146. WATANABE, M.; KAYATA, S.; KODAMA, S.; SUZUKI, K.; SUGAHARA, T. Genetic instability induced by low-dose radiation. High levels of natural radiation. Radiation dose and health effects, Luxin Wei, Tsutomu Sugahara, Zifan Tao eds., p. 391 –395, 1997.
 147. WATANABE, N.; YOKOYAMA, K.; KINUYA, S.; SHUKE, N.; SHIMIZU, M.; MICHIGISHI, T.; TONAMI, N.; SETO, H.; GOODWIN, D.A. Radiotoxicity after Iodine-131 therapy for thyroid cancer using the micronucleus assay. *J. Nucl. Med.*, v. 39, p. 436-440, 1998 a.
 148. 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, p. 2077-2079, 1998 b.
 149. WHELDON, T.E.; O'DONOGHUE, J. A. The radiobiology of targeted radiotherapy. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 58, p. 1-21, 1990. Review.
 150. WUTTKE, K.; STREFFER, C.; MULLER, W. U.; REINERS, C.; BIKO, J.; DEMIDCHIK, E. Micronuclei in lymphocytes of children from the vicinity of Chernobyl before and after ^{131}I therapy for thyroid cancer. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 69, p. 259-268, 1996.
 151. YAMADA, T.; OHYAMA, H. Radiation-induced interphase death of rat thymocytes is internally programmed (apoptosis). *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 53, p. 65-75, 1988.
 152. ZHUANG, Z.; PARK, W. S.; PACK, S.; SCHMIDT, L.; VORTMEYER, A. O.; PAK, E.; PHAM, T.; WAIL, R. J.; CANDIDUS, S.; LUBENSKY, L. A.; LINEHAN, W. M.; ZBAR, B.; WEIRICH, G. Trisomy 7-harboring non-random

duplication of the mutant MET allele in hereditary papillary renal carcinomas. *Nat. Genet.*, v. 20, p. 66-69, 1998.