

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS
ENERGÉTICAS E NUCLEARES
(PROTEN/UFPE – CRCN-NE/CNEN)**

**VIABILIDADE CELULAR PARA PROGNÓSTICO DE
EFEITOS COLATERAIS EM RADIOTERAPIA DE
CÂNCER DE LARINGE**

HEBERTON FERREIRA

RECIFE-PERNAMBUCO - BRASIL

JULHO - 2012

**VIABILIDADE CELULAR PARA PROGNÓSTICO DE
EFEITOS COLATERAIS EM RADIOTERAPIA DE
CÂNCER DE LARINGE**

VIABILIDADE CELULAR PARA PROGNÓSTICO DE EFEITOS COLATERAIS EM RADIOTERAPIA DE CÂNCER DE LARINGE

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, do Departamento de Energia Nuclear, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Dosimetria e Instrumentação Nuclear.

ORIENTADOR: PROF. DR. ADEMIR DE JESUS AMARAL

RECIFE - PERNAMBUCO-BRASIL

JULHO – 2012

F383v **Ferreira, Heberton.**

Viabilidade celular para prognóstico de efeitos colaterais em radioterapia de câncer de laringe. / Heberton Ferreira. - Recife: O Autor, 2012.

75 f. : il., tab., gráf.

Orientador: Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, 2012.

Inclui Referências Bibliográficas.

**1. Viabilidade celular. 2. Efeitos colaterais.
3. Radioterapia. 4. Câncer de laringe. I. Amaral, Ademir de Jesus (orient.). II. Título.**

612.01448 CDD (21. ed.)

UFPE/BDEN/2012-007

**VIABILIDADE CELULAR PARA PROGNÓSTICO DE EFEITOS
COLATERAIS EM RADIOTERAPIA DE CÂNCER DE LARINGE**

Heberton Ferreira

APROVADA EM: 30.07.2012

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral

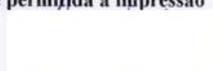
COMISSÃO EXAMINADORA:


Prof. Dr. Thiago de Salazar e Fernandes – DBR/UFPE


Profa. Dra. Edvane Borges da Silva – CAV-UFPE


Profa. Dra. Marcela Maria Pereira Lemos Pinto – DEN/UFPE

Visto e permitida a impressão


Coordenador do PROTEN/DEN/UFPE


Prof. Elmo Silvano de Araújo
PROTEN-UFPE/CRCN-NE-CNEN
Coordenador

Dedico à minha família

AGRADECIMENTOS

À minha família, a quem dedico esta dissertação. O seu apoio e carinho foram essenciais ao longo desta dissertação, bem como durante todo o meu percurso acadêmico.

Às minhas irmãs acadêmicas, Thaísa, Marcela, Neyliane e Suelen, pelo exemplo, auxílio e motivação, e pela verdadeira amizade em todos os momentos e circunstâncias. Especialmente Thaísa, pois através de seu apoio este trabalho pôde se desenvolver e ser concluído.

À Ludimila, minha esposa, pelo apoio, força, motivação, amizade e companheirismo durante esse processo de entrega e aprendizado.

Aos colegas e amigos Alex, Marcílio e Renata por nos tornarmos uma equipe durante este processo de aprendizagem, pelos conhecimentos transmitidos e pelo apoio na dissertação.

Aos colegas e amigos do Grupo de Estudos em Radioproteção e Radioecologia (GERAR), especialmente Prof^a. Edvane Borges e Maria Helena pela disponibilidade e participação direta neste trabalho.

Ao Prof. Ademir de Jesus Amaral, pela orientação da dissertação, transmissão de conhecimentos e amizade. Agradeço a disponibilidade e todos os ensinamentos.

À Dra. Ana Luiza Fassizoli por disponibilizar o Setor de Radioterapia do IMIP para que este trabalho pudesse ser desenvolvido.

A todos os funcionários do Departamento de Energia Nuclear, por tornarem o departamento uma instituição onde pessoas podem se desenvolver academicamente.

À Universidade Federal de Pernambuco, pelos meios disponibilizados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), por disponibilizar o apoio financeiro.

RESUMO

O câncer de laringe é a segunda neoplasia maligna mais comum no trato respiratório. Na fase inicial desta doença, a radioterapia é uma das principais opções de tratamento e cura desses tumores. Submetidos ao mesmo protocolo de tratamento, os pacientes irradiados apresentam efeitos colaterais cujas intensidades variam em função da radiosensibilidade individual. Alguns dos efeitos colaterais comuns da radioterapia de câncer de laringe são: eritema, rouquidão, disfagia e odinofagia. Neste contexto, a existência de testes pré-tratamento para caracterização da sensibilidade individual contribuiria para minimização desses efeitos, bem como para melhoria da qualidade de vida do paciente. Esta pesquisa analisou a taxa de viabilidade de linfócitos do sangue periférico, após irradiados *in vitro*, como bioindicador de radiosensibilidade de pacientes encaminhados para radioterapia de câncer de laringe (estádios clínicos T1 e T2), objetivando comparar o percentual de viabilidade celular (VC) pré-tratamento com a intensidade dos efeitos colaterais apresentados por pacientes, pós-tratamento. Para tanto, foram coletadas amostras de sangue periférico de 16 indivíduos portadores de tumores de laringe, as quais foram irradiadas com doses de 2 e 2,5 Gy, a partir de um acelerador linear. Para cada indivíduo, foi mantida uma alíquota não irradiada, como controle. A viabilidade dos linfócitos foi analisada utilizando o corante azul de Tripán. Por outro lado, os diferentes graus dos efeitos colaterais foram avaliados logo após a última sessão de radioterapia, com base nos critérios do Grupo Oncológico de Terapia das Radiações. Os resultados não apresentaram correlação entre percentual de viabilidade celular e eritemas, principalmente devido à falta de controle no uso de substâncias hidratantes prescritas aos pacientes, como o Dersani, que tem efeito radioprotetor. Entretanto, foram encontradas boas correlações entre os percentuais de viabilidade celular e níveis de rouquidão, disfagia e odinofagia a partir da percepção do próprio paciente, provavelmente devido à estreita relação desses efeitos com inflamações e edemas na região da laringe. De forma geral, os resultados sugerem que o método proposto para análise da viabilidade de linfócitos irradiados *in vitro* auxilia no prognóstico de efeitos colaterais resultantes da radioterapia de pacientes com câncer de laringe, contribuindo na definição de medidas preventivas para minimizar os efeitos adversos do tratamento.

Palavras-chave: Viabilidade celular, Efeitos colaterais, Radioterapia, Câncer de laringe.

CELL VIABILITY FOR PROGNOSIS OF SIDE EFFECTS IN RADIOTHERAPY OF LARYNX CANCER

ABSTRACT

Laryngeal cancer is the second most common malignancy in the respiratory tract. In the initial phase of this disease, radiotherapy is one of the main options for treatment and cure of these tumors. Irradiated patients experience side effects which intensities vary depending on the individual radiosensitivity. Some of the common side effects of radiotherapy for cancer of the larynx are: erythema, hoarseness, dysphagia and odynophagia. In this scenario, the existence pre-treatment tests for evaluating individual radiosensitivity could help to predict and minimize side effects as well as improving the quality of life of patients. In this context, this research investigated the viability of peripheral blood lymphocytes, after irradiation *in vitro*, as bioindicator of individual radiosensitivity from patients undergoing radiotherapy of laryngeal cancer (clinical stages T1 and T2). The aim of this work was to compare the percentage of cell viability, before patients' treatment, with the intensity of side effects presented by them post-treatment. For this, peripheral blood samples were collected from 16 individuals with laryngeal tumors. Samples were separately irradiated with doses of 2 and 2.5 Gy using a linear accelerator. For each subject sample, an aliquot was kept non-irradiated, as a control. The viability of the lymphocytes was tested using Trypan blue dye. The different degrees of side effects were assessed after the last session of radiotherapy, based on the criteria of the Radiation Therapy Oncology Group. The results showed no correlation between the percentage of cell viability and erythema, mainly due to lack of control in the use of moisturizing substances prescribed as radioprotective effect. On the other hand, good correlations were found between the percentage of cell viability and levels of hoarseness, dysphagia and odynophagia from the perception of the patient. These last results are probably related to close relation between inflammation and edema of the larynx region, so the larger the indices of cell viability, more cells remained battered by radiation in the tissue indicating the need for repairs, thus leading to inflammation and edema more acute and more severe side effects then. These finds suggest the use of viability of lymphocytes irradiated *in vitro* as predictor of side effects of radiotherapy of patients with laryngeal cancer, which may permit the definition of measures to minimize such effects.

Keywords: Cell Viability, Radiotherapy Side Effects, Cancer of the larynx

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema anatômico da laringe	4
Figura 2 - Radiólise da água e formação de radicais hidroxil.	9
Figura 3 - Interação direta e indireta da radiação com o DNA.....	10
Figura 4 - Radiografia (convencional) comparada à tomografia (conformacional).....	13
Figura 5 - Paciente em Tratamento.....	15
Figura 6 - Curva de sobrevivência celular <i>in vitro</i> para Raios X.	20
Figura 7 - Linfócito humano visualizado por microscopia óptica.....	22
Figura 8 - Posicionamento para dosimetria clinica absoluta.	26
Figura 9 - Esquema para irradiação das amostras de sangue periférico.....	28
Figura 10 - Esquema para obtenção das células mononucleares do sangue antes e após centrifugação.	29
Figura 11 - Representação da câmara de Neubauer.	30
Figura 12 - Comparação de células coradas e não coradas com Azul de Tripán.	31
Figura 13 - Imagens pré e pós-tratamento do paciente 7.....	36
Figura 14 - Imagens pré e pós-tratamento do paciente 12.....	37
Figura 15 - Imagens pré e pós-tratamento do paciente 15.....	38
Figura 16 - Dados de VC e efeitos colaterais de pele (representação gráfica).....	41
Figura 17 - Imagens pós-tratamento do paciente 16.....	42
Figura 18 - Imagens do paciente 16 uma semana após o tratamento sem hidratantes. ...	42
Figura 19 - Dados de VC e efeitos colaterais de rouquidão (representação gráfica)	45
Figura 20 - Dados de VC e efeitos colaterais de disfagia e odinofagia (representação gráfica)	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estadiamento TNM para câncer de laringe	6
Tabela 2- Tabela de níveis de efeitos colaterais segundo RTOG	16
Tabela 3- Interpretação dos coeficientes de Pearson	32
Tabela 4 - Percentual de VC dos 16 pacientes do estudo	35
Tabela 5 - Resumo das avaliações do grau de efeitos colaterais de pele apresentados pelos pacientes,	39
Tabela 6 - Dados de VC e efeitos colaterais de pele	40
Tabela 7 - Dados de VC e níveis de percepção da rouquidão	44
Tabela 8 - Dados de VC e efeitos colaterais disfagia e odinofagia	46

LISTA DE SIGLAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
IAEA	Agência Internacional de Energia Atômica
ICRU	Comissão Internacional de Unidade e Medidas Radiológicas
IMIP	Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LAMBDA	Laboratório de Modelagem e Biodosimetria Aplicada
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> (Células Mononucleares do Sangue Periférico)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Solução Tampão Fosfato)
RTOG	<i>Radiation Therapy Oncology Group</i> (Grupo Oncológico de Terapia das Radiações)
SI	Sistema Internacional de unidades
SPV	Sangue Periférico Venoso
TNM	T - Tumor primário ; N - Linfonodos Comprometidos ; M - Metástases
TRS	<i>Technical Report Series</i> (Série de Publicações Técnicas)
UICC	União Internacional Contra o Câncer
VC	Viabilidade Celular

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Câncer no Brasil	3
2.1.1 Tumores de Laringe: Incidência e prevalência.....	3
2.1.2 Estadiamento TNM.....	5
2.1.3 Modalidades de tratamento para os estadios T1 e T2.....	7
2.2 Biofísica da Radioterapia	8
2.2.1 Radiações ionizantes.....	8
2.2.2 Mecanismos de interação da radiação com o tecido.....	8
2.2.3 Morte celular.....	11
2.2.4 A Radioterapia.....	12
2.2.5 Aquisição de imagens	12
2.2.6 Volumes: alvos e órgãos críticos	14
2.3 Radioterapia para o câncer de laringe.....	14
2.3.1 Efeitos Colaterais.....	15
2.4 Radiossensibilidade	17
2.4.1 Radiossensibilidade tecidual.....	18
2.5 Sobrevivência celular	20
2.5.1 Linfócitos.....	21
2.5.2 Análise da viabilidade celular.....	22
3 - MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Casuística.....	24
3.2 Orientações aos pacientes.....	25
3.3 Dosimetria clínica.....	25
3.4 Amostragem de sangue periférico	27
3.5 Irradiação das amostras	27
3.6 Obtenção das células mononucleares	28
3.7 Cultivo celular	29
3.8 Avaliação da viabilidade celular	30
3.9 Análise estatística	31

3.10 Tratamento dos pacientes	33
3.11 Acompanhamento dos pacientes	33
3.12 Critérios de avaliação dos efeitos colaterais.....	34
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 Análise da viabilidade celular	35
4.2 Análise dos efeitos colaterais de pele - Eritema.....	36
4.2.1 Registro de Imagens	36
4.3 Análise da rouquidão.....	43
4.4 Análise dos efeitos colaterais disfagia e odinofagia.....	46
4.5 Análise geral.....	48
5 - CONCLUSÕES.....	50
6 - PERSPECTIVAS	51
7 - REFERÊNCIAS	52
ANEXO I.....	57
ANEXO II.....	58
APÊNDICE I.....	60
APÊNDICE II.....	62

1 - INTRODUÇÃO

O câncer de laringe é a segunda neoplasia maligna mais comum no trato respiratório, estando associada ao hábito de fumar e ao uso abusivo do álcool. Conforme a progressão da doença, os tumores de laringe são classificados, segundo o *Radiation Therapy Oncology Group* – RTOG, em níveis que vão do grau 1 (tumor em estágio inicial) até grau 4 (severamente comprometido) (RTOG, 2011).

A escolha terapêutica para esses tumores, quando em fase inicial da doença, passa pela radioterapia ou cirurgia, sendo que ambas apresentam índices de cura superiores a 80% (ISSA et al., 1988), porém são procedimentos distintos. Enquanto a cirurgia é uma técnica invasiva que pode ocasionar sequelas na fala e deglutição podendo até serem permanentes, a radioterapia pode ocasionar efeitos colaterais na pele, na fala e na deglutição (INCA, 2012), a opção de tratamento fica a cargo do paciente e seus familiares levando em conta a disponibilidade das técnicas no hospital em que será tratado.

No tratamento radioterápico, é de extrema importância que se conheça a dose de radiação administrada ao paciente, e em que órgãos esta radiação está interagindo, uma vez que os tumores são sempre circundados por tecidos saudáveis que devem ser minimamente expostos. Protocolos de tratamento atualmente aceitos para tumores de laringe preconizam que sejam administradas doses entre 63 e 65 grays (Gy) distribuídas em 28 ou 29 frações diárias dependendo do estágio da doença (PEREZ et al., 2006).

No entanto, o tratamento radioterápico, por mais específico que seja, não consegue evitar que órgãos saudáveis sejam irradiados. Segundo Zackrisson e colaboradores (2003), os efeitos mais comumente encontrados em pacientes com lesões laríngeas em tratamento radioterápico são rouquidão, eritema, podendo chegar à descamação da pele; disfagia (dificuldade para deglutir) e odinofagia (dor ao deglutir). Tais efeitos colaterais adversos acontecem durante e após o tratamento em maior ou menor grau, dependendo do paciente (HOELLER et al., 2003).

Acredita-se que a gravidade dos efeitos colaterais apresentados pelos pacientes está relacionada a sua sensibilidade às radiações. Esta característica é denominada radiosensibilidade individual, na qual diferentes indivíduos apresentam diferentes radiosensibilidades e, conseqüentemente, diferentes respostas ao tratamento radioterápico (ANDREASSEN et al., 2002).

Atualmente, não existe na prática clínica nenhum indicador que permita prever a severidade do efeito adverso resultante da radioterapia. Por outro lado, existem hoje algumas técnicas laboratoriais que permitem evidenciar o comportamento celular após a irradiação de um tecido ou mesmo de uma amostragem de células (GARCIA et al., 1998; HALL et al., 2006; BORGMANN et al., 2008).

A análise da viabilidade celular (VC) é uma destas técnicas pela qual se pode observar a quantidade de células de uma amostra que sobrevive após exposição a diferentes doses de radiação. Alguns modelos celulares podem ser utilizados para a análise, como por exemplo, linfócitos e fibroblastos. Neste trabalho, a avaliação da viabilidade celular baseou-se na metodologia do corante azul de Tripán, devido a sua simplicidade metodológica, baixo custo e curto tempo de execução, o que a torna viável para a prática clínica em radioterapia. Os linfócitos foram adotados como modelo celular por sua fácil obtenção e cultivo em laboratório (Pinto et al., 2010).

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo geral avaliar o emprego da VC como indicador da radiosensibilidade individual, através da correlação dos níveis de sobrevivência celular individual de linfócitos do sangue periférico, após irradiação *in vitro*, com os efeitos colaterais resultantes da radioterapia de pacientes com câncer de laringe.

Como objetivos específicos, esta pesquisa buscou:

- a) Correlacionar a VC individual com o grau de efeitos colaterais apresentados, particularmente eritema, rouquidão, disfagia e odinofagia.
- b) Avaliar as perspectivas do uso da VC na definição de protocolos paciente-específicos para prevenção dos efeitos colaterais de pacientes em tratamento contra o câncer de laringe.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer no Brasil

Relatórios das agências internacionais de saúde mostram uma preocupação progressiva com a crescente incidência de tumores malignos na população, os quais são responsáveis por morbidade e mortalidade elevadas na população de todo o mundo, afetando jovens e idosos em diferentes proporções (INCA, 2012).

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) a frequência relativa de óbitos por câncer no Brasil foi de 12,4 % em 2005, situando-se, portanto, em um padrão intermediário entre as taxas verificadas em países de melhor ou pior nível socioeconômico. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, foram os cânceres de próstata e de trato respiratório no sexo masculino e os cânceres de mama e de colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo (INCA, 2012).

A incidência de óbitos por câncer em países desenvolvidos se aproxima de 20% de todas as causas de morte, enquanto em países menos desenvolvidos, esta alcança somente 5%. Fato que se deve ao aumento da expectativa de vida que possibilita o aparecimento e a detecção das lesões (INCA, 2012).

É fato que uma das modalidades bastante utilizada para o tratamento do câncer é a radioterapia. Estima-se que 60 a 65% dos portadores de câncer irão passar por radioterapia em alguma fase de seu tratamento (MEHTA et al., 2010).

Neste estudo, o câncer de laringe foi escolhido por ser o segundo tipo mais frequente no trato respiratório, bem como pela maior facilidade de acompanhamento dos pacientes. A seguir será apresentado o comportamento deste tipo de câncer.

2.1.1 Tumores de Laringe: Incidência e prevalência

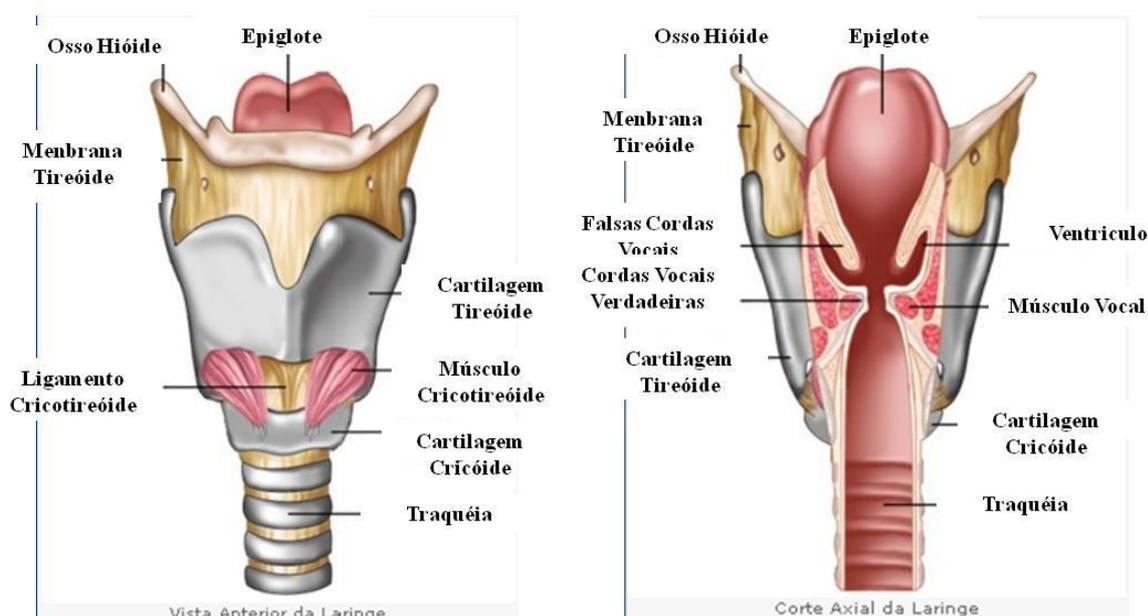
No Brasil a incidência de câncer de laringe varia de 5 a 11 novos casos, a cada 100.000 habitantes, do sexo masculino por ano. Para 2012 estima-se que serão, no total,

6.110 casos novos. A incidência é cerca de seis vezes menor nas mulheres (INCA, 2012).

Conhecer a anatomia da região laríngea é importante para o estudo, pois é através dela que se conhece o grau de avanço da doença e se pode escolher a modalidade terapêutica a ser praticada (SALVAJOLI et al., 1999).

A laringe pode ser dividida em três partes: a glote, que inclui as duas cordas vocais verdadeiras; a supraglote, onde estão as falsas cordas vocais, a epiglote e as pregas ariepiglóticas e a subglote (Figura 1).

Figura 1 - Esquema anatômico da laringe



Fonte: Salvajoli et al. (1999)

Um dos aspectos mais relevantes na tomada de decisão sobre a alternativa terapêutica de escolha é a mobilidade das cordas vocais. Toda a região ocupa um volume pequeno (um tubo com cerca de 5 cm de altura), e é comum que tumores invadam diferentes sítios anatômicos (PEREZ et al., 2006).

Este tipo de câncer, assim como o de pulmão, está intimamente ligado ao tabagismo e ao etilismo e é raro alguém que não fume ter câncer nessa região. Segundo Licitra e colaboradores (2003), o hábito de fumar aumenta sensivelmente o risco de câncer nas cordas vocais e na glote, enquanto que o etilismo é mais proeminente para o câncer na supraglote.

Para todos os tipos de cânceres, a classificação quanto ao grau evolutivo da doença leva em consideração o avanço do tumor primário, o comprometimento das cadeias linfáticas e também as metástases que os pacientes apresentam. Para tanto é utilizada uma escala conhecida como sistema TNM, escala esta que será abordada a seguir, sendo o sistema mais utilizado para a classificação de doenças (INCA, 2012).

2.1.2 Estadiamento TNM

O sistema de estadiamento mais utilizado e preconizado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC) é o sistema TMN, que é empregado para classificar casos de câncer, conforme seus estádios (ou fases). A classificação é dividida nos seguintes itens: componente relacionado à extensão do tumor, no sistema representado pela sigla T; componente que diz respeito à presença de tumores em linfonodos proximais, representado pela sigla N; e o componente que aponta à presença de metástases à distância, relacionado à sigla M. A adição de números a cada componente tem por objetivo indicar o nível de extensão da doença. De acordo com a classificação atual, tem-se: T0, T1, T2, T3 e T4; N0, N1, N2 e N3; M0 e M1 (RTOG, 2011).

Exames básicos para estadiamento incluem exames físicos, com atenção aos linfonodos cervicais bilaterais e mobilidade do estojo laríngeo, e exames como laringoscopia, radiografia de tórax, tomografia e ressonância magnética. A Tabela 1 mostra a classificação quanto à extensão do tumor para o câncer de laringe (SAVAJOLI et al., 1999).

Tabela 1 - Estadiamento TNM para câncer de laringe

Região	Supraglote	Glote	Subglote
Grau			
T1	Mobilidade normal	Limitado as cordas vocais, mobilidade normal	Limitado a subglote
T2	Envolvimento da mucosa de mais de uma sub-região adjacente da supraglote ou da glote ou de região adjacente fora da supraglote; sem fixação	Supraglote, subglote, mobilidade da corda vocal diminuída	Extensão a corda vocal com mobilidade diminuída
T3	Limitado a laringe, com fixação de corda, ou invasão da área pós-cricóidea, tecidos pré-epiglóticos, base da língua	Fixação da corda	Fixação da corda vocal
T4	Extensão além da laringe	Extensão além da laringe	Extensão além da laringe

Fonte: Salvajoli et al. (1999)

Para os estadios T1 e T2 da doença, o tratamento pode ser realizado exclusivamente com radioterapia apresentando altos índices de cura, semelhantes aos da cirurgia, nos estágios mais avançados da doença, como estadios T3 e T4, o uso da quimioterapia para o tratamento se torna indispensável (HALL et al., 2006)

2.1.3 Modalidades de tratamento para os estadios T1 e T2

A rotina terapêutica para lesões glóticas é instituída de acordo com a subregião em que está localizada a lesão, levando em consideração também o grau de avanço da doença. Portanto se a lesão está localizada na supraglote e foi estadiada como T1 ou T2, a indicação é de radioterapia exclusiva, por manutenção da fala, menor morbidade, e possibilidade de resgate da recaída com cirurgia (PELLIZZON et al., 2008).

Se indicada a cirurgia, esta deve ser a laringectomia supraglótica. A retirada total da laringe deve ser reservada para pacientes com impossibilidade de tolerar a retirada da supraglote, que pode levar a doenças respiratórias potenciais (PELLIZZON et al., 2008).

Para lesões iniciais localizadas na glote ou subglote, a indicação também é de radioterapia exclusiva, porém como alternativas temos a cordectomia para lesões superficiais, laringectomia parcial ou excisão a laser (PELLIZZON et al., 2008). As técnicas de radioterapia para as lesões supracitadas serão discutidas adiante em tópico específico.

As taxas de controle local para tumores iniciais variam de 87 % a 92 % para as duas modalidades de tratamento (radioterapia ou cirurgia) com taxas de sobrevida livre de doença em cinco anos da ordem de 80 % a 90 % (PELLIZZON et al., 2008).

O seguimento clínico deve ser trimestral no primeiro ano, quadrimestral no segundo ano, semestral no terceiro e quarto anos e anual a partir de então. Realiza-se exame clínico com nasofaringoscopia a cada consulta. Radiografia de tórax é recomendada anualmente. Tomografia computadorizada é realizada semestralmente e, nos casos de dificuldade na avaliação, solicita-se o exame de ressonância magnética (PELLIZZON et al., 2008).

2.2 Biofísica da Radioterapia

A compreensão da importância da radioterapia como opção de tratamento para o câncer de laringe depende do conhecimento da interação das radiações ionizantes com os tecidos, bem como das grandezas dosimétricas.

2.2.1 Radiações ionizantes

Radiação pode ser definida como energia que se propaga em forma de ondas eletromagnéticas (raios X e radiação gama) ou partículas (partículas alfa e beta), que ao interagir com o meio absorvedor pode modificá-lo. Quando a radiação possui intensidade suficiente para arrancar elétrons dos átomos do meio com o qual está interagindo, é denominada de ionizante (ICRP, 2007).

Utiliza-se a grandeza energia absorvida por unidade de massa de tecido irradiado como unidade básica de dose de radiação (ICRP, 2007), definida pela Equação 1:

$$D = \frac{\Delta E}{\Delta m} \quad (\text{Equação 1})$$

A unidade utilizada para medir a dose absorvida é o Gy (Gray), definida como sendo a energia absorvida de um joule (J) por quilograma de massa (kg) (ICRP, 2007).

As radiações ionizantes podem modificar as estruturas do tecido vivo, dando origem a diversos efeitos que podem resultar em morte celular e no aparecimento de cânceres radioinduzidos (HALL et al., 2006). Os processos pelos quais as radiações modificam o meio com o qual interage serão discutidos a seguir.

2.2.2 Mecanismos de interação da radiação com o tecido

As etapas de interação da radiação com o tecido podem ser classificadas em: efeitos físicos, químicos e biológicos (CEMBER, 2009).

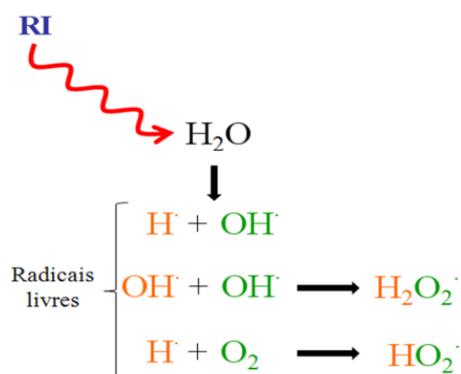
Efeitos físicos

Primeiramente, após a interação da radiação ionizante com o meio, pode haver a formação de diversos íons. Caso a energia da radiação seja suficiente, haverá liberação de elétrons dos átomos, formando assim pares de elétrons-radicais, produzidos pela quebra de ligações eletrônicas nos átomos. Este processo, denominado de efeito físico da radiação, tem duração de aproximadamente 10^{-13} segundos (CEMBER, 2009).

Efeitos químicos

Em seguida, ocorrem os efeitos químicos em que há quebra das moléculas que compõem a matéria. Como mostra a Figura 2, o produto final da interação da radiação com as moléculas de água e oxigênio presentes nos organismos vivos, é a formação de radicais livres e íons reativos que são bastante nocivos à molécula do ácido desoxirribonucléico (DNA). Estes podem causar posteriormente efeitos biológicos como a morte celular, caso os danos radioinduzidos não sejam reparados (CEMBER, 2009).

Figura 2 - Radiólise da água e formação de radicais hidroxil.



Fonte: Fernandes (2005)

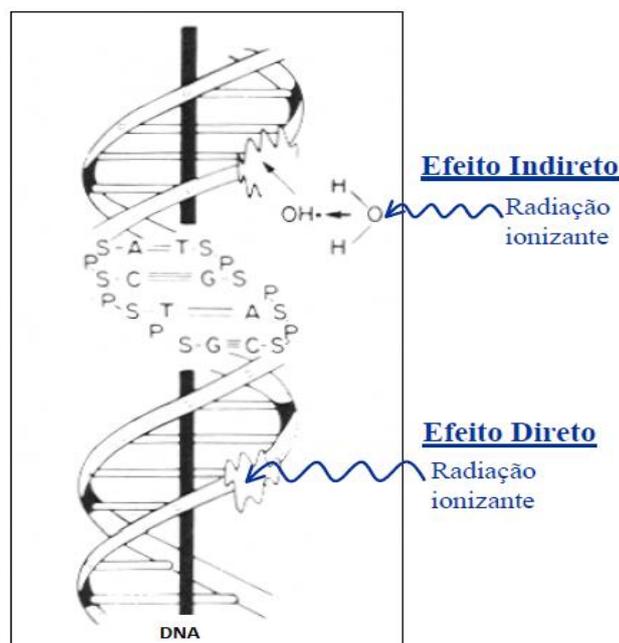
Efeitos biológicos

Os efeitos biológicos induzidos pelas radiações dependem de uma série de fatores, como a dose absorvida e a sensibilidade do tecido que está sendo irradiado. Estes efeitos são resultado de alterações na molécula de DNA que impedem ou retardam a divisão celular, havendo inclusive a possibilidade de que essas alterações sejam transmitidas às gerações celulares posteriores (CEMBER, 2009).

A ação da radiação sobre a molécula de DNA pode ser classificada em ação direta e indireta. Na ação direta, a radiação interage com o DNA promovendo uma modificação dessa molécula, e na ação indireta a radiação ionizante interage primeiramente com a molécula de água (efeitos químicos), originando produtos tóxicos que lesionam a molécula de DNA (BUSHONG, 2008).

A seguir, na Figura 3, apresenta-se um modelo esquemático das duas formas de interação da radiação com o DNA.

Figura 3 - Interação direta e indireta da radiação com o DNA.



Fonte: Fernandes (2005)

A escala de tempo para surgimento de efeitos biológicos varia de alguns minutos, nos casos por exemplo de efeitos associados a alterações na molécula de DNA da célula irradiada, até vários anos, nos efeitos associados às gerações celulares futuras (CEMBER, 2009).

Devido à importância da manutenção da integridade do DNA, as células possuem alguns mecanismos de reparo que auxiliam nas respostas às lesões radioinduzidas. Entretanto, quando este processo não é executado de forma eficiente, há o aparecimento de danos que, a depender da extensão e do grau de comprometimento, podem levar as células afetadas à morte (ALBERTS, 2004).

2.2.3 Morte celular

O processo de morte celular é classificado comumente a partir das características morfológicas e bioquímicas apresentadas pela célula, sendo a catástrofe mitótica, apoptose e necrose, as principais respostas ao dano radioinduzido (GRIVICICH, 2007; KROEMER, 2008).

Na catástrofe mitótica, as células morrem ao tentarem se dividir devido a um dano aberrante, que resulta em segregação cromossômica errônea e inviável. Este tipo de dano é considerado uma “sinalização irreversível” para a morte, pois a célula perde sua capacidade de se dividir (GRIVICICH, 2007; KROEMER, 2008).

A apoptose (termo utilizado para denominar a morte celular programada), por sua vez, é um processo essencial para a manutenção e desenvolvimento dos seres vivos, importante na eliminação de células defeituosas (GRIVICICH, 2007; KROEMER, 2008). Organismos multicelulares, como o ser humano, são capazes de induzir a apoptose em resposta a estímulos externos e internos (GRIVICICH, 2007).

No processo de apoptose, a célula sofre várias alterações características desse tipo de morte celular, como a diminuição da célula, o que causa a perda de aderência com a matriz extracelular e com as células vizinhas; a condensação da cromatina; a invaginação da membrana plasmática; a invaginação e desintegração do núcleo em pequenos fragmentos, envoltos na própria membrana nuclear; e a formação de corpos apoptóticos, característicos da apoptose, que são rapidamente fagocitados por macrófagos, sem causar inflamação (GRIVICICH, 2007; KROEMER, 2008).

Já na necrose há aumento do volume interno da célula, agregação da cromatina, degeneração da membrana citoplasmática, entropia do citoplasma e consequente ruptura da célula. A liberação do conteúdo celular da célula resulta em danos às células vizinhas e inflamação local (GRIVICICH, 2007; ALBERTS, 2004; KROEMER, 2008).

Geralmente, no processo de morte celular pós-irradiação, observa-se uma redução na capacidade de reparo dos danos radioinduzidos, particularmente de quebras duplas no DNA. Há também evidências que relacionam as mutações geradas nos genes envolvidos nos processos de reparo, e checagem do ciclo celular, a uma maior sensibilidade da célula aos efeitos das radiações ionizantes (GARCIA, 1998; PRISE, 2005).

Essa propriedade que a radiação tem de causar danos aos tecidos vivos, podendo levá-los a morte, é uma das razões da utilização deste agente físico em tratamentos médicos, como a radioterapia.

2.2.4 A Radioterapia

A utilização de radiações com finalidade terapêutica teve seu início após três acontecimentos bastante relevantes do ponto de vista científico: a descoberta dos raios X, em 1895, a descoberta da radioatividade, em 1896 e a descoberta do rádio em 1898 (SAVAJOLI et al., 1999).

Desde a publicação sobre a descoberta dos raios X, o uso das radiações ionizantes na medicina tanto para diagnóstico quanto para terapia tem aumentado e se estabelecido, pode-se dizer que hoje é difícil imaginar a prática da medicina sem o uso da radiologia diagnóstica, e a oncologia sem a radioterapia (SAVAJOLI et al., 1999).

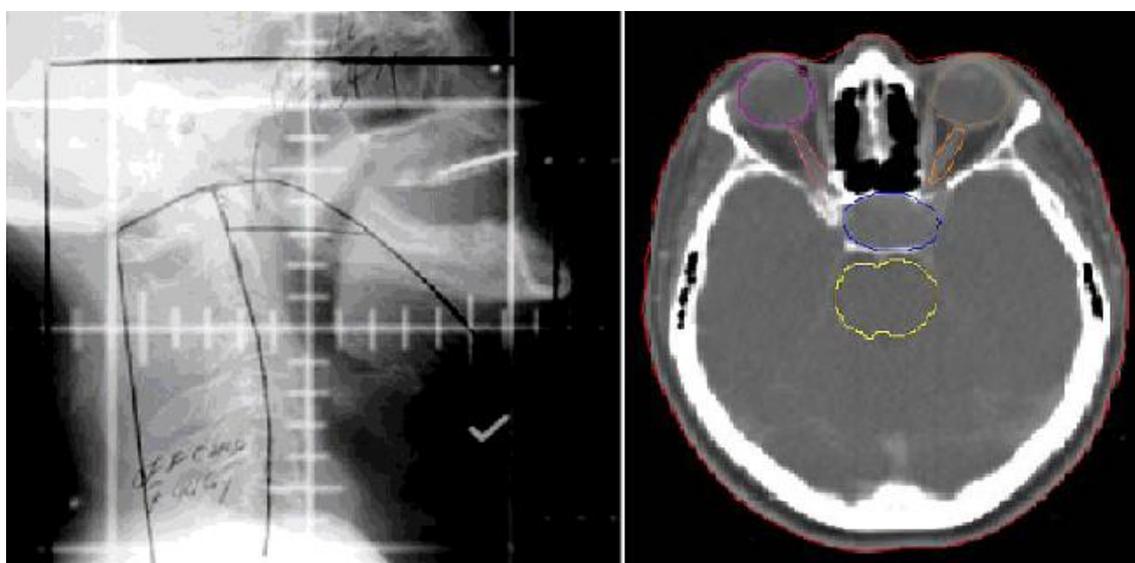
Na radioterapia, todo o processo inicia-se com aquisição de imagens da região do paciente a ser tratada.

2.2.5 Aquisição de imagens

A compreensão do processo de aquisição de imagens é de suma importância para se conhecer como e quais efeitos colaterais podem ocorrer durante o tratamento, pois esta etapa possibilita a delimitação dos tumores e dos órgãos sadios (SAVAJOLI et al., 1999).

A Figura 4, a seguir, apresenta dois exemplos de procedimentos para aquisição de imagens utilizadas no planejamento radioterápico.

Figura 4 - Radiografia (convencional) comparada à tomografia (conformacional).



A - RADIOGRAFIA DE PLANEJAMENTO

B - TOMOGRAFIA PARA PLANEJAMENTO

Fonte: Próprio autor (Radiografia realizada através de um equipamento de Raios-X portátil, marca Philips e a tomografia realizada em tomógrafo Siemens de 16 canais).

A Figura 4-A mostra a radioterapia convencional, na qual a confecção de radiografias possibilita a observação de estruturas ósseas circunvizinhas à região de tratamento. Neste caso, contudo, é impossível delimitar com precisão o volume que deve ser tratado e, por isso são adotados tamanhos de campo de radiação alargados, com margens de segurança que garantam que toda a lesão esteja dentro da área tratada. Na radioterapia convencional as reações adversas, de maneira geral, apresentadas pelos pacientes são maiores, como eritemas de pele e dificuldades para deglutir alimentos (REIS, 2008).

Outra forma de aquisição de imagens no pré-tratamento dá-se pelo uso de tomografia computadorizada (Figura4-B), também denominada de radioterapia conformacional tridimensional. Este tipo de aquisição de imagens visa à delimitação precisa e volumétrica dos órgãos a serem tratados e preservados durante a radioterapia, objetivando aumentar a dose na lesão e, com isso, o aumento do controle do tumor, com a redução da morbidade dos tecidos saudáveis, uma vez que sua real localização é

conhecida. Na modalidade conformacional de tratamento é necessário o uso de *softwares* de cálculo e análise, que permitam a simulação virtual do tratamento anterior à sua realização (REIS, 2008).

Após a aquisição de imagens do paciente, o passo seguinte é a delimitação dos volumes de tratamento.

2.2.6 Volumes: alvos e órgãos críticos

A delimitação precisa dos volumes em radioterapia é importante para que o planejamento do tratamento seja bem executado. Somente após a localização do alvo e dos tecidos normais é que se pode realizar um melhor arranjo de incidências dos feixes de radiação, para otimização do tratamento. Para tanto, é necessário que se determinem quais volumes são importantes em cada tipo de tratamento. Publicações específicas da Comissão Internacional de Unidades e Medidas Radiológicas (ICRU), tais como a ICRU 50 e 62 (ICRU, 1993; ICRU, 1999) determinam estes volumes.

A delimitação dos volumes é a chave para o planejamento radioterápico e também para o conhecimento dos efeitos colaterais que devem ser esperados. Isto porque é através da localização precisa dos órgãos saudáveis que circundam os tumores, e da dose a qual eles estão sendo expostos, que se pode prever que reações poderão ocorrer (REIS, 2008).

2.3 Radioterapia para o câncer de laringe

Como dito anteriormente, uma das modalidades terapêuticas de escolha para lesões tumorais com estadios T1 e T2 de laringe é a radioterapia, que apresenta índices de cura superiores a 80% (PEREZ et al., 2006).

O tratamento radioterápico desse tipo de tumor é restrito a lesão primária, pois o risco de disseminação para as cadeias linfáticas cervicais é mínimo. O campo de radiação padrão tem tamanho reduzido da ordem de $6 \times 6 \text{ cm}^2$. O paciente é tratado em posição supina e o imobilizador mais comumente utilizado é a máscara termoplástica, conforme mostrado na Figura 5. O tratamento deve ser acompanhado diariamente verificando-se a localização do campo de radiação, pois devido ao seu pequeno tamanho

qualquer variação no posicionamento do paciente pode acarretar na não irradiação do alvo e, conseqüentemente, perda de eficiência no tratamento (PEREZ et al., 2006).

A técnica de irradiação dá-se através de campos paralelos e opostos (laterais) e o tratamento pode ser realizado com feixe de energia de 6 MeV de raios X, com taxa de dose de 2 Gy por minuto. A dose prescrita fica entre 63 Gy e 65,25 Gy distribuídos em 28 ou 29 frações (PEREZ et al., 2006).

Figura 5 - Paciente em Tratamento.



Fonte: Próprio autor

Dependendo da sensibilidade do paciente, efeitos colaterais adversos ao tratamento podem ocorrer em maior ou menor grau, estes efeitos serão apresentados a seguir.

2.3.1 Efeitos Colaterais

Todos os pacientes submetidos ao tratamento radioterápico apresentam efeitos colaterais, porém de intensidades diferentes. Segundo o Grupo Oncológico de Terapia das Radiações - RTOG (2011) as reações que podem ocorrer durante ou após o tratamento de lesões glóticas estão representadas na Tabela 2.

Tabela 2- Tabela de níveis de efeitos colaterais segundo RTOG

GRAU	0	1	2	3	4
TECIDO					
PELE	Não há alteração basal	Eritema leve/ depilação /descamação seca/ diminuição do suor	Eritema brilhante/ moderada descamação úmida/	Confluente descamação úmida/ diferentes esfoladela pregas/ edema depositante	Ulceração/ Hemorragia/ Necrose
MUCOSAS	Não há alteração basal	Dor leve, sem necessidade de analgésicos	Mucosites que podem produzir processos inflamatórios/ dor moderada requerendo analgesia	Confluente mucosite fibrinosa/ dor severa requerendo narcóticos	Ulceração/ Hemorragia/ Necrose
GLANDULAS SALIVARES	Não há alteração basal	Leve "secamento" bucal/ leve espessamento da saliva/ leve alteração do paladar/ requer aumento da ingestão de líquidos	Moderado até completo "secamento" bucal/ espessamento da saliva/ alteração grave do paladar	XXX	Necrose aguda das glândulas salivares
LARINGE	Não há alteração basal	Leve rouquidão/ tosse/ leve eritema da mucosa	Rouquidão persistente possibilitando a fala/ dor de garganta/ edema aritenóide/ tosse com necessidade de medicamentos.	Perda da fala/ dor de garganta, ouvidos que exija narcóticos/ confluente edema aritenóide	Dispnéia/ estridor ou hemoptise com traqueostomia ou intubação

Para avaliação da resposta em tratamento radioterápico de tumores de laringe os efeitos colaterais mais comuns são os efeitos colaterais de pele, de laringe (quanto à rouquidão), e de dificuldade e de dor ao deglutir (disfagia e odinofagia), que estão relacionados aos efeitos nas mucosas, glândulas salivares e laringe (SALVAJOLI et al., 1999).

Na prática, observa-se que pacientes que realizam o tratamento seguindo o mesmo protocolo, podem apresentar efeitos colaterais diferentes (BORGSMANN et al., 2002), sendo este fato creditado à radiosensibilidade individual dos pacientes, como será apresentado a seguir.

2.4 Radiossensibilidade

Quando as radiações interagem com tecidos biológicos, alteram a estrutura da molécula de DNA e estas quando danificadas, acionam mecanismos de reparo específicos. Entretanto, a capacidade de recuperação dessas moléculas é uma característica biológica individual de cada ser humano, que resulta em uma sensibilidade maior ou menor aos danos radioinduzidos. Portanto, a radiosensibilidade pode ser definida como a capacidade de recuperação individual do DNA, quando se dá a quebra/dano do mesmo pela interação da radiação (BUSHONG, 2008).

Segundo Bushong (2008), esse fenômeno foi inicialmente evidenciado em indivíduos portadores de síndromes caracterizadas por um defeituoso mecanismo de reparo do DNA, como anemia de Fanconi e a Ataxia Telangiectasia, o que os tornavam mais susceptíveis às radiações ionizantes.

Sabe-se, inclusive, que tecidos diferentes, mesmo que provenientes de um mesmo ser humano têm sensibilidades distintas quando ocorre a interação da radiação ionizante com os mesmos, fenômeno conhecido como radiosensibilidade tecidual (CNEN, 2011). Este conceito é importante no entendimento do porquê diferentes tecidos não apresentam os mesmos efeitos colaterais ao tratamento radioterápico.

2.4.1 Radiossensibilidade tecidual

Em 1906, dois cientistas franceses, Bergonié e Tribondeau, observaram que a susceptibilidade dos tecidos humanos aos efeitos das radiações é função do estado metabólico do tecido que está sendo irradiado (FERNANDES, 2005). Este conceito ficou conhecido como “Lei de Bergonié e Tribondeau”, que estabelece que a radiossensibilidade dos tecidos vivos pode variar com os seguintes critérios:

- O grau de diferenciação do tecido: quanto mais diferenciada for a célula, maior é a sua resistência à radiação;
- A idade do tecido: quanto mais jovem for o tecido ou órgão, mais radiossensível ele será;
- A atividade metabólica: quanto maior a atividade metabólica, maior a radiossensibilidade;
- A taxa de proliferação celular: quando a taxa de proliferação celular e a taxa de crescimento tecidual aumentam, a radiossensibilidade também aumenta.

Por exemplo, o feto é consideravelmente mais sensível à exposição à radiação do que a criança ou o adulto, por conter células indiferenciadas e tecidos e órgãos jovens, com elevada atividade metabólica e alta taxa de proliferação celular e tecidual (BUSHONG, 2008).

A seguir serão apresentados alguns fatores que alteram a radiossensibilidade dos tecidos irradiados.

Quantidade de oxigênio

Quanto maior a oxigenação do tecido, mais sensível ele será às radiações ionizantes, devido à formação de espécies reativas do oxigênio, responsáveis pelo desencadeamento do efeito indireto dos danos radioinduzidos. Porém é necessário que o oxigênio esteja presente durante a irradiação, ou alguns microssegundos após a mesma (BUSHONG, 2008).

A influência da idade

A idade da estrutura biológica irradiada interfere na resposta à radiação devido à maturação e diferenciação das células presentes. A radiosensibilidade decresce à medida que a idade aumenta, porém numa idade avançada, os seres humanos vão se tornando mais radiosensíveis devido à perda da capacidade de renovação das células (DOWD, 1994).

Capacidade de recuperação do tecido

As células humanas possuem vários mecanismos de recuperação do dano ocorrido na exposição às radiações ionizantes. Estes mecanismos baseiam-se na reconstrução da molécula de DNA. Alguns tipos celulares têm maior capacidade que outros de reparar os danos subletais, e esta capacidade pode determinar maior ou menor resistência às radiações ionizantes (DOWD, 1994).

Agentes químicos

Alguns agentes químicos podem modificar a resposta de células, tecidos e organismos às radiações ionizantes. Para que os agentes químicos sejam efetivos, eles devem estar presentes no momento da irradiação, assim como o oxigênio. Substâncias como pirimidinas halogenadas e a vitamina K, por exemplo, são capazes de radiosensibilizar o tecido irradiado (DOWD, 1994).

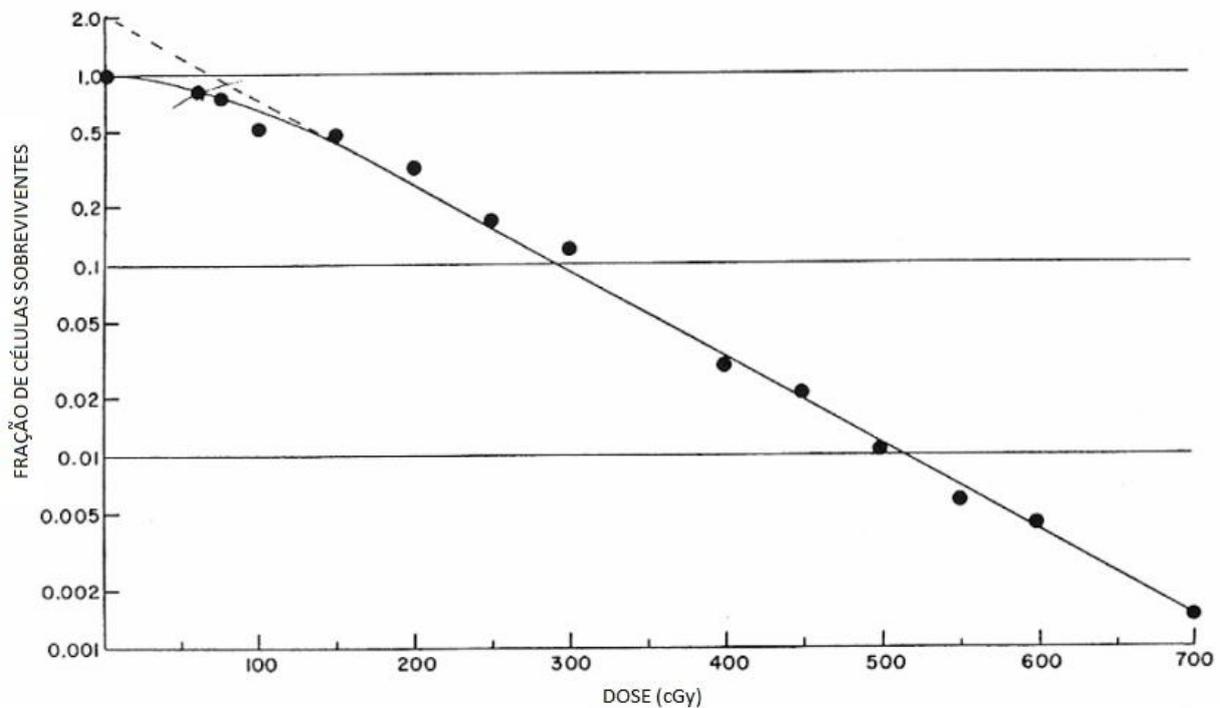
Na radioterapia os parâmetros descritos acima são levados em consideração para a indicação dos tratamentos, porém uma avaliação mais profunda dos níveis de radiosensibilidade individual pode trazer benefícios maiores inclusive com a personalização dos protocolos de tratamento levando a menores efeitos adversos e maiores índices de cura (CAVALCANTI et al., 2011).

Para o estudo da radiosensibilidade é importante conhecer também conceitos como a curva de sobrevivência celular frente a fatores agressores.

2.5 Sobrevivência celular

A avaliação da sobrevivência celular *in vitro* é utilizada para caracterizar os mecanismos de morte celular, bem como caracterizar a sensibilidade individual a diversas substâncias químicas e agentes físicos, como a radiação (CHAUDHARY et al., 2002). A relação entre a dose de radiação e a proporção de células sobreviventes é descrita na chamada curva de sobrevivência celular, conforme mostrado na Figura 6.

Figura 6 - Curva de sobrevivência celular *in vitro* para Raios X.



Fonte: Hall (2006)

O primeiro estudo de curva de sobrevivência *in vitro* foi realizado em 1956 e gerou uma grande motivação no campo da Radiobiologia. Pensou-se que com um sistema quantitativo apontando a correlação da dose de radiação com a fração de células sobreviventes, grandes avanços seriam obtidos na compreensão dos efeitos biológicos das radiações ionizantes (HALL, 2006).

Em particular, foi antecipado que uma significativa contribuição poderia ser obtida em direção a uma melhor compreensão do tratamento radioterápico. Por exemplo, em casos de indivíduos que apresentam radiosensibilidade aumentada, tal como na síndrome genética Ataxia Telangiectasia, as células seriam muito mais

sensíveis às radiações ionizantes, o que pôde ser observado com a construção das curvas de sobrevivência celular (HALL, 2006). Portanto, a investigação prévia deste parâmetro para todos os pacientes poderia contribuir na avaliação dos níveis de radiosensibilidade individual objetivando o planejamento radioterápico, o que, na prática clínica não é observado.

Atualmente, existem várias metodologias que são utilizadas para avaliação da sobrevivência celular, como por exemplo a metodologia baseada no corante Azul de Tripan, que tem como características a simplicidade metodológica, baixo custo e curto tempo de execução, tornando-se viável para o uso na prática clínica da radioterapia. Para a realização desta técnica os linfócitos podem ser adotados como modelo celular e apresentam como características a fácil obtenção e cultivo em laboratório (KIZILIAN-MARTEL et al., 2003; LOU et al., 2008).

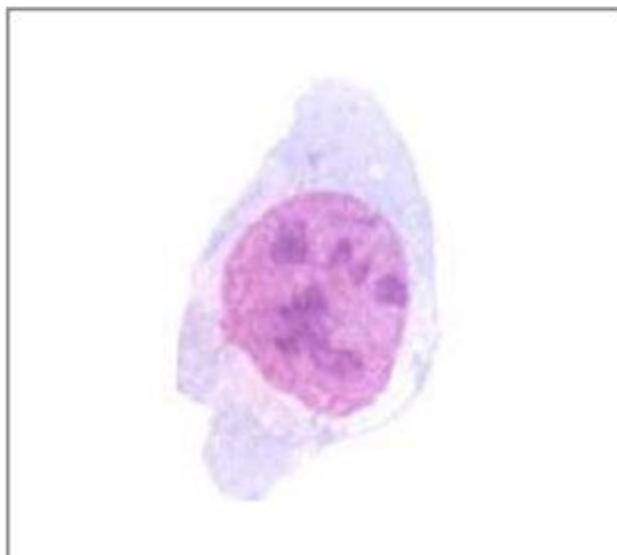
2.5.1 Linfócitos

Os linfócitos (Figura 7) são responsáveis pela resposta imune específica, existindo no corpo humano cerca de 2×10^{12} células linfocitárias, o que torna sua massa celular comparável à de órgãos como o fígado ou cérebro, por exemplo (ALBERTS et al., 2004).

Os linfócitos são divididos em três tipos: linfócitos B, linfócitos T e linfócitos NK (*natural killer*). Cada um destes desempenha diferentes funções e, embora sejam indistinguíveis ao microscópio óptico, apresentam diferenças quando vistos em microscopia eletrônica (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

Os linfócitos possuem uma vida média relativamente longa (aproximadamente 3 anos). São de fácil obtenção e de fácil manipulação, além de se apresentarem na fase G₀ do ciclo celular (não estão se dividindo) (KIZILIAN-MARTEL et al., 2003; LOU et al., 2008). Características estas que os tornam interessantes como modelo biológico para estudos em radiobiologia.

Figura 7 - Linfócito humano visualizado por microscopia óptica.



Fonte: FENECH et al. (2003)

A proposta de utilização de linfócitos do sangue periférico em pesquisa sobre radiosensibilidade é um fator que aumenta a rapidez das análises, já que estas células são de obtenção e cultivo mais simples quando comparados aos fibroblastos, células mais largamente utilizadas para estes fins atualmente (ALMODÓVAR et al., 2002; LEONG et al., 2004).

2.5.2 Análise da viabilidade celular

Para a ponderação da VC, alguns métodos como a citometria de fluxo e avaliação da quantidade de micronúcleos têm sido utilizados, porém ainda em fase inicial (OZSAHIN et al., 1997). Jagetia (2000) observou um aumento da morte celular após irradiação em pacientes que apresentaram maior frequência de micronúcleos.

Aberrações cromossômicas podem também ser utilizadas para determinação deste parâmetro celular, já que sua quantificação tem relação com o nível de sobrevivência celular (JAGETIA, 2000).

A metodologia mais utilizada atualmente para avaliar a morte celular reprodutiva após exposição à radiação ionizante são os ensaios clonogênicos (OZSAHIN et al., 1997; LEONG et al., 2004; FRANKEN et al., 2006). Esse método baseia-se na habilidade de uma única célula formar colônias, que são definidas como

um conjunto de pelo menos cinquenta células, que geralmente são determinadas microscopicamente (NIYAZI et al., 2007). Essas colônias são contadas antes e após exposição às radiações ionizantes para que possa ser calculado o percentual de células que mantêm a sua capacidade reprodutiva, considerando que cada colônia observada é originada de uma única célula (FRANKEN et al., 2006).

Outra metodologia importante consiste na avaliação da VC propriamente dita. Nesse contexto, uma técnica que pode ser utilizada é a coloração com Azul de Tripán. Nesta técnica, o corante, que tem efeito nocivo a célula, penetra em todas as células de uma amostra, porém àquelas cujas membranas estão íntegras, conseguem excluir o corante devido a permeabilidade seletiva da membrana, sendo vistas transparentes ao microscópio óptico, enquanto às que possuem membrana danificada se apresentam coradas em azul (NANAVATY et al., 2006).

Avaliando o emprego destes ensaios na rotina laboratorial, para análise da sobrevivência celular, os ensaios clonogênicos demandam muito tempo (de 1 a 3 semanas), tornando inviável a sua aplicabilidade prática como rotina laboratorial em radioterapia, uma vez que há casos em que se tem rápida progressão nos estágios de doenças (como em alguns tipos de câncer), o que exige rapidez no planejamento do tratamento (OZSAHIN et al., 1997). Em contrapartida a utilização do corante Azul de Tripán permite maior rapidez na análise de níveis de sobrevivência celular após exposição à radiação ionizante.

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar a técnica da análise da VC, com o corante Azul de Tripán, como indicador da radiosensibilidade individual, através da correlação dos níveis de sobrevivência celular individual de linfócitos do sangue periférico, após irradiação *in vitro*, com os efeitos colaterais adversos resultantes da radioterapia apresentados pelos pacientes com câncer de laringe.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

O estudo realizado foi do tipo experimental não-randomizado, o qual foi aprovado pelo comitê de ética do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira – IMIP , parecer nº 1939 – 11 (Anexo I).

3.1 Casuística

- Critérios de inclusão:
 - Indivíduos que iriam iniciar tratamento radioterápico de tumor de laringe em estágio inicial;
 - Indivíduos que tenham conhecimento de não terem sido submetidos previamente a nenhum tipo de agente químico ou físico que interfira na avaliação da sobrevivência celular.

- Critérios de exclusão:
 - Recusa do indivíduo quanto à participação nesta pesquisa;
 - Circunstâncias materiais ou logísticas que tornassem impossível o prosseguimento normal da investigação. Esses casos serão, contudo, relatados;

A partir de um questionário, cada doador forneceu informações sobre seu estado de saúde, de acordo com seus próprios conhecimentos (Apêndice I), e assinou um termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice II) antes da coleta.

No presente trabalho foram avaliados 16 pacientes com as características preditas. Os critérios de avaliação seguem os parâmetros do RTOG, descritos anteriormente, porém para melhor compreensão construímos uma escala que varia de efeito colateral não apresentado (NA), até efeito colateral severo (+++), passando por níveis leve (+) e moderado (++) .

3.2 Orientações aos pacientes

O protocolo do serviço de radioterapia do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira – IMIP, para minimização dos efeitos colaterais de tratamento compreende as seguintes recomendações:

Para prevenção dos efeitos colaterais de pele

Preventivamente, os pacientes devem aplicar uma loção oleosa à base de ácidos graxos essenciais com vitaminas A e E (Dersani), cuja função é revitalizar e manter o equilíbrio hídrico da pele. Esta loção é fornecida pelo próprio serviço de radioterapia do IMIP.

Deve-se realizar as aplicações de radioterapia com a pele completamente limpa, inclusive sem a loção, que deve ser aplicada após ou com grande antecedência ao tratamento.

3.3 Dosimetria clínica

Para garantir que a dose entregue ao paciente em tratamento tenha a maior exatidão possível, uma série de procedimentos denominados dosimetria clínica foram adotados.

O protocolo de dosimetria clínica, atualmente seguido como referência para medidas absolutas de dose absorvida em feixes terapêuticos, recomendado pela Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA), é a publicação número 398 da série de publicações técnicas (*Technical Report Series – TRS 398*).

Este protocolo preconiza que sejam realizadas medidas na água em fantoma com dimensões específicas, que devem ser maiores que o campo de radiação a ser medido em pelo menos 5 centímetros, em todos os lados, para evitar a interação entre as paredes do fantoma e o campo de radiação.

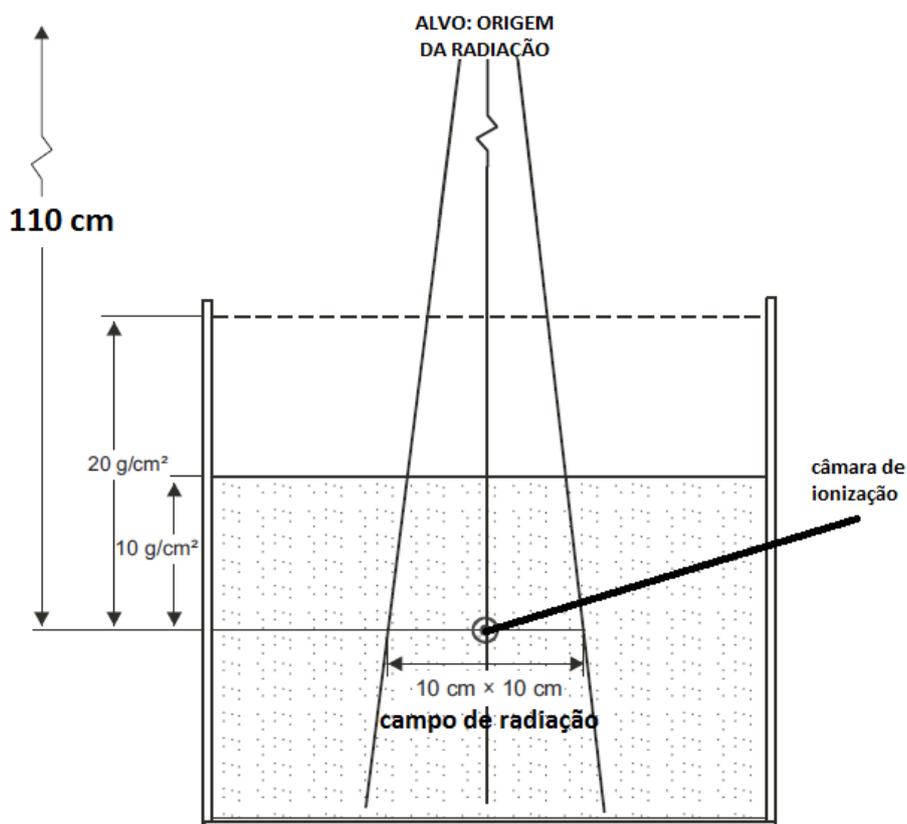
Recomenda-se o uso de posicionadores capazes de alinhar os medidores (câmaras de ionização) em determinadas profundidades, e no centro do campo de radiação.

A profundidade de medida deve variar com a energia do feixe de radiação. Para esta pesquisa (energia de 6 MeV) a profundidade recomendada é de 10 cm, considerando que a densidade da água é de 1 g/cm^3 .

A câmara de ionização ideal para o tipo de feixe utilizado no trabalho é do tipo Farmer cilíndrica, com volume de medição de $0,6 \text{ cm}^3$. Neste trabalho foi utilizada uma câmara com essas especificações à prova d'água (fabricante PTW modelo TN 30013, série 3061), pertencente ao Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira com certificado de calibração IPEN/CNEN número 0835/2009. Para formar o conjunto dosimétrico, o eletrômetro utilizado foi da fabricante PTW, modelo UNIDOS E, série T10010-00432, calibrado em conjunto com a câmara de ionização.

A distância entre a superfície da água do fantoma e o ponto de origem do feixe de radiação (alvo) recomendada é de 100 centímetros. As dimensões do campo de radiação previstas no protocolo para medição absoluta de dose absorvida foram de $10 \times 10 \text{ cm}^2$. O posicionamento do conjunto é mostrado na Figura 8, a seguir.

Figura 8 - Posicionamento para dosimetria clínica absoluta.



Fonte: Próprio autor

As medidas absolutas de dose absorvida conseguidas com este procedimento foram importantes para reproduzir com precisão os níveis de dose administrada aos pacientes em tratamento que foram avaliados no estudo.

3.4 Amostragem de sangue periférico

Foram coletados 9 ml de sangue periférico venoso (SPV) de cada um dos 16 pacientes do estudo, todos portadores de tumores de laringe em fase inicial da doença (estádios T1 e T2), com idades entre 49 e 81 anos. Destes, 13 foram do sexo masculino e 3 do sexo feminino. Antes da coleta foi realizada prévia assepsia do local com álcool a 70%. O SPV foi coletado em tubos à vácuo contendo o anticoagulante heparina sódica.

3.5 Irradiação das amostras

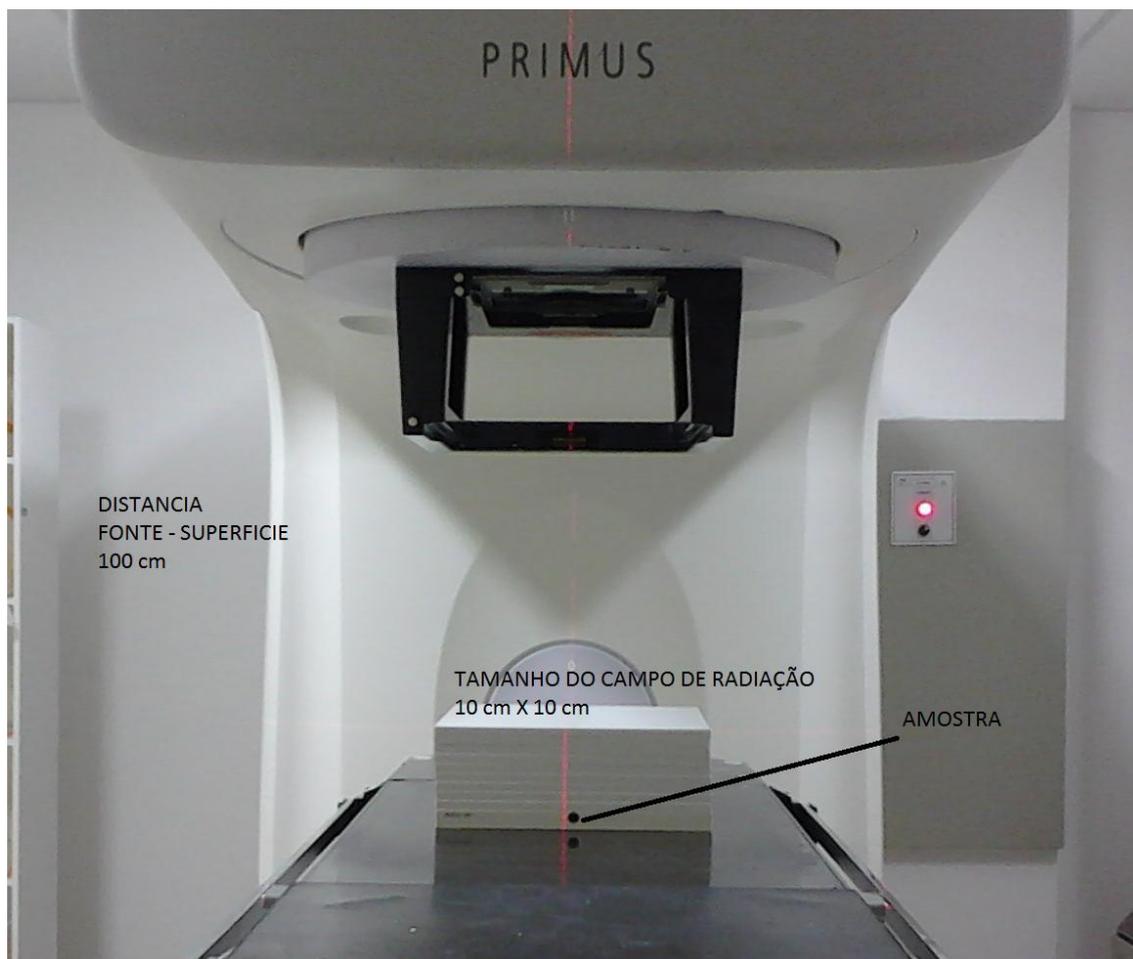
As amostras sanguíneas foram divididas em 3 alíquotas de 3 ml cada, em que duas alíquotas foram irradiadas no Serviço de Radioterapia do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira – IMIP, mantendo-se a alíquota restante como controle negativo (não irradiada). Em seguida foram identificadas e acondicionadas em recipiente térmico, para manutenção da temperatura durante o transporte ao Laboratório de Modelagem e Biodosimetria Aplicada (Lambda), situado no Departamento de Energia Nuclear – UFPE, para análise.

As doses para irradiação das amostras foram de 2 e 2,5 Gy. A escolha destes valores é baseada nas doses utilizadas por aplicação de tratamento radioterápico. Para cada amostra analisada, foi realizado um controle negativo.

A irradiação das amostras foi realizada utilizando-se Raios X com energia de 6 MeV e taxa de dose de 200 cGy (centi-Gray ou 10^{-2} Gy) por minuto, a partir de um Acelerador Linear marca Siemens, modelo Primus.

Uma seringa de cada vez, contendo 3 ml de sangue, foi colocada dentro de um bloco de água sólida ($\rho = 1,0 \text{ g/cm}^3$) e posicionada no centro do campo, com o raio central do campo passando pelo centro da seringa, a uma distância de 100 cm entre a origem do campo de radiação e a superfície do bloco de água sólida. A Figura 9 ilustra o esquema de irradiação das amostras.

Figura 9 - Esquema para irradiação das amostras de sangue periférico.



Fonte: Próprio autor

Após a irradiação, as amostras foram levadas para serem processadas no Lambda para obtenção da camada de células mononucleares ou PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*).

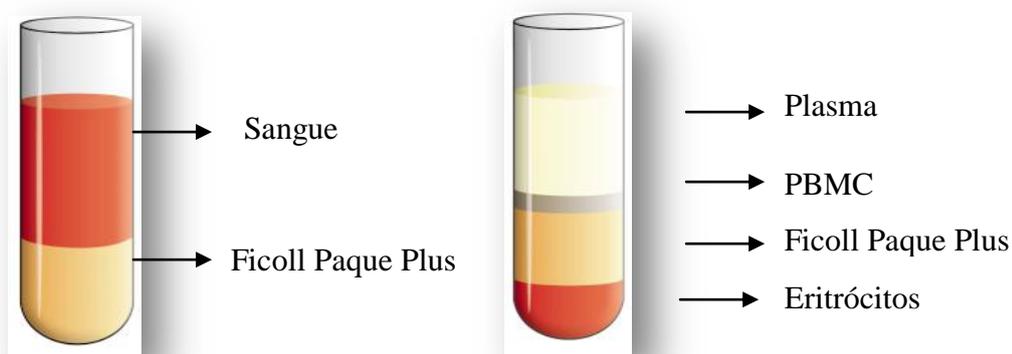
3.6 Obtenção das células mononucleares

Para obtenção das células mononucleares, primeiramente as amostras sanguíneas foram diluídas em solução salina tamponada com fosfato - *phosphate buffered saline* (PBS) com pH de 7,2 a 7,4.

Após a diluição, todas as amostras foram colocadas sobre uma solução que promove o gradiente de concentração (*Ficoll-Paque Plus*), na proporção 1 (*Ficoll*) : 2 (sangue), para a separação dos constituintes sanguíneos e coleta dos linfócitos.

As amostras foram centrifugadas a 400 x g durante 35 minutos. Após a centrifugação formou-se uma camada de células mononucleares (PBMC), onde estavam inseridos os linfócitos. A Figura 10 mostra o esquema da obtenção da PBMC, utilizando um gradiente de concentração a partir do uso de *Ficoll-Paque Plus*. Após centrifugação ocorreu a separação do sangue em várias camadas.

Figura 10 - Esquema para obtenção das células mononucleares do sangue antes e após centrifugação.



Fonte: Souza (2010)

As PBMCs foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato na proporção 1(células): 2(PBS), e os tubos centrifugados a 250 x g durante 10 minutos. Após este procedimento, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o botão celular em 1 ml de meio de cultura RPMI 1640 enriquecido com 10 % de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP, Brasil).

3.7 Cultivo celular

Primeiramente, foi feito um ajuste na concentração de células para o cultivo celular. Para tal, diluiu-se 10 µl do botão celular ressuspenso em meio RPMI 1640 em 90 µl do corante azul de Tripán. Preparou-se então a câmara de Neubauer com 10 µl da

solução formada, e contou-se as células vivas (não coradas). Conhecendo-se o volume da solução na câmara e o número de células vivas, pôde-se diluir a amostra para obtenção de 2×10^6 células por ml.

Logo após, as células foram colocadas em cultivo a 37 °C e concentração de 5% de gás carbônico (CO₂) em placas de cultura de 96 poços durante 72 horas, para posterior avaliação da sobrevivência celular.

Em cada poço de cultura foi colocado um volume de 100 µl da suspensão celular ajustada obtida para cada dose analisada, ficando cada um com o total de 2×10^5 células por poço. Para cada dose, foram feitos poços em triplicata.

3.8 Avaliação da viabilidade celular

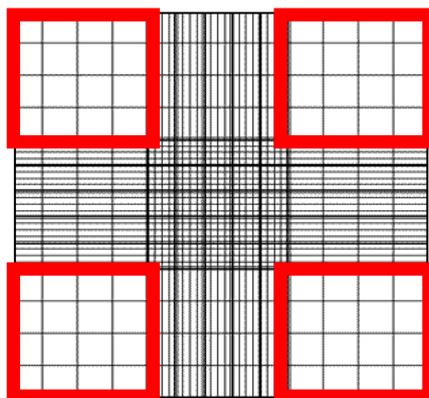
A avaliação da VC foi realizada após o cultivo celular de 72 horas. Para isso, foram retirados 10 µl da suspensão celular e adicionado em 90 µl do corante Azul de Tripán em tubos do tipo *Eppendorf* (1:10).

Foram retirados 10 µl da solução obtida, a qual foi depositada numa câmara de Neubauer para análise por microscopia óptica convencional.

Este tipo de câmara possui o desenho de uma grade, a qual é visualizada apenas ao microscópio óptico. Esquemáticamente, esta grade é composta por quatro quadrantes localizados um em cada extremidade.

A Figura 11 ilustra esquematicamente a câmara de Neubauer, onde é possível observar os quatro quadrantes (em vermelho), cada um contendo 16 retículos menores.

Figura 11 - Representação da câmara de Neubauer.



Fonte: Souza (2010)

Para o estudo da VC foram contadas apenas as células presentes nos quatro quadrantes em vermelho. Foram consideradas viáveis, as células não coradas, ou seja, as células que excluíram o corante.

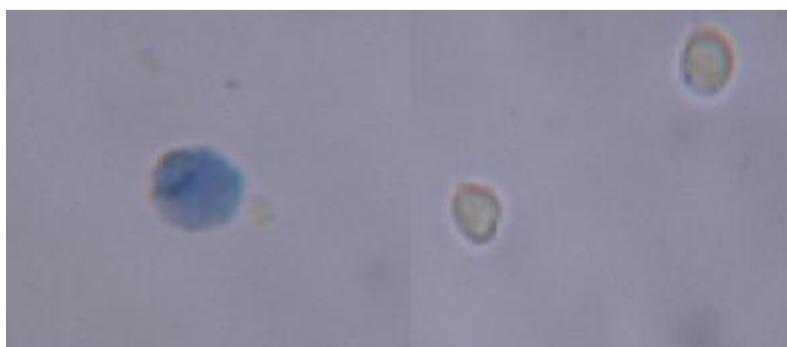
Para se calcular a VC foi utilizada a seguinte fórmula:

$$VC = 100 \times \text{Células viáveis} / \text{Total de células} \quad (\text{Equação 2})$$

Nesta fórmula, as células viáveis representam o número de células que excluíram o corante, isto é, as que sobreviveram, e o total de células representam tanto as sobreviventes, quanto as mortas. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A Figura 12 mostra uma fotografia, em microscópio óptico convencional, de três células, uma corada em azul e outras que expeliram o corante.

Figura 12 - Comparação de células coradas e não coradas com Azul de Tripan.



CELULA CORADA

CELULAS NÃO CORADAS

Fonte: Próprio autor

3.9 Análise estatística

O estudo das correlações entre os dados de VC e de intensidade dos efeitos colaterais foi realizado segundo testes estatísticos baseados no coeficiente de correlação, que indica a força e a direção do relacionamento linear entre duas variáveis aleatórias. Para o estudo foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson, que é obtido a partir da divisão da covariância de duas variáveis pelo produto de seus desvios-padrão (MORETTIN et al., 2010), como mostra a equação 3, a seguir.

$$r = \frac{COV(X,Y)}{\sigma_X \cdot \sigma_Y} \quad (\text{Equação 3})$$

Sendo: r – coeficiente de Pearson
 COV – covariância
 X e Y – sequências de dados
 σ_X e σ_Y - desvio padrão de X e Y

O valor de r está sempre entre -1 e 1, com $r = 0$ correspondendo à não associação. Os valores de r positivos correspondem a uma correlação positiva entre as sequências de dados, e os valores negativos correspondem a uma correlação negativa. Quanto maior o valor de r (positivo ou negativo), mais forte a associação. No extremo, se $r = 1$ ou $r = -1$, todos os pontos no gráfico de dispersão caem exatamente numa linha reta (MORETTIN et al., 2010).

A Tabela 3 descreve como interpretar os valores do coeficiente de correlação de Pearson.

Tabela 3- Interpretação dos coeficientes de Pearson

Valor de r	Interpretação
0,00 a 0,19	Correlação bem fraca
0,20 a 0,39	Correlação fraca
0,40 a 0,69	Correlação moderada
0,70 a 0,89	Correlação forte
0,90 a 1,00	Correlação muito forte

Fonte: MORETTIN et al., 2010

3.10 Tratamento dos pacientes

O tratamento dos pacientes foi realizado segundo protocolo do IMIP, sendo aplicadas 28 frações de 2,25 Gy, totalizando 63 Gy para o tratamento dos pacientes portadores de tumores com estadio T1.

Para pacientes portadores de lesões com estágio T2, foram aplicadas 29 frações de 2,25 Gy, totalizando assim 65,25 Gy, conforme o protocolo da instituição.

3.11 Acompanhamento dos pacientes

Todos os pacientes do estudo tiveram uma Ficha de Tratamento (Anexo II), onde constam os dados e parâmetros de tratamento, com resumos de suas revisões periódicas realizadas a cada 15 dias de tratamento, inclusive após o término do mesmo.

O acompanhamento dos pacientes também foi realizado através de ficha de Acompanhamento (Apêndice I), onde constam as reações adversas que ocorreram durante o tratamento. Estes parâmetros foram utilizados para avaliar a radiosensibilidade individual dos pacientes. Para tanto, foi construída uma escala dos efeitos colaterais apresentados, esta escala foi baseada nas tabelas de efeitos colaterais do RTOG (2011).

Imagens pré e pós-tratamento foram registradas, visando avaliar o grau dos efeitos colaterais de pele apresentados em reação ao tratamento. As imagens pré-tratamento foram registradas antes da primeira aplicação de radioterapia e as pós-tratamento foram adquiridas logo após a última sessão.

Todas as imagens foram avaliadas por uma equipe médica, composta por quatro radioterapeutas dos quais, somente um teve contato com os pacientes do estudo. É importante salientar que esta análise foi realizada por cada médico separadamente e que os avaliadores não tiveram contato com os outros dados do estudo, como os dados de VC dos pacientes, caracterizando-o como duplo cego. Buscou-se assim, uma avaliação isenta e objetiva de cada profissional sobre os graus dos efeitos colaterais de cada paciente.

3.12 Critérios de avaliação dos efeitos colaterais

A avaliação dos efeitos colaterais de pele foi realizada pela equipe médica e seguiu critérios do RTOG (2011), já apresentados anteriormente.

Os efeitos colaterais referentes à rouquidão, disfagia e odinofagia foram avaliados segundo informações fornecidas pelos próprios pacientes, seguindo a mesma escala construída para o estudo (que varia de “não apresentado” a “severo”).

Para o efeito colateral rouquidão, quando o paciente não apresentava diferença vocal antes e depois do tratamento, obviamente o efeito era não apresentado, se havia ligeira mudança na voz, porém sem dificuldades na fala, o efeito foi considerado leve, se o paciente além de apresentar mudança vocal também sentia dificuldades no ato, o efeito foi considerado moderado e, por fim, quando o paciente sentia grandes dificuldades para falar que inclusive o impediam de exercer a fala fluentemente, o efeito foi considerado severo.

Os efeitos colaterais disfagia e odinofagia são próximos e podem ser designados como dificuldade para engolir de uma forma geral, tanto que os pacientes relataram os mesmos graus de efeitos colaterais de ambos os efeitos. Sendo assim, foi considerado efeito colateral “não apresentado” quando o paciente referiu que não sentia diferença na maneira de deglutir em comparação a sua condição antes do tratamento; efeito colateral leve quando o paciente conseguia comer alimentos sólidos, porém sentia maiores dificuldades se comparado à antes do tratamento; efeito colateral moderado se o paciente não conseguia deglutir todos os tipos de alimentos que comia antes do tratamento, mas ainda se alimentava de alimentos sólidos; e efeito colateral severo se o paciente não conseguia comer alimentos sólidos.

Estes critérios foram desenvolvidos visando objetivar as análises dos efeitos colaterais uma vez que os graus das reações adversas foram baseados em relatos dos próprios pacientes. Rancati e colaboradores (2010) utilizaram uma escala, para os efeitos colaterais ao tratamento, semelhante a do presente trabalho. Todavia esses autores relataram certa dificuldade devido ao grau de incerteza quanto à interpretação do relato dos pacientes.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise da viabilidade celular

Na Tabela 4 estão apresentados os percentuais de VC das amostras sanguíneas de cada indivíduo estudado, irradiadas com as doses de 2 e 2,5 Gy, estes índices são relativos aos valores da amostra controle (não irradiada). Os índices de VC para a amostra controle dos pacientes variaram entre 93,8% e 99,8% e o seu valor médio foi de $97,57 \pm 1,42$ %.

Tabela 4 – Percentual de VC dos 16 pacientes do estudo

Pacientes	2 Gy (%)	2,5 Gy (%)
1	$50,12 \pm 0,27$	$49,28 \pm 0,79$
2	$63,48 \pm 9,93$	$53,55 \pm 1,90$
3	$55,50 \pm 2,70$	$54,30 \pm 2,77$
4	$59,12 \pm 4,82$	$56,98 \pm 1,35$
5	$57,24 \pm 0,60$	$58,49 \pm 0,97$
6	$60,87 \pm 1,47$	$60,14 \pm 1,70$
7	$69,23 \pm 0,80$	$62,76 \pm 2,79$
8	$75,59 \pm 2,80$	$64,06 \pm 7,16$
9	$74,53 \pm 0,59$	$69,17 \pm 0,77$
10	$69,84 \pm 0,43$	$70,28 \pm 1,96$
11	$75,06 \pm 1,44$	$72,33 \pm 2,34$
12	$75,95 \pm 2,57$	$72,90 \pm 1,57$
13	$74,92 \pm 0,48$	$74,09 \pm 10,10$
14	$71,64 \pm 2,80$	$74,89 \pm 0,29$
15	$76,03 \pm 4,61$	$76,47 \pm 2,55$
16	$81,77 \pm 0,98$	$82,88 \pm 3,28$

Observa-se que, para a maioria dos casos, não existe alteração nos índices de VC para as doses estudadas, levando-se em conta os desvios-padrão associados, o que sugere que poderia ser utilizada para o estudo qualquer dose entre 2 e 2,5 Gy.

4.2 Análise dos efeitos colaterais de pele - Eritema

4.2.1 Registro de Imagens

As imagens a seguir, mostram exemplos de efeitos colaterais (eritema) leves, moderados e severos segundo avaliação da junta médica.

A Figura 13 apresenta imagens pré e pós-tratamento do paciente 7 do estudo, cuja análise da VC está expressa na Tabela 3. As imagens pré-tratamento foram registradas no primeiro dia de tratamento e as imagens pós-tratamento foram registradas no dia da última sessão de radioterapia após a aplicação.

Figura 13 - Imagens pré e pós-tratamento do paciente 7.



a) Pré-tratamento



b) Pós-tratamento

As imagens do paciente pós-tratamento mostram que o paciente apresentou um leve avermelhamento da pele, denominado hiperemia, o que caracteriza grau 1, segundo a tabela de efeitos colaterais do RTOG (2011). Para a escala utilizada neste estudo é um efeito de grau leve (+).

Apresenta-se a seguir imagens do paciente 12 (Figura 14), que exibiu moderada descamação úmida, cujo grau de efeito colateral de pele segundo o RTOG (2011) é de grau 2 e para o presente estudo, grau moderado (++)).

Figura 14 - Imagens pré e pós-tratamento do paciente 12.



a) Pré-tratamento



b) Pós-tratamento

A Figura 15 apresenta imagens do paciente 15, cujo efeito colateral de pele foi de confluenta descamação úmida com edema severo, o que segundo os critérios do RTOG reflete lesão de grau 3, e classificado como severo (+++) pela equipe médica para o presente estudo.

Figura 15 - Imagens pré e pós-tratamento do paciente 15.



a) Pré-tratamento



b) Pós-tratamento

Segundo Sawada (2006), os efeitos colaterais em pacientes que passam por tratamento de radioterapia estão diretamente ligados a sua qualidade de vida, sendo o ressecamento da pele, o sintoma de maior prevalência para 65% dos pacientes que são submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço.

A Tabela 5 mostra o resultado da avaliação dos efeitos colaterais de pele apresentados por todos os pacientes da pesquisa. Na tabela apresenta-se o resultado designado por cada componente da junta médica e o resultado mais representativo (o que mais se repetiu na avaliação) que foi utilizado como parâmetro do estudo.

Tabela 5 – Resumo das avaliações do grau de efeitos colaterais de pele apresentados pelos pacientes, feitas por quatro radioterapeutas

Pacientes	Médicos				Resultado mais representativo
	A	B	C	D	
1	+	+	+	+	+
2	++	++	++	++	++
3	+	++	++	++	++
4	+++	+++	+++	+++	+++
5	+++	+++	+++	+++	+++
6	++	+++	+++	+++	+++
7	+	+	+		+
8	++	++	+++	++	++
9	+	+	+	+	+
10	+	+	+	++	+
11	++	+++	+++	+++	+++
12	++	+++	++	++	++
13	++	++	++	++	++
14	+++	+++	+++	++	+++
15	+++	+++	+++	+++	+++
16	+	+	+	+	+

Legenda: NA não apresentado; (+) Leve; (++) Moderado; (+++) Severo

Para comparação dos resultados das avaliações dos graus de eritema com os valores das viabilidades celulares (VC) das amostras irradiadas *in vitro* com dose de 2,5 Gy, foi elaborada a Tabela 6.

Nesta tabela, os dados foram ordenados em ordem crescente de percentuais de VC. Os dados referentes à dose de 2,5 Gy foram escolhidos por apresentarem melhor correlação com os efeitos colaterais dos pacientes.

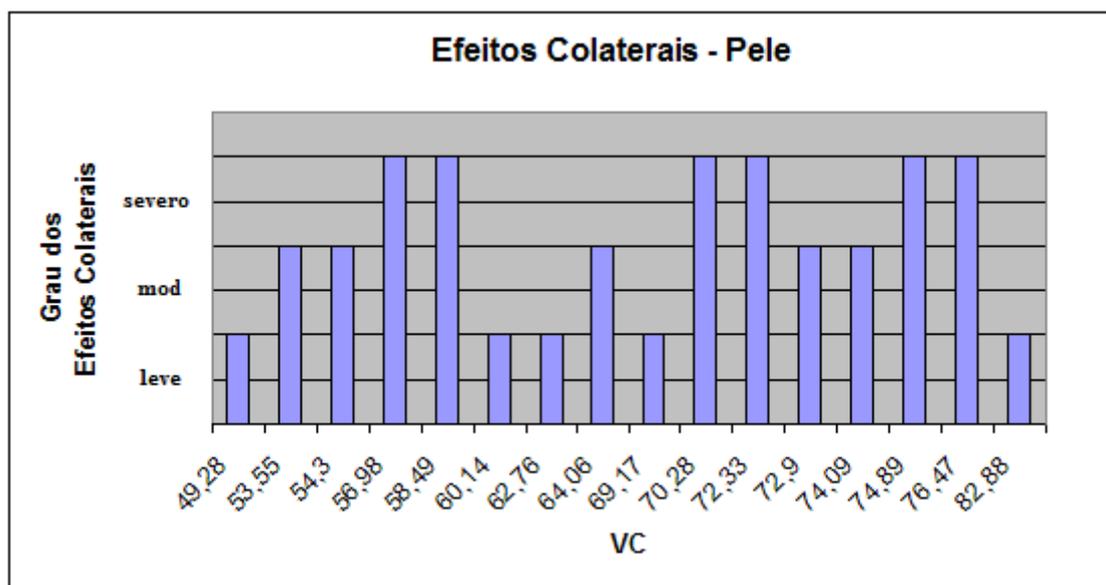
Tabela 6 - Dados de VC e efeitos colaterais de pele

Pacientes	Pele	VC 2,5 Gy (%)	Idade (anos)
1	+	49,28 ± 0,79	51
2	++	53,55 ± 1,90	81
3	++	54,30 ± 2,77	57
4	+++	56,98 ± 1,35	53
5	+++	58,49 ± 0,97	58
6	+	60,14 ± 1,70	58
7	+	62,76 ± 2,79	65
8	++	64,06 ± 7,16	63
9	+	69,17 ± 0,77	56
10	+++	70,28 ± 1,96	72
11	+++	72,33 ± 2,34	67
12	++	72,90 ± 1,57	69
13	++	74,09 ± 10,10	76
14	+++	74,89 ± 0,29	50
15	+++	76,47 ± 2,55	49
16	+	82,88 ± 3,28	61

Legenda: NA não apresentado; (+) Leve; (++) Moderado; (+++) Severo

Graficamente pode-se apresentar os resultados conforme a Figura 16 a seguir.

Figura 16 - Dados de VC e efeitos colaterais de pele (representação gráfica)



No gráfico da Figura 16, o grau dos efeitos colaterais está representado pela altura da barra, sendo o efeito colateral leve representado pela barra menor barra e o efeito severo, pela maior barra.

Efeitos colaterais em radioterapia são originados devido à ação clastogênica das radiações e se apresentam exatamente nos volumes dos órgãos sadios irradiados, neste caso a pele. Nota-se que as reações adversas estão presentes na área do tratamento indicando que as características do tecido irradiado são preponderantes para o aparecimento de tais efeitos (HOPEWELL et al., 2000). Outros fatores como a energia da radiação utilizada na terapia e a taxa de dose podem levar a diferentes intensidades de efeitos colaterais (BUSHONG, 2008). Neste estudo os parâmetros mantiveram-se constantes para todos os pacientes sendo a energia de 6 MeV, a taxa de dose de 2 Gy por minuto.

Observando-se os dados da tabela nota-se que o fator “idade” dos pacientes não foi relevante para o trabalho, uma vez que não se relaciona com os índices de VC, nem tampouco com os graus dos efeitos colaterais apresentados para o tipo de lesão estudado, resultado que não concorda com dados da literatura que predizem que a idade da estrutura biológica irradiada interfere na resposta à radiação devido à maturação e diferenciação das células presentes (BUSHONG, 2008).

Analisando-se estatisticamente os resultados apresentados, encontrou-se o coeficiente de correlação de Pearson no valor de 0,16 , o que representa uma correlação

bem fraca entre os graus dos efeitos colaterais e o percentual de viabilidade celular, na prática pode-se dizer que não existe correlação entre os dados (MORETTIN et al., 2010). Uma das prováveis razões para tal pode estar associada à falta de controle do uso adequado de cremes hidratantes durante o tratamento.

Esta hipótese baseia-se em um fato importante observado durante o acompanhamento do paciente 16. A Figura 17 apresenta o aspecto visual de sua pele no último dia de tratamento.

Figura 17 - Imagens pós-tratamento do paciente 16.



A avaliação médica deste paciente, segundo os critérios do RTOG, levaria a classificá-lo como efeito colateral leve. Entretanto, uma semana após, este mesmo paciente apresentou os efeitos colaterais de pele mostrados na Figura 18.

Figura 18 - Imagens do paciente 16 uma semana após o tratamento sem hidratantes.



Esta mudança brusca de aparência na pele chamou a atenção da equipe médica para a reavaliação deste efeito colateral que, neste momento apresentava-se como severo. Durante os questionamentos feitos ao paciente, verificou-se que no intervalo de tempo de uma semana, este não havia usado a loção prescrita.

Acredita-se que o efeito radioprotetor do hidratante prescrito (Dersani), que tem em sua composição a vitamina A, importante na cicatrização e vitamina E, antioxidante que combate a formação de radicais livres, portanto diminuindo os danos indiretos causados pela radiação, e a maneira como foi utilizado o hidratante possa ter interferido no resultado final dos efeitos colaterais de pele. Embora esse produto tivesse sido efetivamente prescrito, constatou-se que sua utilização não foi devidamente acompanhada pelos profissionais de saúde, o que repercutiu diretamente na eficácia desse tratamento coadjuvante e, por sua vez, inviabilizando uma avaliação adequada dos efeitos da radiação sobre a pele.

Segundo Harris e colaboradores (2012), o emprego de substâncias hidratantes em radioterapia não obedece a um protocolo específico no que se refere ao tipo de produto, quantidade e frequência de utilização durante as sessões do tratamento, nem tampouco em relação a métodos de monitoração do uso adequado desses produtos. Estes aspectos certamente influenciam nos efeitos colaterais, mesmo quando aplicados os mesmos protocolos de tratamento radioterápico. Fato este que pode ter mascarado os resultados do projeto.

Outra possível explicação para a não correlação entre os índices de VC e os efeitos colaterais de pele pode ser à diferença celular dos tecidos avaliados. Segundo Berardinelli (2011) as relações de radiosensibilidade entre as células utilizadas no estudo e as demais células do corpo devem ser estudadas separadamente, como por exemplo, as diferenças entre os linfócitos, que foi o modelo celular em que o estudo foi baseado, e os fibroblastos que é o principal tipo de célula formador do tecido epitelial.

4.3 Análise da rouquidão

O efeito colateral rouquidão foi avaliado segundo critérios fornecidos pelos próprios pacientes, seguindo a mesma escala construída para o estudo (que varia de “não apresentado” a “severo”).

Os dados referentes aos efeitos colaterais de rouquidão estão apresentados na Tabela 7.

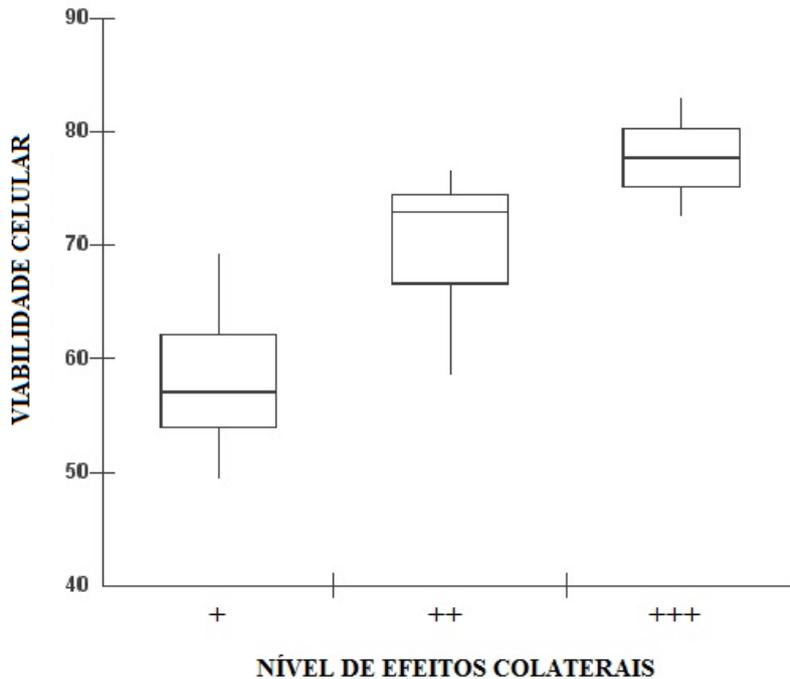
Tabela 7 - Dados de VC e níveis de percepção da rouquidão

Pacientes	Rouquidão	VC 2,5 Gy (%)
1	+	49,28 ± 0,79
2	+	53,55 ± 1,90
3	+	54,30 ± 2,77
4	+	56,98 ± 1,35
5	++	58,49 ± 0,97
6	+	60,14 ± 1,70
7	++	62,76 ± 2,79
8	+	64,06 ± 7,16
9	+	69,17 ± 0,77
10	++	70,28 ± 1,96
11	+++	72,33 ± 2,34
12	++	72,90 ± 1,57
13	++	74,09 ± 10,10
14	++	74,89 ± 0,29
15	++	76,47 ± 2,55
16	+++	82,88 ± 3,28

Legenda: NA não apresentado; (+) Leve; (++) Moderado; (+++) Severo

Os resultados da Tabela 7 foram agrupados e apresentados graficamente na Figura 19, a seguir.

Figura 19 - Dados de VC e efeitos colaterais de rouquidão (representação gráfica)



No gráfico da Figura 19 os dados de VC estão representados pela mediana dos valores encontrados, e os níveis dos efeitos colaterais estão dispostos como na escala do estudo, sendo “+” para o efeito leve, “++” para o moderado e “+++” representando o efeito severo.

Observa-se, no gráfico, que existem três valores de medianas distintos, inclusive maiores conforme os efeitos colaterais se tornam mais severos, indicando correlação positiva entre esses parâmetros.

Para os efeitos colaterais de rouquidão, estatisticamente, os dados apresentam uma forte correlação, com coeficiente de correlação igual a 0,74 , o que sugere uma tendência de maior severidade com o crescimento do índice de VC. Resultado este que concorda com os trabalhos de Barber e colaboradores (2000), Opptiz e colaboradores (2001) e Borgmann e colaboradores (2002) nos quais a relação de radiosensibilidade com a morte dos linfócitos irradiados *in vitro* foi estudada.

É importante ressaltar que todos os pacientes fumantes relataram ter deixado o hábito de fumar antes de iniciar o tratamento, pois segundo Hocevar-Boltezar e colaboradores (2009), os resultados mais severos em relação aos efeitos colaterais de rouquidão em pacientes após a radioterapia são encontrados naqueles que não abandonaram o vício do cigarro.

4.4 Análise dos efeitos colaterais disfagia (dificuldade ao deglutir) e odinofagia (dor ao deglutir)

Os efeitos colaterais disfagia e odinofagia foram avaliados segundo critérios fornecidos pelos próprios pacientes, seguindo a escala que varia de “não apresentado” a “severo”, conforme se observa na Tabela 8.

A seguir estão dispostos os dados referentes aos efeitos colaterais de disfagia e odinofagia, comparados com o índice de VC para a mesma dose de 2,5 Gy.

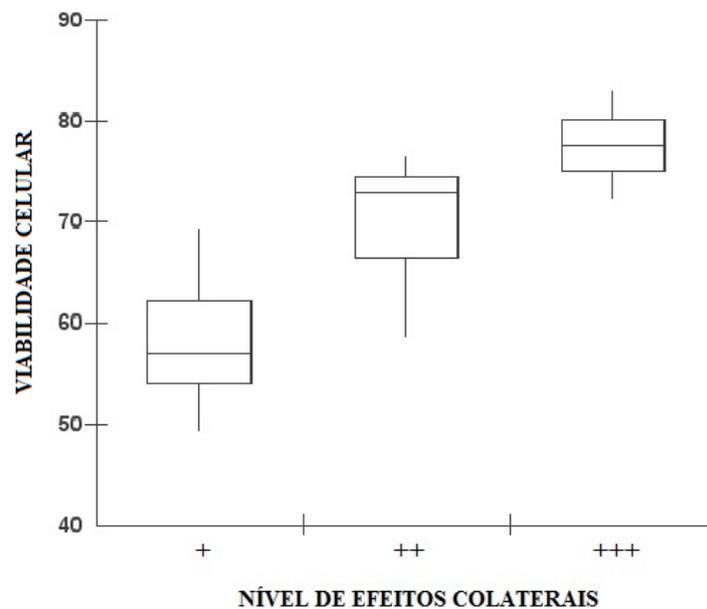
Tabela 8 - Dados de VC e efeitos colaterais disfagia e odinofagia

Pacientes	Disfagia	Odinofagia	VC 2,5Gy (%)
1	NA	NA	49,28 ± 0,79
2	+	NA	53,55 ± 1,90
3	+	+	54,30 ± 2,77
4	+	+	56,98 ± 1,35
5	++	++	58,49 ± 0,97
6	+	+	60,14 ± 1,70
7	++	++	62,76 ± 2,79
8	+	+	64,06 ± 7,16
9	+	+	69,17 ± 0,77
10	++	++	70,28 ± 1,96
11	+++	+++	72,33 ± 2,34
12	++	++	72,90 ± 1,57
13	++	++	74,09 ± 10,10
14	++	++	74,89 ± 0,29
15	++	++	76,47 ± 2,55
16	+++	+++	82,88 ± 3,28

Legenda: NA - não apresentado; (+) - Leve; (++) - Moderado; (+++) - Severo

Graficamente, os dados estão apresentados na figura 20, a seguir.

Figura 20 - Dados de VC e efeitos colaterais de disfagia e odinofagia (representação gráfica)



No gráfico da Figura 20 os dados de VC estão representados pela mediana dos valores encontrados, e os níveis dos efeitos colaterais estão dispostos conforme a escala do estudo, sendo “+” efeito leve, “++” moderado e “+++” efeito severo.

Observa-se, no gráfico, a mesma tendência dos dados relativos à rouquidão, em que os valores das medianas crescem com o aumento da severidade dos efeitos colaterais, indicando correlação positiva entre os parâmetros.

Foi observado que os pacientes tiveram dificuldade em definir e distinguir disfagia (dificuldade de engolir) e odinofagia (dor ao engolir), o que pode ser notado na Tabela 8, onde as respostas foram muito semelhantes para ambos os parâmetros.

Esta dificuldade também foi sentida por Jensen e colaboradores (2007) e Caglar e colaboradores (2008) que não distinguiram estes parâmetros em seus estudos, caracterizando-os como dificuldade ao engolir de modo geral.

Para tais efeitos colaterais (disfagia e odinofagia), a análise estatística dos dados resultou em um coeficiente de correlação de 0,81, que significa uma forte correlação entre os dados, o que, assim como na análise dos efeitos colaterais de rouquidão, sugere uma tendência de maior severidade com o aumento dos índices de VC dos pacientes. Notou-se que até o paciente 9, cujo índice de VC é de aproximadamente 70%, os efeitos variam entre “não apresentado” e “moderado”. Após este paciente, há uma nítida

predominância de efeitos que vão de moderado a severos. Resultado também condizente com os trabalhos de Barber e colaboradores (2000), Borgmann e colaboradores (2002) e Opptiz e colaboradores (2001).

4.5 Análise geral

Os resultados do estudo sobre rouquidão, disfagia e odinofagia, que sugerem correlação positiva com os índices de VC, eram esperados do ponto de vista clínico em radioterapia, pois estes efeitos colaterais estão intimamente ligados a edemas, inchaços e inflamações na região do pescoço que ocorrem devido à sinalização do dano pelas células agredidas pela radiação (ABBAS, 2005). Porém, para as doses, administradas no tratamento radioterápico (aproximadamente 2 Gy por fração), as mortes celulares são, predominantemente, provocadas por via de apoptose e morte reprodutiva (HALL,2006). Estes eventos, ao contrário da morte por necrose, não sinalizam dano para o corpo e causam assim menos inflamações, edemas e inchaços no local do tratamento (GRIVICICH, 2007; KROEMER, 2008), levando a efeitos colaterais de rouquidão, disfagia e odinofagia mais brandos.

Portanto, uma hipótese sugerida pelos resultados do trabalho é de que quanto maior o índice de VC, menos células morrem, mas apresentam os efeitos da exposição à radiação, sinalizando o dano para o sistema de defesa do organismo e assim o tecido apresenta mais inflamações e edemas, conseqüentemente os efeitos mais severos da irradiação.

Outra hipótese baseada nos resultados obtidos no estudo é de que o processo de renovação celular é responsável pelos efeitos colaterais mais leves (SAVAJOLI, 1998), assim quanto menor o índice de VC, maiores são as taxas de morte e, por conseguinte, de renovação celular. Isto leva o tecido a apresentar efeitos colaterais mais leves, uma vez que as novas células não sofreram danos radioinduzidos.

A maior dificuldade na realização do trabalho residiu no acompanhamento dos pacientes, pois muitos deles, ao apresentar efeitos colaterais, principalmente quando mais severos, deixavam de acreditar no tratamento e mostravam inclusive a intenção de interromper o mesmo. Esta dificuldade foi reportada no trabalho de Hussain (2006), que conclui que a falta de informação dos pacientes, assim como suas condições econômicas desfavoráveis são as principais causas do não seguimento dos pacientes.

Outro problema encontrado durante o estudo foi a interpretação subjetiva dos efeitos adversos ao tratamento, porém a construção da escala de avaliação e a definição de critérios baseados nas recomendações do RTOG possibilitaram o andamento do projeto.

De maneira inicial, a técnica proposta mostrou-se interessante como ferramenta para previsão dos efeitos colaterais dos pacientes em tratamento de câncer de laringe, embora estudos sejam necessários para confirmar a efetividade da metodologia.

A conscientização dos médicos, familiares e pacientes quanto aos efeitos colaterais aos quais serão submetidos, reflete diretamente na qualidade de vida dos mesmos, e possibilita a prevenção ou minimização dos efeitos adversos, daí a importância do estudo.

5 - CONCLUSÕES

- Os percentuais de Viabilidade Celular (VC) de linfócitos do sangue periférico irradiados *in vitro* antes da radioterapia, não apresentaram correlação com os graus de vermelhidão de pele pós-tratamento.
- Os resultados sugerem correlação positiva entre os valores centrais dos índices de VC e o grau de rouquidão, disfagia e odinofagia pós-tratamento, percebido por cada paciente.
- A metodologia empregada no trabalho se mostrou promissora no sentido de prever a severidade dos efeitos colaterais de rouquidão, disfagia e odinofagia para os pacientes em tratamento de câncer de laringe em estagio inicial, particularmente no prognóstico de efeitos colaterais leves e severos.

6 - PERSPECTIVAS

Como perspectiva para futuros trabalhos é importante avaliar se a tendência se mantém aumentando-se sensivelmente o número de pacientes estudados.

O controle dos parâmetros que possam alterar os resultados dos efeitos colaterais, como o uso de hidratantes para o efeito colateral de pele, é de vital importância para realização de novos trabalhos.

O emprego de outras técnicas de análise do comportamento celular após irradiação, como o uso da citometria de fluxo para análise da expressão da proteína P53, ou a avaliação de outros tipos celulares como os fibroblastos, também se mostra interessante para o desenvolvimento de futuros projetos objetivando validar o presente estudo.

7 - REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K., LICHTMANN, A. H. *Imunologia Celular e Molecular*, 5º ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2005.
- ALBERTS, Bruce. *Biologia molecular da célula*. 4.ed. Porto Alegre: **Ar Tmed**, 2004.
- ALMODÓVAR, J. M. R.; GUIRADO, D.; NÚÑEZ, M. I.; LÓPEZ, E.; GUERRERO, R.; VALENZUELA, M. T.; VILLALOBOS, M.; MORAL, R. Individualisation of radiotherapy in breast cancer patients: possible usefulness of a DNA damage assay to measure normal cell radiosensitivity, v. 62, p. 327-333, 2002.
- ANDREASSEN, C. N.; ALSNER, J.; OVERGAARD, J. Does variability in normal tissue reactions after radiotherapy have a genetic basis – where and how to look for it? **Radiotherapy and Oncology**, v. 64, p. 131-140, 2002.
- BARBER, J.B.P.; BURRIL, W.; SPREADBOROUGH, A.R. Relationship between in vitro chromosomal radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes and the expression of normal tissue damage following radiotherapy for breast cancer. **Radiotherapy and Oncology**, v. 55, p.179–86, 2000.
- BERARDINELLI, G.N. **Análise de marcadores genicos de estresse genotxico em fibroblastos humanos normais e células de glioblastoma**, 2011. **Dissertação (Mestrado em Genética)** – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- BORGMANN, K.; ROPER, B.; EL-AWADY, R.A. Indicators of late normal tissue response after radiotherapy for head and neck cancer: fibroblasts, lymphocytes, genetics, DNA repair, and chromosome aberrations. **Radiotherapy and Oncology**; v. 64, p.141–52, 2002.
- BORGMANN, K; WILLERS, H.; KACHNIC, L.A.; LUO, C.M.; PURSCHKE, M.; HELD, K.D.; POWELL, S.N. Biomarkers and Mechanisms of FANCD2 Function **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Article ID 821529, 8 pages, 2008.
- BUSHONG, S.C. *Radiologic science for technologists*, Ed.: **Elsevier**, 9ª edição, 2008.
- CAGLAR, H.B.; TISHLER, R.B.; OTHUS, M.; BURKE, E.; LI, Y.; GOGUEN, L.; WIRTH, L.J.; HADDAD, R.I.; NORRIS, C.M.; COURT, L.E.; ANINNO, D.J.; POSNER M.R.; ALLEN, A.M. Dose to larynx predicts dor swallowing complications after intensity-modulated radiotherapy. **Int. J. Radiation Oncology Biology Physics**, v. 72, p. 1110–1118, 2008.
- CAVALCANTI, M.B.; SILVA, A.P.G.; FREITAS, R.; AMARAL, A. P53 protein expression and cell viability in irradiated peripheral blood mononuclear cells as bioindicators of radiosensitivity. **Journal of Biophysical Chemistry**, v.2, p. 63-67, 2011.
- CEMBER, H.; JOHNSON, T.E. *Introduction to Health Physics*, Ed.: **McGroll Hill**, 4º edição, 2009.

CHAUDHARY, M. A., HANNAN, M. A. A SAS macro for the analysis of cell survival curves. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 67, p. 201–207, 2002.

CNEN NN 3.01 – **Diretrizes Básicas de Radioproteção**, 2011

DOWD, S.B. The practice of radiobiology in the radiologic science. **Radiologic Technology**, v. 66 (1), p. 25-31, 1994.

FENECH, M.; CHANG, W. P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E; HUMAN MICRONNUCLEUS PROJECT. Detailed description of the scoring criteria for the cytokinesisblock micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research**, v. 534, p. 65-75, 2003.

FERNANDES, T.S. **Emprego das aberrações cromossômicas instáveis e micronúcleos no Biomonitoramento individual: estudo Comparativo** , 2005. **Dissertação (Mestrado em Tecnologias Energéticas Nucleares)** - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

FRANKEN, N. A. P.; RODERMOND, H. M.; STAP, J.; HAVEMAN, J.; BREE, C. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, p. 2315-2319, 2006.

GARCIA, A. C. E. Biofísica. São Paulo-Brasil: Ed. **Sarvier**, 1998.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; BRONDANI DA ROCHA, A. Apoptosis programmed cell death. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, p. 335-343, 2007.

HALL, E. J. Radiobiology for the radiologist 5. ed. Philadelphia: Ed. **Lippincott Company**, 2006.

HARRIS, R.; PROBST, H.; BEARDMORE C.; JAMES, S.; DUMBLETON, C.; BOLDERSTON, A.; FAITHFULL, S.; WELLS, M.; SOUTHGATE, E. Radiotherapy skin care: A survey of practice in the UK. **Radiography**, v. 18, p. 21-27, 2012.

HOCEVAR-BOLTEZAR, I.; ZARGI, M.; STROJAN, P. Risk factors for voice quality after radiotherapy for early glottic cancer. **Radiotherapy and Oncology**, v. 93, p. 524–529, 2009.

HOELLER, U.; BORGMANN, K.; BONACKER, M.; KUHLMEV, A.; BAJROVC, A.; JUNG, H.; ALBERTI, W.; DIKOMEV, E. Individual radiosensitivity measured with lymphocytes may be used to predict the risk of fibrosis after radiotherapy for breast cancer. **Radiotherapy and Oncology**, v. 69, p. 137–144, 2003.

HOPEWELL, J. W.; TROTT, K. R. Volume effects in radiobiology as applied to radiotherapy. **Radiotherapy and Oncology**, v. 56, p. 283-288, 2000.

HUSSAIN, Q.M.; ALAM, M.U.; HAI, M.A. Study on follow up of patients in the Department of Radiotherapy in a teaching hospital. **TAJ**, v. 19(2), p. 57-59, 2006.

INCA, Instituto Nacional do Câncer, [Internet] disponível em: <http://www.inca.gov.br> (21/05/2012).

INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIATION UNITS AND MEASUREMENTS (ICRU). Prescribing, Recording, and Reporting Photon Beam Therapy (Report 50) **ICRU Report No. 50**, 1993.

INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIATION UNITS AND MEASUREMENTS (ICRU). Prescribing, Recording and Reporting Photon Beam Therapy (Report 62) (Supplement to ICRU Report 50) **ICRU Report 62**, 1999.

INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION (ICRP). The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. **Annals of the ICRP**, v. 37, p. 1 - 332, 2007.

ISSA, P.Y. Cancer of the supraglottic larynx treated by radiotherapy exclusively **Int. J. Radiation Oncology Biology Physics**, v. 15, p. 843-850, 1988.

JAGETIA, G. C., ARUNA, R. Correlation between cell survival and micronuclei-induction in HeLa cells treated with adriamycin after exposure to various doses of γ -radiation. **Toxicol Letters**, v. 115, p. 183-193, 2000.

JENSEN, K.; LAMBERTSEN, K.; GRAU, C. Late swallowing dysfunction and dysphagia after radiotherapy for pharynx cancer: Frequency, intensity and correlation with dose and volume parameters **Radiotherapy and Oncology**, v. 85, p. 74-82, 2007.

KIZILIAN-MARTEL, N.; WILKINS, R. C.; MCLEAN, J. R. N.; MALONE, S.; RAAPHORST, G. P. Prediction of radiosensitivity by measurement of x-ray-induced apoptosis in human blood using the comet assay. **Anticancer Research**, v. 23, p.3847-3854, 2003.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V.; EL-DEIRY, W. S.; GOLSTEIN, P.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LIPTON, S. A.; MALORNI, W.; NUÑEZ, G.; PETER, M. E.; TSCHOPP, J.; YUAN, J.; PIACENTINI, M.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, p. 3-11, 2008.

LEONG, T; BORG, M; MCKAY, M. Clinical and cellular radiosensitivity in inherited human, **Clinical Oncology**, v. 16, p. 206-209, 2004.

LICITRA, L.; BERNIER, J.; GRANDI, C.; LOCATI, L.; MERLANO, M.; GATTA, G.; LEFEBVRE, J.L. Cancer of the larynx, **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 47, p. 65- 80, 2003.

LOHMANN, T.H.O. **Análise da radiosensibilidade de linfócitos periféricos de pacientes com câncer de pele e de indivíduos sadios por meio do método do micronúcleo**, 1995. **Dissertação (Mestrado em Tecnologias Nucleares)** - Universidade de São Paulo, São Paulo.

LOPEZ, E.; GUERRERO, R.; NUNEZ, M. I.; MORAL, R.; VILLALOBOS, M.; GALAN, J. M.; VALENZUELA, M. T.; GAMEZ, A. M.; OLIVER, F. J.; OLIVA, D. M.; ALMODOVAR, M. R. Early and late skin reactions to radiotherapy for breast cancer and their correlation with radiation-induced DNA damage in lymphocytes. **Breast Cancer Research**, v. 7, p. 690-698, 2005.

LOU, J. L.; CHEN, Z. J.; WEI, J.; HE, J. L.; JIN, L. F.; CHEN, S. J.; ZHENG, W.; XU, S. Response of lymphocytes to radiation in untreated breast cancer patients as detected with three different genetic assays. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 21, p. 499-508, 2008.

MEHTA, S.R.; SUHAG, M.V.; SEMWAL, M.; SHARMA, M.N. Radiotherapy : Basic Concepts and Recent Advances. **MJAFI**, v. 66, p. 158-162, 2010.

MOTA, C.L.S. **Estudo das amostras de sangue humano e hemocomponentes irradiados com baixa dose utilizando a técnica de fluorescência de raios X por reflexão total**, 2008. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Nuclear)** – Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MORETTIN, P. A.; BUSSAB, W. O. **Estatística Básica** 6. ed. Ed. **Saraiva**, 2010.

NANAVATY, M. A.; JOHAR, K.; SIVASANKARAN, M. A.; VASAVADA, A. R.; PRAVEEN, M. R.; ZETTERSTROM, C. Effect of trypan blue staining on the density and viability of lens epithelial cells in white cataract. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 32, p. 1483-1488, 2006.

NIYAZI, M.; NIYAZI, I.; BELKA, C. Counting colonies of clonogenic assays by using densitometric software. **Radiation Oncology**, v. 2, p. 4, 2007.

OPPITZ, U.; BAIER, K.; WULF, J.; SCHAKOWSKI, R.; FLENTJE, M. The in vitro colony assay: a predictor of clinical outcome. **International Journal Radiation Biology**, v. 77, p. 105–110, 2001.

OZSAHIN, M.M.D., OZSAHIN H.M.D., YUQUAN SHI M.D., LARSSON, B. , WÜRGLER F.E. AND CROMPTON, N.E.A. Rapid assay of intrinsic radiosensitivity based on apoptosis in human CD4 and CD8 T-lymphocytes. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 38, p. 429-440, 1997.

PELLIZZON, A.C.A.; CASTRO, D.G.; SALVAJOLI, J.V.; MAIA, M.A.C.; NOVAES, P.E.R.S.; FOGAROLI, R.C.; HANRIOT, R.M. **Rotinas e condutas em radioterapia** 3 ed. Ed. **Lemar**, 2008.

PEREZ, C.A.; PURDY, J.A.; LEVITT, S.H. **Technical Basis of Radiation Therapy** 4. ed. Ed. **Springer**, 2006.

PINTO, M.P.L.; SANTOS, N.F.G.S.; AMARAL, A. Current status of biodosimetry based on standard cytogenetic methods. **Radiat Environ Biophysics**, 2010.

PRISE, K. M.; SCHETTINO, G.; FOLKARD, M.; HELD, K. D. New insights on cell death from radiation exposure. **The Lancet Oncology**, v. 6, p. 520-528, 2005.

RANCATI, T.; SCHWARZ, M.; ALLEN, A.M.; FENG, F.; POPOVTZER, A.; MITTAL, B.; EISBRUCH, A. Radiation Dose-Volume effects in the larynx and pharynx. **Int. J. Radiation Oncology Biology Physics**, v. 76, p. 64-69, 2010.

REIS, S. F. S. **Optimização de processos de prestadores de cuidados de saúde em serviço de radioterapia**, 2008. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica)** - Universidade de Coimbra, Coimbra.

RTOG, Radiation Therapy Oncology Group, [Internet] disponível em: <http://www.rtog.org/> (15/11/2011).

SALVAJOLI, S.V.; SOUHAMI, L.; FARIA, S.L Radioterapia em Oncologia 1 ed. Rio de Janeiro: Ed. **Medsa**, 1999

SAWADA, N.O.; DIAS, A.M.; ZAGO, M.M.F. O efeito da radioterapia sobre a qualidade de vida dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.52(4), p. 323-329, 2006.

SOUZA, T.F. **Avaliação da sobrevivência de linfócitos do sangue periférico humano após irradiação in vitro**, 2010. **Monografia (Bacharel em Biomedicina)**. Universidade Federal de Pernambuco, Recife

ZACKRISSON, B.; MERCKE, C.; STRANDER, H.; WENNERBERG, J.; CAVALLIN E. A systematic overview of radiation therapy effects in head and neck cancer. **Acta Oncology** v. 42, p. 443-461, 2003.

ANEXO I

COMITÊ DE ÉTICA

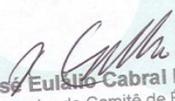
Instituto de Medicina Integral
Prof. Fernando Figueira
Escola de Pós-graduação em Saúde Materno Infantil
Instituição Civil Filantrópica



DECLARAÇÃO

Declaro que o projeto de pesquisa nº 1939-11 intitulado "**Biodosimetria aplicada ao controle de qualidade de tratamento de tumores glóticos com acelerador linear.**" apresentado pelo (a) pesquisador (a) **Ademir de Jesus Amaral** foi **APROVADO** pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira – IMIP, em reunião de 19 de janeiro de 2011.

Recife, 21 de janeiro de 2011.


Dr. José Eulálio Cabral Filho
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa em Seres Humanos do
Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira

UTILIDADE PÚBLICA MUNICIPAL - Lei. 9851 de 08/11/67
UTILIDADE PÚBLICA ESTADUAL - Lei. 5013 de 14/05/64
UTILIDADE PÚBLICA FEDERAL - Dec. 86238 de 30/07/81
INSCRIÇÃO MUNICIPAL: 05.897-1
INSCRIÇÃO ESTADUAL - Isento
CNPJ: 10.988.301/0001-29

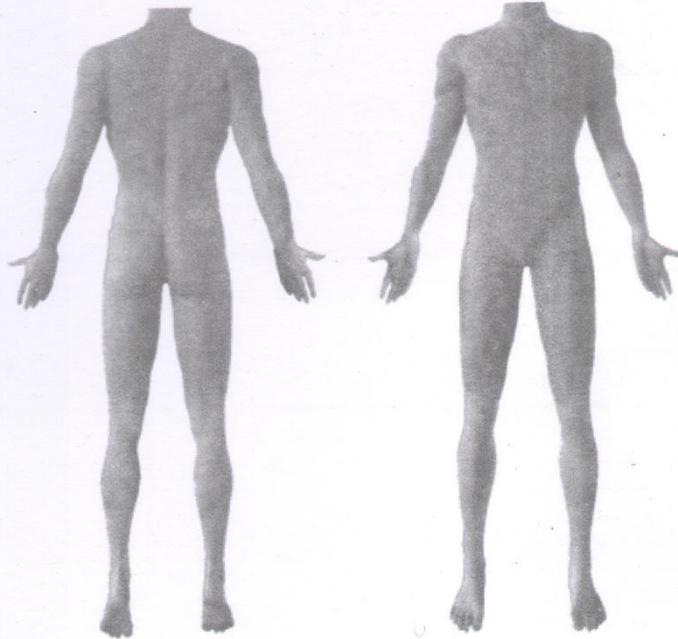
Rua dos Coelhos, 300 Boa Vista
Recife - PE - Brasil - CEP: 50.070-550
PABX: (81) 2122.4100
Fax: (81) 2122.4722 Cx. Postal 1393
e-mail: imip@imip.org.br
www.imip.org.br

ANEXO II

FICHA DE TRATAMENTO


Serviço de Radioterapia


NOME	TELEFONE
DIAGNÓSTICO	MATRÍCULA
CID.	

PLANEJAMENTO MÉDICO										
Nº DO CAMPO	TAMANHO DO CAMPO	LOCALIZAÇÃO ANATÔMICA	DOSE TUMOR total (cGy)	DOSE TUMOR diária(cGy)	Nº DE APLICAÇÕES	PROF. (cm)	DFS	GANTRY	COLIMADOR	PESO

DAP	DLL	ENERGIA	SUPORTE
ACESSÓRIOS	DECÚBITO	TÉCNICA	

APÊNDICE I

VIABILIDADE CELULAR NO PROGNÓSTICO DE EFEITOS COLATERAIS EM RADIOTERAPIA DE CÂNCER DE LARINGE

FICHA DE ACOMPANHAMENTO DO PACIENTE

DADOS DO PACIENTE

NOME: _____

ENDEREÇO: _____

BAIRRO: _____ MUNICÍPIO: _____ ESTADO: _____

TELEFONE: _____

IDADE: _____

SEXO: () MASCULINO () FEMININO

RAÇA: _____

FUMANTE:

() SIM () NÃO

FEZ USO DE ALGUM TRATAMENTO ANTERIOR COM RADIAÇÃO
IONIZANTE?

() SIM () NÃO

OBS: _____

FEZ USO ANTERIORMENTE DE QUIMIOTERAPIA?

() SIM () NÃO

OBS: _____

PARÂMETROS DE TRATAMENTO

DOSE TOTAL: _____

DOSE POR FRAÇÃO: _____

TOXICIDADES

PELE

GRAU:

() LEVE () MODERADO () SEVERO

TEMPO DE RECUPERAÇÃO: _____

ROUQUIDÃO

GRAU:

() LEVE () MODERADO () SEVERO

TEMPO DE RECUPERAÇÃO: _____

DISFAGIA

GRAU:

() LEVE () MODERADO () SEVERO

ODINOFAGIA

GRAU:

() LEVE () MODERADO () SEVERO

DATA: ____ / ____ / _____

RESPONSÁVEL: _____

APÊNDICE II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.

I. Dados de identificação do sujeito da pesquisa e responsável legal:

Nome do paciente: _____

Data de nascimento: ___/___/_____

Endereço: _____

Telefone: _____

II. Informações sobre a pesquisa:

Título: **VIABILIDADE CELULAR NO PROGNÓSTICO DE EFEITOS COLATERAIS EM RADIOTERAPIA DE CÂNCER DE LARINGE**

Pesquisador responsável: Heberton Ferreira

Em radioterapia é de extrema importância que se conheça a dose de radiação administrada ao paciente. Dosimetria clínica é o termo genérico para o conjunto de procedimentos que devem ser seguidos de sorte a garantir que a diferença entre a dose planejada e a dose entregue ao paciente esteja dentro dos limites estabelecidos.

Protocolos atuais de radioterapia consideram adequadas diferenças de até cinco por cento entre a dose prescrita e àquela entregue no tratamento, sendo a câmara de ionização o dosímetro de referência nessas avaliações.

O câncer da laringe é a segunda neoplasia maligna mais comum no trato respiratório, imediatamente após o câncer de pulmão, estando associado ao hábito de fumar e o uso abusivo do álcool. A escolha terapêutica para estes tumores passa pela radioterapia ou cirurgia, sendo que ambas apresentam índices de cura semelhantes. Portanto a opção diz respeito às condições gerais do paciente, vontade do mesmo e características do Serviço onde o paciente será tratado.

No trabalho adotaremos a técnica biodosimétrica para avaliação de dose nos tratamentos radioterápicos de tumores de laringe em fase inicial.

Sabe-se que a biodosimetria avalia a interação da radiação com o corpo humano, através de marcadores biológicos radioinduzidos, esta pesquisa pretende investigar o emprego da biodosimetria como indicador da radiosensibilidade individual.

III. Consentimento da participação do sujeito

Eu, _____, declaro que fui devidamente informado pelo pesquisador _____, sobre a finalidade da pesquisa acima, estou consciente das condições sobre a minha participação no estudo descritas no item anterior e concordo com a participação na pesquisa.

Recife, ___ de _____ de _____.

Assinatura do responsável.

Assinatura do pesquisador

Testemunha.