UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO AMBIENTE – PPGSHMA

Cátia Simone Ferreira Silva

FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS COMO INDICADOR DA RADIOSSENSIBILIDADE EM PACIENTES COM CÂNCER DE COLO UTERINO

Vitória de Santo Antão

2017

Cátia Simone Ferreira Silva

FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS COMO INDICADOR DA RADIOSSENSIBILIDADE EM PACIENTES COM CÂNCER DE COLO UTERINO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**.

Área de Concentração: Saúde e Ambiente.

Orientadora: Profa. Dra. Edvane Borges da Silva

Co-Orientadora: Profa. Dra. Mariana Brayner Cavalcanti Freire Bezerra

Vitória de Santo Antão

2017

Catalogação na fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE – Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Ana Ligia F. dos Santos, CRB4-2005

S586f Silva, Cátia Simone Ferreira
Frequência de micronúcleos como indicador da radiossensibilidade em pacientes com câncer de colo uterino. / Cátia Simone Ferreira Silva. - Vitória de Santo Antão, 2018.
81 folhas: fig.; tab.

Orientadora: Edvane Borges da Silva.
Coorientadora: Mariana Brayner Cavalcanti Freire Bezerra.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CAV, Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, 2018.

1. Neoplasia Intraepitelial Cervical. 2. Radiação ionizante. 3. Radioterapia. I. Silva, Edvane Borges da (Orientadora). II. Bezerra, Mariana Brayner Cavalcanti Freire (Coorientadora). III. Título.

616.994 CDD (23.ed.) **BIBCAV/UFPE-003/2018**

Cátia Simone Ferreira Silva

FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS COMO INDICADOR DA RADIOSSENSIBILIDADE EM PACIENTES COM CÂNCER DE COLO UTERINO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**.

Área de concentração: Saúde e Ambiente.

Aprovado em: 30/01/2017.

_____

Orientadora: Drª. **Edvane Borges da Silva**
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

BANCA EXAMINADORA

_____

Dr. **Carlos Eduardo de Oliveira Costa Júnior**
Faculdade Integrada de Pernambuco - FACIPE

_____

Dr. **Thiago Salazar e Fernandes**
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

_____

Drª. **Simey de Souza Leão Pereira Magnata**
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

_____

Drª**. Claudia Rohde**
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dedico este trabalho a Deus, por me conceder a oportunidade de estar viva.

Aos meus pais Joel e Nalva pelo exemplo, amor e carinho.

Aos meus filhos Natália e Mateus pela paciência e apoio.

A Edvaldo pela ajuda e por sempre estar comigo.

Aos meus amigos pela convivência, apoio e atenção nos momentos alegres e tristes.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Às minhas orientadoras e amigas Profas. **Edvane Borges** e **Mariana Brayner**, por acreditarem em mim, me mostrarem o caminho da ciência, fazerem parte da minha vida nos momentos bons e ruins, por serem exemplos de profissional e de mulheres fortes e guerreiras com um coração imenso.

À minha família, a qual amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo.

Aos amigos que fizeram parte desses momentos sempre me ajudando e incentivando.

Aos meus amigos de trabalho do laboratório GERAR (DEN-UFPE), em especial, aos professores **Thiago Salazar e Ademir Amaral,** aos amigos **Natanias, Ayalla, Leone, Lídia, Luis, Giciliene, Benaia, Ewerton, Liderlânio, Diego, Amanda** e aos amigos da ASCES, **Evanísia, Adriana, Rosa Régia, Walkíria, Gybbeli**, que participaram diretamente deste trabalho e me ajudaram em todos os momentos.

Aos meus amigos do mestrado que sempre estiveram do meu lado dando força e apoio, **Isabel, Aparecida, Franciele, Lidielda e Lúcia.**

Aos colegas do IMIP, **Tássio e Geneci** e no HCP, **Dr. Jonathan, Dr. Rivaldo, Isabel, Gláucia, Niedja, Ana, Karla, Djalma e Tiago** por me receberem tão bem, me ajudaram e torceram por esse trabalho.

Às pacientes que depositaram em mim sua confiança e sem elas nada seria possível.

A todos os professores da pós-graduação em Saúde humana e meio ambiente pelo convívio e aprendizado.

Agradeço à **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa durante todo o período de realização deste mestrado.

Muito Obrigada!

RESUMO

O tratamento radioterápico envolve riscos e benefícios inerentes à ação da radiação ionizante no corpo humano com o intuito de eliminar ou inibir as células tumorais, podendo atingir áreas sadias adjacentes ao tumor e causar efeitos adversos indesejáveis no paciente. A radiossensibilidade é uma característica intrínseca que que está associada a uma reação exacerbada à ação da radiação ionizante no corpo humano. Por isso, identificar se um paciente submetido à radioterapia apresenta radiossensibilidade elevada pode ajudar a otimizar o tratamento, além de permitir que sejam minimizados os efeitos deletérios da radiação em tecidos sadios. A quantificação de micronúcleo (MN) pode ser usada como indicador citogenético do dano provocado pela radiação, além de mostrar-se uma importante metodologia complementar à dosimetria física, principalmente em casos de estimativa de dose individual para essa modalidade terapêutica. O objetivo deste trabalho foi avaliar se a frequência de micronúcleo pode ser usada como indicador da radiossensibilidade de pacientes submetidas ao tratamento radioterápico contra câncer de colo de útero e se existe a correlação com os efeitos adversos apresentados pelas mulheres. Para tal, foi coletado uma amostra de sangue periférico de 10 mulheres diagnosticadas com câncer de colo uterino e com indicação de tratamento radioterápico. Foi realizada a irradiação das amostras sanguíneas, *in vitro*, com uma dose 2 Gy, em seguida realizada cultura de linfócitos com bloqueio da citocinese e posterior processamento para confecção de lâminas. A verificação de Micronúcleos foi realizada em um número mínimo de 1000 células linfocitárias binucleadas. A descrição dos sintomas clínicos e epidemiológicos foi relatada pelas pacientes antes e após o tratamento radioterápico por meio de um questionário e entre os resultados foi possível verificar uma forte correlação positiva (r = 0,7614, p-valor = 0,0105) da frequência de micronúcleos com os níveis de gravidade dos efeitos adversos sistêmicos e na região genital, descritos pelas mulheres logo após a terapêutica com radiação ionizante. A quantificação de micronúcleos mostrou-se mais elevada nas amostras irradiadas, tendo em vista o grupo controle. Os resultados sugerem que a frequência de micronúcleo pode ser utilizada para identificar a radiossensibilidade de pacientes portadoras de câncer de colo de útero. Contudo, estudos posteriores, com um maior número de pacientes, são necessários para confirmar o potencial preditivo dos micronúcleos como indicador da sensibilidade aos efeitos da radiação ionizante.

Palavras-Chave: Neoplasia Intraepitelial Cervical. Radiação ionizante. Radioterapia. Irradiação *in vitro*. Indicador citogenético.

ABSTRACT

Radiation therapy involves risks and benefits inherent in the action of ionizing radiation on the human body in order to eliminate or inhibit tumor cells, which can reach healthy areas adjacent to the tumor and cause undesirable side effects and cellular damage not visible to the naked eye. Radiosensitivity is an intrinsic characteristic that is associated with an exacerbated reaction to the action of ionizing radiation in the human body. Therefore, to identify if a patient submitted to radiotherapy has high radiosensitivity can help to optimize the treatment, besides allowing the deleterious effects of the radiation in healthy tissues to be minimized. Micronucleus (MN) quantification can be used as a cytogenetic indicator of the damage caused by radiation, in addition to showing an important complementary methodology to physical dosimetry, especially in cases of individual dose estimation for this therapeutic modality. The objective of this study was to evaluate whether the micronucleus frequency can be used as an indicator of the radiosensitivity of patients undergoing radiotherapy treatment against cervical cancer and whether there is a correlation with the adverse effects presented by women. For that, a peripheral blood sample was collected from 10 women diagnosed with cervical cancer and indicated for radiotherapy. Blood samples were irradiated in vitro with a dose of 2 Gray (Gy), followed by culture of lymphocytes with cytokinesis block and subsequent processing for the preparation of slides. The Micronucleus check was performed on a minimum of 1000 binucleated lymphocyte cells. The description of the clinical and epidemiological symptoms was reported by the patients before and after the radiotherapy treatment using a questionnaire and among the results it was possible to verify a positive correlation ($r = 0,7134$, p-value = 0.0137) Of micronuclei with the severity levels of the systemic adverse effects and in the genital region described by women soon after the therapy with ionizing radiation. The micronucleus quantification was higher in the irradiated samples, in view of the control group. The results suggest that the micronucleus frequency can be used to identify the radiosensitivity of patients with cervical cancer. However, further studies with a larger number of patients are needed to confirm the predictive potential of micronuclei as an indicator of sensitivity to the effects of ionizing radiation.

Key words: Cervical Intraepithelial Neoplasia. Ionizing Radiation. Radiation Therapy. In vitro Irradiation. Cytogenetic Indicator.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 -	Estadiamento do câncer de colo uterino e sua localização (FIGO, 2003).	17
Figura 1.2 -	Agentes mutagênicos que comumente as pessoas estão expostas (RIBEIRO, SALVATORI, MARQUES, 2003).	19
Figura 1.3 -	Desenho de um acelerador em tratamento de teleterapia (THALHOFER, 2016).	25
Figura 1.4 -	Desenho esquemático apresentando a os dispositivos para execução da braquiterapia (FONTE: FIGURA ADAPTADA RETIRADA DA INTERNET: HTTP://WWW.VENCEROCANCER.ORG.BR, 2017).	26
Figura 1.5 -	Efeitos indireto e direto produzidos pela exposição à radiação ionizante (FONTE: PRÓPRIA AUTORA).	29
Figura 1.6 -	Formação de micronúcleo através do efeito clastogênico (A) e do efeito aneugêncio (B) (FONTE: FIGURA ADAPTADA RETIRADA DA INTERNET: HTTP://WWW.UAB.ES/IMATGE/242/472/MICRONUCLISIM.JPG).	31
Figura 1.7 -	Linfócitos binucleados (A – com 1 MN, B – com 2 MN, C – com 3 MN e D – com Mais de 3 MN). (FONTE: FENECH, 2000).	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 -	Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016, exceto pele não melanoma (INCA, 2015).	16
Tabela 1.2 -	Tratamentos para o câncer de colo uterino (FONTE: NOVAES, 2016).	24

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
CBC	Células binucleadas contadas
CEMAR	Critérios de Escore para Morbidade Aguda por Radiação
CERAPE	Centro de Radioterapia de Pernambuco
D	Dose
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FIGO	International Federation of Gynecology and Obstetrics
FISH	Fluorescence in situ hibridisation
FMN	Frequência de micronúcleos
FMN	Frequência de micronúcleos
Gy	Gray
IAEA	Internacional Atomic Energy Agency
INCA	Instituto nacional do câncer
LAMBDA	Laboratório de modelagem e biodosimetria aplicada
MeV	Megaeletronvolt
MN	Micronúcleos
MNCtB	Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese
NaCl	Cloreto de sódio
NIC	Neoplasia Intraepitelial cervical
OMS	Organização Mundial de Saúde
QT	Quimioterapia
Rpm	Rotação por minuto
RT	Radioterapia
RTOG	Radiation Therapy Oncology Group
SFB	Soro fetal bovino
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 12
1.1 Objetivos 14
1.2 Objetivo geral 14
1.3 Objetivos específicos 14
2 REVISÃO DA LITERATURA 15
2.1 O Câncer 15
2.2 O Câncer de Colo Uterino 18
2.3 Diagnóstico do Câncer de Colo Uterino 22
2.4 Tratamentos do Câncer de Colo Uterino 23
2.5 Radiossensibilidade 29
2.6 Micronúcleo (MN) 30
3 FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS COMO INDICADOR DA RADIOSSENSIBILIDADE EM PACIENTES COM CÂNCER DE COLO UTERINO . 36
4 CONCLUSÃO 60
REFERÊNCIAS 61
ANEXO A – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP). . 72
APÊNDICE A - Termo de consentimento livre e esclarecido - (TCLE) (para adultos impossibilitados de assinar o TCLE - resolução 466/12). 73
APÊNDICE B - Termo de consentimento livre e esclarecido - (TCLE) (para maiores de 18 anos ou emancipados - resolução 466/12). 76
APÊNDICE C – Questionário Clínico Epidemiológico 79

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença popularmente conhecida em todo o mundo e sua incidência vem crescendo ano após ano, principalmente em países em desenvolvimento. O crescimento da expectativa de vida da população é um importante fator relacionado às doenças crônicos-degenerativas. Sendo assim, essas doenças apresentam-se como importante problema de saúde pública (MASCARELLO *et al.,* 2012).

O INCA (2015), afirma que, apesar de inúmeras estratégias de prevenção para o câncer, entre os principais tipos existentes, há o do tipo colo uterino que está em terceiro lugar em mortes na população feminina no Brasil. O câncer uterino, assim como outras neoplasias malignas, é consequência da soma de alterações em genes, no qual seus mecanismos de reparo do DNA estão comprometidos, assim como os de proliferação e diferenciação. Os mecanismos atuantes como fatores de risco para o desenvolvimento do câncer uterino estão, portanto, ligados direta ou indiretamente à instabilidade genética (BEIRUTHY; KAZAN, 2016).

Segundo o Ministério da saúde (2014), quando diagnosticada a neoplasia, existe a possibilidade de escolha entre os vários tratamentos. Para os pacientes do Sistema Único de Saúde (SUS) existe um guia próprio em que são indicados os protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas em oncologia, atualizado periodicamente, no entanto, a radiação ionizante, é uma escolha primária no tratamento para os casos mais avançados, podendo ser utilizada sozinha ou em conjunto com a quimioterapia e a cirurgia oncológica (INCA, 2015).

Entre os fatores existentes, que podem afetar o tratamento com a radiação ionizante, pode-se citar a sensibilidade individual intrínseca, a qual está diretamente ligada aos efeitos adversos exacerbados da terapêutica (SILVA, *et al.,* 2014). Esses efeitos ocorrem quando a radiação ionizante interage com os átomos das células, alterando suas moléculas, que por sua vez, podem sofrer ionizações e quebras de biomoléculas e consequente fragmentação (divisão) do DNA, molécula essa encarregada da transmissão de caracteres hereditários de seres vivos (FERNANDES, 2005; OKUNO, 2013).

Diante disso, fica clara a importância de um protocolo que possa ser utilizado visando avaliar a radiossensibilidade intrínseca de cada paciente em tratamento radioterápico, objetivando otimizar os resultados pretendidos e servindo como medida de prevenção dos efeitos adversos durante e após a terapêutica com radiação ionizante, o que pode se mostrar altamente benéfico ao paciente.

Um biomarcador bastante utilizado para identificação de genotoxicidade provocada por agentes físicos, químicos e biológicos, é o micronúcleo. O Teste de Micronúcleos é amplamente empregado na avaliação da exposição a substâncias potencialmente genotóxicas, defeito no processo mitótico ou falha no reparo do DNA (SOETEMAN-HERNÁNDEZ, 2015; NERSESYAN *et al.,* 2016).

Os micronúcleos (MN) são resultados de perdas de fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros, que durante o processo de divisão celular. A fase da divisão em que isto ocorre é a “anáfase”, pois as fibras do fuso mitótico não se ligam aos cinetócoros dos centrômeros do cromossomo que acabam se perdendo em decorrência da exposição a um agente genotóxico, e, como consequência, há a formação de um aglomerado semelhante a um pequeno núcleo, além do núcleo celular comum (KIRSCH-VOLDERS *et al.,* 2003).

Segundo Aires (2008), o Teste de Micronúcleo tem sido apontado como um instrumento útil na avaliação da ocorrência de danos cromossômicos, com isso, é considerado um efetivo marcador de exposição (revelando danos genéticos) e potencial marcador de efeito (indicador de risco de câncer).

Esse teste citogenético é simples, permite a sua aplicação em larga escala, confiável, sensível, rápido e de baixo custo, tornando-se uma importante ferramenta no biomonitoramento de indivíduos expostos a fatores de riscos para o desenvolvimento de câncer, permitindo a possibilidade de implantação como políticas e estratégias de prevenção de doenças com altas taxas de morbidade e mortalidade. Desta forma, se mostra um potencial método preventivo a ser aplicado para a individualização do protocolo da radioterapia, onde seja avaliada a ocorrência de efeitos adversos em tecidos sadios.

1.1 Objetivos

1.2 Objetivo geral

Avaliar o potencial uso do teste de micronúcleos como preditivo de reações adversas em pacientes com câncer de colo uterino submetidas ao tratamento radioterápico.

1.3 Objetivos específicos

- Avaliar *in vitro* a frequência de micronúcleos em amostras de sangue periférico, irradiadas e não irradiadas.
- Analisar a resposta clínica da paciente após o tratamento radioterápico;
- Avaliar se existe correlação entre a frequência de micronúcleos e a resposta clínica após o tratamento radioterápico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O Câncer

Câncer é um termo utilizado para designar um conjunto de mais de 100 doenças diferentes que possuem um crescimento celular desordenado. Atualmente é um problema de saúde pública sendo umas das principais causas de morte e morbidade em todo o mundo, especialmente em países em desenvolvimento.

Em 2012, o câncer foi responsável por 8,2 milhões de mortes, porém, estimativas sugerem um aumento anual de 14 milhões de novos casos de câncer nas próximas duas décadas (“WHO | Câncer”, 2014). O início da doença se dá de forma sutil, vindo a desenvolver-se interna ou externamente após anos de latência (COUTO; BARROS, 2009). Estima-se que, para as próximas décadas, o impacto do câncer na população corresponda a 80% dos mais de 20 milhões de casos novos estimados para 2025.

A estimativa para o Brasil, no biênio 2016-2017, aponta a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma (aproximadamente 180 mil casos novos), ocorrerão cerca de 420 mil casos novos de câncer

Os tipos de câncer mais incidentes no mundo são: pulmão (1,8 milhão), mama (1,7 milhão), intestino (1,4 milhão) e próstata (1,1 milhão). Nos homens, os mais frequentes foram pulmão (16,7%), próstata (15,0%), intestino (10,0%), estômago (8,5%) e fígado (7,5%). Em mulheres, as maiores frequências encontradas foram mama (25,2%), intestino (9,2%), pulmão (8,7%), colo do útero (7,9%) e estômago (4,8%). No Quadro 1.1 é possível verificar a incidência dos principais tipos de cânceres que acometem as mulheres.

Apesar do câncer de mama ser o mais incidente entre as mulheres, o câncer do colo do útero ainda contribui de forma importante para a carga da doença, estando como o terceiro mais incidente e como a segunda causa de morte por câncer feminino.

Tabela 1.1 – Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016, exceto pele não melanoma.

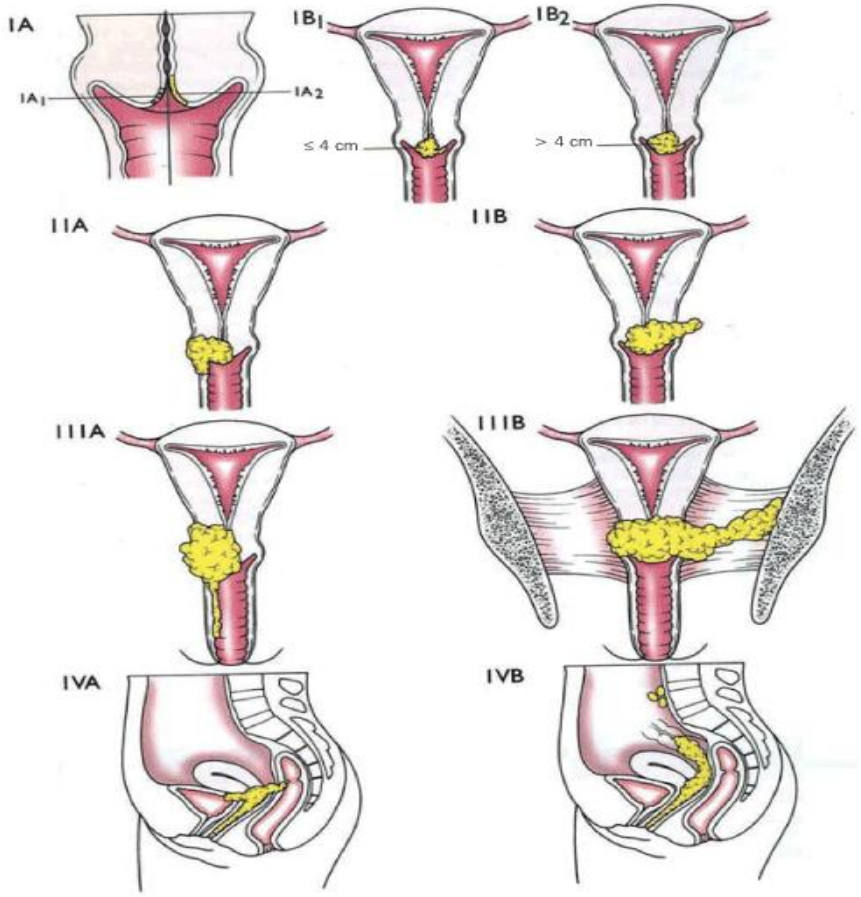
Localização do Câncer	Número de Casos	Percentual
Mama Feminina	57.690	28,1%
Cólon e Reto	17.620	8,6%
Colo do Útero	16.340	7,9%
Traquéia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Estômago	7.600	3,7%
Corpo do Útero	6.950	3,4%
Ovário	6.150	3,0%
Glândula da Tireoide	5.870	2,9%
Linfoma de não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

FONTE: INCA, 2015.

O INCA (2015), classifica o câncer do colo do útero de acordo com seu estadiamento. Estadiar quer dizer, classificar a sequência do desenvolvimento da neoplasia e assim, identificar a extensão do tumor no corpo humano e sua localização. Existem vários tipos de estadiamento, são eles: I, IA, IA1, IA2, IB, IB1, IB2, II, IIA, IIA1, IIA2, IIB, III, IIIA, IIIB, IV, IVA e IVB, (onde, no estágio I o câncer uterino está resumido ao útero, no estágio II é quando o câncer envolve o colo uterino, no estágio III se sucede por meio do acometimento de trompas, ovários e/ou linfonodos e no estágio IV a tumoração envolve adjacências, tais como: reto, bexiga, ou outros órgãos) conforme demonstrado na Figura 1.2**.** Contudo, essas apresentações são passíveis de cura em até 100% dos casos quando diagnosticadas e tratadas precocemente e da maneira correta (INCA, 2016).

Em termos regionais essa tipologia de câncer encontra-se na primeira posição em incidência para a região Norte do Brasil, está descrita como a segunda posição mais frequente nas regiões Centro-Oeste e Nordeste, em terceiro na região Sudeste e quarto na região Sul. Com um número estimado de mais de 16 mil novos casos para cada 100 mil mulheres no ano de 2016. Em Pernambuco as estimativas apontam que anualmente ocorrem cerca de mais de 2 mil casos novos para cada 100.000 mulheres (INCA, 2015).

Figura 1.1 – Estadiamento do câncer de colo uterino e sua localização



FONTE: FIGO, 2003.

Grande parte dos cânceres cervicais tem seu início em lesões pré-neoplásicas chamadas Neoplasias Intraepiteliais Cervicais (NIC) I, II e III, em que, o processo de evolução em malignidade do epitélio cervical é comumente longo, podendo decorrer, em média, de cinco até seis anos desde a mutação primária até o câncer invasivo, acometendo até tecidos adjacentes (ELHAMIDI *et al.,* 2004; CAMPOS *et al.,* 2008).

Logo após o desenvolvimento das primeiras células neoplásicas malignas, cerca de 50% dos cânceres irão persistir ou desenvolver-se ainda mais na ausência de tratamento e, em aproximadamente 5% dos danos, há recorrência após o tratamento finalizado (CIRISANO, 1999; BAR-AM *et al.,* 2000; MILOJKOVIC, 2002; GÓIS SPECK *et al.,* 2015).

De outra forma, mais de 10% dos danos com diagnóstico anatomopatológico (Biópsia) de NIC I identificam somente condições reativas sem potencial e competência para a progressão, propondo que muitas dessas condições de desenvolvimento cancerígeno, não fazem parte de uma continuidade de modificações que antecedem o processo maligno (AL-NAFUSSI; COLQUHOUN, 1990; KIVIAT; KOUSTY, 1993). Por conseguinte, existe a necessidade de realizar investigações com o intuito de expor o “porquê” de grande parte das lesões em fase inicial prosseguirem para o câncer (GÓIS SPECK *et al.,* 2015).

A conduta clínica para as pacientes com diagnóstico de NIC I é, assim, um dos grandes desafios para a cura do câncer uterino, sendo de extrema importância a escolha do tratamento a ser empregado, onde deve haver o diagnóstico precoce das lesões com capacidade para progressão ou regressão (AU; SIERRA-TORRES; TYRING, 2003).

2.2 O Câncer de Colo Uterino

Entre os principais fatores relacionados ao desenvolvimento do câncer de colo de útero estão as relacionadas ao fator genético (5% dos casos) (hereditariedade), e aqueles relacionados a fatores externos (95 % dos casos), como a contaminação por Human Papilomavirus (HPV), nível socioeconômico, hábitos alimentares, estilo de vida e cultura. O Quadro 1.2 apresenta os fatores endógenos e exógenos que são mutegênicos e podem contribuir com o desenvolvimento do câncer (RIBEIRO; SALVATORI; MARQUES, 2003; 2015).

Entre os fatores exógenos, as exposições ambientais do início da vida, também desempenham um papel importante no desenvolvimento da doença (SPENCE, 2001; ALMEIDA *et al.,* 2005; WORLD CANCER RESEARCH FUND, AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESERCH, 2007; MERLO *et.al*., 2014). Sendo assim, compreende-se por ambiente o local em geral (água, terra e ar), o entorno ocupacional (em se tratando de fator insalubre), o habitat social e cultural (estilo e hábitos de vida) e os hábitos de consumo de (alimentos, fármacos). Essas

alterações desenvolvidas pelo homem podem caracterizar os diversos tipos de câncer (ALMEIDA *et al.,* 2005; CAMPOS *et al.,* 2008; ANJOS *et al.,* 2013).

Além disso, há fatores de riscos que estão diretamente ligados ao início e desenvolvimento do câncer de colo uterino, são: o início precoce as relações sexuais e seus maus hábitos de higiene, muitos partos e abortos, o uso de contraceptivos hormonais por tempo prolongado, baixa condição econômica, o uso de álcool e o hábito de fumar (que está diretamente ligado ao número de cigarros fumados e essa taxa se eleva quando o hábito de fumar se inicia em idade precoce) (FRIGO; OLIVEIRA ZAMBARDA, 2015; MELO *et al.,* 2016).

Figura 1.2 - Agentes mutagênicos que comumente as pessoas estão expostas.

Tipo		**Exemplos**
ENDÓGENOS		Óxido nítrico Radicais livres de oxigênio Formação de nitrosaminas endógenas
EXÓGENOS	Ocupacional	Produtos petroquímicos Produção de energia nuclear Produção de ferro e aço
	Dieta	Mutágenos naturais presentes na dieta Mutágenos gerados durante o cozimento de alimentos Mutágenos gerados no processo de preservação de alimentos
	Radiação	Exposição médica – Raios X para diagnóstico e radioterapia Exposição a lixo nuclear
	Poluição	Efluentes industriais Subprodutos da cloração da água Emissões por motores de veículos Pesticidas usados na agricultura Incineração de lixo
	Biológico	Mutágenos originados de infecção crônica por vírus, bactérias ou parasitas.

FONTE: RIBEIRO, SALVATORI, MARQUES, 2003.

Entre os fatores exógenos biológicos, a infecção pelo vírus HPV tem destaque por ser responsável pela maioria dos casos relatados de câncer de útero. O HPV é um vírus com capacidade de contágio da pele e das mucosas. Existem em uma variedade de mais de 150 tipos diferentes, porém, cerca de, 40 tipos são passíveis de contaminação do trato reto-genital (INCA, 2016).

Esses vírus podem ser contraídos, em 99% dos casos, por via de relação sexual, e a infecção é agravada quando situações em que há o contato precoce com as atividades sexuais, a multiplicidade de parceiros e a falta de maturidade são observadas. Isso confirma que o comportamento sexual é um fator de primordial importância na contaminação do vírus ou mais de um vírus do HPV (BICCA *et al.,* 2013; AGUIAR *et al.,* 2014; MELO *et al.,* 2016).

A faixa etária de contaminação pelo HPV é cada vez mais baixa, entre 20 e 39 anos, mas também dependerá da região geográfica em que se encontra o indivíduo (BICCA *et al.,* 2013). Outro fator importante é a contaminação por outros agentes infecciosos tais como (HIV, Clamídia e Herpes) e os polimorfismos genéticos, os quais constituem uma eminente condição para o desenvolvimento de transformação maligna no epitélio cervical, aumentando o risco da alteração de uma infecção por HPV para o câncer cervical (CASTELLSAGUÉ; BOSCH; MUÑOZ, 2002; MASCARELLO *et al.,* 2012).

O HPV é considerado de “alto risco” para neoplasias. Em especial os subtipos do vírus oncogênicos do HPV 16 e HPV 18, são apontados como um dos fatores de riscos para o desenvolvimento do câncer de colo uterino e o mais popularmente relatado, sendo frequentemente encontrado em cerca de 99,7% dos casos confirmados de neoplasia uterina. Entretanto grande parte das mulheres contaminadas pelo HPV não desenvolverão a doença (SOUTO; FALHARI; CRUZ, 2005; BERNARD, 2005; MENDES *et al.,* 2008; MONTEIRO SANTOS *et al.,* 2015; OLIVEIRA *et al.,* 2015).

Ao que tudo indica, as variações pré-neoplásicas e neoplásicas são desenvolvidas por sua ação direta nas células de base do tecido pluriestratificado, influenciando na atividade celular, facilitando modificações numéricas e estruturais dos cromossomos (PINTO; TÚLIO; CRUZ; 2002; MENDES *et al.,* 2008). Sendo assim, a contaminação pelo HPV é considerada necessária, mas não o bastante

para a progressão do câncer cervical, haja vista que, é considerável o número aumentado de mulheres infectadas que não desenvolvem a doença, sendo necessários outros indutores para o desenvolvimento do câncer (INCA, 2015).

A identificação precoce, pela realização do exame citológico de Papanicolau, tem se mostrado uma estratégia eficaz e segura. Contudo, por volta do ano 2000, foram disponibilizadas a população as vacinas preventivas contra o HPV para alguns subtipos do vírus (JEMAL *et al.,* 2011; SOUSA *et al.,* 2016), com o intuito de modificar as estatísticas de incidência e mortalidade deste tipo de câncer (INCA, 2000; MELO *et al.,* 2009; GÓIS SPECK *et al.,* 2015; SOUSA *et al.,* 2016).

Pesquisas mostram que, pacientes com menor renda familiar tem prevalência do HPV quando comparadas às de maior renda (BICCA *et al.,* 2013; PRADO, 2014).

Segundo Smith e colaboradores (2003), outro importante fator são os contraceptivos hormonais utilizados por longos períodos, em geral são responsáveis por atuarem diretamente na transcrição do genoma do HPV em mulheres com diagnóstico de HPV positivo. Os níveis aumentados de progesterona e estradiol na mulher podem induzir a uma predisposição a modificações ou proporcionar o crescimento tumoral diretamente ligado ao HPV (COLLABORATIVE GROUP ON EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF OVARIAN CANCER *et al.,* 2015)

Segundo Teixeira, (2015) outra condição favorável ao desenvolvimento de câncer é o hábito de fumar. O consumo de cigarro propicia a exposição direta do DNA de células epiteliais a substâncias cancerígenas, à nicotina e cotinina, ou através das reações com os produtos metabólicos do fumo, pois o fumo industrializado possuí um grande número de substâncias clastogênicas complexas, exercendo forte influência na iniciação, como na promoção e progressão do tumor (ANJOS *et al.,* 2013).

A desigualdade socioeconômica mostra-se como um considerável prejuízo para as mulheres assistidas no Sistema Único de Saúde - SUS em relação às mulheres que são assistidas no sistema privado (CAMPOS *et al.,* 2008; ANJOS *et al.,* 2013; TEIXEIRA, 2015).

2.3 Diagnóstico do Câncer de Colo Uterino

Em 1943, George Papanicolau propôs a utilização do exame de citologia, que leva o seu nome, Papanicolau, para o diagnóstico de câncer na região cervical. Este exame se baseia no esfregaço ou raspado de células esfoliadas do epitélio cervical e vaginal e sua coloração, que serve para a identificação e a prevenção do câncer de colo uterino, de forma que, eram analisadas as modificações das células das regiões cérvix e vagina, quando da possibilidade de qualquer tipo de doença e alterações exposta nos diferentes momentos do ciclo menstrual, o que por muito facilitou a identificação e o diagnóstico dessa doença (MAMMAS; SPANDIDOS, 2012; NICHOLAS, 2015).

Porém, em países em desenvolvimento, esses exames são realizados apenas por livre demanda, onde as pacientes procuram os serviços de saúde espontaneamente, consequentemente a aderência aos programas de prevenção é baixa. No Brasil, essa metodologia de identificação da doença chegou em meados dos anos 50, ainda assim, estima-se que cerca de 40% da população feminina brasileira ainda não tenham realizado o exame (FRIGATO; HOGA, 2003; MELO *et al.,* 2009; NORONHA *et al.,* 2005; INCA, 2014; SANTOS *et al.,* 2015).

Além do teste de Papanicolau, na atualidade são utilizados também outras formas complementares para a identificação cada vez mais precoce do câncer de colo uterino, tais como: citologia em meio líquido e os testes para detecção do HPV por captura híbrida (CAETANO *et al.*, 2006).

A citologia em meio líquido é uma técnica em que as células coletadas da cérvice são imersas em líquido conservante antes da fixação da lâmina, evitando assim, o ressecamento do material e reduzindo a quantidade de material gasto e obtendo menores taxas de exames insatisfatórios (CAETANO *et al.,* 2006).

Já no teste para detecção do HPV por captura híbrida, possibilita a identificação de 13 tipos de vírus sendo considerados de alta probabilidade para o desenvolvimento do câncer (subtipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68) e 5 tipos de vírus de menor risco oncogênico (6, 11, 42, 43 e 44), com uma facilidade de análise superior à do exame citopatológico convencional na identificação do câncer do colo do útero ou suas lesões precursoras possibilitando

ainda a auto coleta do material a ser analisado, minimizando assim, os tabus em relação ao exame ginecológico e facilitando a aderência e cobertura em regiões de difícil acesso (FLORES *et al.,* 2003; CAETANO *et al.,* 2006).

Apenas 30% das mulheres submetem-se regularmente ao exame citopatológico (Papanicolau) ou citologia oncológica (CO), exames estes que são os principais na estratégia de programas de rastreamento do câncer do colo do útero no mundo, sendo também recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil, em mulheres sexualmente ativas, de 25 a 64 anos (ANDRADE *et al.,* 2014; SOUSA *et al.,* 2016).

2.4 Tratamentos do Câncer de Colo Uterino

As possibilidades do tratamento são múltiplas e possuem meios de terapêuticas complementares ou possibilidades conjuntas às cirurgias não conservadoras. Porém, os tratamentos procuram se adequar em função da idade da mulher, estado geral de saúde, do quadro clínico, da especificidade do tumor e sua extensão (FRIGATO; HOGA, 2003; CAMPOS *et al.,* 2015).

Entre os principais tratamentos na atualidade, existem os procedimentos cirúrgicos, a quimioterapia e a radioterapia. Dentre os procedimentos cirúrgicos está a histerectomia total com anexectomia bilateral, em que consiste em uma das principais técnicas de tratamento, onde é realizada a retirada do tumor através de uma intervenção cirúrgica, da qual pode também ser necessária a prática da extração do útero e dos ovários (FRIGO; OLIVEIRA; ZAMBARDA, 2015; TSUNODA *et al.,* 2015; MINAEI *et al.,* 2016).

A quimioterapia é um tipo de tratamento que utiliza recursos terapêuticos sistêmicos antineoplásicos com o intuito de combater as células cancerígenas (FRIGO; OLIVEIRA; ZAMBARDA, 2015; TSUNODA *et al.,* 2015; MINAEI *et al.,* 2016).

E por fim, o tratamento radioterápico que utiliza a radiação ionizante, para combater as células cancerígenas. É uma das mais importantes modalidades não cirúrgicas no tratamento do câncer (CARVALHO, 2012). Cerca de 60% das pessoas

acometidas com algum tipo de câncer irão se submetem ao tratamento radioterápico. O objetivo principal da RT é erradicar e/ou minimizar tumores malignos por meio da irradiação de tecidos tumorais utilizando uma dose suficiente de radiação ionizante (RI) com danos mínimos aos tecidos normais adjacente (JORGE; SILVA, 2010; INCA, 2014; FRIGO; OLIVEIRA; ZAMBARDA, 2015).

A RT geralmente é indicada quando a dimensão do tumor é grande e não há indicação cirúrgica, a terapêutica é feita inicialmente, existindo assim a sua diminuição do tumor e possibilitando a intervenção cirúrgica.

Para o câncer de útero usualmente podem ser utilizados em três categorias de tratamento: a cirúrgica, a quimioterápica e a radioterápica. O protocolo escolhido será de acordo com as condições clínicas do paciente e do estadiamento do câncer. Para o tratamento no estádio 0, pré invasivo, ou I, microinvasivo, a indicação de tratamento é o cirúrgico. Nos estádios IB a IIA indica-se os tratamentos cirúrgicos e/ou radioterápico. No estádio IIB a IVA, é indicada principalmente a radioterapia e o estádio IVB indicados a quimioterapia e a radioterapia como tratamento paliativo. (SALVAJOLI; SOUHAMI; FARIA, 1999). A Tabela 1.1. apresenta os estádios do câncer de colo uterino e os seus respectivos tipos de tratamentos.

Tabela 1.2 - Tratamentos para o câncer de colo uterino

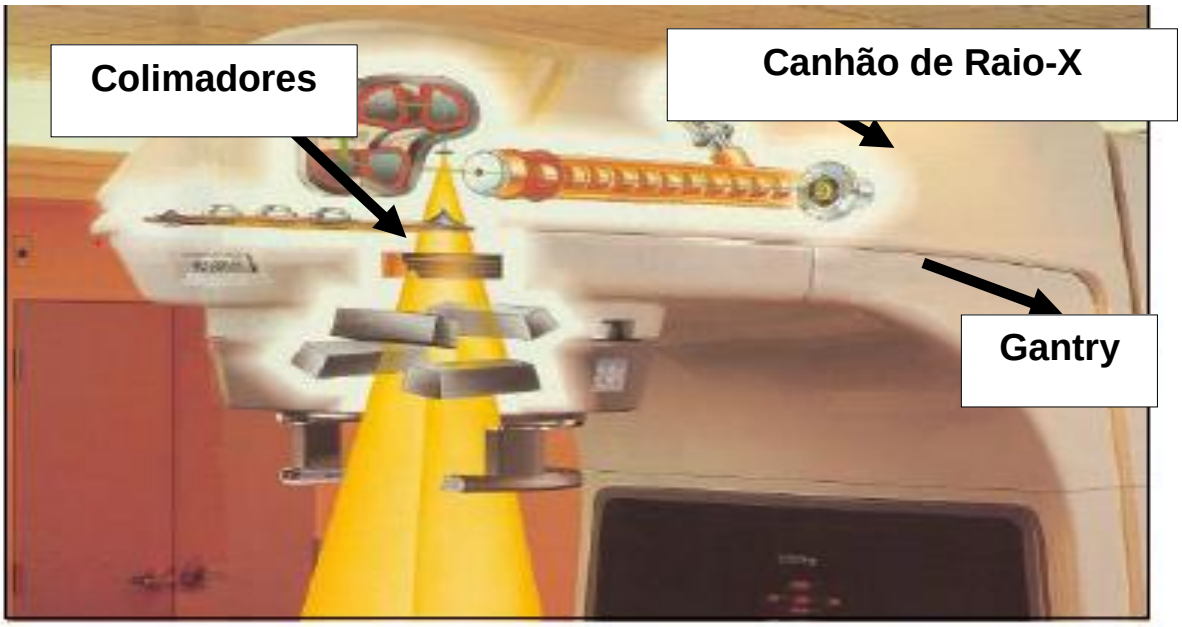
Estádio do Câncer	Tratamento Empregado
IB	1. Histerectomia Total + salpingo-oforectomia bilateral + Linfadenectomia pélvica e lomboaórtica; 2. Radioterapia (RT) + Quimioterapia (QT) (RT pélvica 45Gy + QT + Braquiterapia de Alta Taxa de Dose (HDR (4 x 6Gy ponto A))
IIA	1. RT + QT
IIB	1. RT + QT (RT pélvica 45Gy + QT + HDR
IIIA	1. RT + QT
IIIB/IVA	1. RT + QT + complementação parametrial
IVB	QT + RT paliativa

FONTE: NOVAES, 2016.

As modalidades de radioterapia são:

- **Teleterapia:** é uma modalidade de tratamento radioterápico conhecido como radioterapia a distância (teleterapia), como fonte de radiação ionizante são utilizados: aparelhos de fonte cobalto 60, aceleradores lineares, entre outras. Este tipo de tratamento as doses de radiação são administradas diariamente, por cinco dias semanais, com duração de tratamento por cinco a oito semanas a depender do protocolo estabelecido. Nesta prática, existente uma distância física segura entre o aparelho emissor da radiação e o paciente (SILVEIRA, 2013; NADER, 2014). A Figura 1.4 representa, de forma esquemática, uma imagem de uma parte de um acelerador linear utilizado na radioterapia. É possível observar o *gantry* onde se vê o "caminhão de raio-x e o colimador. O *gantry* pode realizar um movimento de rotação de 360^0, possibilitando que o colimador (por onde sairá o feixe radioativo) possa ser direcionado da melhor forma possível para o tratamento clínico.

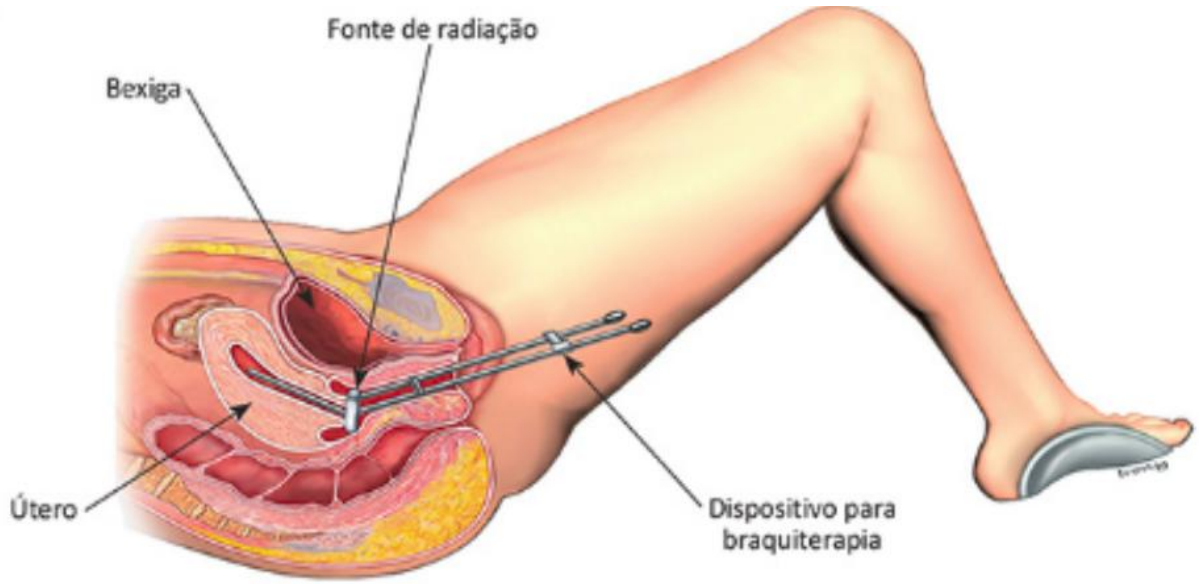
Figura 1.3 - Desenho de um acelerador em tratamento de teleterapia.



FONTE:THALHOFER, 2016.

- **Braquiterapia:** a fonte de irradiação tem contato direto com a região que precisa ser tratada seja diretamente no tumor ou em sua proximidade. Neste tipo de tratamento as fontes de radiação são inseridas na área tumoral (Figura 1.5)., (NADER, 2014). E, está terapêutica vem passando por aprimoramentos no que diz respeito ao tratamento e planejamento, no entanto ela só é indicada nos casos em que a paciente possuí contraindicações clínicas para a cirurgia (INCA, 2016).

Figura 1.4 - Desenho esquemático apresentando a os dispositivos para execução da braquiterapia.



FONTE: FIGURA ADAPTADA RETIRADA DA INTERNET: HTTP://WWW.VENCEROCANCER.ORG.BR, 2017.

- **Radiocirurgia estereotáxica**: consiste em uma terapêutica de dose única e alta de radiação ionizante, de modo que se use o acelerador linear com o propósito de acertar unicamente a extensão que interessa, minimizando a irradiação das regiões ao redor do tumor (JOAQUIM *et al.,* 2013).

- **Isoterapia:** que é administrada por via oral ou endovenosa, de isótopos radioativos, que por sua vez, são selecionados e absorvidos pelos tecidos tumorais (SILVEIRA, 2013).

A sua aplicação juntamente com o uso de aplicadores compatíveis e com recursos de imagens como a tomografia computadorizada (TC) e a ressonância magnética (RM) tem possibilitado a obtenção de imagens tridimensionais de toda a área pélvica com os aplicadores já devidamente posicionados para o tratamento. Essas imagens, em conjunto com os modernos *softwares* de planejamento, favorecem o delineamento do volume alvo e a análise do comportamento da dose de radiação nas estruturas sadias com alto grau de fidedignidade, ajudando, dessa forma, a otimização dos pontos e tempos de parada da fonte de radiação (SILVA *et al.,* 2014).

As doses de radiação ionizante utilizadas na teleterapia, preconizada na literatura e utilizada nas pacientes com câncer do colo do útero de Hospital do Câncer de Pernambuco, podem variar de: 45Gy, 550Gy à 54Gy na região ventral, com fracionamentos diários de: 25 x 1,8 Gy, 25 x 2Gy ou 28 x 1,8Gy respectivamente. No caso das pacientes submetidas à braquiterapia a dose diária é relativamente maior, com inserções semanais de 5,5Gy, 6Gy, 6,5Gy ou 7cGy (INCA, 2000; ZULIANI, *et al.,* 2010).

Ao interagir com o tecido vivo, a radiação ionizante depositará energia, ocasionando uma ionização e consequentemente uma instabilidade na célula, que poderá ocasionar danos nas moléculas envolvidas. Por exemplo, a radiação ionizante pode interagir com a molécula do DNA ocasionado danos, esta interação pode ocorrer de forma direta e/ou indireta. No mecanismo direto, a radiação interage diretamente com a molécula de DNA, podendo causar desde mutações genéticas até morte celular. No mecanismo indireto, a radiação ionizante promove alterações na molécula de DNA por meio de efeitos químicos, pela interação de produtos tóxicos e reativos com a molécula de DNA. Como exemplo de efeito indireto, tem-se a radiolíse da água, que ocorre quando a RI interage primeiramente com a molécula de água, formando assim radicais livres, elétrons, íons, peróxidos, que podem vir a danificar a molécula de DNA (NOUAILHETAS *et al.,* 2017). A Figura

1.6 apresenta de forma esquemática os efeitos direto e indireto da radiação ionizante na molécula do DNA.

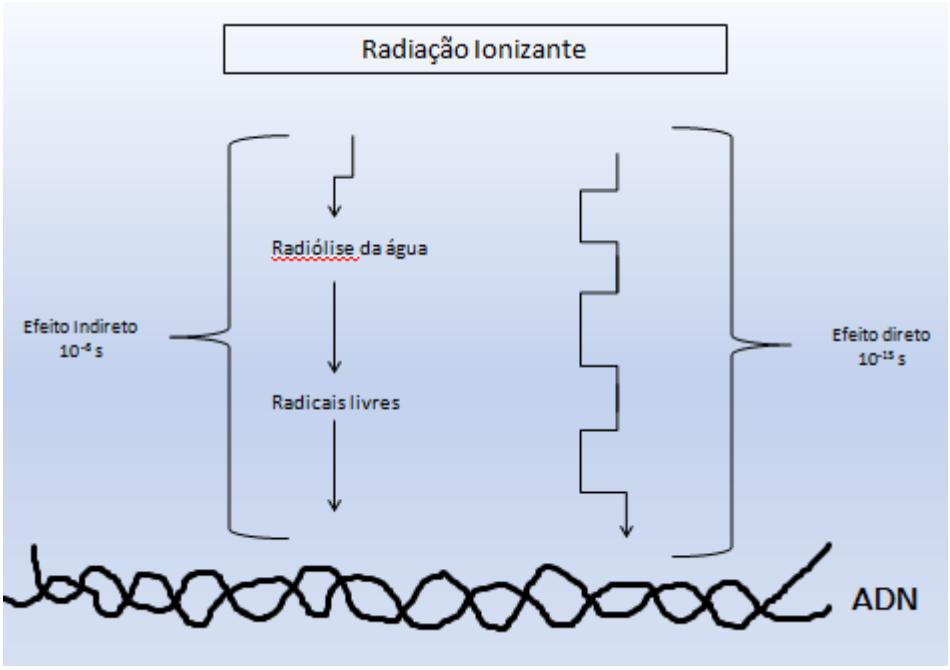
Portanto, as lesões na molécula do DNA, desempenham um papel importante entre os efeitos biológicos produzidos pela interação da RI. Os efeitos biológicos podem ser classificados de acordo com sua probabilidade de ocorrência (determinístico ou estocástico), conforme seu tempo de aparecimento (imediato ou tardio) e do ponto de vista biológico (somático e hereditário).

A gravidade e a frequência dos efeitos determinísticos variam de acordo com a dose de radiação, ocorrendo apenas quando o valor limiar da dose é excedido. São exemplos dos efeitos determinísticos: catarata, radiodermite, síndrome da radiação aguda. Já os efeitos estocásticos, a probabilidade de ocorrência aumenta com o aumento da dose de radiação. As leucemias são exemplos clássicos deste tipo de efeito.

Os efeitos biológicos são considerados imediatos quando surgem logo após a exposição à RI, já os tardios surgem meses ou anos após a exposição às radiações.

Do ponto de vista biológico, os efeitos somáticos ocorreram quando as células expostas são as responsáveis pela manutenção e funcionamento orgânico. Por outro lado, no hereditário as células atingidas pela radiação são as responsáveis pela transmissão genética do indivíduo.

Figura 1.5 – Efeitos indireto e direto produzidos pela exposição à radiação ionizante.



FONTE: PRÓPRIA AUTORA.

A gravidade das alterações celulares causadas pela interação da radiação com a célula varia em função dos diferentes tipos de radiação e dos diferentes graus de sensibilidade celular.

2.5 Radiossensibilidade

A radiossensibilidade individual pode ser descrita como sendo uma característica intrínseca do indivíduo, a qual é associada aos efeitos adversos exacerbados da RI sobre o corpo humano.

Diversos estudos propõem que o espectro de reações adversas que ocorrem no tecido normal, após a exposição às radiações ionizantes. Estes efeitos adversos radioinduzidos variam entre os indivíduos e possuem diferentes graus de gravidade. Estudos indicam uma base genética para o alto grau de variabilidade desses efeitos entre indivíduos, sugerindo que variantes genéticas comuns determinam a resposta individual às radiações ionizantes (KERNS; OSTRER; ROSENSTEIN, 2014). Novas tecnologias estão sendo empregadas no tratamento com radiação ionizante com o objetivo de reduzir a radiotoxicidade dos tecidos normais circunvizinhos ao tumor.

Apesar de melhorarem a eficiência terapêutica, cerca de 10% dos pacientes submetidos a RT ainda apresentam efeitos adversos graves, manifestados principalmente nos tecidos sadios. (BURNET *et al.,* 1992; 1996; CAVALCANTI *et al.,* 2008; CAVALCANTI *et al.,* 2011).

Existem diversos fatores que podem influenciar o grau de radiotoxicidade após o tratamento com radiações, tais como: fatores físicos (dose, taxa de dose e fracionamento da dose), fatores químicos (teor hídrico e oxigenação do tecido) e fatores biológicos (idade, tabagismo e coexistência de doenças como diabetes e hipertensão), os quais são utilizados atualmente como parâmetros no planejamento dosimétrico na RT. No entanto, cerca de 80% da variação das reações adversas entre os pacientes não pode ser explicada por tais fatores, estando provavelmente relacionada com as características genéticas dos indivíduos e, consequentemente, pode determinar a sua radiossensibilidade celular (BARNETT *et al.*, 2009; SILVA; CAVALCANTI; CARNEIRO, 2014).

A variabilidade na resposta individual quando da exposição às RIs – ou seja, os diferentes graus de radiossensibilidade – embora seja reconhecidamente um aspecto importante para a eficácia da RT, não possui indicador clínico ou laboratorial para definição de protocolos de tratamentos. Nesse sentido, pesquisas envolvendo alterações e/ou características genéticas vem ganhando espaço como potenciais biomarcadores de sensibilidade às RIs, a exemplo do micronúcleo.

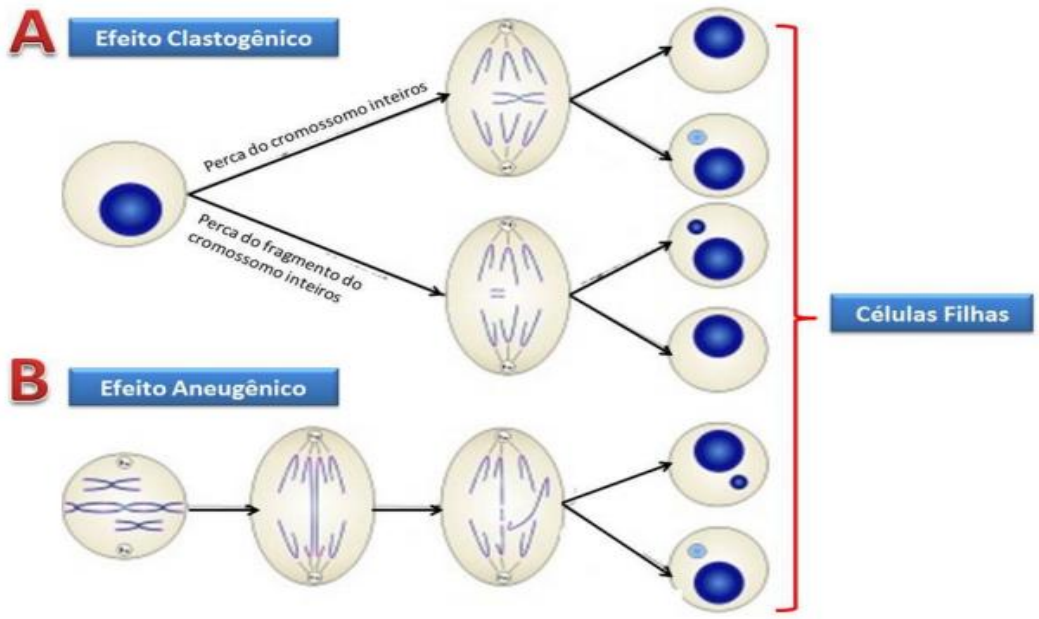
2.6 Micronúcleo (MN)

Fenech (2007), define o micronúcleo como o resultado de fragmentos cromossômicos acêntricos (sem centrômeros) ou de cromossomos inteiros que não completaram a migração anafásica da divisão celular.

A denominação dada é devido à morfologia e a composição do micronúcleo que que são idênticos ao núcleo da célula de origem. A origem do MN pode acontecer de forma espontânea, no entanto, sua maior frequência está associada a exposição das células a agentes clastogênicos e/ou aneugênicos (HEDDLE *et al*., 1983).

A ação aneugênica ocorre quando o agente genotóxico interage com o DNA ocasionado a perda de um cromossomo inteiro, normalmente este efeitos são observados nas células expostas a agentes químicos. Já a ação clastogêntica, ocorre quando o agente genotóxico interage com o DNA ocasionado a perda de uma parte do cromossomo, este sem o centrômero. Ações destes tipos, são observadas em células expostas às RIs. A Figura 1.7 apresenta, de forma esquemática, a formação de micronúcleo através do efeito clastogênico (A) e do efeito aneugêncio (B).

Figura 1.6 - Formação de micronúcleo através do efeito clastogênico (A) e do efeito aneugêncio (B).



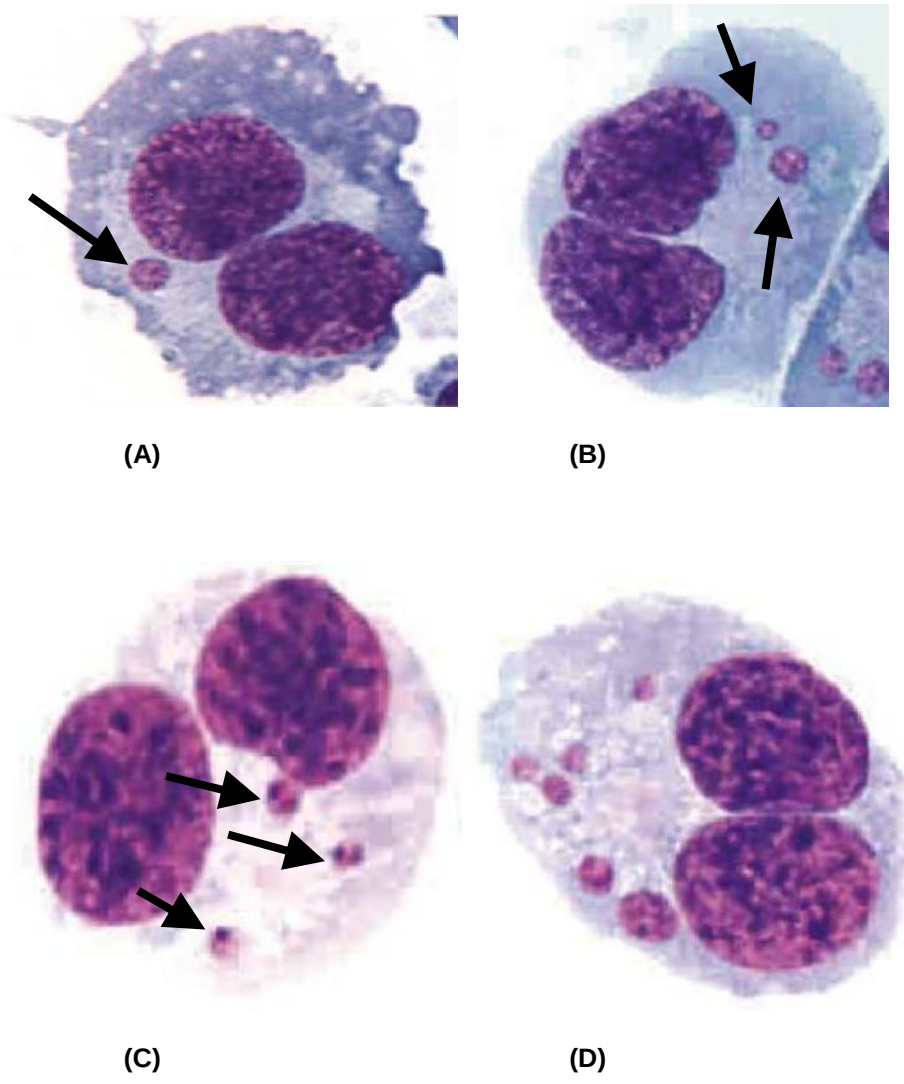
FONTE: FIGURA ADAPTADA RETIRADA DA INTERNET: HTTP://WWW.UAB.ES/IMATGE/242/472/MICRONUCLISIM.JPG

Os primeiros estudos com MNs foram realizados utilizando eritrócitos policromáticos de medula óssea de roedores (SCHMIDT, 1976), porém, com o desenvolvimento de novas tecnologias, foi estendido a eritrócitos circulantes (MAcGREGOR *et al.,* 1980).

Os MNs também podem ser identificados e analisados em outros segmentos celulares, a exemplo de hemácia madura, a qual já perdeu o seu material genético; reticulócitos que são as hemácias imaturas, a qual apresenta em seu interior RNA e

células esfoliativas epiteliais (FENECH, 2000). Na Figura 1.8 mostra células binucleadas que geraram 1, 2, 3 ou até mais MN. É possível observar que os MNs possuem a mesma coloração do núcleo de origem, não ultrapassam 1/3 do tamanho do núcleo e estão sempre dentro do perímetro citoplasmático.

Figura 1.7 - Linfócitos binucleados (A – com 1 MN, B – com 2 MN, C – com 3 MN e D – com Mais de 3 MN)



FONTE: FENECH, 2000.

A frequência MN em indivíduos é de 1 a 3 micronúcleos a cada 1000 células binucleadas analisadas (CARRARD *et al.,* 2007). No entanto, estudos apontam que

em linfócitos de sangue periférico esta frequência pode variar em até 36 MNs por 1000 células analisadas (IAEA, 2001, 2011).

O teste de MN é utilizado na biodosimetria, para informar se o indivíduo foi exposto ou não à radiação ionizante e para estimar a dose absorvida (PINTO, BAGGIO; GUEDES, 2005; CAVALCANTI, 2009; SHI; YONG-HUA *et al.,* 2015).

A frequência aumentada de MNs radioinduzidos pode ser um indicativo de radiossensibilidade podendo, portanto, ser um método empregado para predizer a radiossensibilidade individual (ENCHEVA *et al.,* 2012). A quantificação de MN é um método já bem estabelecido na literatura, de baixo custo, sensível, rápida, de fácil manipulação, e que pode ser aplicada em larga escala (FERNANDES, 2005; FRIEAUFF *et al.* 2013; CAMPOS *et al.,* 2008; AMBROISE; BALASUNDARAM; PHANSALKAR, 2013; ADAM *et al.,* 2015).

Segundo Heddle e colaboradores (1983), a utilização do teste de MN apresenta vantagens e algumas limitações, tais como:

Vantagens:

- A sua metodologia dispensa procedimentos elaborados, tornando-a de baixo custo, portanto, aplicável em grandes populações;
- São facilmente identificadas, com condições rápidas para a análise, além de ser menos complicado que outros testes;
- Podem ser visualizados em células interfásicas, não requerendo a identificação individual de cromossomos;
- A frequência espontânea é baixa;
- Permite a identificação de agentes clastogênicos e aneugênico (dependendo da técnica empregada, por exemplo as técnicas de hibridização *In situ* por fluorescência [Fluorescence in situ hibridisation (FISH)] e do bandeamento Cromossômico).

Limitações:

- O MN só é visualizado a partir da divisão da célula principal, sendo totalmente dependente desta ação;

- Há aberrações que possibilitam rearranjos cromossômicos sem a ocorrência de fragmentação de cromossomos dando origem a fragmentos acêntricos, por exemplo, translocações ou inversões, que não são identificadas, subestimando a frequência real com que ocorrem os danos;
- Apenas a partir da contagem de MN, é laborioso diferenciar os efeitos clastogênicos dos que tem como resultado a perda do cromossomo por lesão do fuso (HEDDLE, *et al.,* 1983).

Dentre as várias alterações celulares possíveis, a instabilidade dos cromossomos é resultante do excesso ou da redução do número desses cromossomos e/ou ainda pode ser causada pela falha na estrutura celular, o que engloba a quebra e o rearranjo cromossômico (BENDER *et al*., 1988). A continuidade deste processamento faz com que as anomalias hereditárias produzidas pelos clones defeituosos, resultem no acúmulo desses danos causando diminuição das enzimas metabólicas que combatem esses danos, o que aumenta na predisposição e suscetibilidade das células a agentes genotóxicos exógenos e/ou endógenos (LEHUCHER-MICHEL *et al.,* 1996; FERRAZ *et al.,* 2016).

A técnica de FISH é um dos métodos de visualização mais eficazes, o que reduz o risco de erros durante a análise e contagem, pois nele utilizam-se sondas específicas ligadas a substâncias fluorescentes, para marcação do material genético, porém ainda considerado com um elevado alto para ser empregado (BARBOSA, 2003; FERNANDES, 2009).

Esta instabilidade é um dos fatores de início de doenças entre elas o câncer. Um dos vieses para a detecção desta instabilidade é a quantificação da frequência das mudanças genéticas ocorridas após exposição a agentes mutagênicos e potencial para carcinogênese (BENDER *et al*., 1988).

Tais agentes não induzem novos tipos de aberrações, mas simplesmente aumentam a frequência das que ocorrem em baixos níveis, sem qualquer exposição, é considerado um procedimento que pode ser aplicado várias vezes, de forma rápida e com baixo custo econômico (FENECH; MORLEY, 1985; FENECH *et al.,* 1999; MENDES *et al.,* 2011).

Um considerável aspecto sobre o aparecimento dos MN é a correlação com os hábitos de vida dos indivíduos, por exemplo o consumo de cigarro, álcool e deficiência de nutrientes na alimentação, os quais podem induzir os danos genéticos (FENECH *et al.,* 1999).

Na literatura é possível encontrar uma correlação em uma variedade de resultados em estudos sobre o hábito de fumar e a frequência de micronúcleos em linfócitos do sangue periférico de fumantes. Um exemplo disso são os resultados apresentados em um dos estudos do projeto HUMN (BONASSI *et al.*, 2003).

3 FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS COMO INDICADOR DA RADIOSSENSIBILIDADE EM PACIENTES COM CÂNCER DE COLO UTERINO

Revista da Submissão: ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS

(Qualis CAPES B2)

FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS COMO INDICADOR DA RADIOSSENSIBILIDADE EM PACIENTES COM CÂNCER DE COLO UTERINO

Cátia Simone Ferreira da Silva[a]*, Mariana Brayner Cavalcanti[b], Ademir Amaral[b], Edvane Borges da Silva[a,b],

[a] **Centro Acadêmico de Vitória**

Universidade Federal de Pernambuco, Rua Alto do Reservatório, S/N, Vitória de Santo Antão, PE – Brasil, Postal code: 55608-680

[b] **Laboratório de Modelagem e Biodosimetria Aplicada (LAMBDA)**

Departamento de Energia Nuclear

Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Luiz Freire, 1000, Cidade Universitária, PE – Brasil, Código Postal: 50740-540

Palavras-chave: Neoplasia Intraepitelial Cervical, Radiação ionizante, Radioterapia, Irradiação in vitro, Indicador citogenético.

Micronúcleo e radiossensibilidade

Academy section: Biomedical Science

Autor Correspondente:
Cátia Simone Ferreira da Silva
Rua Alto do Reservatório, S/N, Vitória de Santo Antão, PE – Brasil, Código Postal 55608-680
Fone: +55 (81) 9946-5120
E-mail: catiasimonefs@gmail.com

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar se a frequência de micronúcleo pode ser usada como indicador da radiossensibilidade de pacientes submetidas ao tratamento radioterápico para o câncer de colo de útero. Para tal, foram coletados 9 mL de sangue periférico de 10 mulheres diagnosticadas com câncer de colo uterino e com indicação de tratamento radioterápico. Foi realizada a irradiação das amostras sanguíneas, *in vitro*, antes do início do tratamento com uma dose 2 Gy, em seguida realizada cultura de linfócitos com bloqueio da citocinese e posterior processamento para confecção de lâminas. A análise de Micronúcleo (MN) foi analisada em um número mínimo de 1000 células linfocitárias binucleadas. A descrição dos sintomas clínicos e epidemiológicos foi relatada pelas pacientes, antes e após o tratamento radioterápico, e, para os sintomas considerados, a saber, enjoos, diarreia, vômitos, feridas cutâneas, queimaduras e fístulas, foi adotada uma escala de 0 a 5, sendo o 0 (zero) considerado quando não foram relatados sintomas e 5 para o sintoma mais grave. Com isso, foi possível verificar uma forte correlação positiva ($r = 0,7614$, p-valor = 0,0105) da frequência de micronúcleos (FMN) com os efeitos adversos sistêmicos na região genital descritos pelas pacientes após o tratamento com a radiação ionizante. Como esperado, as frequências de MN nas amostras irradiadas foram maiores que as dos grupos controle ($0,0078 \pm 0,0022$ e $0,0038 \pm 0,0016$, respectivamente), o que foi confirmado pela análise estatística, a qual mostrou haver diferença significativa entre as amostras controle e as irradiadas (p-valor $< 0,0001$) ao nível de 5% de significância. Também foi possível observar uma forte correlação positiva entre os micronúcleos obtidos antes e após a irradiação ($r = 0,8974$, p-valor = 0,0004). Os resultados obtidos sugerem que a frequência de micronúcleo pode ser utilizada como teste preditivo para identificar a ocorrência de efeitos adversos na região genital em pacientes portadoras de câncer de colo de útero que serão submetidas ao tratamento radioterápico.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate whether the micronucleus frequency can be used as an indicator of the radiosensitivity of patients undergoing radiotherapy for cervical cancer. For this, 9 mL of peripheral blood were collected from 10 women diagnosed with cervical cancer and indicated for radiotherapy treatment. In vitro blood samples were irradiated prior to the start of treatment with a dose of 2 Gy, followed by culture of lymphocytes with cytokinesis block and subsequent processing for the preparation of slides. Micronucleus (MN) analysis was analyzed in a minimum of 1000 binucleated lymphocyte cells. A description of clinical and epidemiological symptoms was reported by patients before and after radiotherapy using a questionnaire, where it was possible to verify a positive correlation (r = 0,7762, p-valor = 0,0083) of the frequency of micronuclei (FMN) with the systemic adverse effects in the genital region described by the patients after treatment with ionizing radiation. In addition, the MN frequency in the irradiated samples was much higher than in the control group with a mean of 6 - 13.5 MN, whereas in the control group it presented a mean of 1 - 7.5 MN. The results suggest that the micronucleus frequency can be used as a predictive test to identify tissue radiosensitivity in patients with cervical cancer.

INTRODUÇÃO

Câncer é um termo genérico utilizado para designar um conjunto de mais de 100 doenças diferentes que possuem um crescimento celular desordenado. Atualmente é um problema de saúde pública sendo umas das principais causas de morte e morbidade em todo o mundo, especialmente em países em desenvolvimento (SALIMENA *et al*., 2014). O câncer de colo de útero é responsável pela terceira causa de mortes em mulheres no Brasil, com estimativas de 16 mil casos a cada 100 mil mulheres no ano de 2016, em Pernambuco estudos apontam que anualmente ocorrem cerca de mais de 2 mil casos novos para cada 100.000

mulheres (INCA, 2015). Entre as principais causas desta neoplasia está a exposição ao Human Papilomavírus (HPV) (AGUIAR *et al.,* 2014; MELO *et al*., 2016).

A Radioterapia (RT) é uma das mais importantes modalidades não cirúrgicas no tratamento do câncer. No entanto, a eficácia do tratamento é limitada devido aos efeitos adversos exacerbados que surgem nos tecidos normais, circunvizinhos ao tumor, após a exposição à radiação.

Estes efeitos estão relacionados com o parâmento da radiossensibilidade individual e que, por falta de técnicas, não são previstos antes do início do tratamento. Portanto, fica clara a importância de medidas de precaução que possam ser utilizadas visando avaliar a radiossensibilidade intrínseca de cada paciente em tratamento radioterápico, objetivando otimizar os resultados pretendidos e servindo como medida de prevenção aos efeitos adversos durante e após a terapêutica com radiação ionizante, o que pode se mostrar altamente benéfico ao paciente. Um biomarcador bastante utilizado para identificação de genotoxicidade provocada por agentes físicos, químicos e biológicos, é o teste de micronúcleo (KIRSCH-VOLDERS *et al.* 2003).

Com base no exposto acima, o presente trabalho propõe avaliar se existe correlação entre a frequência de micronúcleo de amostras de sangues irradiadas in vitro com as respostas clínicas apresentadas pelas pacientes após o tratamento radioterápico.

MATERIAL E MÉTODOS

População estudada e aspectos éticos

O estudo realizado foi do tipo experimental ou ensaio clínico não randomizado, iniciado após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco sob parecer de número 1.737.624. Antes do início do experimento, todos os indivíduos assinaram o Termo de Consentimento Livre e

Esclarecido (TCLE). Após a assinatura do TCLE, os indivíduos responderam a um questionário com dados epidemiológicos e clínicos, sendo também, consultado o prontuário da voluntária paciente para complementar as respostas do questionário, bem como, coletadas amostras de sangue por punção venosa.

O presente estudo incluiu mulheres com diagnóstico histopatológico de câncer de colo uterino com indicação para tratamento radioterápico contra o câncer, que foram atendidas em serviço especializado no Centro de Radioterapia de Pernambuco – CERAPE, do Hospital do Câncer de Pernambuco, e que atenderam aos critérios de inclusão, sendo eles: pacientes que assinaram o TCLE, maiores de 18 anos, diagnosticadas com câncer de colo de útero, que não estivessem realizando quimioterapia, e que não tivessem sido expostas à radiação ionizante nos últimos três meses contados da data de início da radioterapia.

Coleta e irradiação das amostras

Amostras de sangue periférico (9 mL por indivíduo) foram coletadas de pacientes voluntárias (N = 10), utilizando coletor (seringa) para sangue e tubo contendo heparina sódica, como anticoagulante.

A coleta da amostra de sangue foi realizada no momento da consulta da paciente, antes do início do tratamento radioterápico. Parte dessa amostra foi utilizada como grupo controle e a outra parte da amostra foi separada em seringas, para a irradiação *in vitro*. As seringas foram acondicionadas em um fantoma, construído com um material de densidade semelhante à do tecido mole humano (ρ = 1,0 g/cm^3). Este aparato foi levado a um acelerador linear (Siemens/ Modelo Primus), pertencente ao Instituto Materno Infantil de Pernambuco – IMIP, para serem irradiadas com raios-X de energia de 6 MeV, por 2 minutos, em dose total de 200 cGy, além disso, no tratamento com a radiação ionizante externa (teleterapia) das voluntárias foi empregada a técnica "Caixa", que se trata da aplicação de um feixe de luz visível em um campo quadrado que delimita o local (campo de irradiação). Este campo inclui

inevitavelmente 2/3 da vagina, 50% da bexiga, atingindo o segmento do reto e partes do intestino delgado (CABRAL, 2015), sendo empregado o mesmo maquinário, porém, as pacientes foram irradiadas no Centro de Radioterapia de Pernambuco (CERAPE).

Após a irradiação i*n vitro,* as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Modelagem e Biodosimetria Aplicada (LAMBDA/GERAR), para a realização do cultivo celular e confecção de lâminas para visualização e análise dos micronúcleos.

Cultivo celular

O cultivo celular para o ensaio de micronúcleos seguiu o método descrito por Fenech (1985, 2007) e adaptado pela Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA), (2011). Foram utilizados 4 mL de meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 20% (1 mL) de soro fetal bovino e 2% (0,1 mL) de fitohemaglutinina, para estimular a divisão celular. Em seguida, foram adicionados 0,4 mL de sangue total. A cultura foi incubada em estufa de CO_2 (5%) a 37° C por 72 horas. Após transcorridas 44 horas de incubação, foram adicionados 0,2 mL à cultura citocalasina B, numa concentração final de 5 pg/mL, para a obtenção de células linfocitárias binucleadas (FENECH, 2007).

Retirada da cultura

Após completar 72 horas de incubação da cultura de linfócitos, o material foi transferido para um tubo afunilado para ser centrifugado a 300 g por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado, sendo realizada a lavagem do sedimento com 7 mL de solução de NaCl (0,9%) gelado para haver o choque hipotônico dessas células, sedo capaz de provocar a lise da membrana plasmática dos linfócitos e desprezar o citoplasma, facilitando a obtenção de uma suspensão nuclear e em seguida foi realizada imediatamente a centrifugação. Em seguida, foi adicionado 1 mL de fixador delicadamente, que consiste em metanol e ácido acético na proporção de 3:1. O material passou por algumas centrifugações até que o

sobrenadante estivesse visivelmente límpido. As células foram ressuspendidas com cerca de 1 mL do fixador.

Preparo das lâminas

Para o preparo das lâminas, foram gotejadas de 50 mililitros da suspensão de células por lâmina devidamente identificadas e as mesmas foram coradas com Giemsa. A lâmina corada foi analisada ao microscópio óptico na objetiva de aumento de 20X, percorrendo a lâmina para a observação de células binucleadas, sendo quantificadas 1000 células binucleadas de cada indivíduo (FENECH, 2007), em um total de células binucleadas analisadas de 54677 células binucleadas. As análises dos micronúcleos ocorreram em objetiva de aumento de 100X, em um microscópio óptico modelo E 100, marca NIKON. A captura das imagens foi realizada por meio de câmera 13 megapixels do aparelho Lenovo vibe K5.

Aplicação do questionário clínico e epidemiológico

Antes e ao final do tratamento radioterápico, no momento de suas consultas, as pacientes voluntárias responderam o questionário clínico e epidemiológico, elaborado especificamente para o presente trabalho. Os dados clínicos e os dados laboratoriais foram coletados através de questionário, anamnese clínica, bem como, a consulta ao prontuário das pacientes para complementação dos questionamentos.

Análise estatística

As variáveis qualitativas foram expressas por frequências absolutas e relativas, enquanto as variáveis quantitativas foram expressas por médias e desvio padrão. Para avaliar a normalidade dos dados obtidos, foi empregado o teste de D´Agostino (LUCAMBO, 2008). Para avaliar a correlação entre as frequências de micronúcleos e os efeitos adversos observados, foi utilizado o teste de Correlação de Pearson (MORETTIN, BUSSAB, 2010).

Para a comparação entre as frequências de micronúcleos, antes e após a irradiação, foi utilizado o teste t-Student. Para todas os testes, foi adotado o nível de significância de 5%, sendo as análises realizadas por meio do programa BioEstat, versão 5.0 (BRAGANÇA-PEREIRA, 1991).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total, foram avaliadas 10 voluntárias (identificadas por P1 a P10), com idades que variaram entre 23 a 78 anos. Com base nos dados obtidos a partir do questionário clínico e epidemiológico, foi constatado que ove voluntária que tiveram filho e apenas uma, relatou não ter filho. Com relação ao nível educacional, uma dessas mulheres, relatou ter cursado o ensino médio incompleto, oito delas, relataram ter o ensino fundamental incompleto e uma relatou ser analfabeta. Apenas quatro delas relataram uso de fumo e seis consumiam álcool. Oito delas foram diagnosticadas com o câncer há menos de seis meses e duas, com mais de seis meses. Quanto às características do câncer, de acordo com a International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) (CARVALHO *et al.,* 2016), foram identificadas sete pacientes em estádio IIIB, duas em IIB e uma mulher em estadiamento IB (NOWAKOWSKI *et al.,* 2016). Todas, relataram algum tipo de co-morbidade antes do tratamento, tais como: hipertensão, infecção urinária, diarréia e constipação conforme descrito em Tabela 1.

Todas as pacientes receberam radioterapia pélvica externa adjuvante através de uma máquina de acelerador linear no Centro de Radioterapia de Pernambuco (CERAPE) em alguns casos foi necessária à complementação com a braquiterapia. No total foi administrada dose total diária de 200 centigrays (cGy). O protocolo seguido de tratamento radioterápico, foi o da própria instituição de acordo com apresentação e a localização tumoral.

Tabela 1 - Frequência de pacientes, por características clínicas apresentadas, antes do tratamento radioterápico. (N = 10).

Características clínicas apresentadas pelas pacientes antes do tratamento	Frequência (%)
Tempo do diagnóstico	
<6 meses	80
>6 meses	20
Tabagismo	60
Câncer na família	50
Etilista	60
Infecção Urinária	20
Hipertensão	30

Os sinais clínicos foram relatados pelas mulheres, sendo essas guiadas pelas perguntas do questionário clínico e epidemiológico e essas respostas associadas com a frequência de micronúcleos das amostras controle e irradiadas das pacientes.

Além dos efeitos colaterais descritos outras reações adversas foram mencionadas, tais como: cólicas abdominais, avermelhamento na pele da vagina e coceira, sendo consideradas ocorrências frequentes. No exercício clínico é habitual encontrar pacientes que finalize o tratamento sem apresentar qualquer reação adversa, ou justifique algumas reações leves e/ou moderados - classificados como efeitos adversos.

Porém, houve um pequeno grupo de pacientes que necessitou da suspensão temporária do tratamento por ocorrência de efeitos adversos secundários agudos, subagudos e/ou crônicos, sem que exista diferenciação na terapêutica empregada que justifique tal manifestação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Sendo assim, nesses casos, o tratamento foi interrompido temporariamente em três pacientes. Tal descontinuidade se deveu ao fato das pacientes alegaram crise de ansiedade e por apresentarem efeitos adversos agudos (fistulas retovaginal). Por conseguinte, duas delas tiveram que receber uma dose menor que a preconizada na literatura para à teleterapia, por apresentarem reações secundárias agudas durante a exposição à radiação ionizante (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Das pacientes, três tiveram a necessidade de passar por procedimento cirúrgico para a retirada total do útero (histerectomia total), conjunto ao tratamento. Entretanto, duas relataram já ter passado por procedimento cirúrgico de histerectomia total previamente ao tratamento. Todas as pacientes fizeram quimioterapia concomitantemente à radioterapia e três dessas pacientes se submeteram à braquiterapia (P4, P7, P8) (Tabela 2).

No que se refere ao controle local da doença durante o tratamento, 80% delas não apresentaram qualquer tipo de evolução da doença após os primeiros dois meses e tiveram uma resposta satisfatória ao tratamento, no entanto, em duas dessas mulheres, houve constatação de persistência da doença e uma paciente evoluiu para óbito, após diagnóstico de metástase.

Tabela 2 – Esquema de dose e procedimentos após radioterapia, com evolução do tratamento recebido por cada voluntária avaliada.

Paciente	**Dose radioterápica total empregada**	**Resultado após tratamento radioterapia externa**	**Evolução**
P1	7920cGy	Quimioterapia	Internação por complicações pós tratamento
P2	700cGy	Quimioterapia	Alta casa
P3	6440cGy	Quimioterapia	Alta casa
P4	600cGy	Braquiterapia + quimioterapia	Óbito
P5	5040cGy	Quimioterapia	Internação por complicações pós tratamento
P6	5040cGy	Quimioterapia	Alta casa
P7	4500cGy	Braquiterapia + quimioterapia	Alta casa
P8	5040cGy	Braquiterapia + quimioterapia	Alta casa
P9	700cGy	Quimioterapia	Alta casa
P10	5040cGy	Quimioterapia	Alta casa

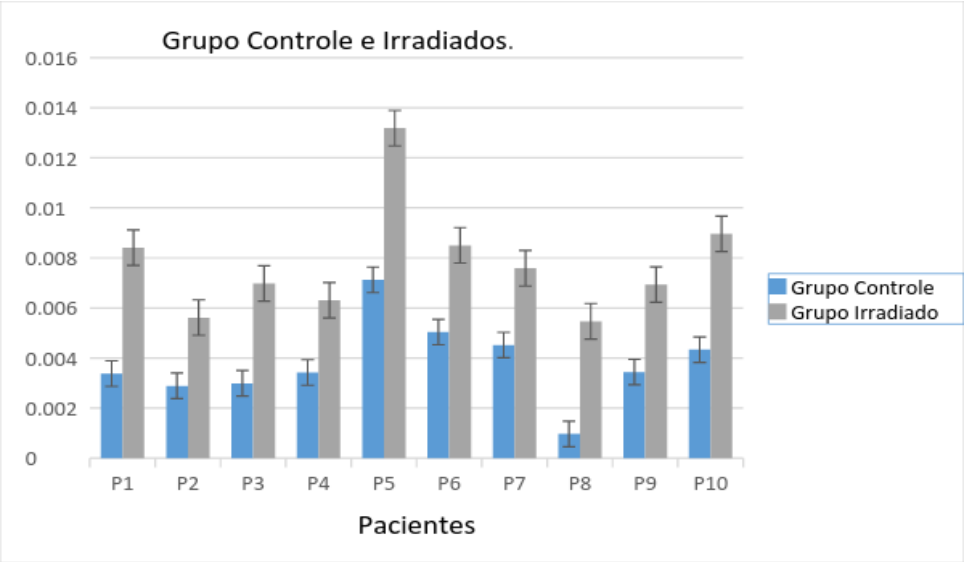
Foi realizada a quantificação de micronúcleos, nas amostras das pacientes em tratamento radioterápico, de acordo com o protocolo padrão da instituição (HCP). As frequências de micronúcleos variaram de 0,0009 a 0,0071 (média e desvio padrão de 0,0038 ±

0,0016), para as amostras não irradiadas (controles), e de 0,0055 a 0,0132 (0,0078 ± 0,0022), para as amostras irradiadas. Como esperado, as frequências de micronúcleos das amostras irradiadas foram maiores, o que foi confirmado pelo teste t-Student, o qual indicou que existe diferença significativa entre os valores (p-valor < 0,0001), ao nível de 5% de significância.

Fenech (2001, 2011), em seus mais diversos estudos afirma que a frequência de micronúcleos em linfócitos de sangue periférico de pessoas não expostas pode variar de 0,0008 a 0,0036 MN, valores esses que podem ser influenciados por hábitos de vida, ocupação, cultura e até mesmo pelas estações do ano. No entanto, Barbosa (2003) e Barbosa e colaboradores (2005), em seus estudos mostram que a frequência de MN em indivíduos não irradiados estão entre 0,0008 a 0,0013 MN. Sendo assim, o valor médio da frequência de MN encontrados para as amostras não irradiadas, no presente trabalho, mostra-se superior aos descritos nos estudos citados acima, o que já era esperado, uma vez que as pacientes avaliadas já estavam sendo sensibilizadas pelo quimioterápico cisplatina, ou seja, as células já vinham sofrendo com a ação aneugênica do fármaco (MIŠÍK *et al.*, 2016).

A Figura 1 apresenta as frequências de MN de células binucleadas linfocitárias, por doadora, de P1 a P10, sendo a amostra sanguínea subdividida em controle e irradiado. A análise estatística mostrou que houve uma forte correlação positiva entre as frequências de micronúcleo antes e após a irradiação (r = 0,8974; p-valor = 0,0004), indicando que, provavelmente, mesmo antes das amostras serem irradiadas, já é possível se prever a presença de efeitos adversos em pacientes que serão submetidas à radioterapia.

Figura 1 - Frequências de micronúcleos em amostras controle e irradiadas.



Para a análise da correlação entre frequência de micronúcleos e os sintomas apresentados, foi adotada uma classificação de identificação da gravidade dos sintomas, segundo os Critério de Escore para Morbidade Aguda por Radiação (CEMAR) do Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) (SILVEIRA,2013). Foram considerados 6 (seis) sintomas principais, sendo eles: enjoos, diarreia, vômitos, queimaduras (vermelhidão e bolhas), feridas cutâneas e fístulas. O Enjoo foi classificado como MUITO LEVE; Diarréia, LEVE; Vômitos e feridas cutâneas, MODERADO; Queimaduras (vermelhidão e bolhas), GRAVE; e Fístulas, GRAVÍSSIMO. Para a quantificação da gravidade desses sintomas, adotou-se uma escala de 0 a 5, onde: 0 – AUSÊNCIA DE SINTOMA; 1 – MUITO LEVE; 2 – LEVE; 3 – MODERADO; 4 – GRAVE; 5 – GRAVÍSSIMO. Após a identificação da presença de cada sintoma, por paciente, foi obtida uma média, referente à pontuação dos sintomas que a paciente apresentou (Tabela 3).

Tabela 3. Frequência de micronúcleo e média das pontuações dos sintomas apresentados pelas pacientes.

Pacientes	Estadiamento	Frequência de MN*		Sintomas relatados pelas pacientes**	Média de pontuação
		Não irradiados	Irradiados		
P01	IIB	0.0034	0.0084	Fístula reto-vaginal, feridas no perímetro irradiado e queimaduras	2.00
P02	III B	0.0029	0.0056	Dor no perímetro irradiado, anorexia e diarreia	0.71
P03	III B	0.0029	0.0069	Enjoos, anorexia, diarreia,	1.00
P04	III B	0.0034	0.0063	Vômitos, edema em membros inferiores, diarreia, dor no perímetro irradiado	0.83
P05	III B	0.0071	0.0132	Náuseas, diarreia, dor no perímetro irradiado, rubor, bolhas na pele e fístula retovaginal	2.33
P06	I B	0.0050	0.0085	Náuseas, diarreia, cefaleia, dor no perímetro irradiado, rubor, bolhas na pele e fístula retovaginal	2.33
P07	III B	0.0045	0.0076	Náuseas, diarreia, cefaleia, dor no perímetro irradiado, rubor e bolhas na pele	1.20
P08	III B	0.0009	0.0055	Dor no perímetro irradiado, náuseas e fraqueza muscular	0.33
P09	II B	0.0034	0.0069	Dor no perímetro irradiado, diarreia e enjoos	0.67
P10	III B	0.0043	0.0089	Bolhas, queimaduras, dor no perímetro irradiado e constipação	0.80

* Em 1000 células binucleadas de linfócitos

** Para a quantificação dos sintomas, foram considerados enjoos (pontuação: 1,0): diarreia (pontuação: 2,0); vômitos e feridas cutâneas (pontuação: 3,0), queimaduras (vermelhidão e bolhas) (pontuação: 4,0) e fístulas (pontuação 5,0), de acordo com o critério adotado.

A análise estatística para a determinação da correlação da frequência de micronúcleos e a presença dos sintomas mostrou que existe uma forte correlação positiva significativa, para amostras irradiadas ($r = 0,7614$; p-valor = 0,0105), e para as amostras não irradiadas ($r = 0,7896$; p-valor = 0,0066), o que vem confirmar a hipótese de que, mesmo antes de serem irradiadas, amostras coletadas de pacientes que se submeteram ao tratamento quimioterápico já podem ser utilizadas como bioindicador para o possível surgimento de reações adversas em pacientes que serão submetidas à radioterapia.

Quando os sintomas foram considerados de forma separada, foi observada uma correlação positiva moderada significativa para os sintomas queimaduras (r = 0,6228, p-valor = 0,0406), feridas e fístulas (r = 0,6263, p-valor = 0,0392, para cada sintoma). Para vômitos, enjoos e diarréia, não foram observadas correlações significativas.

O uso do teste de MN tem se mostrado um biomarcador importante na identificação de exposição humana a agentes mutagênicos e clastogênicos, além disso, têm sido cada vez mais sensíveis a baixas doses de exposição, incluindo o contato com substâncias químicas industrializadas, poluentes atmosféricos, incluindo a radiações ionizantes (VILANOVA *et al.*, 2015).

Plamadeala e colaboradores (2015), discorre sobre o projeto internacional envolvendo grupos, países e instituições, para juntos estudar a frequência de micronúcleo humano (HUMN), estudou grandes populações, com inúmeros fatores que poderiam influenciar os parâmetros citogenéticos. Este autor afirma ainda que, não existe a correlação da frequência de MN com efeitos letais para os pacientes exposto a radioterapia, o que difere do observado em nosso estudo. No entanto, é importante salientar que as análises realizadas pelos autores citados acima, foram realizadas utilizando amostras coletadas dos pacientes após o tratamento (FENECH, 2001, 2011). Já no presente estudo as amostras foram coletadas antes da submissão à radioterapia.

A quantificação de MN é uma técnica bem estabelecida, no entanto, para predizer a radiossensibilidade, o teste deverá empregado antes do início do tratamento (TUCKER *et al.*, 2013), o que ocorreu no presente trabalho.

Diversos motivos incentivam pesquisadores a investigar a associação de efeitos deletérios após a terapêutica com radiação ionizante em pacientes com câncer de útero, com os efeitos secundários à radiação, tais como efeitos gastrointestinais, geniturinários, entre

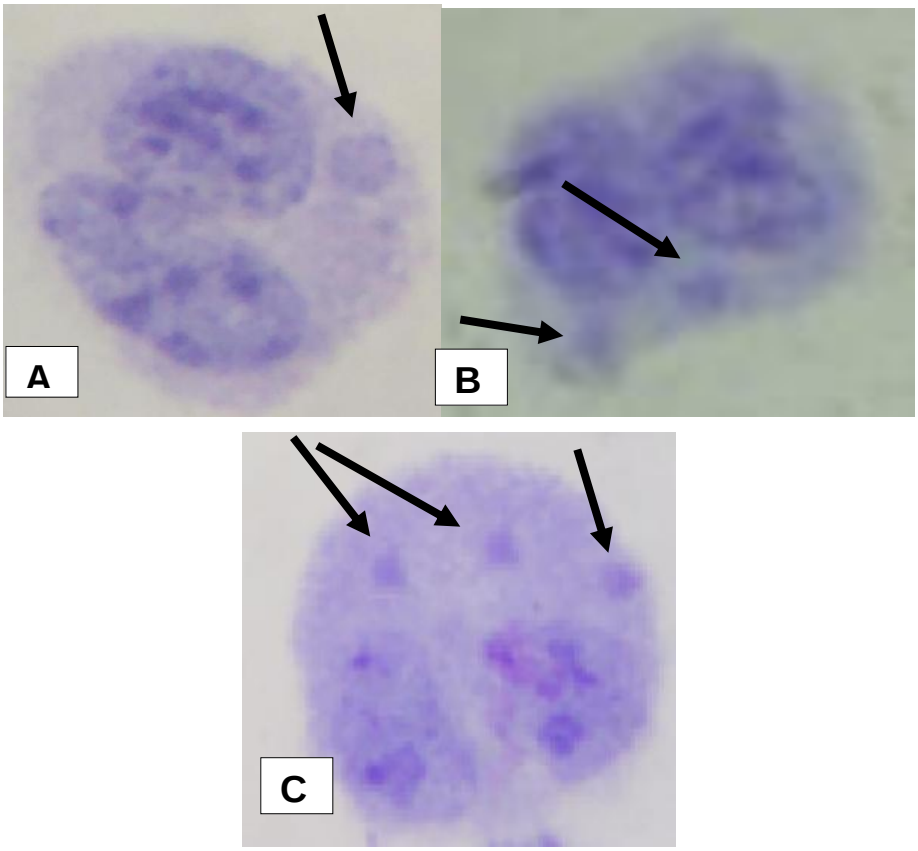
outros, pudessem ser minimizados, concebendo maior qualidade de vida a esses indivíduos (ENCHEVA *et al.*, 2012; VILANOVA *et al.*, 2015).

As voluntárias identificadas por P1, P5 e P6, apresentaram sinais e sintomas de algumas patologias como efeito colateral pós radioterapia, sendo caracterizadas como as voluntárias mais sensíveis à radiação ionizante. Foram descritos os efeitos: feridas na pele, queimaduras e fístula retovaginal. Esses efeitos foram descritos por Ferreira e colaboradores (2015) como a proliferação de tecido fibroso da endartéria e consequente oclusão vascular (endarterite obliterante progressiva), a qual causa a obstrução da vascularização local, o que resulta em necrose/ruptura das superfícies mucosas. Ainda segundo esses autores, cerca de 2% de todas as pacientes submetidas a essa terapêutica desenvolverão essas complicações em até 30 anos após o tratamento.

Na Figura 2 são apresentadas as células obtidas das amostras da voluntária P5, o que contribuiu para a confirmação da hipótese de que as frequências de MN podem estar relacionadas com a exacerbação do sinais e sintomas apresentados durante a radioterapia.

O principal resultado aqui obtido foi a correlação de frequência de MN com a sintomatologia adversa apresentada pelas pacientes, após o tratamento radioterápico (CAMPOS *et al.*, 2008). Alguns estudos mostram que o teste de MN é uma ótima possibilidade para o uso clínico de rotina. Porém, na maioria dos trabalhos, o ensaio do MN foi o mais estudado como um indicador do desenvolvimento de várias neoplasias malignas, tais como: câncer de cabeça e pescoço, mama, pulmão e útero (SCOTT *et al.*, 1999; ENCHEVA *et al.*, 2012).

Figura 2 - Células linfocitárias binucleadas apresentando respectivamente em A – 1 MN, B – 2 MN e C – 3 MN da paciente P5 (FONTE: Própria autora)



Mozdarani e colaboradores (2005), em seus estudos, afirmaram que mesmo existindo o efeito deletério da radiação, ele está intimamente relacionado ao tipo de câncer, o esquema de fracionamento e a dose aplicada.

Alguns estudos mostram que a variação nos valores de frequência de MN ocorre desde o grupo controle até as amostras irradiadas. Desta forma, o aparecimento de MN pode estar atribuído à exposição a agente genotóxico e a falha na capacidade de reparação do DNA (WIDEL *et al.*, 2003).

A exposição aos mais diversos agentes clastogênicos e/ou genotóxicos, tais como, poluentes e aos raios UV, são descritos como causadores de modificadores do DNA. No presente estudo, foi descartada a possibilidade de radioindução por UV, pois 100% das

mulheres estudadas tinham igual ou menor que 10 minutos de exposição diárias ao sol (DEMIRCIGIL *et al.*, 2014).

Por conseguinte, na irradiação aguda, é comum a presença de alguns efeitos adversos conforme a dose de radiação ionizante absorvida individualmente. São elas: náuseas, vômitos, diarreia e as radiodermites (síndrome cutânea da radiação) (PORTAS *et al.*, 2013). O tempo médio desses sintomas também está relacionado com a característica pessoal, por exemplo, em caso em que a irradiação ocorre em doses de 100 a 200 cGy, náuseas e vômitos aparecem dentro de um prazo de 6 horas após a exposição (AMARAL; FERNANDES; CAVALCANTI, 2008).

O presente estudo evidenciou que o aumento da frequência de MN tem uma correlação positiva entre o surgimento dos sintomas adversos. No entanto, divergindo dos resultados aqui obtidos, Encheva e colaboradores (2012), afirmam que o teste de MN não é capaz de identificar a sensibilidade à radiação ionizante, mas que, porém, existem diferenças após a exposição à 1,5 Gy na irradiação *in vitro*. No presente estudo também foi observado variações interindividuais entre as pacientes avaliadas; enquanto alguns pacientes apresentaram efeitos secundários e baixas frequências de micronúcleos, outras manifestaram sintomas significativos ou efeitos colaterais secundários, mesmo com alta frequência de micronúcleos.

Segundo Baeyens e colaboradores (2002), a idade e a ocorrência de câncer na família estão diretamente relacionadas com a quantidade de micronúcleos apresentado. No entanto, não foi observada correlação entre idade e frequência de micronúcleos para as amostras avaliadas no presente trabalho.

A literatura mostra que existe a necessidade de investir em alternativas tecnológicas para predizer as doses a serem prescritas durante o tratamento com radiação ionizante (MEDEIROS *et al.*, 2016). No entanto, os resultados aqui obtidos indicam que o teste de MN

pode ser um importante marcador de sensibilidade radioinduzidos se bem utilizado, podendo prevenir os efeitos adversos e a parada imprevista da terapêutica.

Como relatado por Carvalho (2012), os mecanismos de sensibilidade à radiação ainda não são claros, sendo em partes relatados por fatores clínicos envolvidos com os pacientes. Porém, Barnett e colaboradores (2009), afirmam que apenas de 5 a 10 % dos pacientes sofrem algum efeito adverso grave no tecido normal, o que diferiu dos resultados observados no presente estudo, onde foi observado que metade das pacientes avaliadas apresentaram algum tipo de efeito adverso tecidual (queimaduras, feridas e fístulas). Esta reação exacerbada nos tecidos mais sensíveis faz com que seja limitada a dosagem de radiação submetida para o indivíduo em tratamento. Além disso, a qualidade do equipamento de radioterapia envolvido, é algo que deve ser levado em conta pois, a sua acurácia deve ser avaliada periodicamente (INCA, 2000).

Para Fowler, Lindstrom (1992), enterite (diarreia e cólicas abdominais) é o efeito agudo mais habitual, ocorrendo em aproximadamente 70% das pacientes, na terceira semana de tratamento. Já os efeitos vesicais (disúria, urgência miccional), imediato à fase aguda da irradiação, ocorrem em cerca de 30% dos casos. Entre os efeitos tardios, as alterações gastrintestinais essas são os mais consideráveis, pois em um elevado número de pacientes, tornam-se permanente, afetando assim a qualidade de vida.

Outros efeitos, englobam retites e as cistites crônicas, além de, fístulas vésico-vaginais e reto-vaginais, e os quadros de enterite com os mais diversos graus de obstrução intestinal (NOVAES, 2016).

Os resultados obtidos no presente estudo revelaram que todas as pacientes avaliadas apresentaram elevados número de efeito adversos, de leves a gravíssimos, sendo os mais frequentes: enjoos, diarreia, vômitos, queimaduras, feridas e fístulas.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos sugerem que a frequência de micronúcleo pode ser utilizada como teste preditivo para identificar a ocorrência de efeitos adversos na região genital em pacientes portadoras de câncer de colo de útero que serão submetidas ao tratamento radioterápico.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos, a qual contribuiu a realização da pesquisa.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, L.N.R.; *et al.* Mulheres portadoras de HPV e vulnerabilidade sexual. In: Congresso Internacional da Rede Unida 11º. Interface (Botucatu) [online], supl. 3, 2014. Disponível em: <http://conferencias.redeunida.org.br/ocs/index.php/redeunida/RU11/paper/view/1380>. Acessado em: 17 jan. 2017.

AMARAL, A.; FERNANDES, T.S.; CAVALCANTI, M.B. Bioindicators in radiation protection. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. Curitiba, v. 51, n. SPE, p. 91 - 96, 2008.

BAEYENS, A. *et al.* Chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients with a known or putative genetic predisposition. **British journal of cancer**, London, v. 87, n. 12, p. 1379 - 1385, 2002.

BARBOSA, I.M.S.S. **Quantificação de micronúcleos em linfócitos de pacientes expostas à radiação gama para a avaliação da dose absorvida.** 2003. 89 f. Dissertação (Dissertação em Tecnologias Energéticas e Nucleares) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco. 2003.

BARBOSA, I.M.S.S.; *et al.* Dose assessment by quantification of chromosome aberrations and micronuclei in peripheral blood lymphocytes from patients exposed to gamma radiation. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 28, n. 3, p. 452 - 457, 2005.

BARNETT, G.C.; *et al.* Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype. **Nat Rev**., London, v. 9:p. 134 – 142, 2009.

BONASSI S.; *et al.* Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human Micronucleus project. **Mutation Research**, Amsterdan, v.543 p.155 – 166, 2003.

BRAGANÇA-PEREIRA, C.A. Teste estatístico para comparar proporções em problemas citogenéticos. In: RABELLO-GAY, M.N.; RODRIGUES, M.A.L.A.R.; MONTELEONE NETO, R. **Mutagênese, carcinogênese e teratogênese: Métodos e critérios de avaliação.** Sociedade Brasileira de Genética, São Paulo, p. 113 - 21, 1991.

CABRAL, M.O.M. **Desenvolvimento de um modelo computacional de exposição para uso em avaliações dosimétricas em gestantes.** Dissertação (Mestrado em tecnologias energéticas e nucleares), 2015. 93 f.. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 2015.

CAMPOS, L.M.F.R.*; et al.* Prevalência de micronúcleos em células esfoliativas do colo uterino de pacientes com fatores de risco para o câncer de colo uterino. **São Paulo Medical Journal**, São Paulo, v. 126, n. 6, p. 323 - 328, 2008.

CARVALHO, A.T.S. **O papel dos polimorfismos de genes da via de reparo com a radiotoxicidade em pacientes com câncer de cólo uterino**. 2012, 92 f. Dissertação (Mestrado em genética). Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiás, 2012.

CARVALHO, K.P.A.; *et a*l. **Estadiamento, genótipos de HPV e metilação do gene WIF1 em câncer do colo do útero: associações com o prognóstico e sobrevida.** 2016. 91 f. Dissertação (Mestrado em patologia tropical e saúde pública) Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2016.

MEDEIROS, C.; *et al.* Análise do conhecimento sobre radiações ionizantes e qualidade do equipamento de proteção individual em um hospital público. **Rev. de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 14, n. 2, p. 136 - 142, 2016.

MELO, T.F.V.; *et al.* Perfil epidemiológico de mulheres com HPV atendidas em uma unidade básica de saúde. **Rev. de Pesquisa: Cuidado é Fundamental Online**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 4, p. 5177 - 5183, 2016.

DEMIRCIGIL, G.Ç.; *et al.*Cytogenetic biomonitoring of primary school children exposed to air pollutants: micronuclei analysis of buccal epithelial cells. **Environmental Science and Pollution Research**, Berlin, v. 21, n. 2, p. 1197 - 1207, 2014.

ENCHEVA, E.; *et al.* Investigating micronucleus assay applicability for prediction of normal tissue intrinsic radiosensitivity in gynecological cancer patients. **Reports of Practical Oncology & Radiotherapy**, Netherlands, v. 17, n. 1, p. 24 - 31, 2012.

FENECH M.; MORLEY A.A., Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutat. Res.,** Amsterdam, v.147, n.1 - 2 p.29-36, 1985.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature protocols**, London, v. 2, n. 5, p. 1084 - 1104, 2007.

FERREIRA, D.M.; *et al.* Ressonância magnética da vagina: uma visão geral para os radiologistas, com enfoque na decisão clínica. **Radiol Bras**, São Paulo, v. 48, n. 4, p. 249 - 259, 2015.

FOWLER, J.F.; LINDSTROM, M.J. Loss of local control with prolongation in radiotherapy. **IntJ Radiat Oncol Biol Phys**., United States, v. 23, p. 457 – 467, 1992.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA). Cytogenetic dosimetry: Applications in preparedness for and response to radiation emergencies. **Scientific and Technical Publications**. Vienna, 2011.

KIRSCH-VOLDERS, M.; *et al.* Report from the in vitro micronucleus assay working group. **Environmental and molecular mutagenesis**, New York, v. 35, n. 3, p. 167 - 172, 2003.

LUCAMBIO, F. Diferentes testes para verificar normalidade de uma amostra aleatória. **Departamento de Estatística. Universidade Federal do Paraná. Curitiba/PR**, p. 81531 - 990, 2008. Disponível em: <http://docplayer.com.br/4269910-Diferentes-testes-para-verificar-normalidade-de-uma-amostra-aleatoria.html>. Acessado em: 17 jan. 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Biblioteca Virtual em Saúde (BVSMS). **Bases do Tratamento do Câncer**. Capítulo 6. Disponível em: <http//:ww.bvsms.saude.gov.br/ bvs/publicações/inca/ações _cap 6.pdf.>. Acessado em: 12 nov. 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer. **Curso para técnicos em radioterapia**. Rio de Janeiro, INCA, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde. **Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas em Oncologia/**Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde – Brasília, Ministério da Saúde, 2014.

MIŠÍK, M.; *et al.* Analyses of combined effects of cytostatic drugs on micronucleus formation in the Tradescantia. **Environmental Science and Pollution Research**, New York, v. 23, n. 15, p. 14762 - 14770, 2016.

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

MOZDARANI, H.; MANSOURI, Z.; HAERI, S.A. Cytogenetic radiosensitivity of g0-lymphocytes of breast and esophageal cancer patients as determined by micronucleus assay. **J Radiat Res.,** Tokyo, v. 46, n.1, p. 111 – 6, 2005.

NOVAES, E.R.S. **Câncer de Colo Uterino: Epidemiologia, Etiopatogenia, Diagnóstico e Estadiamento Clínico**. Capítulo 1. Disponível em: <http//:ww.inca.gov.br/pqrt/download/tec_int /int.pdf.>. Acessado em: 16 nov. 2016.

NOWAKOWSKI, A.; *et al.* Cervical Cancer Histology, Staging and Survival before and after Implementation of Organised Cervical Screening Programme in Poland. **PloS one**, São Francisco, v. 11, n. 5, p. e0155849, 2016.

OLIVEIRA, M.M.; et al. Estimativa de pessoas com diagnóstico de câncer no Brasil: dados da Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. **Rev. Bras. Epidemiol.,** São Paulo, v. 18, n. 2, p. 146 - 157, 2015.

PLAMADEALA, C.; WOJCIK, A.; CREANGA, D., Micronuclei versus Chromosomal Aberrations Induced by X-Ray in Radiosensitive Mammalian Cells. **Iranian journal of public health,** Teharan, v. 44, n. 3, p. 325, 2015.

PORTAS, M; *et al.* Biomarkers of chronic inflammatory reaction in patients with radiological burns (cutaneous radiation syndrome). **Rev. Bras. Queimaduras**, Limeira, v. 12, n. 1, p. 6 - 10, 2013.

SALIMENA, A.M.O.; *et al*. Mulheres portadoras de câncer de útero: percepção da assistência de enfermagem. **Rev. de Enf. do Centro-Oeste Mineiro,** Divinópolis, v. 4, n.1, 2014.

SCOTT, D.; BARBER, J.B.; SPREANDBOROUGH, A.R.; BURRIL, W.; ROBERT, S.A., Increased chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients: a comparison of two assays. **Int J Radiat Biol.,** London, p. 1 – 10, 1999.

SILVA, R.M.V.; *et al.* A atual situação da braquiterapia de alta taxa de dose em colo do útero realizada no Brasil. **Radiol Bras**., Rio de janeiro, v. 47, n. 3, p. 159 - 164 2014.

SILVEIRA, C.F. **Qualidade de vida e toxicidade aguda por radiação em pacientes com câncer de colo do útero, de endométrio e de mama submetidas à radioterapia**. 2013. 86 f. Dissertação (Mestrado em atenção à saúde) Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Minas Gerais, 2013.

TUCKER, J.D.; *et al.* Estimating the lowest detectable dose of ionizing radiation by the cytokinesis-block micronucleus assay. **Radiation research**, Tokyo, v. 180, n. 3, p. 284 - 291, 2013.

VILANOVA, L.B.; *et al.* Determinação da frequência de alterações citogenéticas, através do teste de micronúcleo, em células cervicais uterinas de pacientes portadoras de HPV. **Vittalle Rev. de Ciências da Saúde**, Rio Grande, v. 24, n. 1, p. 19 - 26, 2015.

WIDEL, M.; JEDRUS, S.; LUKASZCZYK, B.; RACZEK-ZWIERZYCKA, K.; SWIEMIAK, A. Radiation-induced micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes is correlated with normal tissue damage in patients with cervical carcinoma undergoing radiotherapy. **Radiat Res**., Tokyo, v. 159, n. J6, p. 713 – 21, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). World cancer report, 2014. Edited by Bernard W. Stewart and Christopher P. Wild. ISBN 978-92-832-0443-5. p. 632, Disponível em: < http://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014>. Acessado em: 22 jan. 2017.

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos sugerem que a frequência de micronúcleo pode ser utilizada como teste preditivo para identificar a ocorrência de efeitos adversos na região genital em pacientes portadoras de câncer de colo de útero que serão submetidas ao tratamento radioterápico.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, L.N.R.; *et al.* Mulheres portadoras de HPV e vulnerabilidade sexual. In: Congresso Internacional da Rede Unida 11º. Interface (Botucatu) [online], supl. 3, 2014. Disponível em: <http://conferencias.redeunida.org.br/ocs/index.php/redeunida/RU11/paper/view/1380>. Acessado em: 17 jan. 2017.

AIRES, G.M.A. **Avaliação da frequência de micronúcleos como marcador da progressão das neoplasias intraepiteliais cervicais.** 2008. 72f. Dissertação (mestrado em biotecnologia) Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, 2008.

ALMEIDA, LH.R.B.; PEREIRA, Y.B.A.S.; OLIVEIRA, T.A. Radioterapia: percepção de mulheres com câncer cérvico-uterino. **Rev Bras Enferm**, Brasília, v. 61, n. 4, p. 482 - 487, 2008.

ALMEIDA, V.L.; *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quím. Nova.**, São Paulo, v.28, n.1, p. 118-129, 2005.

AL-NAFUSSI, A. I.; COLQUHOUN, M. K. Mild cervical intraepithelial neoplasia (CIN 1): a histological overdiagnosis. **Histopathology**, [s.l], v. 17, n. 6, p. 557- 561, 1990.

AMARAL, A.; FERNANDES, T.S.; CAVALCANTI, M.B. Bioindicators in radiation protection. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 51, n. SPE, p. 91-96, p. 91- 96, 2008.

ANJOS, S.J.S.B.; *et al.* Risk factors for cancer of the cervix in women prisoners.**Rev. Bras. Enferm.**, Curitiba, v. 66, n. 4, p. 508-513, 2013.

AU, W.W.; SIERRA-TORRES, C.H.; TYRING, S.K. Acquired and genetic susceptibility to cervical cancer. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, Amsterdam, v. 544, Issue 2, p. 361 - 364, 2003.

BAEYENS, A.; *et al.* Chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients with a known or putative genetic predisposition. **British journal of cancer**, London, v. 87, n. 12, p. 1379 - 1385, 2002.

BAR-AM, A.; *et al.* Combined colposcopy, loop conization, and laser vaporization reduces recurrent abnormal cytology and residual disease in cervical dysplasia **Gynecologic oncology,** New York, v. 78, n. 1, p. 47 - 51, 2000.

BARBOSA, I.M.S.S. **Quantificação de micronúcleos em linfócitos de pacientes expostas à radiação gama para a avaliação da dose absorvida**. 2003. 89 f. Dissertação (Dissertação em Tecnologias Energéticas e Nucleares) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco. 2003.

BARNETT, G.C.; *et al.* Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype. **Nat Rev**., England, v. 9, p. 134 – 142, 2009.

BATISTA, C.R.; JÚNIOR, E.O.C. Avaliação da genotoxicidade em células de pacientes fumantes e não fumantes por meio do teste do micronúcleo. **Getec**, [s.l], v.3, n.6, p. 49 - 58, 2014.

BEIRUTHY, I.W.; KAZAN, R.S. Étude corrélationnelle sur les facteurs prédictifs de la pratique du test de dépistage du cancer du col utérin chez les femmes fréquentant les centres médico-sociaux à Zahlé (Libanon). **Revue Francophone Internationale de Recherche Infirmière**, [s.l], v. 2, n. 1, p. 31 - 40, 2016.

BENDER, M. A.; *et al.* Current status of cytogenetic procedures to detect and quantify previous exposures to radiation. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 196, p. 103 - 159, 1988.

BERNARD, H.U. The clinical importance of nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. **J ClinVirol.,** Amsterdam, v. 32 (Suppl 1), p. 1 - 6, 2005.

BICCA, G.L.O.; *et al.* Prevalence of infection with high-risk HPV in women using hybrid capture conducting prevention of cervical cancer in Southern Brazil. **J bras Doenças Sex Transm**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 2, p. 109 - 114, 2013.

BONASSI S.; *et al.*Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human Micronucleus project. **Mutation Research**, Amsterdam, v.543, p.155 – 166, 2003.

BRAGANÇA-PEREIRA, C.A. Teste estatístico para comparar proporções em problemas citogenéticos. In: RABELLO-GAY, M.N.; RODRIGUES, M.A.L.A.R.; MONTELEONE NETO, R. Mutagênese, carcinogênese e teratogênese: Métodos e critérios de avaliação, São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética, p. 113 - 21, 1991.

CABRAL, W.B.M. **Análise da genotoxidade in vivo dos agrotóxicos ciromazina e mancozeb em baixas doses**. 2014. 76 f. Dissertação (mestrado em saúde e meio ambiente). Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, 2014.

CAETANO, R.; *et al.* Custo-efetividade no diagnóstico precoce do câncer de colo uterino no Brasil. **Physics**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 1, p. 99 - 118, 2006.

CAMPOS, L.M.F.R.*; et al.* Prevalência de micronúcleos em células esfoliativas do colo uterino de pacientes com fatores de risco para o câncer de colo uterino. **São Paulo Medical Journal**, São Paulo, v. 126, n. 6, p. 323 - 328, 2008.

CAMPOS, N.B.D.; *et al.* Ferramentas tecnológicas auxiliando os enfermeiros no controle e prevenção do câncer de colo de útero. **Interfaces da Educ.**, Paranaíba, v. 6, n. 17, p. 117 - 140, 2015.

CARRARD, V.C.; *et al.* Teste dos micronúcleos- Um biomarcador de dano genotóxico em células descamadas da mucosa bucal. **Rev. Fac. Odontol.,** Porto Alegre, v.48, n.1 - 3, p. 77 - 81, 2007.

CARVALHO, A.T.S. **O papel dos polimorfismos de genes da via de reparo com a radiotoxicidade em pacientes com câncer de cólo uterino.** 2012, 92 f. Dissertação (Mestrado em Genética). Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiás, 2012.

CASTELLSAGUÉ, X.; BOSCH, F.X.; MUÑOZ, N. Environmental cofactors in HPV carcinogenesis. **Virus Res.,** Amsterdam, v. 89, p. 191 - 199, 2002.

CAVALCANTI, M.B. **Proteína p53 como bioindicador da radiossensibilidade individual**. 2009. 100 f. Tese (Doutorado em Tecnologias Energéticas e Nucleares) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 2009.

CAVALCANTI, M.B.; *et al.* p53 protein expression and cell viability in irradiated peripheral blood mononuclear cells as bioindicators of radiosensitivity. **Journal of Biophysical Chemistry**, Washington, v. 2, n. 2, 2011.

CAVALCANTI, M.B.; *et al.* p53 protein expression levels as bioindicator of individual exposure to ionizing radiation by flow cytometry. **Molecular and cellular biochemistry**, Netherlands, v. 308, n. 1-2, p. 127-131, 2008.

CIRISANO, F.D. Management of preinvasive disease of the cervix. **Seminars in surgical oncology**, New York, v. 16, p. 222 - 227, 1999.

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

COLLABORATIVE GROUP ON EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF OVARIAN CANCER, *et al.* Menopausal hormone use and ovarian cancer risk: individual participant meta-analysis of 52 epidemiological studies. **The Lancet**, England, v. 385, n. 9980, p. 1835 - 1842, 2015.

COUTO, R; BARROS, D.O.S. O tratamento radioterápico para o câncer do colo do útero: sentimento e percepções de mulheres idosas. **Memorialidades**, [s.l]. v. 6, n. 11, p. 161 - 188, 2009.

DEMIRCIGIL, G.Ç.; *et al.* Cytogenetic biomonitoring of primary school children exposed to air pollutants: micronuclei analysis of buccal epithelial cells. Environmental **Science and Pollution Research**, Berlin, v. 21, n. 2, p. 1197 - 1207, 2014.

ELHAMIDI, A.; *et al.* Cervical intraepithelial neoplasia: prognosis by combined LOH analysis of multiple loci. **Gynecologic oncology**, New York, v. 94, n. 3, p. 671 - 679, 2004.

ENCHEVA, E.; *et al.* Investigating micronucleus assay applicability for prediction of normal tissue intrinsic radiosensitivity in gynecological cancer patients. **Reports of Practical Oncology & Radiotherapy**, Netherlands, v. 17, n. 1, p. 24 - 31, 2012.

FENECH M.; MORLEY A.A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutat. Res.,** Amsterdam, v. 147, n.1 - 2 p. 29 - 36, 1985.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature protocols**, England, v. 2, n. 5, p. 1084 - 1104, 2007.

FENECH, M. The Human Micronucleus Project – International collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutat. Res**., Amsterdam, v. 428, n.1 - 2, p.271 - 83, 1999.

FERNANDES, T. de S. **Emprego das aberrações cromossômicas instáveis e micronúcleo no biomonitoramento individual: estudo comparativo**. 2005. 69 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Energéticas e Nucleares). Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2005.

FERNANDES, T. S. **Adequação da Dosimetria Citogenética para Avaliação de Irradiação Parcial e de Corpo Inteiro**. 2009, 111f. Tese (Doutorado em Tecnologias Energéticas e Nucleares) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 2009.

FERRAZ, G.A.; *et al.* Effects of age on the frequency of micronuclei and degenerative nuclear abnormalities. **Rev. Bras. de Geriatria e Gerontologia**, Rio de Janeiro. v. 19, n. 4, p. 627 - 634, 2016.

FLORES, Y.; *et al.* Improving cervical cancer screening in Mexico: results from the Morelos HPV Study. S**alud Pública de México**, México, v. 45, p. 388 - 398, 2003.

FOWLER, J.F.; LINDSTROM, M.J. Loss of local control with prolongation in radiotherapy. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**., Elmsford, v. 23, p. 457–467, 1992.

FRIGATO, S.; HOGA, L.A.K. Assistência à mulher com câncer de colo uterino: o papel da enfermagem, **Rev. Bras. Cancerol.,** Rio de Janeiro, v. 49, n. 4, p. 209 - 214, 2003.

FRIGO, L.F.; DE OLIVEIRA ZAMBARDA, S. Câncer do colo de útero: efeitos do tratamento. **Cinergis,** [s.l], v. 16, n. 3, 2015.

GÓIS SPECK, N.M.; *et al.* Cervical cancer screening in young and elderly women of the Xingu Indigenous Park: evaluation of the recommended screening age group in Brazil. **Einstein,** São Paulo, v. 13, n. 1, p. 52 - 57, 2015.

GUERREIRO, G.P., *et al.* Relação entre espiritualidade e câncer: perspectiva do paciente.**Rev Bras Enferm.**, Brasília, v. 64, n. 1, p. 53 - 59, 2011.

HEDDLE, J.A.; *et al.* A report os the environmental protection agency gene-tox program, **Mutation Research,** Amsterdam, v. 13, p. 61-118, 1983.

HOGA, Z., **Fundamentos de Toxicologia**. 2ª Ed. São Paulo, p. 516, 2003.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA). Cytogenetic dosimetry: Applications in preparedness for and response to radiation emergercies. **Scientific and Technical Publications**. Vienna, 2011.

JADON, R.; *et al.* A systematic review of organ motion and image-guided strategies in external beam radiotherapy for cervical cancer. **Clinical oncology**, London, v. 26, n. 4, p. 185 - 196, 2014.

JEMAL, A.; *et al.* Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin.,** New York, v. 61, n. 2, p. 69 - 90, 2011.

JHAM, B.C.; FREIRE, A.R.S. Oral complications of radiotherapy in the head and neck**.Rev. Bras. de Otorrinolaringologia**, Rio de Janeiro, v. 72, n. 5, p. 704 - 708, 2006.

JOAQUIM, A.F. *et al.* Stereotactic radiosurgery for spinal metastases: a literature review. **Einstein (São Paulo)**, São Paulo, v. 11, n. 2, p. 247 - 255, 2013.

JORGE, L.L.R.; SILVA, S.R. Avaliação da qualidade de vida de portadoras de câncer ginecológico, submetidas à quimioterapia antineoplásica. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**, Ribeirão Preto, v. 18, n. 5, p. 849 - 855, 2010.

KEHDY, F.S.G. Avaliação dos efeitos genotóxicos da exposição ocupacional a pesticidas sobre agentes sanitários da fundação nacional de saúde Minas Gerais. Disponível em: <http://slideplayer.com.br/slide/353028/ > Acessado em: 16 jan. 2017.

KIRSCH-VOLDERS, M.; *et al.* Report from the in vitro micronucleus assay working group. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 540, n. 2, p. 153 - 163, 2003.

KIVIAT, N.B.; KOUSTY, L.A. Specific human papilomavírus types as causal agents of most cervical intraepithelial neoplasia: implications for current views and treatment. **J. Natl. Inst. Cancer,** Bethesda, v. 85, p. 934 - 935, 1993.

LACOMBE, J.; *et al.* Radiosensibilité individuelle: les tests vontchanger nos pratiques, **Cancer/Radiothérapie**, Paris, v. 17, p. 337 – 343, 2013.

LEHUCHER-MICHEL, M.P. *et al.* Micronuclei kinetics of exfoliated urothelial cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 354, p. 1 - 7, 1996.

LINDEGAARD, J.C*.; et al.* MRI-guided adaptive radiotherapy in locally advanced cervical cancer from a Nordic perspective. **Acta Oncologica**, Spain, v. 52, n. 7, p. 1510 - 1519, 2013.

MAMMAS, I. N.; SPANDIDOS, D. A. George N. Papanicolaou (1883-1962): Fifty years after the death of a great doctor. **Journal of B.U.ON.**, Greece. v. 17, n. 180484, 2012.

MASCARELLO, K.C.; *et al.* Perfil Sociodemográfico e Clínico de Mulheres com Câncer do Colo do Útero Associado ao Estadiamento inicial, **Rev. Bras. Cancerol. (Online)**, p. 417 - 426, 2012.

MELO, S.C.C.S.; *et al.* Alterações citopatológicas e fatores de risco para a ocorrência do câncer de colo uterino. **Rev. Gaúcha Enferm. (Online)**, Porto Alegre. v. 30, n. 4, p. 602 - 608, 2009. Disponível em:<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1983-14472009000400004&lng=pt&nrm=iso>. Acessado em: 09 dez. 2015.

MELO, T.F.V.; *et al.* Perfil epidemiológico de mulheres com HPV atendidas em uma unidade básica de saúde. **Revista de Pesquisa: Cuidado é Fundamental Online**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 4, p. 5177 - 5183, 2016.

MENDES, C.F.; *et al.* Micronúcleos em células do colo uterino em mulheres HIV+ segundo sua condição de imunidade. **Rev Bras Ginecol Obstet**, São Paulo, v. 33, n.10, p. 305 - 309, 2011.

MERLO,; *et al.* Micronuclei in Cord Blood Lymphocytes and Associations with Biomarkers of Exposure to Carcinogens and Hormonally Active Factors, Gene Polymorphisms, and Gene Expression: The NewGeneris Cohort**, Environmental Health Perspectives**, United States, v. 122, n. 2, 2014.

MILOJKOVIC, M. Residual and recurrent lesions after conization for cervical intraepithelial neoplasia Grade 3. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, United States, v. 76, n. 1, p. 49 - 53, 2002.

MINAEI, S.E.; *et al.* Evaluation of Cytogenetic Alterations in Peripheral Blood Lymphocytes of Esophageal Cancer Patients Treated with Radiotherapy or Chemoradiotherapy using Cytokinesis-Blocked Micronucleus Assay, **Acta MedicaIranica**, Iran, v. 54, n. 1, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, BIBLIOTECA VIRTUAL EM SAÚDE (BVSMS). **Bases do Tratamento do Câncer**. Brasília, Capítulo 6. Disponível em: <http//:ww.bvsms.saude.gov.br/ bvs/publicações/inca/ações_cap 6.pdf.> Acesso em: 12 nov. 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, Neoplasia intra-epitelial cervical – NIC: condutas do INCA/MS. **Rev. Bras. Cancerol**., Rio de janeiro. v. 46, n. 4, p. 355 - 57, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Colo do útero. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_utero/hpv-cancer-perguntas-mais-frequentes >. Acesso em: 20 de out. 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasi**l / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Rio de Janeiro: INCA, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Mensagem aos médicos. Câncer Fundamentos;** Secretária de Assistência Médica-Divisão Nacional de Câncer; Brasília. p. 7 - 47, 1971.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde. **Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas em Oncologia** / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde – Brasília. Ministério da Saúde, 2014.

MORETTIN, P. A.; BUSSAB, W.O. **Estatística Básica** 6ª. Edição, Ed. Saraiva, São Paulo, 2010.

MOURÃO, A.P.; OLIVEIRA, F.A., **Fundamentos de Radiologia e imagem.** 1ª edição, Ed. Difusão, São Paulo, 2009.

MOZDARANI, H.; MANSOURI, Z,; HAERI, S.A. Cytogenetic radiosensitivity of g0-lymphocytes of breast and esophageal cancer patients as determined by micronucleus assay. **J Radiat Res.,** Tokyo, v. 46, n.1, p. 111 – 6, 2005.

NARAYAN, K.; *et al.* Relation between FIGO stage, primary tumor volume, and presence of lymph node metastases in cervical cancer patients referred for radiotherapy. **International Journal of Gynecological Cancer,** Cambridge. v. 13, p. 657 – 663, 2003.

NERSESYAN, A. *et al.* Use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay in occupational biomonitoring of genome damage caused by in vivo exposure to chemical genotoxins: Past, present and future. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, Amsterdan. v. 770, p. 1 - 11, 2016.

NICHOLAS, G., George Nicholas Papanicolaou, Father of Modern Cytopathology. **Journal of the association of physicians of India**, Bombay. v. 63, p. 107, 2015.

NOUAILHETAS, Y. *et al.,* Radiações ionizantes e a vida. Disponível em : < http://ns1.sismepe.pe.gov.br/caosaude/arquivos/md/CNEN-RadiacoesIonizantesVida.pdf >. Acessado em: 12 dez. 2017.

NOVAES, E.R.S., **Câncer de Colo Uterino: Epidemiologia, Etiopatogenia, Diagnóstico e Estadiamento Clínico**. Capítulo 1. Disponível em: <http//:ww.inca.gov.br/pqrt/download/tec_int /int.pdf.>. Acessado em: 16 nov. 2016.

OKUNO, E., Efeitos biológicos das radiações ionizantes: acidente radiológico de Goiânia. **Estudos avançados**, São Paulo, v. 27, n. 77, p. 185 - 200, 2013.

OLIVEIRA, M.M. *et al.* Estimativa de pessoas com diagnóstico de câncer no Brasil: dados da Pesquisa Nacional de Saúde, 2015 **Rev. Bras. Epidemiol.** São Paulo, v. 18, n. 2, p. 146 - 157, 2015.

PENNA, R**. Radioterapia.** Disponível em: <http://slideplayer.com.br/slide/1862252/>. Acessado em: 16 jan. 2017.

PINTO, A.P.; BAGGIO, H.C.; GUEDES, G.B., Sexually-transmitted diseases in women: clinical and epidemiological aspects and advances in laboratory diagnosis. **Braz J Infect Dis**., Salvador, v. 9, n. 3, p. 50 - 241, 2005.

PINTO, A.P.; TÚLIO, S.; CRUZ, O.R., Co-fatores do HPV na oncogênese cervical. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 1, n. 48, p. 73 - 8, 2002.

PLAMADEALA, C.; WOJCIK, A; CREANGA, D., Micronuclei versus Chromosomal Aberrations Induced by X-Ray in Radiosensitive Mammalian Cells. **Iranian journal of public health**, Teharan, v. 44, n. 3, p. 325, 2015.

POROCK, D., Factors influencing the severity of radiation skin and oral mucosal reactions: development of a conceptual framework. **European Journal of Cancer Care**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 33 - 43, 2002.

PRADO, B.B.F., Influência dos hábitos de vida no desenvolvimento do câncer. **Cienc. Cult.**, São Paulo, v. 66, n. 1, 2014.

SANTOS, C.; *et al.* O enfermeiro na assistência à mulher com câncer de colo uterino. (Portuguese): Nurses in care woman with cervical cancer. **Rev. Científica de Enfermagem - RECIEN.** Rio de Janeiro, v. 5, n. 14, p. 19 - 24, 2015.

SILVA, E.C.S.; CAVALCANTI, M.B.; CARNEIRO, P.F.P. Radioterapia versus Radiossensibilidade Individual. **Cad. de Grad. Ciências Biológicas e da Saúde-FACIPE**, Recife, v. 1, n. 3, p. 111 - 117, 2014.

ZULIANI, A.C. *et al*., Brachytherapy for stage IIIB squamous cell carcinoma of the uterine cervix: survival and toxicity. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 56, n. 1, p. 37-40, 2010.

ANEXO A – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP).

SOCIEDADE PERNAMBUCANA DE COMBATE AO CÂNCER-SPCC

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS NA RADIOSSENSIBILIDADE DE PACIENTES COM CÂNCER DE COLO UTERINO

Pesquisador: Cátia Simone Ferreira Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 46607715.3.3001.5205

Instituição Proponente: Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.737.624

APÊNDICE A - Termo de consentimento livre e esclarecido - (TCLE) (para adultos impossibilitados de assinar o TCLE - resolução 466/12).

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO AMBIENTE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - (TCLE)
(PARA ADULTOS IMPOSSIBILITADOS DE ASSINAR O TCLE - Resolução 466/12)

Convidamos a Sra. para participar, como voluntária, da pesquisa **FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS NA RADIOSSENSIBILIDADE DE PACIENTES COM CÂNCER DE COLO UTERINO**, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Cátia Simone Ferreira Silva, residindo a Rua serinhaem, n°. 315, Boa vista, Caruaru – Pernambuco, CEP 55038-015, contato celular 81-99521-7213 e e-mail: catiasimonefs@gmail.com, para contato do pesquisador responsável (inclusive ligações a cobrar) e está sob a orientação de: Profa. Dra. Edvane Borges da Silva Telefones para contato: 81-99946-5120, e-mail edvborges@yahoo.com. Também participa desta pesquisa: Profa. Dra. Mariana Brayner Cavalcanti Freire Bezerra, Telefones: 81- 2126-8252.

Caso este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE contenha informações que não lhe sejam compreensível, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando e apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem dados e concorde com a realização do estudo, pedimos que rubrique ou carimbe com a digital do polegar direito as folhas e ao final deste documento, que está em duas vias, uma via lhe será entregue para que possa guardá-la e a outra ficará com o pesquisador responsável.

A Sra. não terá nenhuma despesa e nem receberá qualquer pagamento para participar como voluntária.

A Sra. será esclarecida sobre qualquer dúvida e estará livre para decidir participar ou recusar-se. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema, desistir é um direito seu. Para participar deste estudo, a pessoa autorizada por você deverá assinar pela Sra. ou carimbar a digital com o polegar direito este Termo de Consentimento, podendo, também, retirar esse consentimento ou interromper a sua participação a qualquer momento, sem nenhum prejuízo.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

¬ Descrição da pesquisa: Avaliar por meio de uma amostra de sangue retirada da veia de qualquer um dos braços por um profissional qualificado e habilitado analisando esta amostra em um ambiente controlado e fechado de um laboratório e que serão feitos normalmente em recipientes de vidro o aparecimento de células duplicadas na amostra do sangue da paciente voluntária que estiver com câncer de útero e em fase inicial para o tratamento radioterápico no Centro de Radioterapia de Pernambuco - CERAPE (Hospital do Câncer de Pernambuco).

¬ O tempo de participação do voluntário será em média de 01 (um) mês que poderá se estender por mais 01 (um) mês. Sendo no primeiro momento, o paciente ao aceite de

participar da pesquisa através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE, responderá os questionários clínico e epidemiológico e fornecerá uma amostra de sangue da veia de qualquer um dos braços, que será coletado após as respostas dos questionários.

Coleta de amostras de sangue: Durante este estudo, o sangue do paciente será colhido (aproximadamente 9 mL, 2 colheres de sopa serão colhidas) a amostra de sangue será coletada em apenas um momento, logo após consulta de início ao tratamento radioterápico, por um profissional qualificado, o próprio pesquisador, utilizando uma seringa própria para esse uso, sem nenhum custo ao indivíduo participante. Os riscos da coleta de sangue incluem desconforto temporário da agulha no braço, dor temporária, inchaço no local da agulha, equimose (mancha arroxeada) e, raramente, infecção.

Resposta ao questionário clínico e epidemiológico: o paciente responderá o questionário clínico e epidemiológico no momento da sua consulta antecedendo o início do tratamento radioterápico, durante o dia de sua consulta de término do tratamento radioterápico, assim como, o pesquisador terá acesso ao seu prontuário para complementar as respostas do questionário proposto. Os riscos do questionário clínico e epidemiológico incluem possibilidade de constrangimento por responder perguntas íntimas, ou de não entender os questionamentos sugeridos pelo pesquisador, porém, a entrevista ocorrerá em ambiente tranquilo, de forma individual, apenas com a presença do pesquisador durante a entrevista, todos os dados serão mantidos em total sigilo sem qualquer tipo de exposição para o paciente sobre as informações fornecidas para este estudo.

Não haverá benefícios diretos ao voluntário, porém, o estudo tentará comprovar que através das amostras e respostas cedidas pelo paciente estudado, existem benefícios indiretos em especial, para a população em geral, uma vez que atualmente muitas pessoas estão em contato com fatores que podem desencadear o câncer ou pelo fator de herança familiar para essa doença.

O estudo tenta beneficiar a todos através da pesquisa de uma nova tecnologia que possibilitará a identificação de células sensíveis ao tratamento radioterápico e da resposta do corpo (resposta clínica) a esta forma de tratamento, sendo assim, após o uso dessa tecnologia a presente pesquisa mostrará que haverá a necessidade de reajuste individual do tratamento radioterápico para a necessidade daquele paciente com câncer de colo uterino. Além do mais, o paciente voluntário possibilitará o aprimoramento dos profissionais de saúde sobre essa temática e ajudará na proteção das pessoas que estiverem em contato com as radiações durante o tratamento para o câncer de útero.

As informações desta pesquisa serão confidencias e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação das voluntárias, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a participação das voluntárias.

Os dados coletados nesta pesquisa entrevista e dados clínicos ficarão armazenados em pastas de arquivo no computador pessoal, sob a responsabilidade da pesquisadora, no endereço Rua Serinhaém, n°. 315, Boa vista, Caruaru - Pernambuco, pelo período de (mínimo) 5 anos. Garantimos que, se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas ou ressarcidas (deslocamento e alimentação) pela pesquisadora. Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife - PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br.

_____

(Assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIA

Eu,_____,CPF_____, abaixo assinado pelo meu representante legal, após a escuta da leitura deste documento e ter tido a oportunidade de conversar e esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo **FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS NA RADIOSSENSIBILIDADE DE PACIENTES COM CÂNCER DE COLO UTERINO**, como voluntária. Fui devidamente informada e esclarecida pela pesquisadora sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação.

Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

A rogo de _____, que é não alfabetizado/juridicamente incapaz e/ou deficiente visual, eu_____, assino o presente documento que autoriza a sua participação neste estudo.

Local e data _____

Assinatura: _____

Digital Opcional

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite da voluntária em participar.

Nome:	Assinatura:
Nome:	Assinatura:

APÊNDICE B - Termo de consentimento livre e esclarecido - (TCLE) (para maiores de 18 anos ou emancipados - resolução 466/12).

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO AMBIENTE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - (TCLE)
(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)

Convidamos a Sra. para participar, como voluntária, da pesquisa **FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS NA RADIOSSENSIBILIDADE DE PACIENTES COM CÂNCER DE COLO UTERINO**, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Cátia Simone Ferreira Silva, residindo a Rua Serinhaém, n°. 315, Boa vista, Caruaru – Pernambuco, CEP 55038-015, contato celular 81-99521-7213 e e-mail: catiasimonefs@gmail.com, para contato do pesquisador responsável (inclusive ligações a cobrar) e está sob a orientação de: Profa. Dra. Edvane Borges da Silva Telefones para contato: 81-99946-5120, e-mail edvborges@yahoo.com. Também participa desta pesquisa: Profa. Dra. Mariana Brayner Cavalcanti Freire Bezerra, Telefones: 81- 2126-8252.

Caso este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE contenha informações que não lhe sejam compreensível, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando e apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem dados e concorde com a realização do estudo, pedimos que rubrique ou carimbe com a digital do polegar direito as folhas e ao final deste documento, que está em duas vias, uma via lhe será entregue para que possa guardá-la e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Caso não concorde não haverá penalidade, bem como será possível retirar o consentimento a qualquer momento, também sem qualquer penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

¬ Descrição da pesquisa: Avaliar por meio de uma amostra de sangue retirada da veia de qualquer um dos braços por um profissional qualificado e habilitado analisando esta amostra em um ambiente controlado e fechado de um laboratório e que serão feitos normalmente em recipientes de vidro o aparecimento de células duplicadas na amostra do sangue da paciente voluntária que estiver com câncer de útero e em fase inicial para o tratamento radioterápico no Centro de Radioterapia de Pernambuco - CERAPE (Hospital do Câncer de Pernambuco).

¬ O tempo de participação do voluntário será em média de 01 (um) mês que poderá se estender por mais 01 (um) mês. Sendo no primeiro momento, o paciente ao aceite de participar da pesquisa através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE, responderá os questionários clínico e epidemiológico e fornecerá uma amostra de sangue da veia de qualquer um dos braços, que será coletado após as respostas dos questionários.

Coleta de amostras de sangue: Durante este estudo, o sangue do paciente será colhido (aproximadamente 9 mL, 2 colheres de sopa serão colhidas) a amostra de sangue será coletada em apenas um momento, logo após consulta de início ao tratamento

radioterápico, por um profissional qualificado, ou seja, o próprio pesquisador, utilizando uma seringa própria para esse uso, sem nenhum custo ao indivíduo participante. Os riscos da coleta de sangue incluem desconforto temporário da agulha no braço, dor temporária, inchaço no local da agulha, equimose (mancha arroxeada) e, raramente, infecção.

Resposta ao questionário clínico e epidemiológico: o paciente responderá o questionário clínico e epidemiológico no momento da sua consulta antecedendo o início do tratamento radioterápico e durante o dia de sua consulta de término do tratamento radioterápico, assim como, o pesquisador terá acesso ao seu prontuário para complementar as respostas do questionário proposto. Os riscos do questionário clínico e epidemiológico incluem possibilidade de constrangimento por responder perguntas íntimas, ou de não entender os questionamentos sugeridos pelo pesquisador, porém, a entrevista ocorrerá em ambiente tranquilo, de forma individual, apenas com a presença do pesquisador durante a entrevista, todos os dados serão mantidos em total sigilo sem qualquer tipo de exposição para o paciente sobre as informações fornecidas para este estudo.

Não haverá benefícios diretos ao voluntário, porém, o estudo tentará comprovar que através das amostras e respostas cedidas pelo paciente estudado, existem benefícios indiretos em especial, para a população em geral, uma vez que atualmente muitas pessoas estão em contato que fatores que podem desencadear o câncer ou pelo fator de herança familiar para essa doença.

O estudo tenta beneficiar a todos através da pesquisa de uma nova tecnologia que possibilitará a identificação de células sensíveis ao tratamento radioterápico e da resposta do corpo (resposta clínica) a esta forma de tratamento, sendo assim, após o uso dessa tecnologia a presente pesquisa mostrará que haverá a necessidade de reajuste individual do tratamento radioterápico para a necessidade daquele paciente com câncer de colo uterino. Além do mais, o paciente voluntário possibilitará o aprimoramento dos profissionais de saúde sobre essa temática e ajudará na proteção das pessoas que estiverem em contato com as radiações durante o tratamento para o câncer de útero.

Todas as informações desta pesquisa serão confidencias e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação das voluntárias, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a participação das voluntárias.

Os dados coletados nesta pesquisa entrevista e dados clínicos ficarão armazenados em pastas de arquivo no computador pessoal, sob a responsabilidade da pesquisadora, no endereço Rua Serinhaém, n°. 315, Boa vista, Caruaru - Pernambuco, pelo período de (mínimo) 5 anos. Garantimos que, se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas ou ressarcidas (deslocamento e alimentação) pela pesquisadora. Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife - PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).

_____

(Assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIA

Eu,_____,CPF_____, abaixo assinado após a leitura (ou a escuta desta leitura) deste documento e de poder ter tido a oportunidade de conversar e esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo **FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS NA RADIOSSENSIBILIDADE DE PACIENTES COM CÂNCER DE COLO UTERINO**, como voluntária.

Fui devidamente informada e esclarecida pela pesquisadora sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Local e data:_____

Assinatura do participante: _____

Digital opcional

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite da voluntária em participar.

Nome:	Assinatura:
Nome:	Assinatura:

APÊNDICE C – Questionário Clínico Epidemiológico

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO AMBIENTE

QUESTIONÁRIO CLÍNICO E EPIDEMIOLÓGICO

Nome: _____Número do Prontuário:_____

Data de nascimento: _____Procedência: _____

Renda familiar: _____Escolaridade: _____

Estado civil: _____Ocupação: _____

Idade da primeira menstruação: _____

Gestação (ões)?_____Parto(s)?_____Parto(s)Natural(is)?_____

Cesariana(s)?_____Aborto(s)?_____Filhos ?_____Gestação gemelar?_____

Má formação na gestação (s)? Sim ( ); Não ( )

Outro (os) tipo(os) de Cirurgia(as)? Sim ( ); Não ( ), qual (is)?_____

Faz uso de hormônio? Sim ( ); Não ( ), Se sim, qual(is)?_____

Faz uso de preservativo? Sim ( ); Não ( ), Se sim, com qual frequência?_____

Câncer em parentes de 1º Grau? Sim ( ); Não ( ); Se sim, qual(is)?_____

Faz uso de álcool Sim ( ); Não ( ); Faz Uso De Drogas Sim ( ); Não ( ); Fumante: Sim ( ); Não ( )

Teve algum outro tipo de câncer? Sim ( ); Não ( ) Se sim, qual(is)?_____

e a quanto tempo?_____

A quanto tempo foi diagnosticada com câncer de útero: < 6 Meses ( ); 6 Meses ou mais ( );

Estadiamento: IA1 ( ); IA2 ( ); IA1 ( ); IIA ( ); IIIA ( ); IB ( ); IB1 ( ); IB2 ( ); IIB ( ), IIIB ( ); IVA ( ).

Esquema terapêutico:_____

Distúrbios Orgânicos:

Hipertensão Arterial ( ); Hipotireoidismo ( ); Hipertireoidismo ( ); Diabetes ( ); Epilepsia ( ); Diarreia ( ); Constipação ( ); HIV positivo ( ); Infecção urinária ( ); Cardiopatias ( ); Sangramentos ( ); Anemia ( ); Parasitoses intestinais ( ); Episódios de náuseas ( ); Episódios de vômitos ( ); Desmaios ( ); Coceiras ( ); Doenças infecciosas ( ); Outros:_____

Exames laboratoriais

Glicemia de jejum;_____ TGO;_____TGP;_____

Hemograma completo;_____ Hemoglobina;_____HIV;_____

Creatinina sérica;_____Papanicolau;_____Biópsia; _____

Na região pélvica e adjacências

Sente dor na pelve? Sim ( ); Não ( );

Se sim, qual a intensidade? Leve ( ); Moderado( );Intenso ( ).

Sente fogachos? Sim ( ); Não ( ); Se sim, onde?_____

Dificuldades para urinar? Sim ( ); Não ( ). Sente dor ao urinar? Sim ( ); Não ( ).

Se dor, qual a intensidade? Leve ( ); Moderado( ); Intenso ( ).

Qual a apresentação da urina: Pouca quantidade ( ); moderada ( ); muita ( );

Qual a cor da urina: límpida ( ); turva ( ); amarelo escuro ( ); sanguinolenta ( ); marrom ( ).

Qual o cheiro da urina? Forte ( ); fraco ( ); Se característico, de que?_____

Quantas vezes vai ao banheiro por dia para fazer cocô?_____

Apresenta dificuldades para evacuar? Sim ( ); Não ( ).

Qual a apresentação das fezes: Pouca quantidade ( ); moderada ( ); muita ( );

Qual a cor das fezes: amareladas ( ); verdes( ); presença de muco( ); sanguinolenta ( ); marrom ( ).

Sente inchaço(s) na região pélvica e/ou vaginal? Sim ( ); Não ( ). Onde?_____

Atualmente está ativa sexualmente? Sim ( ); Não ( ).

Se sim. Durante as relações sexuais sentiu algum tipo de desconforto? Sim ( ); Não ( ).

Qual(is)?_____Se dor. Qual a intensidade? Leve ( ); Moderado ( ); Intenso ( ).

Existe presença de flacidez na musculatura da vagina? Sim ( ); Não ( )

Existe presença de enrijecimento na musculatura da vagina? Sim ( ); Não ( )

Na pele

Existe presença de alergia na pele da vagina ou entorno? Sim ( ); Não ( ).

Existe presença de nódulos? Sim ( ); Não ( ). Se sim, descreva:_____

Existem marcas ou cicatrizes detectáveis? Sim ( ); Não ( ). Se sim, descreva:_____

Existe presença de avermelhamento na pele da vagina ou entorno? Sim ( ); Não ( ).

Existe presença de bolhas na pele da vagina ou entorno? Sim ( ); Não ( ).

Existe presença de manchas claras na pele da vagina ou entorno? Sim ( ); Não ( ).

Existe presença de manchas escuras na pele da vagina ou entorno? Sim ( ); Não ( ).

Existe presença de atrofia na pele da vagina ou entorno? Sim ( ); Não ( ).

Existe presença de erupções na pele da vagina ou entorno? Sim ( ); Não ( ).

Existe presença de feridas na pele da vagina ou entorno? Sim ( ); Não ( ).

Existe presença necrose na pele da vagina ou entorno? Sim ( ); Não ( ).

Existe descamação na pele da vagina ou entorno? Sim ( ); Não ( ).

Se descamação vaginal, qual tipo? Úmida ( ) ou seca ( ).

Existe espessamento na pele da vagina ou entorno? Sim ( ); Não ( ).

Existe coceira na pele da vagina ou entorno? Sim ( ); Não ( ).

Existe petéquias, púrpura (hemorragia / sangramento na pele ou mucosa) na pele da vagina ou entorno? Sim ( ); Não ( ).

Exposição a agentes genotóxicos ou agentes mutagênicos

Teve contato com agrotóxicos e/ou fertilizantes?Sim ( ); Não ( ).

Se sim, qual e a quanto tempo?_____ e com que frequência? _____.

Quais tipos de agentes químicos?_____

Como medicamentos? Sim ( ); Não ( ). Inseticidas Sim ( ); Não ( ).

Fungicidas, Sim ( ); Não ( ). Herbicidas, Sim ( ); Não ( ).

Fertilizantes, Sim ( ); Não ( ).

Outros produtos quais? _____

Fica exposto ao sol sem a proteção de protetor solar e/ou guarda sol ou chapéu? Sim ( ); Não ( ). Se sim, por quanto tempo ao dia?_____ e com que frequência? _____

Fez uso de raio – x ? Sim ( ); Não ( ). Se sim, a quanto tempo?_____

Fez uso de tomografia? Sim ( ); Não ( ). Se sim, a quanto tempo?_____