

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE DANO CELULAR EM PACIENTES DIAGNOSTICADAS  
COM CÂNCER DE MAMA EM TRATAMENTO COM RADIOTERAPIA ATRAVÉS  
DAS TÉCNICAS DE MICRONÚCLEO E ENSAIO COMETA

FERNANDA ROCHA DA TRINDADE

Porto Alegre  
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE DANO CELULAR EM PACIENTES DIAGNOSTICADAS  
COM CÂNCER DE MAMA EM TRATAMENTO COM RADIOTERAPIA ATRAVÉS  
DAS TÉCNICAS DE MICRONÚCLEO E ENSAIO COMETA

FERNANDA ROCHA DA TRINDADE

Orientador: Gilberto Schwartzmann

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Medicina: Ciências  
Médicas, UFRGS, como requisito para  
obtenção do título de Mestre

Porto Alegre

2012

### CIP - Catalogação na Publicação

Rocha da Trindade, Fernanda

Avaliação do índice de dano celular em pacientes diagnosticadas com câncer de mama em tratamento com radioterapia através das técnicas de micronúcleo e ensaio cometa / Fernanda Rocha da Trindade. -- 2012. 81 f.

Orientador: Gilberto Schwartzmann.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Radioterapia. 2. Técnica de Micronúcleo. 3. Ensaio Cometa. 4. Efeitos Biológicos da radiação ionizante. I. Schwartzmann, Gilberto , orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## **Agradecimentos**

Aos Físicos e estagiários do Serviço de Física Médica e Radioproteção do HCPA por todo o apoio, ensinamento e carinho durante a minha árdua jornada.

Ao Professor José Roberto Goldim pelo voto de confiança no meu projeto, incentivo e apoio. Muito mais que um professor, foi um grande amigo e inesquecível co-orientador.

Ao pessoal do Laboratório de Bioética, especialmente a Bruna, a Gabriella e o Lucas, muito mais que colegas, vocês são amigos que levarei para o resto da vida.

Ao meu orientador, Prof. Gilberto Schwartzmann e sua querida secretária Rosana, por me darem a chance de colocar meu projeto em prática e cursar o Mestrado.

Aos Médicos José Antônio Cavalheiro, Carlos Henrique Menke, Jorge Biazús, Ângela, Ana, Camile, Residentes, Enfermeiras e Secretários do Serviço de Mastologia do HCPA por apoiarem meu projeto e serem fundamentais na etapa de seleção de pacientes e coleta de dados.

Ao Biólogo Sharbel e todos os integrantes do Serviço de Citogenética do HCPA, especialmente a Roberta, a Natália, Gisele e Thiago pelo apoio, dedicação, ensinamentos e auxílio durante a preparação e análise das amostras de sangue.

Ao Médico Paulo Renato Figueiredo, Secretárias, Recepcionistas, Enfermeiras, Técnicos e Físicos do Serviço de Radioterapia do HCPA pela ajuda.

Aos meus amigos, especialmente a Lize, Ju Araújo e Ju Marcolino por entenderem minha falta de tempo e minha neurose durante estes dois longos anos.

Aos meus colegas e Professores do curso de Mestrado por compartilharem comigo esta experiência única com muitos momentos agradáveis e aprendizados que levarei para a vida toda.

A minha amada família que sempre me apoiou. Aos meus pais pelo incansável incentivo, amor, carinho, atenção, amizade e ajuda financeira. Ao meu

irmão Flavio, minha cunhada Karina, minha irmã Flávia e meu cunhado Rodrigo pelo apoio e por inúmeras vezes tentarem me tirar de casa para me divertir e não ficar apenas na velha rotina de ler, escrever e dormir.

A minha cadelinha Bricka que conviveu comigo durante 14 anos e em junho deste ano nos deixou. Ela passou muitos dias ao meu lado enquanto eu estava escrevendo esta dissertação. Estará sempre no meu coração.

À todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram durante todo o curso e não foram citadas!

## Resumo

**Introdução:** Toda a exposição à radiação ionizante envolve um benefício e um risco inerente. O tratamento com radioterapia utiliza feixes de alta energia que tem como finalidade destruir o tumor, atingindo também áreas adjacentes e podendo causar dano celular, não visível macroscopicamente. **Objetivos:** O objetivo principal deste projeto é avaliar o índice de dano em células nucleadas do sangue periférico de pacientes diagnosticadas com câncer de mama em tratamento com radioterapia, através das técnicas de micronúcleo e ensaio cometa. O objetivo específico é avaliar a percepção de risco e coerção de pacientes diagnosticadas com câncer de mama em relação ao seu tratamento com radioterapia. **Métodos:** A metodologia consiste em dois sub-estudos, um com delineamento longitudinal, do tipo estudo de casos incidentes, composto por pacientes com câncer de mama em tratamento no Serviço de Radioterapia. Foram realizadas quatro coletas de sangue em diferentes momentos para a realização das duas técnicas: (1) antes do início do tratamento, (2) na segunda semana, (3) no final e (4) aproximadamente um mês após o seu término. O segundo sub-estudo, com delineamento transversal, foi realizado no período antes do tratamento radioterápico. As pacientes que foram submetidas à radioterapia foram pareadas com outro grupo de participantes voluntárias que não têm diagnóstico de câncer e nem indicação de radioterapia. Cada sub-estudo foi formado por 18 indivíduos do sexo feminino, totalizando 36 sujeitos de pesquisa. Utilizando-se a técnica de micronúcleo, foram analisadas três tipos de alterações celulares: micronúcleo, buds e pontes nucleoplasmáticas. Durante a segunda coleta de sangue um questionário contendo a percepção de coerção e de risco foi aplicado às pacientes. **Resultados:** Em relação ao estudo longitudinal houve diferença

significativa na alteração nuclear de micronúcleo entre as coletas realizadas antes e após um mês de tratamento com radioterapia. Em relação à alteração nuclear buds não houve diferença significativa e em relação à alteração nuclear pontes nucleoplasmáticas houve diferença significativa, mas não foi possível verificar entre quais momentos da coleta de sangue. Houve diferença significativa na técnica ensaio cometa comparando as coletas realizadas duas semanas após o início da radioterapia e no final da mesma. Em relação ao estudo transversal, os resultados da técnica de micronúcleo mostraram que não há diferença significativa entre as pacientes com câncer e sem câncer. A percepção de coerção obteve um valor médio de 0,79, com desvio padrão de 0,91. Quanto à percepção de risco em relação ao seu tratamento, as pacientes inferiram um risco médio de 5,4% e um desvio padrão de 11,9%. A maioria das pacientes, 84% da amostra, teve uma percepção de risco que não ultrapassou 10%. **Conclusão:** A radioterapia induziu danos celulares, ou seja, houve efeito biológico causado pelo tratamento com radioterapia evidenciado pela alteração nuclear de micronúcleo. A técnica ensaio cometa evidenciou, que o sistema de reparo foi eficiente, pois, o dano celular induzido na segunda semana de tratamento diminuiu no final do mesmo. Com base na avaliação das percepções de coerção e de risco, em relação à radioterapia, foi possível verificar que: a) A percepção de risco obteve valores baixos, sendo que na maioria da amostra o risco percebido foi igual a zero; b) A baixa percepção de coerção evidencia que as pacientes tiveram liberdade para optar pelo tratamento proposto pela equipe assistencial com reduzida pressão de fatores externos.

## **PALAVRAS-CHAVE**

Radioterapia, micronúcleo, ensaio cometa, efeitos biológicos.

## Abstract

**Background:** Benefits and inherent risks are involved in any exposure to ionizing radiation. Treatment with radiation therapy uses high energy beams that aim to destroy the tumor, affecting also adjacent areas and potentially causing cell damage, in a macroscopic view. **Objective:** The main objective of this research was to evaluate the damage index in nucleated cells from peripheral blood of breast cancer patients receiving treatment with radiotherapy through the techniques micronucleus and comet assay. The specific objective is to evaluate the risk perception and coercion of patients diagnosed with breast cancer about their treatment with radiotherapy. **Methods:** The methodology consists of two sub-studies, the first one is a longitudinal study of incident cases, comprising patients with breast cancer undergoing treatment at the Radiotherapy Service. Four blood samples were taken at different times to the achievement of both techniques: (1) before starting treatment, (2) in the second week, (3) at the end and (4) a month after finished the treatment. The second sub-study, with cross-sectional design was carried out before radiotherapy. The patients who underwent radiotherapy were paired with another group of voluntary participants who have no diagnosis of cancer and are not using any radiation. Each sub-study consisted of 18 females, making 36 research subjects. Using the micronucleus assay, we analyzed three types of cellular changes: micronuclei, buds and nucleoplasmatic bridges. During the second blood collection a perception of coercion and risk perception questionnaire was applied to patients. **Results:** The longitudinal study showed a significant difference in the nuclear micronuclei changes between samples taken before and after a month of radiotherapy. Regarding amendment nuclear buds there was no significant difference



and in relation to amendment nuclear nucleoplasmatic bridges there was a significant difference, but it was not possible to verify what time between blood collection. There were significant differences in the comet assay comparing the samples taken two weeks after the start of radiotherapy and at the end of treatment. Regarding the cross-sectional study, the micronucleus assay results showed no significant difference between patients with cancer and without cancer. The perception of coercion obtained an average value of 0.79 with a standard deviation of 0.91. Regarding the risk perception in relation to their treatment, patients inferred an average risk of 5.4% and a standard deviation of 11.9%. Most patients, 84% of the sample had a risk perception that did not exceed 10%. **Conclusion:** The radiation induced cell damage, there was biological effect caused by radiotherapy and evidenced by changes in nuclear micronuclei. The comet assay showed that the repair system was efficient, because cellular damage in the second week of treatment decreased at the end of it. Based on the assessment of the perceptions of coercion and risk in relation to radiotherapy, we found that: a) risk perception obtained low values, and in most of the sample perceived risk was zero, b) Low perception of coercion shows that the patients were free to choose the treatment proposed by the treatment team with a reduced pressure of external factors.

## **KEYWORDS**

Radiotherapy, micronucleus assay, comet assay, biological effects.

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Diferenças entre as técnicas de micronúcleo e ensaio cometa.....	24
Tabela 2: Classificação dos tumores malignos de mama em relação à dimensão do tumor primário (T), extensão da disseminação em linfonodos regionais (N) e presença de metástases (M).....	29
Tabela 3: Agrupamento por estádios em relação à Classificação dos Tumores Malignos de mama. ....	30

## Lista de Figuras

Figura 1: Interação da radiação ionizante com o átomo que (a) através da excitação deslocará o elétron para outra camada orbital; (b) através da ionização desprenderá um elétron da camada orbital .....	17
Figura 2: Ilustração de uma ação direta e indireta no DNA.....	17
Figura 3: Formação de: (a) binucleada; (b) micronúcleo; (c) pontes nucleoplasmáticas; (d) <i>buds</i> nucleares .....	22
Figura 4: Índice do dano: (a) zero; (b) um; (c) dois; (d) três; (e) quatro.....	24
Figura 5: Esquema com: (a) Tratamento com teleterapia e (b) Tratamento com Braquiterapia.....	33
Figura 6: Escala análogo-visual de risco em relação ao tratamento com radioterapia das pacientes diagnosticadas com câncer de mama.....	38

## Lista de Abreviaturas

SIGLA	Significado
UNSCEAR	<i>United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation</i>
CBMN	<i>Cytokinesis-Block Micronucleus</i>
MN	Micronúcleos (micronuclei)
PNPs	Pontes Nucleoplasmáticas (nucleoplasmatic bridges)
SCGE	<i>Single-Cell Gel Eletrophoresis</i>
UICC	União Internacional Contra o Câncer

## Sumário

1 Introdução .....	14
2 Revisão da literatura.....	16
2.1 Radiação Ionizante .....	16
2.1.2 Efeitos Biológicos da Radiação Ionizante .....	18
2.2 Mutação e Reparo Celular .....	19
2.2.1 Técnicas de Avaliação de Danos na Célula.....	21
2.3 Câncer .....	25
2.3.1 Tipos de Tumores.....	25
2.3.2 Câncer de Mama .....	26
2.3.3 Tratamento do Câncer de Mama .....	31
2.4 Bioética .....	34
2.4.1 Escala de Percepção de Coerção.....	36
2.4.2 Percepção de Risco.....	37
3 Objetivos .....	39
3.1 Objetivo principal.....	39
3.2 Objetivos específicos .....	39
4 Referências bibliográficas .....	40
5 ARTIGO.....	45
5.1 Artigo 1.....	45
5.2 Artigo 2.....	58
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	72
7 APÊNDICE .....	74

## 1 Introdução

Ao longo da vida, naturalmente, nossas células sofrem mutações diárias, sendo a sua grande maioria reparada, ou seja, não há nenhum tipo de consequência direta à saúde. O número de mutações celulares aumenta quando estamos expostos a agentes denominados mutagênicos como, por exemplo, a radiação ionizante e o hábito tabagista<sup>1</sup>.

A radiação ionizante faz parte da vida do homem e de todos os seres vivos, pois é emitida pelo Sol, está presente no solo, na água, entre outros. Além destas exposições naturais, o homem está sujeito às denominadas exposições médicas, na qual os pacientes são expostos à radiação ionizante em decorrência de procedimento de terapia. Estas exposições têm a possibilidade de causar um risco adicional de dano biológico aos pacientes expostos, o que denominamos risco, além, do benefício conhecido do exame. A paciente terá um benefício se a dose pré-calculada do seu tratamento for suficiente para causar um dano ou efeito biológico no tumor que será exposto ao feixe de radiação. Como existe sempre uma margem que inclui o tecido saudável da paciente ao redor do tumor, é esperado que as pacientes tenham, em algum momento do tratamento radioterápico, uma alteração celular.

De acordo com a *United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation* (UNSCEAR), não existe uma dose segura de exposição de radiação ionizante sob o ponto de vista genético, sendo que qualquer exposição à radiação pode envolver um risco de indução de efeitos biológicos<sup>2</sup>.

O câncer é uma doença multifatorial e pode ser causado por danos na molécula de DNA de uma célula que ao se multiplicar espalha o dano pelo tecido. Os agentes mutagênicos aumentam a probabilidade destes danos atingirem a parte do DNA que contém as informações genéticas importantes para o funcionamento correto do organismo. O câncer de mama é o mais frequente nas mulheres das regiões Sudeste, Sul, Centro-Oeste e Nordeste, sem considerar os tumores tipo não melanoma de pele<sup>3</sup>. O tratamento é realizado, geralmente, através de cirurgia, quimioterapia e radioterapia, combinados ou separadamente. A radioterapia envolve exposição da paciente a uma alta taxa de dose de radiação ionizante. Além de interagir com o tumor, a radiação ionizante interage com as células sadias dos tecidos adjacentes, sendo esta a principal preocupação deste estudo<sup>4,5,6</sup>.

No presente estudo foi avaliado, através de amostras de sangue periférico, o dano celular de pacientes diagnosticadas com câncer de mama submetidas à tratamento radioterápico.

## 2 Revisão da literatura

### 2.1 Radiação Ionizante

Para fins de proteção radiológica a radiação ionizante é definida como qualquer partícula ou radiação eletromagnética que, ao interagir com a matéria biológica, ioniza seus átomos ou moléculas<sup>7</sup>. Na colisão da partícula transportando energia com o átomo, a energia, inicialmente da partícula, será transferida parcial ou totalmente aos elétrons constituintes deste átomo. Essa energia transferida pode ser inferior ou superior a energia de ligação do átomo.

A energia inferior à de ligação do átomo será absorvida pelo mesmo, ocorrendo um deslocamento do elétron para estados disponíveis nas estruturas eletrônicas, gerando a denominada excitação atômica, Figura 1(a). A energia superior a de ligação do átomo acarretará em uma ionização, ou seja, elétrons serão removidos dos orbitais, Figura 1(b), resultando em elétrons livres de alta energia, íons positivos ou radicais livres<sup>8,9</sup>. Com isso, ao interagir com a matéria biológica, a energia transferida pela radiação ionizante ioniza ou excita os átomos ou moléculas.

Os processos denominados excitação e ionização podem alterar os átomos do corpo humano e conseqüentemente também a estrutura das moléculas dependentes do mesmo, ocasionando um efeito cascata de alterações. Estas alterações, causadas pela interação do átomo com a célula, podem atingir, direta ou indiretamente, o DNA do indivíduo, Figura 2. Os danos celulares relacionados à molécula do DNA podem ser: quebras simples e duplas da molécula, ligações cruzadas, alterações nos açúcares ou nas bases<sup>8,9</sup>.



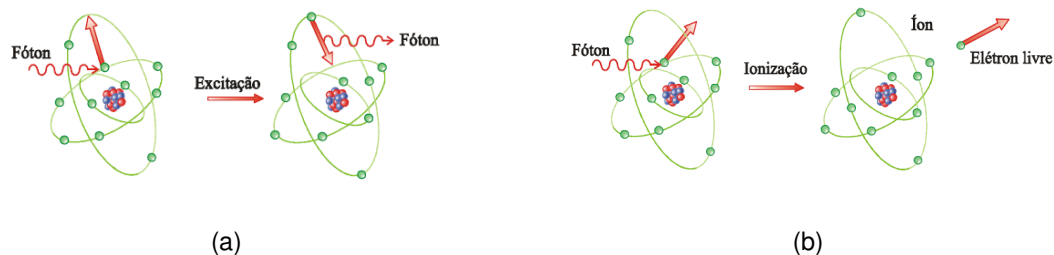


Figura 1: Interação da radiação ionizante com o átomo que (a) através da excitação deslocará o elétron para outra camada orbital; (b) através da ionização desprenderá um elétron da camada orbital. Fonte: Tauhata et al., 2003.

Estas alterações podem evoluir através de um processo complexo que envolve quatro estágios sucessivos denominados: físico, químico, biológico e da saúde ou orgânico.

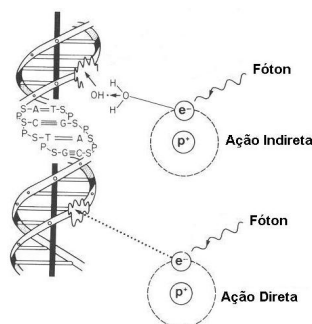


Figura 2: Ilustração de uma ação direta e indireta no DNA.

Fonte: [http://200.145.134.134/twiki/pub/Main/Radiobiologia/aula\\_5\\_08042009.pdf](http://200.145.134.134/twiki/pub/Main/Radiobiologia/aula_5_08042009.pdf)

O estágio físico é a própria transferência de energia da partícula para o átomo, ocorrendo a ionização do mesmo. Este estágio depende basicamente do tipo de radiação ionizante, da dose recebida, da taxa de dose, do tipo de exposição e do tipo de célula ou tecido atingido. Após o consequente desequilíbrio atômico, poderá ocorrer alterações ou reações químicas com as moléculas vizinhas que resultará na

formação de produtos secundários que caracteriza o estágio químico. Neste estágio surgem as espécies reativas que podem levar a formação de elétrons denominados hidratados e radicais livres que podem levar à formação de novas moléculas<sup>10</sup>. Isso poderá afetar alguns processos vitais, biológicos, modificar e bloquear o que caracteriza o estágio da saúde. No último estágio ocorre o aparecimento de lesões e mutações, ou seja, ocorre o efeito biológico da radiação ionizante<sup>11</sup>.

### **2.1.2 Efeitos Biológicos da Radiação Ionizante**

Os efeitos biológicos constituem uma resposta natural do organismo a um agente agressor ou modificador. Dependendo da gravidade do efeito, o organismo pode se recuperar sem que a pessoa perceba.

A resposta dos diferentes órgãos e tecidos à radiação ionizante é diferente, tanto em relação ao tempo de aparecimento como à gravidade dos efeitos produzidos. As diferenças de sensibilidade verificadas seguem a *Lei de Bergonie e Tribondeau* que diz: “São mais radiosensíveis as células que exibem maior atividade mitótica e/ou menor grau de diferenciação celular”, mas exceções podem ser observadas. Entre os tecidos mais sensíveis do homem estão: ovários, testículos, olhos, medula óssea, linfócitos e tecido gastrointestinal<sup>11</sup>.

Os efeitos biológicos podem ser somáticos ou hereditários. O efeito somático ocorre no indivíduo exposto à radiação ionizante, enquanto que os hereditários se originam a partir danos na linhagem germinativa do indivíduo e se manifestam em sua descendência.

Para fins didáticos, os efeitos biológicos podem ser divididos em:  
1) determinísticos, também denominados reações teciduais ou efeitos imediatos da

radiação e 2) estocásticos, também denominados tardios para a saúde. Os efeitos determinísticos surgem num curto espaço de tempo (dias, horas, minutos) a partir de um limiar de dose e sua gravidade é função do aumento dessa dose. Estas reações incluem inflamação e ulceração da pele, náusea, vômito, anorexia, diarreia, queda de cabelos, anemia, hemorragia, infecções, entre outros. Os efeitos estocásticos são aqueles cuja probabilidade de ocorrência é função da dose, não existindo limiar. Com isso, quanto maior a dose recebida maior é o risco de efeitos atribuíveis à radiação se manifestarem, por exemplo, o câncer. A dose entre estes dois tipos de efeito ainda não é conhecida, sendo esta, apenas aproximada<sup>12</sup>.

## **2.2 Mutação e Reparo Celular**

As mutações estão intrinsecamente ligadas á origem da vida, à capacidade que todas as formas de vida têm para evoluírem e sobreviverem. Este processo não é determinístico, mas aleatório e desagregador. Os organismos estão constantemente expostos a uma grande variedade de agentes causadores de mutação no DNA. As alterações no DNA são de ordem química ou molecular, devido a processos físico-químicos<sup>1</sup>.

As mutações convencionalmente são classificadas em gênicas e cromossômicas. As mutações gênicas correspondem a alterações induzidas na molécula de DNA que resultam na perda ou na transformação de informações codificadas na forma de genes. As mutações cromossômicas ocorrem na forma de uma reorganização na estrutura da dupla hélice do DNA (translocação, inversão ou mesmo ganho ou perda de parte maior destes cromossomos)<sup>13,14</sup>.

As respostas das células as mutações podem ser definidas como uma cascata de sinalização na qual as lesões no DNA atuam como um sinal inicial que é detectado por algumas proteínas. As proteínas efetoras recebem o sinal e executam diversas funções celulares, entre elas, o bloqueio do ciclo celular ou *checkpoints*, o reparo do DNA e a apoptose<sup>13</sup>. Os *checkpoints* fornecem o tempo para a célula reparar o dano no DNA antes que o ciclo progrida. Porém, se houver danos excessivos, gatilhos para apoptose podem ser ativados, assim como a senescência celular. Defeitos nos processos de *checkpoint* podem resultar em instabilidade genômica e levar à transformação de células normais em células tumorais<sup>14</sup>.

Os genes de reparo do DNA podem ser agrupados em: genes associados com sinalizações e regulação de reparo; e genes associados com mecanismos distintos de reparo. Esses genes, quando mutados, podem estar correlacionados com o desenvolvimento tumoral, além de estarem vinculados com a resistência de células tumorais a drogas utilizadas no tratamento de diferentes tipos de câncer. Mutações em vários genes são responsáveis por câncer hereditário, bem como por tumores esporádicos<sup>14</sup>.

A introdução de mutações no genoma de uma célula é considerada indispensável para a indução de um câncer por ação das radiações, no entanto, mutações não evoluem obrigatoriamente para alguma doença<sup>10,13</sup>. O DNA, por ser responsável pela codificação da estrutura molecular de todas as enzimas das células, passa a ser a molécula chave para o desenvolvimento deste processo.

## 2.2.1 Técnicas de Avaliação de Danos na Célula

### 2.2.1.1 Técnica de Micronúcleo

A Técnica de Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese (CBMN – *cytokinesis-block micronucleus*) é utilizada para determinar a presença e a extensão de dano cromossômico, sendo estas, detectadas pela formação de pequenos corpúsculos em células binucleadas. Esta técnica necessita de uma divisão celular, por isso, há o cultivo celular dos linfócitos a partir da amostra de sangue periférico coletada do indivíduo em um tubo estéril e heparinizado.

O cultivo celular é realizado a partir dos linfócitos do sangue periférico que são colocados em cultura com RPMI, soro bovino fetal e fitoemaglutinina. Os frascos de cultura são deixados em uma estufa a 37°C por 44h, após esse período, adiciona-se citocalasina B, de acordo com o método descrito por Fenech e Morley<sup>15,16,17</sup>. A citocalasina B impede a divisão do citoplasma sem afetar a divisão do núcleo e assim, dependendo do número de divisões pelas quais as células passam, essas podem apresentar dois ou mais núcleos<sup>18</sup>. Após mais 28 horas na estufa, a cultura é transferida para um tubo de centrífuga e centrifuga-se a 700 rpm por sete minutos. Após, é descartado o sobrenadante e adiciona-se KCl, Formalina e Fixador. Centrifuga-se mais uma vez, descarta-se o sobrenadante e adiciona-se mais fixador (este procedimento é realizado duas vezes) e ressuspende-se. Para finalizar, goteja-se (de 2 a 4 gotas/lâmina) a suspensão de células sobre as lâminas previamente lavadas e deixa-se secar a temperatura ambiente. As lâminas devem ser coradas com Giemsa.

Na análise das células binucleadas, Figura 3(a), pode-se encontrar três alterações distintas: micronúcleos (MN), pontes nucleoplasmáticas (PNPs) e *buds* nucleares (amplificação gênica). Os MN, Figura 3(b), correspondem a fragmentos acêntricos ou cromossomos inteiros que não estão ligados ao fuso mitótico durante a divisão celular e acabam fora dos núcleos-filhos. As PNPs, Figura 3(c), ocorrem quando os centrômeros de cromossomos, cromátides ou anéis dicêntricos transferidos para pólos opostos da célula na anáfase. Os *buds* nucleares, Figura 3(d), correspondem a ampliações de DNA<sup>19</sup>.

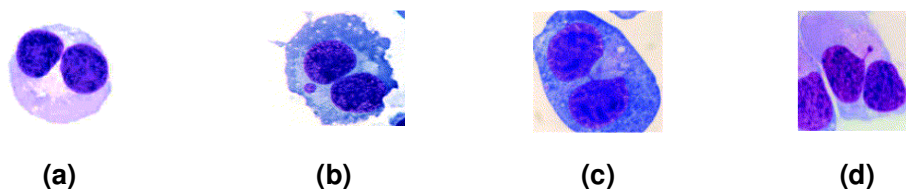


Figura 3: Formação de: (a) binucleada; (b) micronúcleo; (c) pontes nucleoplasmáticas; (d) *buds* nucleares. Fonte:

<http://www.icb.ufmg.br/biq/prodap/2003/micronucleos/imagens.html>

### 2.2.1.2 Ensaio Cometa

A Técnica Ensaio Cometa ou *Single-Cell Gel Eletrophoresis* (SCGE) é rápida, sensível e de baixo custo para avaliação de quebras de cadeias de DNA em células eucarióticas e para a investigação do dano genético associado a exposições a agentes potencialmente genotóxicos. As lesões detectadas são passíveis de correção.

A técnica é realizada a partir de amostras de sangue que são misturadas com agarose *low melting point*, espalhadas em lâminas pré-cobertas com agarose, cobertas delicadamente com uma lamínula e depositadas em câmara fria. Uma vez

que as amostras solidificam, as lamínulas são removidas e as lâminas são colocadas em solução de lise (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10.2, na qual 1% Triton X-100 e 10% DMSO foram adicionados) por 1-2 dias sob refrigeração. O excesso de líquido é removido de cada lâmina e elas, então, são transferidas para uma cuba de eletroforese (25 V, 0,9 V/cm e 300 mA), onde uma solução alcalina (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13) é adicionada. As lâminas são expostas a essa solução por 20 minutos, para permitir o desnovelamento do DNA e permitir a expressão dos sítios alcali-lábeis e das quebras de fita única. O DNA é então submetido à eletroforese por 20 minutos.

As lâminas são removidas da cuba, limpas, lavadas três vezes com solução neutralizadora (0.4 M Tris, pH 7.5), lavadas três vezes com água destilada, e secas à temperatura ambiente. Todos esses processos, desde a coleta das amostras, devem ser realizados sem a interferência de luz. As lâminas são fixadas e coradas com coloração de prata<sup>20</sup>. Para a avaliação de dano de DNA, 100 células por amostra são analisadas sob aumento de 200x em microscópio óptico.

A avaliação da técnica é realizada através da classificação dos cometas, Figura 4, por inspeção visual, tipicamente em cinco classes: 0 (zero) representa células sem dano (cometa sem cauda ou com caudas pouco detectáveis), e de 1 a 4 representam um aumento relativo na intensidade das caudas. O somatório dos valores (de 0 a 4) dos 100 núcleos analisados resulta no valor individual, que pode variar, dessa forma de 0 a 400 unidades arbitrárias<sup>21</sup>.

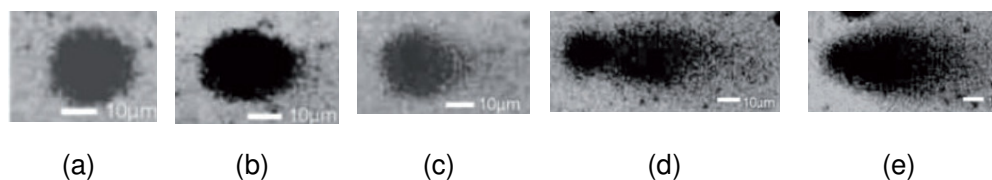


Figura 4: Índice do dano: (a) zero; (b) um; (c) dois; (d) três; (e) quatro. Fonte: SILVA J. O uso do Ensaio cometa para o ensino de genética toxicológica. *Genética na Escola*, v. 2, n. 2, pp. 30 – 33, 2007.

As técnicas de micronúcleo e ensaio cometa são realizadas e analisadas de maneira distinta, mas são complementares. Na Tabela 1, consta as principais diferenças entre as mesmas.

Tabela 1: Diferenças entre as técnicas de micronúcleo e ensaio cometa.

	<i>Micronúcleo</i>	Ensaio Cometa
Tipo de Alteração	Mutação cromossômica	Dano de DNA
Reparo	Não reparável	Reparável
Divisão Celular	Necessária	Não é necessária
Tempo de Exposição	Mediano/longo (dias/meses)	Curto/mediano (min/h)
Aneuploidia	Detecta	Não é possível

Fonte: Silva; Bernardo; Pegas Henriques, 2003.



## **2.3 Câncer**

Os cânceres humanos são, na sua maioria, de origem somática resultantes da interação de fatores ambientais, mas também podem ser genéticos. É uma doença cuja iniciação e progressão envolve passos nos quais o DNA acumula uma série de mutações. Estas alterações afetam diferentes passos nas vias que regulam os processos de proliferação, diferenciação e sobrevivência celulares<sup>4</sup>.

Apenas uma fração diminuta das células do corpo que sofreram mutações leva ao câncer. Existem diversas razões para isso: 1) a maioria das células mutadas tem menor capacidade de sobrevivência que as células normais; 2) apenas algumas das células mutadas que sobreviveram perdem os controles normais de feedback que impedem o crescimento excessivo; 3) as células que são potencialmente cancerígenas são, com grande frequência, destruídas pelo sistema imune do corpo, antes que possam formar um câncer<sup>22</sup>.

### **2.3.1 Tipos de Tumores**

A formação de um tumor é um processo complexo e frequentemente se estende por décadas. Células consideradas normais evoluem para células com fenótipos denominados neoplásicos por um processo chamado de progressão tumoral. Essa progressão é dirigida por uma sequência de mutações que ocorrem aleatoriamente e alterações epigenéticas do DNA que afetam os genes que controlam a proliferação, a sobrevivência celular e outras características associadas ao fenótipo celular maligno. Os tumores podem ser tanto benignos (localizados, não-invasivos) como malignos (invasivos, metastáticos)<sup>23</sup>.

Os tumores são classificados em dois grandes grupos de acordo com sua origem: tecido epitelial (carcinoma) e tecido não-epitelial (sarcomas; leucemia e linfomas; gliomas, blioblastomas e neuroblastomas). Os sarcomas derivam dos diversos tecidos conjuntivos; Leucemia e linfomas desenvolvem-se a partir de diversos tipos de células que constituem os tecidos formados de sangue; os gliomas, glioblastomas e neuroblastomas desenvolvem-se a partir de células que formam diversos componentes do sistema nervoso central e periférico<sup>23</sup>.

### **2.3.2 Câncer de Mama**

O câncer de mama é uma doença assintomática, relativamente raro antes dos 35 anos e acima desta faixa etária sua incidência cresce rápida e progressivamente<sup>5,6</sup>. O câncer identificado em estágios iniciais, através da mamografia, apresenta prognóstico mais favorável e elevado percentual de cura. O rastreamento é uma estratégia dirigida às mulheres na faixa etária em que o balanço entre benefícios e riscos do rastreamento é mais favorável, com maior impacto na redução da mortalidade<sup>24</sup>. Apesar disso, as taxas de mortalidade no Brasil continuam elevadas, provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados. Estima-se que em 2012 sejam diagnosticados no Brasil 52.680 novos casos. Na população mundial, a sobrevida média após cinco anos do tratamento é de 61%<sup>25</sup>.

O sintoma palpável do câncer de mama é o nódulo no seio, acompanhado ou não de dor mamária, podendo surgir alterações na pele que recobre a mama ou nódulos palpáveis na axila. Os fatores de risco incluem história familiar, idade, menarca precoce, menopausa tardia, ocorrência da primeira gravidez após os 30

anos, nuliparidade, ingestão regular de álcool e a exposição à radiação ionizante em idade inferior a 35 anos<sup>26</sup>.

Os carcinomas mamários são divididos em três grandes grupos denominados: ductal, lobular e tubular. O carcinoma ductal inicia nas células de revestimento dos ductos mamários. O carcinoma lobular, como o próprio nome diz inicia nos lóbulos. Os carcinomas ductal e lobular podem ser divididos em in situ (contido nos ductos) ou invasor (ducto é rompido atingindo os tecidos em volta). O carcinoma tubular é um tipo especial de carcinoma ductal, muito bem diferenciado. A lesão é composta por proliferação de túbulos glandulares de forma irregular<sup>26</sup>.

O diagnóstico é realizado através de mamografia, ressonância magnética ou ultrassonografia da mama. Os exames realizados pós-biópsia incluem cintilografia óssea, radiografia do tórax, tomografia computadorizada e ultrassom pélvico ou abdominal<sup>5</sup>.

Apesar da sua variedade, os tumores malignos seguem um curso biológico comum a todos, iniciado pelo crescimento e invasão local, seguindo pela invasão dos órgãos vizinhos e termina com a disseminação regional e sistêmica. A União Internacional Contra o Câncer (UICC) desenvolveu um sistema de estadiamento denominado Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos. Esta classificação tem como base a avaliação da dimensão do tumor primário (T), a extensão da disseminação em linfonodos regionais (N), e a presença ou não de metástases a distância (M), Tabela 2. Na interpretação de cada fator são analisadas as diversas variações de T, N e M, sendo que as suas combinações determinam os estádios clínicos da doença, Tabela 3<sup>1</sup>. Para o câncer de mama a classificação

clínica TNM é aplicável somente para carcinomas, tanto para mama feminina quanto masculina.

Tabela 2: Classificação dos tumores malignos de mama em relação à dimensão do tumor primário (T), extensão da disseminação em linfonodos regionais (N) e presença de metástases (M).

<i>T</i>		<i>Avaliação da dimensão do tumor primário (T)</i>	
<i>Tis</i>	Carcinoma <i>in situ</i>		
<i>T1</i>	Tumor com $\leq 2\text{cm}$	<i>T1mic</i>	Microinvasão de $\leq 0,1\text{ cm}$
<i>T2</i>	Tumor com $> 2,0\text{cm}$ até $5,0\text{cm}$		
<i>T3</i>	Tumor com $> 5,0\text{cm}$		
<i>T4</i>	Parede Torácica/pele		
<i>N</i>		<i>Extensão da disseminação em linfonodos regionais (N)</i>	
<i>N1</i>	Linfonodos axilares móveis		
<i>N2</i>	Linfonodos axilares fixos		
<i>N3</i>	Linfonodos infra-claviculares		
<i>M</i>		<i>Presença ou não de metástases a distância (M)</i>	
<i>MX</i>	Presença de metástase à distância não pode ser avaliada		
<i>M0</i>	Ausência de metástase à distância		
<i>M1</i>	Metástase à distância		

Fonte: Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. TNM: classificação de tumores malignos. 6. ed. - Rio de Janeiro: INCA, 254p, 2004.

Tabela 3: Agrupamento por estádios em relação à Classificação dos Tumores Malignos de mama.

<i>Estádio</i>	<i>T</i>	<i>N</i>	<i>M</i>
<i>0</i>	Tis	N0	M0
<i>I</i>	T1 (inclui T1mic)	N0	M0
<i>IIA</i>	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
<i>IIB</i>	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
<i>IIIA</i>	T0	N2	M0
	T1 (inclui T1mic)	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
<i>IIIB</i>	T4	N0, N1, N2	M0
<i>IIIC</i>	Qualquer T	N3	M0
<i>IV</i>	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. TNM: classificação de tumores malignos. 6. ed. - Rio de Janeiro: INCA, 254p, 2004.

### **3.3.3 Tratamento do Câncer de Mama**

O tratamento é realizado através de cirurgia, quimioterapia e radioterapia, separadamente ou em conjunto.

#### **3.3.3.1 Cirurgia**

Para a realização do tratamento, atualmente, é possível a realização de cirurgias menos radicais e que associadas à radioterapia e/ou quimioterapia, permitem a mesma chance de sobrevivência do que as cirurgias radicais<sup>27</sup>. A cirurgia depende do tamanho da mama e da localização do tumor. A cirurgia denominada setorectomia é realizada através da retirada apenas do nódulo em uma parte da mama (geralmente um quarto da mama). Esta cirurgia preserva a mama sem retirá-la na totalidade, ao contrário da mastectomia que retira a mama inteira e dos gânglios axilares.

O tratamento cirúrgico do câncer de mama pode ser aplicado com finalidade curativa ou paliativa. É considerado curativo quando indicado nos casos iniciais da maioria dos tumores sólidos. A ressecção curativa é aquela em que todo o câncer visível é removido e as margens cirúrgicas são microscopicamente livres de lesão. A finalidade paliativa reduz a população de células tumorais ou controla sintomas que põem em risco a vida da paciente ou comprometem a qualidade da sua provisão.

#### **3.3.3.2 Quimioterapia**

A quimioterapia antineoplásica consiste no emprego de substâncias químicas, isoladas ou em combinação, com o objetivo de tratar as neoplasias malignas. Os antineoplásicos atuam diretamente na célula, atuando nas diversas fases do ciclo celular. A quimioterapia é dividida de acordo com a sua finalidade e a dose dos

medicamentos é calculada através da superfície corporal (Body Surface Area – BSA), que envolve o peso (em quilograma) e a altura (em centímetros) da paciente<sup>28</sup>.

### 3.3.3.3 Radioterapia

A radioterapia é um método de tratamento capaz de destruir células tumorais, empregando feixes de radiação ionizante. Uma dose pré-calculada de radiação ionizante é aplicada, em um determinado tempo, a um volume de tecido que engloba o tumor. Esta dose busca erradicar todas as células tumorais, com o menor dano possível às células normais circunvizinhas, nas quais se fará a regeneração da área exposta<sup>29</sup>.

Pode-se dividir a radioterapia em: teleterapia e braquiterapia. Na teleterapia ou radioterapia externa, o equipamento fica afastado do paciente, mantendo distância da pele que varia de 1 centímetro a 1 metro, Figura 5(a). É utilizada para tratamento de lesão superficial, semiprofunda ou profunda, dependendo da qualidade da radiação ionizante gerada pelo equipamento. Na braquiterapia ou radioterapia de contato, o equipamento fica em contato com o organismo do paciente, Figura 5(b)<sup>30</sup>. Utilizam-se isótopos radioativos sob a forma de tubos, agulhas, fios, sementes ou placas que emitem radiação gama de diferentes energias<sup>6</sup>.

O paciente necessita manter seu posicionamento durante todo o tratamento para que a radiação ionizante atinja apenas a região necessária. Em alguns casos, pode ser confeccionado molde de gesso ou de plástico, como também, moldes de chumbo para proteção de tecidos e órgãos sadios adjacentes ao tumor<sup>30</sup>.



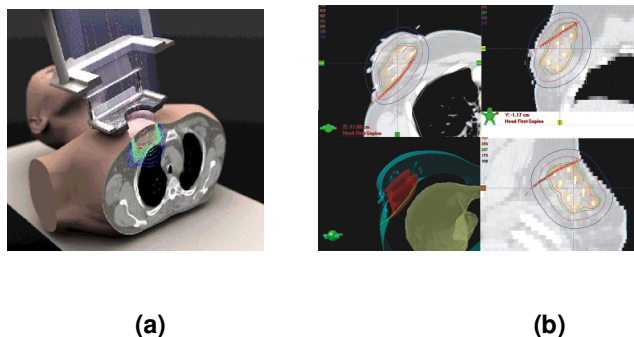


Figura 5: Esquema com: (a) Tratamento com teleterapia e (b) Tratamento com Braquiterapia. Fonte: <http://novastecnologiasaude.blogspot.com.br/2008/05/radioterapia-externa-teleterapia.html> e <http://www.radium.com.br/branquiterapia-alta-taxa-dose.php>

Para que a radiação ionizante atinja um maior número de células neoplásicas e a tolerância dos tecidos normais seja respeitada, a dose total de radiação ionizante a ser administrada é fracionada em doses diárias iguais. A velocidade da regressão tumoral representa o grau de sensibilidade que o tumor apresenta às radiações e depende fundamentalmente da origem celular, do grau de diferenciação, da oxigenação e da forma clínica de apresentação. A maioria dos tumores radiosensíveis são radiocuráveis. A curabilidade local só é atingida quando a dose de radiação ionizante aplicada é letal para todas as células tumorais, mas não ultrapassa a tolerância dos tecidos normais<sup>29, 30</sup>.

O tratamento radioterápico para o câncer de mama pode variar de acordo com o tamanho e localização do tumor. A teleterapia conservadora, tratamento utilizado neste trabalho, é composta por 25 sessões com dose de 200 cGy (2,0 Gy) até um total de 5000 cGy (50,0 Gy), seguido de reforço no quadrante afetado de mais 5 sessões de 200 cGy.

## 2.4 Bioética

A ética sempre se preocupou com o tema da vida e no século XX, alguns autores, como Albert Schweitzer, Fritz Jahr e Van Rensselaer Potter, propuseram questionamentos sobre o papel do ser humano, da vida, do lugar do ser humano na natureza<sup>31,32,33</sup>.

Albert Schweitzer, provavelmente motivado por sua formação religiosa, introduziu a discussão da sacralidade da vida em todas as suas dimensões. Fritz Jahr possivelmente foi o primeiro a utilizar a palavra bioética e propôs a ampliação da noção dos deveres dos seres humanos para com outros seres humanos, incluindo também para com os animais e as plantas<sup>34</sup>. Aldo Leopold e Hans Jonas ampliaram a abrangência temporal dos deveres dos seres humanos uns para com os outros, incluindo também as gerações futuras. Os dois autores propuseram que todos os seres vivos, mesmo os ainda não existentes, são merecedores de consideração. Aldo Leopold, na década de 1930, também criou a ética da terra. A proposta de Leopold ampliando a discussão feita por Jahr ao incluir, além das plantas e animais, o solo e demais recursos naturais como objeto de reflexão ética<sup>35,36</sup>.

Van Rensselaer Potter, no início da década de 1970, questionou se a possibilidade de sobrevivência da própria humanidade não dependeria de uma reflexão ética interdisciplinar que pudesse acompanhar a revolução científica, que poderia servir como uma “ponte para o futuro”<sup>37</sup>. Esta contribuição foi fundamental para a incorporação da bioética como a área de discussão sobre temas emergentes e relevantes para a vida, combinando ciência e filosofia.

A Bioética teve uma outra origem paralela em língua inglesa. Em 1970, André Hellegers propôs a rediscussão do foco da ética médica. A perspectiva tradicional baseada predominantemente na atuação do médico deveria ser ampliada para uma reflexão sobre temas da área da saúde, incluindo os aspectos sociais a eles associados<sup>38</sup>.

Estes autores deram os primeiros passos da bioética e inúmeros outros se sucederam<sup>38, 39</sup>. Em uma das suas definições, Clotet escreveu que a bioética é o estudo sistemático da conduta humana na área das ciências da vida e cuidado da saúde, enquanto essa conduta é examinada à luz dos valores e princípios morais<sup>40</sup>. A bioética também pode ser definida como uma reflexão complexa, compartilhada e interdisciplinar sobre a adequação das ações que envolvem a vida e o viver<sup>38</sup>. O tratamento com radioterapia se encaixa perfeitamente na questão que envolve a vida e o viver. A vida da paciente está em risco, mas o tratamento com radioterapia envolve o viver da mesma.

A partir do surgimento da bioética médica e principalmente nas últimas duas décadas, os problemas éticos da Medicina e das ciências biológicas explodiram em nossa sociedade com grande intensidade. Isto mudou as formas tradicionais de fazer e decidir utilizadas pelos profissionais da saúde. Constitui um desafio para a ética contemporânea providenciar um padrão moral comum para a solução das controvérsias provenientes das ciências biomédicas e das altas tecnologias aplicadas à saúde.

O tratamento do câncer de mama é recomendado às pacientes pelo seu médico. A paciente pode aceitar ou não todo o tratamento. A tomada de decisão baseia-se

em diversas habilidades da paciente como a possibilidade de se envolver com o assunto, compreender ou avaliar o tipo de alternativa e comunicar a sua preferência. As decisões podem ser tomadas através da voluntariedade, na qual o paciente faz a escolha tendo como base seu melhor interesse ou através de coerção, quando há possíveis pressões externas.

De acordo com Piaget, coerção é toda relação entre dois ou mais indivíduos na qual intervém um elemento de autoridade ou de prestígio e existe na medida que é sofrida (...) independente do grau efetivo de reciprocidade existente<sup>41</sup>. Coerção também pode ser definida de maneira puramente comportamental como o uso de uma ameaça para controlar o comportamento de outro. O ponto de vista que muitas vezes utilizado para justificar a coerção por vezes é justificada é referido como o paternalismo. A autoridade, seja ela estatal ou profissional médico, justifica o uso de ameaças e força com base no melhor interesse do indivíduo<sup>42</sup>.

#### **2.4.1 Escala de Percepção de Coerção**

O questionário de expressão de coerção é composto por cinco questões, com respostas do tipo concordo/discordo, com os seguintes temas: 1) Senti-me livre para fazer o que quisesse a respeito do meu tratamento; 2) Eu escolhi fazer o tratamento; 3) Foi minha a idéia de fazer o tratamento; 4) Tive bastante decisão sobre se eu faria o tratamento; 5) Tive mais influência do que qualquer outra pessoa sobre o fato de fazer ou não o tratamento. O escore do questionário varia de zero a cinco, sendo zero a ausência de expressão de coerção e cinco a máxima<sup>43</sup>.

### 2.4.2 Percepção de Risco

Potter sugere que a combinação das propriedades biológicas e culturais em sistemas vivos, tanto humanos como não-humanos, envolve um número enorme de eventos probabilísticos. É preciso dedicar mais atenção para o problema da ordem e desordem na nossa evolução cultural. Estes eventos probabilísticos são denominados de risco-benefício. As maneiras de lidar com estes eventos são diversas, podendo ser o risco expressado através do temor e o benefício através da esperança ou oportunidade<sup>44</sup>.

O conceito de risco pode ser associado à probabilidade de ocorrência de um evento indesejado e sua severidade<sup>45</sup>. Em relação a uma linha do tempo podemos dividir as situações em: temor do risco (passado), consciência do risco ou oportunidade do benefício (presente) e esperança do benefício (futuro)<sup>46</sup>.

A percepção de risco pode desenvolver-se depois de uma ação avaliação racional das possibilidades existentes executada pelo próprio indivíduo.

As características do risco que têm influência na percepção do próprio risco são: medo, controle, escolha, conscientização, confiança, entre outros. O temor é um exemplo claro daquilo que a pessoa pensa sobre um risco em termos de seus sentimentos intuitivos. Quanto mais consciente a pessoa estiver do risco, melhor é mais adequada será a sua percepção e conseqüente preocupação. Quanto mais confiança tiver nos profissionais que estão encarregados da aplicação do tratamento e sua proteção menos medo a paciente irá sentiremos. Quanto menos confiança sentirmos, maior será o nível de preocupação<sup>47</sup>.

O risco pode ser medido através de uma escala análogo-visual que varia de 0 a 100, Figura 6.

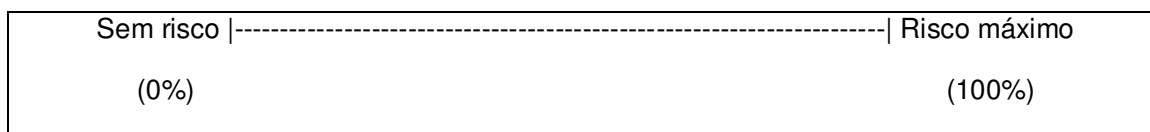


Figura 6: Escala análogo-visual de risco em relação ao tratamento com radioterapia das pacientes diagnosticadas com câncer de mama.

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivo principal**

Avaliar o índice de dano em células nucleadas do sangue periférico de pacientes diagnosticadas com câncer de mama em tratamento com radioterapia através das técnicas de micronúcleo e ensaio cometa.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Avaliar o índice de dano celular induzido pelo tratamento com radioterapia, por meio das técnicas de micronúcleo e ensaio cometa.

Avaliar a diferença verificada no índice do dano em células nucleadas do sangue periférico nos períodos imediatamente antes, durante e um mês após o tratamento com radioterapia.

Avaliar a percepção de risco e coerção das pacientes em relação ao seu tratamento com radioterapia.

#### 4 Referências bibliográficas

1. Silva J, Bernardo E, Pegas Henriques JA.. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, 2003.
2. Apresentação: Efeitos Biológicos da Radiação em Células – Parte I.  
Disponível em: <http://www.ipen.br/conteudo/upload/200610201946570>
3. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: Inca, 2011. 118 p.
4. O que é câncer? Disponível em: [http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?ID=322](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=322)
5. Câncer de Mama – INCA.  
Disponível em: [http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?ID=336](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=336).
6. Câncer de Mama – INCA. Disponível em:  
[http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/publicacoes/cancer\\_mama\\_2010.pdf](http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/publicacoes/cancer_mama_2010.pdf).
7. BRASIL. Portaria nº. 453 do Ministério da Saúde e Secretaria de Vigilância Sanitária, de 1º de junho de 1998. Diretrizes de proteção em radiodiagnóstico médico e odontológico. Diário Oficial da União, Brasília, 1998.
8. Attix FH. Introduction to Radiological Physics and Radiation Dosimetry, New York, NY: J. Wiley, 607 p., 1986.
9. Johns HE, Cunningham JR. Physics of Radiology. Springfield: C.C. Thomas, 796 p. 983.



10. Xavier AM, Moro JT, Heilbron PF. Princípios Básicos de Segurança e Proteção Radiológica. Terceira Edição, UFRGS, 2006.
11. Gomes RS. Condições do Meio Ambiente de Trabalho e Riscos da Exposição aos Raios X no Serviço de Radiodiagnóstico de um Hospital Público. Ministério do Trabalho e Emprego, 2002.
12. ICRP, 2007. Radiological Protection in Medicine. ICRP Publication 105. Ann. ICRP 37 (6).
13. Merchi IM. Modulação da Expressão de Genes de Reparo do DNA em Células Humanas Irradiadas com Raios Gama sob Diferentes Taxas de Dose. 2007, 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.
14. Agnoletto MH. *Estudo de Lesões e Reparo de DNA em Pacientes com Câncer de Mama e em Fibroblastos Humanos*. 2006, 102 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
15. Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research* 1985;147:29-36.
16. Fenech M., The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutat Res* 1997, 392: 11 – 18.
17. Fenech M, Crott JW, Micronuclei, nucleoplasmatic bridges and buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat Res* 2002, 504: 131 – 136.

18. Silva Valgôde FG. *Avaliação do Dano Radioinduzido, Capacidade de Reparo e Morte Celular em Células Humanas Tumorais (T-47D e MCF-7) e não Tumorais (MCF-10) de Mama*. 2008. 69 f. Dissertação (Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear-Aplicações) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia associada à Universidade de São Paulo, São Paulo.
19. Palazzo, R. P. ; Maluf, S. W. . Técnica micronúcleos com bloqueio da citocinese celular. In: Sharbel Weidner Maluf; Mariluce Riegel. (Org.). *Citogenética Humana*. Citogenética Humana. 1ed .Porto Alegre: Artmed, 2010, v. 1, p. 180 - 193.
20. Nadin SB, Vargas-Roig LM, Ciocca DR. A silver staining method for single-cell gel assay. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2001;49:1183-1186.
21. Bagatini P. B. ; Maluf, S. W. . Ensaio Cometa. In: Sharbel Weidner Maluf; Mariluce Riegel. (Org.). *Citogenética Humana*. Citogenética Humana. 1ed. Porto Alegre: Artmed, 2010, v. 1, p. 194 – 202.
22. Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica*. Rio de Janeiro: Elsevier, 11 ed, 2006.
23. Weinberg RA. *A biologia do câncer*. 1 ed, 864 p., Porto Alegre: Artmed, 2008.
24. Programa Nacional de Controle do Câncer de Mama. Disponível em: [http://www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/521d4900470039c08bd8fb741a182d6f/pncc\\_mama.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=521d4900470039c08bd8fb741a182d6f](http://www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/521d4900470039c08bd8fb741a182d6f/pncc_mama.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=521d4900470039c08bd8fb741a182d6f)
25. Tipos de Câncer – Mama – INCA. Disponível em: [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer\\_mama](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer_mama).

26. Freitas F, Menke CH, Rivoire WA, Passos EP. Rotinas em Ginecologia. 6ª Edição, Porto Alegre: Artmed, 2011.
27. Instituto Nacional de Câncer (Brasil). *Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço*. 3. ed. Rio de Janeiro: INCA, 628 p, 2008.
28. Dubois D, Dubois EF. "A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known." *Archives of Internal Medicine* 1916,17; 863 - 871.
29. Radioterapia – INCA. Disponível em:  
[http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=100](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=100).
30. Perguntas e Respostas Sobre Radioterapia.  
Disponível em: [http://www1.inca.gov.br/cancer/PDF/perguntas\\_rx.pdf](http://www1.inca.gov.br/cancer/PDF/perguntas_rx.pdf).
31. Albert Schweitzer. The Ethics of Reverence for Life.  
Disponível em: <http://www1.chapman.edu/schweitzer/sch.reading4.html>.
32. Jahr F. Bio=Ethik. Eine Umschau über die ethischen Beziehung des Menschen zu Tier und Pflanze. *Kosmos* 1927;24:2-4.
33. Potter VR. *Bioethics. Bridge to the future*. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1971:2
34. Albert Schweitzer, The Ethics of Reverence for Life.  
Disponível em: <http://www1.chapman.edu/schweitzer/sch.reading4.html>
35. Aldo Leopold, The Land Ethic.  
Disponível em: <http://home.btconnect.com/tipiglen/landethic.html>
36. Jonas, H. Técnica e responsabilidade: reflexões sobre as novas tarefas da Ética. In: *Ética, medicina e técnica*. Lisboa: Vega Passagens, 1994:27-62.

37. Potter VR. Bioethics. Bridge to the future. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1971:2.
38. Goldim JR. Bioética: Origens e Complexidade. Revista do HCPA, 2006, 26(2):86 – 92.
39. Goldim JR. Bioética complexa: uma abordagem abrangente para o processo de tomada de decisão. Revista da AMRIGS, 2009, 53(1):58-63.
40. Clotet J. Por que Bioética? Bioética, 1993, 1(1):13 – 19.
41. Protas JS. Adaptação da escala de percepção de coerção em pesquisa e da escala de expressão de coerção para procedimentos assistenciais em saúde. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
42. Stephen G. Post. Encyclopedia of Bioethics, 3rd ed, pp. 467 -470.
43. Gross CC, Gross JL, Goldim JR. Problemas Emocionais e Percepção de Coerção em Pacientes com Diabetes Tipo 2: um estudo observacional. Revista do HCPA, 2010, 30(4):430 – 434.
44. Potter VR. Humility with Responsibility - A Bioethic for Oncologists: Presidential Address. Cancer Research, 1975, 35:2297-2306.
45. Teixeira Navarro MV. Conceito de Controle de Risco à Saúde: Uma Abordagem de Vigilância Sanitária. Tese (Doutor em Saúde Pública) – Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2007.
46. Goldim JR. Ética e Pesquisa. Disponível em:  
<http://www.bioetica.ufrgs.br/pesq2004.ppt#1>.
47. Percepção de Risco. Disponível em:  
[http://www.opas.org.br/ambiente/risco/tutorial6/p/pdf/tema\\_04.pdf](http://www.opas.org.br/ambiente/risco/tutorial6/p/pdf/tema_04.pdf).

## 5 ARTIGO

### 5.1 Artigo 1

Micronucleus and comet assay techniques used to evaluate the index of cellular damage in patients treated with radiotherapy for breast cancer

F. R. Trindade, P. R. Figueiredo Ferreira, J. R. Goldim, S. W. Maluf, J. A. Cavalheiro, A. Bacelar, G. Schwartzmann

---

Breast cancer patients are becoming more curable, with a large number of long-term survivors. Factors affecting the quality and length of survival of patients include the consequences of radiation therapy. Micronucleus and comet assay techniques have been used to evaluate cellular damage in unilateral breast cancer patients treated with radiotherapy. We describe the results of a study of radiation effects in a series of breast cancer patients exposed to radiotherapy and healthy controls using the above mentioned techniques. Two sub-groups were analyzed. Eighteen breast cancer patients referred for radiotherapy were enrolled in a longitudinal study, and micronucleus and comet assay techniques were used to evaluate cellular damage in these patients. A single blood sample was collected from 18 healthy volunteers not exposed to radiotherapy or any form of ionizing radiation enrolled in a transversal study and the micronucleus assay was performed. The study was powered at 99%. A statistically significant difference was observed between samples collected before and after one month of radiotherapy using the micronucleus assay. A significant difference was also found in the detection of nucleoplasmatic bridges, while no difference was found in buds detection between the various treatment time-points. With the comet assay, a statistically significant difference was found between samples collected two weeks following the initiation of radiotherapy and at one month after its completion. These results deserve confirmation in a larger population.

---

**Key Words:** Radiotherapy, cell damage, Micronucleus assay, Comet assay,

Breast cancer is one of the most frequent types of malignancy in women in both developing and developed countries<sup>1</sup>. Radiotherapy is usually a key component of patient management<sup>2</sup>. As radiation damage is a well-recognized risk-factor for the development of acute and long-term complications of treatment, it is very important to estimate the potential effects caused by ionizing radiation in the genetic material of normal cells<sup>3</sup>.

Micronucleus assay detects the presence and the extent of chromosomal damage through the formation of little corpuscles in binucleated cells. This technique detects three nuclear alterations groups: micronuclei, buds and nucleoplasmatic bridges. The frequency of these fragments is analyzed in 100 binucleated lymphocytes for each individual<sup>4</sup>. Comet assay, or single-cell gel electrophoresis (SCGE), detects DNA lesions that may result in possibly correctable mutations. Analysis is done in a 100 cell sample and damage is ranged from 0 to 4, accordingly to tail intensity (size and shape)<sup>5</sup>. Both techniques are used to evaluate DNA damage caused by ionizing radiation exposure.

Previous studies have demonstrated that the above mentioned assays can be useful in the evaluation of DNA damage in breast cancer<sup>6,7</sup>. Peripheral lymphocytes<sup>8</sup> have been used as a source of DNA for genetic analysis. In our study, the amount of damage in peripheral lymphocytes of patients with breast cancer following radiotherapy was evaluated using micronucleus and comet assay techniques.

## **MATERIAL AND METHODS**

This study was approved by the Ethics and Research Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Prior to study enrollment, all participants were requested to sign an Informed Consent Form.

The sample sizes were calculated using the GraphPad StatMate 2.00 software. A minimum of 16 individuals was needed to detect a 10 percent variation in cells with micronuclei (with 100 cells analyzed) and a 50 percent variation in damage index measured with comet assay (with 100 cells analyzed). The statistical power was fixed at 99%.

Two sub-groups of individuals were analyzed. Eighteen female breast cancer patients referred for radiotherapy were enrolled in a longitudinal study. Micronucleus assay and comet assay were used to evaluate cellular damage in these patients.

In order to perform micronucleus assay, patients were submitted to three blood collections: 1) before the start of treatment, 2) at the end of treatment; and 3) one month after the completion of treatment. For the comet assay, patients underwent four blood collections: 1) before the start of treatment, 2) two weeks after treatment, 3) at the end of treatment; and 4) one month after the completion of treatment.

For the transversal study, a single blood sample was collected from 18 healthy volunteers not exposed to radiotherapy or any form of ionizing radiation (control group) and the micronucleus assay was performed.

The results obtained with these samples were then compared with the results of the first blood samples collected from patients enrolled in the

longitudinal study (drawn before the start of treatment). Participants in both studies were matched by age and smoking habits.

The radiotherapy equipment used for the treatment of breast cancer patients contained a photon beam with continuous spectrum and energy of 6 MV. Treatment consisted of 25 radiotherapy sessions with fractions of 200 cGy (2.0 Gy) to a total of 5000 cGy (50,0 Gy), plus an additional boost of 200 cGy (2.0 Gy) times 5 sessions to the affected quadrant. Thus, the total dose administered in the affected quadrant was 6000 cGy (60.0 Gy).

Results obtained with both techniques were analyzed with SPSS statistical package, version 18.0. Friedman and Dunn tests were used to analyze the results of the longitudinal study results. Results from the transversal study were analyzed with the Mann-Whitney test.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

With recent progresses in detection and therapy, breast cancer patients became more curable, with an increasing number of long-term survivors<sup>9</sup>. Factors affecting the quality of life and length of survival of patients include the consequences of radiation therapy. There is a robust body of evidence linking radiation exposure and carcinogenesis, especially from studies of survivors of atomic bomb irradiation<sup>10,11</sup>. Furthermore, it has been suggested that irradiation of surrounding tissues during breast radiotherapy can also lead to secondary malignancies<sup>12</sup>.

Medical oncologists agree that the benefits of radiotherapy outweigh the risks of developing subsequent cancers. However, these potential risks point to



the need for further studies into the means to reduce the radiation exposure to surrounding tissues.

Several factors may also contribute to the occurrence of secondary cancers in exposed individuals besides radiation-induced carcinogenesis, such as genetic predisposition, environmental exposure to carcinogens, reproductive factors and other treatment-related complications.

Temporal patterns underlying associations in the co-occurrence of cancers are useful in discerning the predominant etiology underlying these associations. Iatrogenic tumours resulting from the effects of treatment for a first cancer tend to develop some time after primary treatment. For cancers resulting from an exposure to radiation, solid tumors tend to occur after about 10 years, while leukemias may occur within 5 years from irradiation<sup>13</sup>.

Fortunately, there is a low overall risk of secondary malignancies following radiotherapy of breast cancer. This can be illustrated by the results of a large series including 33,763 patients who received breast irradiation, for which only 160 cases of secondary malignancy could be attributed to radiation exposure. Therefore, it is important to emphasize to the patients that in breast cancer the benefits of radiotherapy outweigh the risks of developing subsequent second cancers<sup>9</sup>.

In our study, patients included in the longitudinal sub-group had a mean age of 56.1 years, with a standard deviation of 11.7 years. The mean age of participants in the transversal study was 52.5 years with a standard deviation of 23.8 years.

Of the 18 patients diagnosed with breast cancer, 6% were smokers and 72% had relatives with a previous history of cancer. The most frequent treatment given to these patients was a combination of surgery, chemotherapy and radiotherapy (44.4%). Radiotherapy was always the last treatment modality applied to the patients. Eighty-three percent of the patients had ductal carcinoma and 38.9% were classified as stage IIIA (Table 1).

TABLE 1: Frequency and percentage of different treatments, tumor types and TNM score of patients diagnosed with breast cancer.

Treatment	Frequency (N)	Percentage (%)
Surgery, chemotherapy and radiotherapy	8	44.4
Surgery and radiotherapy	7	38.9
Chemotherapy and radiotherapy	3	16.7
Tumor Type	Frequency (N)	Percentage (%)
Ductal	15	83.3
Lobular	2	11.1
Tubular	1	5.6
TNM score	Frequency (N)	Percentage (%)
0	1	5.6
I	3	16.7
IIA	3	16.7
IIB	1	5.6
IIC	2	11.1
IIIA	7	38.9
IIIB	1	5.6

A daily ionizing radiation dose of 200 cGy was received by 94% of the patients included in the study. By the time the second blood sample was drawn

for the comet assay, patients had received a median dose of 2200 cGy (median of 11 sessions), while at the third blood collection (for the comet assay and micronucleus assay) patients had already received 4800 cGy (median of 24 sessions).

The time between first and second blood samples collection varied from 19 to 176 days. Three patients received chemotherapy before radiotherapy, but this treatment was discontinued several days before the start of irradiation and did not interfere with the results. Between the second and third blood collections, the time varied from 14 to 30 days, while between the third and fourth collection it varied from 16 to 161 days.

No statistical difference was observed between the two groups in the results obtained with the micronucleus assay. Using the same technique, a statistically significant difference was observed between samples collected before and after one month of radiotherapy treatment.

No difference was found in terms of buds detection using micronucleus assay between the various treatment time-points. However, a significant difference was found in the detection of nucleoplasmatic bridges.

With the comet assay, a statistically significant difference was found between blood collections 2 and 4, (Table 2 and Table 3). Table 4 shows the differences founded in the index of cell damage evaluated with the comet assay. A statistically significant difference was also found between samples collected before and after one month of radiotherapy treatment as regards to the micronuclei detection.

TABLE 2: Medians of micronucleus assay and comet assay in the different sample collections of patients.

Sample	Micronucleus			Comet Assay
	Micronuclei	Buds	Nucleoplasmatic bridges	
	Median			Median
Longitudinal Study (Patients)				
1	4.5	0.0	0.0	3.5
2	-	-	-	11.0
3	14.5	0.0	0.0	4.0
4	10.0	0.0	0.0	6.0
p	0.0	0.062	0.011	0.013
Transversal Study (Control Group)				
1	3.0	0.0	2.0	-
p*	0.468	0.468	0.468	-

p\* Data compared only to sample 1.

- Comet assay was not performed at this time.

TABLE 3: P value to different sample collecting times of patients.

Sample	Micronucleus			Comet assay
	Micronuclei	Buds	Nucleoplasmatic bridges	
1 – 2	-	*	-	0.059
1 – 3	0.000	*	0.368	1.000
1 – 4	0.059	*	1.000	1.000
2 – 3	-	*	-	0.560
2 – 4	-	*	-	0.018
3 – 4	0.200	*	0.368	1.000

- There is no sample at this time for that technique.

\* Test result was non-significant.

TABLE 4: Comet assay – median of each damage (0 to 4) at each sample collected time.

Sample	Comet Assay			
	Damage 1	Damage 2	Damage 3	Damage 4
	Mediana			
1	3.0	0.0	0.0	0.0
2	9.0	1.0	0.0	0.0
3	3.5	0.0	0.0	0.0
4	4.5	0.0	0.0	0.0

This result shows that radiotherapy treatment induced cell damage. The trend towards significance between blood collections performed before and after treatment deserves confirmation in a larger population.

Regarding the comet assay, a significant difference was found between blood collections performed two weeks after the start of treatment and its completion, demonstrating the effect of DNA repair.

Data analysis from the transversal study demonstrated no differences between control subjects and patients before radiotherapy. Both studies had non-parametric results, demonstrating that repair system varies from person to person. This occurred both in patients with breast cancer submitted to radiotherapy and in healthy volunteers not exposed to ionizing radiation.

The observation of a higher micronuclei frequency during radiotherapy was previously reported<sup>14,15</sup>. Other studies using micronucleus assay and comet assay found similar results, showing not only an increased cell damage after the start of radiotherapy, but also that biological effects varied between patients<sup>16</sup>.

Radiation therapy involves patient exposure to a high dose of ionizing radiation and this is the reason why fractionated doses are used. The total dose and number of areas to be irradiated in each patient are predefined to reach the majority of the tumor with the lower volume of healthy tissue as possible, to minimize the biological effect to the patient. It is known that some patients have skin damage in various different grades at treatment ending<sup>17</sup>. These tissue reactions are caused by the high dose administered, but are not easily visible at the cell level.

Studies using these techniques in the evaluation of medical exposure to ionizing radiation cannot be directly compared to our results because different energy and beam types are used, leading to potentially distinct biological effects. Furthermore, other studies showed that not only cells exposed to radiation can be damaged, but also cells not directly irradiated.

About half of the patients with cancer are treated with radiation therapy sometime during the course of the disease. Technical advances in beam precision and imaging have improved the therapeutic ratio and accuracy of modern radiotherapy. However, damage to normal tissues near the tumor leads to radiation induced injury that develops immediately and continues long after the exposure to radiation has occurred<sup>18</sup>. If DNA damage occurs in regions containing important genetic information, there is risk of the occurrence of secondary malignancies. This happens because mutations can be accumulated in the DNA, modifying signaling from pathways that regulate cell proliferation, differentiation and cell death<sup>19</sup>.

**REFERENCES**

1. O. M. Ginsburg, R. R. Love. Breast cancer: a neglected disease for the majority of affected women worldwide. *Breast J.* 2011 May-Jun; 17(3): 289–295.
2. S. W. Maluf. Monitoring DNA damage following radiation exposure using cytokinesis–block micronucleus method and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Clinica Chimica Acta*, **347**, 15 – 24 (2004).
3. M. Fenech, A. A. Morley. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research*, **147**, 29 – 36 (1985).
4. M. Fenech. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutation Research*, **392**, 11 – 18 (1997).
5. M. Fenech, J. W. Crott. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutation Research*, **504**, 131 – 136 (2002).
6. W. U. Muller, T. Bauch, C. Streffer, D. V. Mallek. Does radiotherapy affect the outcome of the comet assay? *The British Journal of Radiology*, **75**, 764 – 771 (2002).
7. G. C. Jagetia, A. Jayakrishnan, D. Fernandes, M. S. Vidyasagar. Evaluation of micronuclei frequency in the cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients before and after radiation treatment. *Mutation Research*, **491**, 9 – 16 (2001).
8. M. Gamulin, N. Kopjar, M. Grgić, Ramić S, Viculin T, Petković M, Garaj-Vrhovac V. Cytogenetic follow-up in testicular seminoma patients exposed to

- adjuvant radiotherapy. *Collegium Antropologicum*, **34**, Issue 2, 455 – 465 (2010).
9. R. Roychoudhuri, H. Evans, D. Robinson, H. Moller. Radiation-induced malignancies following radiotherapy for breast cancer. *Br J Cancer*. **91**, Issue 5, 868–872 (2004).
  10. D. L. Preston, Y. Shimizu, D. A. Pierce, A. Suyama, K. Mabuchi. Studies of mortality of atomic bomb survivors. Report 13: Solid cancer and noncancer disease mortality: 1950–1997. *Radiat Res.*, **160**, 381–407 (2003).
  11. C. E. Land, M. Tokunaga, K. Koyama, M. Soda, D. L. Preston, *et. al.* Incidence of female breast cancer among atomic bomb survivors, Hiroshima and Nagasaki, 1950-1990. *Radiat Res.*, **160**, Issue 6, 707-717 (2003).
  12. M. Henni, D. Ali. Radiation induced side effects. *Rev Prat.*, **62**, Issue 4. 461-466 (2012).
  13. A. Kimura. Radiation associated leukemia and myelodysplastic syndrome. *Nihon Rinsho.*, **70**, Issue 3, 431-435 (2012).
  14. T. K. Lee, R. R. Allison, K. F. O'Brien, J. L. Naves, U. L. Karlsson, A. L. Wiley. Persistence of micronuclei in lymphocytes of cancer patients after radiotherapy. *Radiation Research*, **157**, Issue 6, 678 – 684 (2002).
  15. E. M. Minicucci. Avaliação dos efeitos citogenéticos e citopatológicos da radioterapia em pacientes com tumores malignos de cabeça e pescoço. Dissertação (Mestre em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.
  16. W. F. Morgan, M. B. Sowa. Effects of ionizing radiation in nonirradiated cells. *PNAS*, **102**, Issue 40, Commentary, 14127–14128 (2005).



17. K. Tsujino, K. Kashihara, S. Kotani, *et. al.* A Survey of Patients with Inflammatory Skin Recurrence Corresponding to the Area of Previous Irradiation after Postoperative Radiotherapy for Breast Cancer. *Journal of Radiation Research*, **52**, 797–803 (2011).
18. Boice JD Jr, Day NE, Andersen A, Brinton LA, Brown R, Choi NW, Clarke EA, Coleman MP, Curtis RE, Flannery JT, *et al.* Second cancers following radiation treatment for cervical cancer. An international collaboration among cancer registries. *J Natl Cancer Inst.*, **74**, Issue 5, 955-975 (1985).
19. Neugut AI, Weinberg MD, Ahsan H, Rescigno J. Carcinogenic effects of radiotherapy for breast cancer. *Oncology*. **13**, 1245–1256 (1999).

Este artigo será enviado para a Revista *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. O site desta revista não informa a documentação necessária para o manuscrito ser enviado para publicação, por esta razão, mandamos um e-mail e estamos aguardando retorno. O modelo foi baseado nos manuscritos já publicados na revista.

## 5.2 Artigo 2

### Avaliação da Percepção de Risco e Coerção de Pacientes Diagnosticadas com Câncer de Mama em Relação ao seu Tratamento com Radioterapia

Fernanda Rocha da Trindade; Gilberto Schwartzmann; José Roberto Goldim

#### RESUMO

**Objetivo:** Avaliar a percepção de risco e coerção de pacientes diagnosticadas com câncer de mama em relação ao seu tratamento com radioterapia. **Métodos:** Foram selecionadas 19 pacientes diagnosticadas com câncer de mama e indicadas a tratamento com radioterapia. Durante a segunda semana de tratamento com radioterapia foi aplicado um questionário com a Escala de Percepção de Coerção e uma escala análogo-visual de percepção de risco em relação ao seu tratamento com radioterapia. **Resultados:** Em relação ao histórico de câncer na família, 68% (n = 13) das pacientes possuíam histórico familiar. Em relação à escolaridade, todas as pacientes eram alfabetizadas e a maioria (42,1%) estudou até o ensino fundamental. A percepção de coerção, que pode variar de 0 a 5, obteve um valor médio de 0,79, com desvio padrão de 0,91. O intervalo de confiança foi de 0,38 – 1,2. Quanto a percepção de risco em relação ao seu tratamento, as pacientes tiveram um risco médio de 5,4% e um desvio padrão de 11,9%. **Conclusões:** Com base na avaliação das percepções de coerção e de risco, em relação a radioterapia, na amostra de 19 pacientes diagnosticadas com câncer de mama foi possível verificar que: 1) A percepção de risco obteve valores baixos, sendo que na maioria da amostra (42,1%) o risco percebido foi igual a zero; 2) A percepção de coerção obteve o menor valor médio até o presente momento em amostras assistenciais. A maioria das pacientes (47,4%) obteve uma percepção de coerção igual a zero.

Unitermos: Radioterapia, Coerção, Risco.

## INTRODUÇÃO

Em 2012, estima-se 52.680 casos novos de câncer de mama no Brasil, com um risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres. Esse tipo de câncer é o mais frequente nas mulheres das regiões Sudeste, Sul, Centro-Oeste e Nordeste, sem considerar os tumores tipo não melanoma de pele<sup>1</sup>. O tratamento do câncer de mama pode ser realizado através de cirurgia, quimioterapia e/ou radioterapia – combinados ou separadamente. A radioterapia é um tratamento capaz de destruir células tumorais utilizando uma fonte emissora de feixes de alta energia de radiação ionizante, procurando preservar ao máximo as estruturas normais que circundam o tumor. O tratamento com radioterapia, como toda a exposição à radiação ionizante, oferece um benefício e um risco as pacientes. O encaminhamento a qualquer tratamento é realizado pelo médico, mas necessita do consentimento das pacientes, que pode ser influenciado pelos riscos, benefícios e coerção associados.

É amplamente concordado que as pessoas têm problemas no processamento de informações sobre os riscos e que estes problemas podem introduzir erros inferenciais e desproporcionais exageros na percepção de riscos na tomada de opções<sup>2</sup>. A definição de risco engloba uma variedade de medidas de probabilidades incluindo aquelas baseadas em dados estatísticos ou em julgamentos subjetivos, como por exemplo: probabilidade de ocorrência de um evento desfavorável<sup>3</sup> e perigo potencial de ocorrer uma reação adversa à saúde das pessoas expostas a ele<sup>4</sup>. O risco percebido pela paciente muitas vezes não é mensurado ou conhecido, pois a noção de risco é ambígua, sendo desta forma, superestimada ou subestimada<sup>5</sup>.

A coerção pode resultar tanto por alguém atraído para fazer algo que não queria fazer ou impedir que alguém faça algo que queira fazer<sup>2</sup>. A coerção é justificada por vezes sob o ponto de vista do paternalismo. No paternalismo a autoridade, seja ela estatal ou profissional médico, justifica o uso de ameaças e força com base no melhor interesse do indivíduo. Alguns pensadores argumentam que a coerção é inerentemente um julgamento moralizado que só pode ser compreendido no contexto normativo em que é realizada<sup>5</sup>. O objetivo deste trabalho é avaliar a percepção de risco e coerção de pacientes diagnosticadas com câncer de mama em relação ao seu tratamento com radioterapia.

## **MÉTODO**

Foram selecionadas 19 pacientes, com idade entre 34 e 74 anos (média de 55,8 anos e desvio padrão de 11,4 anos), todas com diagnóstico de câncer de mama e em tratamento com radioterapia. Além da radioterapia, o tratamento das pacientes também envolvia cirurgia e/ou quimioterapia. Das 19 pacientes, 7 realizaram cirurgia combinada com radioterapia, 3 pacientes realizaram quimioterapia combinada com radioterapia e 9 realizaram a combinação dos três tratamentos em sequência (cirurgia, quimioterapia e radioterapia). Em todos os tratamentos a radioterapia é a última etapa.

No momento em que era marcada a primeira consulta, todas as pacientes recebiam um Manual para pacientes em Radioterapia. Este manual contém a apresentação do Centro de Radioterapia, explicação do que é Radioterapia, a equipe de profissionais que trabalham neste Centro, quais são as etapas envolvidas no tratamento, o grau de segurança da Radioterapia e os efeitos indesejáveis. Os

riscos são mencionados como risco de efeitos colaterais envolvidos no tratamento. Alguns efeitos indesejáveis são mencionados, mas não são relacionados com risco. Para a mama estes efeitos indesejáveis são: inchaço, desconforto, discreto vermelhidão e ressecamento da pele. Também é mencionado que esses fenômenos, algumas vezes, desconfortáveis, podem surgir apesar de todas as precauções técnicas adotadas para minimizá-los e variam de intensidade de pessoa a pessoa.

O processo de consentimento foi realizado antes das pacientes iniciarem o tratamento com radioterapia. Na segunda semana de tratamento as pacientes responderam a um questionário contendo: idade, escolaridade, histórico de câncer na família, escala de percepção de risco e escala de percepção de coerção em relação ao seu tratamento com radioterapia. Em nenhum momento da pesquisa revelou-se o nome das pacientes, sendo as mesmas identificadas por códigos (RT N°X), de acordo com a aceitação em participar da pesquisa.

A percepção de coerção foi medida através de um questionário denominado Escala de Percepção de Coerção, que pode apresentar uma variação de 0 a 5 pontos<sup>6</sup>. Esta escala é composta por cinco questões, com respostas do tipo concordo/discordo. Os temas selecionados para esta pesquisa foram: Senti-me livre para fazer o que quisesse a respeito do meu tratamento; Eu escolhi fazer o tratamento; Foi minha a idéia de fazer o tratamento; Tive bastante decisão sobre se eu faria o tratamento; Tive mais influência do que qualquer outra pessoa sobre o fato de fazer ou não o tratamento.

A percepção de risco foi quantificada através da Escala Análogo-Visual de Risco que varia de 0% (sem risco) a 100% (risco máximo), como ilustra a Figura 1. Cada paciente, deveria marcar um risco vertical entre 0% e 100%, dependendo da sua percepção de risco em relação ao tratamento com radioterapia.

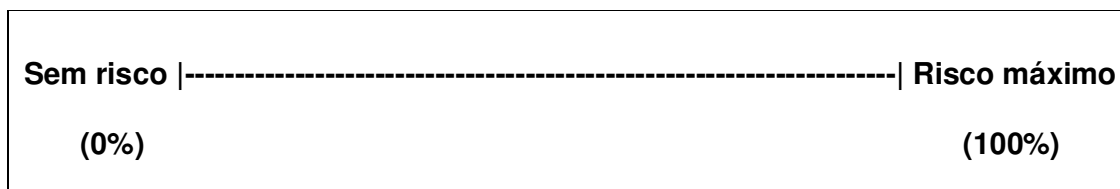


Figura 1: Escala de Percepção de Risco. A escala mede 10 centímetros.

A análise dos resultados foi realizada através do cálculo de médias, desvios padrão, frequência e percentual dos dados obtidos nos questionários respondidos pelas pacientes.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEP/HCPA), com o protocolo 10-0408.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Em relação ao histórico de câncer na família, 68% (n = 13) das pacientes possuíam histórico familiar. Foram relatadas, como sendo portadoras deste tipo de diagnóstico, 18 diferentes pessoas com seis diferentes vínculos familiares, sendo o mais frequente o relativo aos Tios e Tias (Tabela 1).

Tabela 1: Histórico de câncer das 13 pacientes diagnosticadas com câncer de mama realizando tratamento com radioterapia.

ID	Parentesco	Tipo
RT 6	Mãe	Esôfago
RT 1	Pai	Garganta
RT 12	Pai	Fígado
RT 18	Pai	Rim
RT 3	Irmã	Ovário
RT 11	Irmã	Mama
RT 17	Irmão	Garganta
RT 21	Avô	Esôfago
RT 7	Tia e Tia	Colo do útero e Intestino
RT 8	Tia avó e Avó	Mama e Fígado
RT 9	Tia e Prima 2º grau	Língua e Estômago
RT 10	Tia e Sobrinho	Estômago e Tireóide
RT 19	Tio e Irmão	Pulmão e Próstata; Fígado

Em relação à escolaridade, todas as pacientes eram alfabetizadas e a maioria (42,1%) estudou até o ensino fundamental (Tabela 2). O padrão de escolaridade da amostra é semelhante ao da população atendida nos ambulatórios do HCPA<sup>7</sup>.

Tabela 2: Escolaridade das pacientes que participaram deste estudo.

Escolaridade	Frequência (n)	Percentual (%)
Não alfabetizada	0	0,0
Ensino Fundamental (primário/1º grau)	8	42,1
Ensino médio (ginásio/2º grau)	6	31,6
Ensino superior (faculdade)	5	26,3
Pós-graduação (mestrado/doutorado)	0	0,0

A percepção de coerção, que pode variar de 0 a 5, obteve um valor médio de 0,79, com desvio padrão de 0,91. O intervalo de confiança foi de 0,38 – 1,2 (Tabela 3).

Tabela 3: Frequência e Percentual de Coerção das Pacientes.

	Frequência (n)	Percentual (%)
Sem Coerção (0)	9	47,4
Coerção Muito Baixa (1)	6	31,6
Coerção Baixa (2)	3	15,8
Coerção Média (3)	1	5,3
Coerção Alta (4)	-	-
Coerção Muito Alta (5)	-	-
Total	19	100,0



Todas as pacientes foram unânimes ao concordar com duas questões: “Senti-me livre para fazer o que quisesse a respeito do meu tratamento” e “Tive mais influência do que qualquer outra pessoa sobre o fato de fazer ou não o tratamento”. Algumas pacientes discordaram nas três questões restantes: 21% na questão “Eu escolhi fazer o tratamento”, 53% na questão “Foi minha a idéia de fazer o tratamento” e 5% na questão “Tive bastante decisão sobre se eu faria o tratamento” (Tabela 4).

Tabela 4: Respostas a cada um dos cinco itens da Escala de Percepção de Coerção com relação ao tratamento com radioterapia (n=19).

<i>Coerção Percebida</i>	<i>Sim</i>	<i>Não</i>
Senti-me livre para fazer o que quisesse a respeito do meu tratamento	100%	0%
Eu escolhi fazer o tratamento	79%	21%
Foi minha a ideia de fazer o tratamento	47%	53%
Tive bastante decisão sobre se eu faria o tratamento	95%	5%
Tive mais influência do que qualquer outra pessoa sobre o fato de fazer ou não o tratamento	100%	0%

As Pacientes 4 e 19 discordaram de duas questões (“Eu escolhi fazer o tratamento” e “Foi minha a idéia de fazer o tratamento”), as duas relataram ter feito tudo que o médico recomendou (cirurgia, quimioterapia e radioterapia). A paciente 4 salientou que avisou o marido que se ele quisesse até poderia separar-se dela, mas ela seguiria até o final do tratamento. A Paciente 19 relatou que não escolheu ter câncer e por isso discordou das duas questões. São duas explicações diferentes

para um mesmo tipo de resposta. A paciente 4 tendo por base a determinação para se tratar e a 19 pela imposição da doença sobre a sua escolha.

As Pacientes 8 e 13 discordaram de uma das questões (“Foi minha a idéia de fazer o tratamento”). A Paciente 8 relatou que a ideia de fazer o tratamento foi do médico e a Paciente 13 destacou que o tratamento foi sugestão do médico, salientou que tudo foi sugestão.

Quanto a percepção de risco em relação ao seu tratamento, as pacientes tiveram um risco médio de 5,4% e um desvio padrão de 11,9%. Devido a distribuição assimétrica dos dados a melhor medida descritiva é a mediana, que é de 0,3%. O maior valor atribuído ao risco foi de 43,3%, assinalado por apenas uma paciente, e o valor mais frequente foi de risco igual a zero, com oito participantes (Figura 2). A maioria das pacientes, 84% da amostra, teve uma percepção de risco que não ultrapassou 10% (Tabela 5). Vale lembrar que todas as pacientes receberam o Manual para Pacientes em Radioterapia. Neste material não há uma quantificação dos riscos associados.

A Paciente 15 relatou que a radioterapia não apresentava riscos, mas observou a ocorrência de algumas reações, após o início do tratamento, relacionando-as aos procedimentos terapêuticos. A Paciente 14, que assinalou que a sua percepção de risco era de 43,3% teve uma percepção de coerção igual a zero. A justificativa da escolha da paciente por este valor para a percepção de risco foi a aproximação ao ponto médio da escala, como forma de destacar que o risco pode ou não ocorrer.

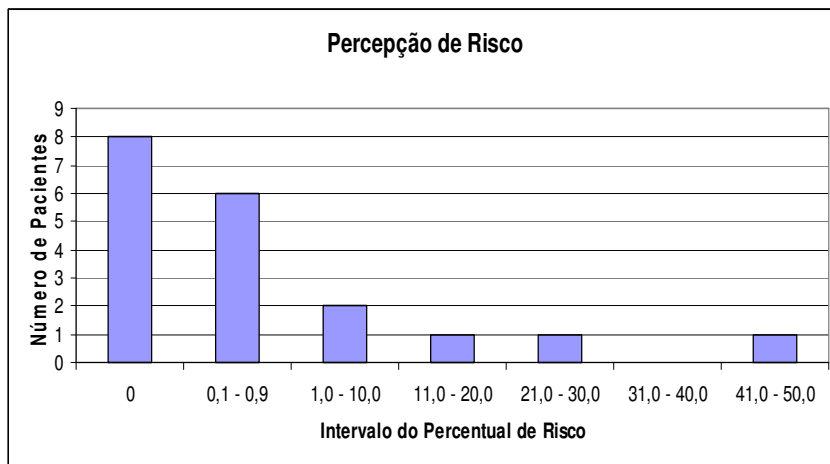


Figura 2: Percepção de Risco das pacientes diagnosticadas com câncer de mama em tratamento com radioterapia.

Tabela 5: Percepção de Risco das pacientes diagnosticadas com câncer de mama e submetidas a tratamento com radioterapia (n=19).

Risco Percebido	n	Frequência relativa (%)	Frequência cumulativa (%)
0,0	8	42	42
0,2	1	5	47
0,3	2	11	58
0,4	2	11	68
0,5	1	5	74
3,1	1	5	79
8,2	1	5	84
16,3	1	5	89
29,9	1	5	95
43,3	1	5	100
Total	19	100	-

## DISCUSSÃO

Os dados obtidos evidenciam que as pacientes da presente amostra tiveram liberdade para optar entre se tratar ou não, pois relataram baixa percepção de coerção associada. Em outros dois estudos utilizando o mesmo instrumento para avaliar a coerção associada, os pacientes com indicação para tratamento em cuidados paliativos tiveram um valor médio de 1,56, com intervalo de confiança de 1,10 a 2,01<sup>8</sup>, e os pacientes em tratamento ambulatorial a média foi de 0,95, com intervalo de confiança de 0,78 a 1,12<sup>9</sup>. A comparação destes dados permite

identificar que a percepção de coerção na amostra de mulheres em tratamento com radioterapia foi a menor até agora obtida.

Em diversos estudos realizados, a lembrança dos riscos associados aos procedimentos foi sempre inferior a dos benefícios e dos procedimentos realizados<sup>10, 11</sup>.

## **CONCLUSÃO**

Com base na avaliação das percepções de coerção e de risco, em relação a radioterapia, na amostra de 19 pacientes diagnosticadas com câncer de mama foi possível verificar que:

- a) A percepção de risco obteve valores baixos, sendo que na maioria da amostra (42,1%) o risco percebido foi igual a zero;
- b) A percepção de coerção obteve o menor valor médio até o presente momento em amostras assistenciais. A maioria das pacientes (47,4%) obteve uma percepção de coerção igual a zero.

Esta baixa percepção de coerção evidencia que as pacientes tiveram liberdade para optar pelo tratamento proposto pela equipe assistencial com reduzida pressão de fatores externos. Por outro lado, a igualmente baixa percepção de risco associada ao tratamento pode ser devida a dois fatores: a subestimativa dos riscos em relação aos benefícios esperados, e a ausência de quantificação dos riscos nos materiais informativos distribuídos às pacientes.

A aceitação, com reduzida pressão externa, da realização de radioterapia pelas pacientes portadoras de câncer de mama pode sugerir que houve

entendimento da necessidade deste tratamento, com ênfase nos benefícios e não nos riscos associados.

### **Referências**

1. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: Inca, 2011. 118 p.
2. Faden RR, Beauchamp, TL. A history and theory of informed consent. *New York: Oxford. Oxford University Press*, 1986
3. Kennedy Institute of Ethics. Bioethics Thesaurus. Washington: Georgetown, 1995:44.
4. Cox LA jr. Risk Analysis: foundations, models and methods. Boston: Kluwer, 2002.
5. Post SG. Encyclopedia of bioethics. Macmillan, 3rd ed,. 2004.
6. Gross CC, Gross JL, Goldim JR. Problemas Emocionais e Percepção de Coerção em Pacientes com Diabetes Tipo 2: um estudo observacional. *Revista do HCPA*, v. 30, n. 4, pp. 430 – 434, 2010.
7. Bittencourt VC, Araujo D, Protas J, Silva CAM, Goldim JR. Processo de Consentimento e Alfabetismo Funcional. *Revista do HCPA*, 27(Supl 1):273, 2007.

8. Vieira, RW. Bioética, cuidados paliativos e qualidade de vida: a importância do processo de tomada de decisão. 2010. Dissertação (Medicina: Ciências Médicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
9. Protas, JS. Adaptação e validação da escala de percepção de coerção em pesquisa e em assistência. 2010. Dissertação (Medicina: Ciências Médicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
10. Francisconi, CF. O Processo de obtenção do Consentimento Informado em situações de prática endoscópica e em atendimento clínico no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. 2003. Tese (Ciências em Gastroenterologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
11. Goldim JR, Clotet J, Ribeiro JP. Adequacy of informed consent in research carried out in Brazil. *Eubios Journal of Asian and International Bioethics*,17:177–80, 2007.

Este artigo foi enviado para a Revista da Associação Médica Brasileira. O manuscrito já foi submetido à revista e no momento está sendo avaliado pelo editor.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em relação ao estudo com delineamento longitudinal, houve uma diferença significativa (aumento) na análise dos dados referente à técnica de micronúcleo com tipo de alteração nuclear de micronúcleo entre as coletas realizadas antes e após um mês de tratamento com radioterapia. Em relação à parte clínica, sabe-se que o objetivo do tratamento com radioterapia é causar um dano ou efeito biológico no tumor, mas ao mesmo tempo, uma parte ao seu redor pode ser afetada por essa dose pré-calculada pelo Físico Médico. O resultado mostrou exatamente isso, no final do tratamento houve um aumento de micronúcleos e após o tratamento esse resultado não se manteve significativo. Pode-se concluir que houve reparo celular, evidenciado também através da técnica ensaio cometa, pois houve uma diferença significativa (diminuição) entre as coletas realizadas duas semanas após o início da radioterapia e no final do tratamento com radioterapia.

A análise dos dados referente ao estudo com delineamento transversal, na qual as pacientes foram pareadas por idade e hábito tabagista com participantes sem câncer não foi significativa. Este resultado mostrou que o que interferiu nos resultados das pacientes foi à exposição à radiação ionizante referente ao tratamento com radioterapia e não o seu câncer de mama.

Os resultados dos dois estudos foram não paramétricos, mostrando que o sistema de reparo celular varia de pessoa para pessoa, inclusive, isto se repetiu com as participantes que não foram expostas à radiação ionizante e não possuem câncer de mama.



Através dos dados obtidos em relação ao estudo envolvendo a percepção de coerção e de risco das pacientes em relação ao seu tratamento com radioterapia, na amostra de 19 pacientes diagnosticadas com câncer de mama foi possível verificar que:

- a) A percepção de risco obteve valores baixos, sendo que na maioria da amostra (42,1%) o risco percebido foi igual a zero;
- b) A percepção de coerção obteve o menor valor médio até o presente momento em amostras assistenciais. A maioria das pacientes (47,4%) obteve uma percepção de coerção igual a zero.

Esta baixa percepção de coerção evidencia que as pacientes tiveram liberdade para optar pelo tratamento proposto pela equipe assistencial com reduzida pressão de fatores externos. Por outro lado, a igualmente baixa percepção de risco associada ao tratamento pode ser devida a dois fatores: a subestimativa dos riscos em relação aos benefícios esperados, e a ausência de quantificação dos riscos nos materiais informativos distribuídos às pacientes.

A aceitação, com reduzida pressão externa, da realização de radioterapia pelas pacientes portadoras de câncer de mama pode sugerir que houve entendimento da necessidade deste tratamento, com ênfase nos benefícios e não nos riscos associados.

## 7 APÊNDICE

### Apêndice A.: Escala de Coerção aplicada nas pacientes submetidos a tratamento com radioterapia.

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

ANO                      MÊS                      DIA                      L                      COLET.                      SUJ.

SEXO: ( ) F

IDADE: \_\_\_\_ ANOS

ESCOLARIDADE: \_\_\_\_ ANOS DE ESTUDO

( ) NÃO ALFABETIZADO

( ) ENSINO FUNDAMENTAL (PRIMÁRIO/ 1º GRAU)

( ) ENSINO MÉDIO (GINÁSIO/ 2º GRAU)

( ) ENSINO SUPERIOR (FACULDADE)

( ) PÓS-GRADUAÇÃO (MESTRADO/ DOUTORADO)

**Leia as seguintes frases e assinale se concorda ou discorda da afirmação com relação a Radioterapia:**

	Concordo	Discordo
Senti-me livre para fazer o que quisesse a respeito do meu tratamento		
Eu escolhi fazer o tratamento		
Foi minha a idéia de fazer o tratamento		
Tive bastante decisão sobre se eu faria o tratamento		
Tive mais influência do que qualquer outra pessoa sobre o fato de fazer ou não o tratamento.		

Caso a resposta para a última questão for "discordo", indique quem teve maior influência na decisão de fazer o tratamento: \_\_\_\_\_

--	--	--	--	--	--

0      1      2      3      4      5

**ESCALA DE PERCEPÇÃO DE COERÇÃO/ASSISTÊNCIA**

**LABORATÓRIO DE PESQUISA EM BIOÉTICA E ÉTICA NA CIÊNCIA  
CENTRO DE PESQUISA EXPERIMENTAL/HCPA**

**Apêndice B.: Questionário aplicado nas pacientes submetidos a tratamento com radioterapia.**

**Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)**

**Local:** Serviço de Radioterapia do HCPA

**Data:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**PREENCHIMENTO DA PACIENTE**

**a) Nome:** \_\_\_\_\_

**b) Data de Nascimento:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**c) Idade:** \_\_\_\_ anos

***II – ANTECEDENTES PESSOAIS***

**d) Possui hábito tabagista?**  Sim  Não

Se SIM, quanto Tempo? \_\_\_\_ (\_\_\_\_) meses (anos)

Se NÃO: pule para a pergunta b).

**e) Já possuiu hábito tabagista?**  Sim  Não

Se SIM, quanto Tempo? \_\_\_\_ (\_\_\_\_) meses (anos)

Se NÃO: pule para a pergunta c).

**f) Alguém na família já teve algum câncer?**  Sim  Não

Se SIM, qual o parentesco? \_\_\_\_\_

Qual tipo de câncer? \_\_\_\_\_

**g) Escala análogo-visual de percepção de risco da radioterapia.**

Sem risco |-----| Risco máximo

(0%)

(100%)

**PREENCHIMENTO DO PESQUISADOR****SEQÜÊNCIA DE TRATAMENTO** Apenas Radioterapia Cirurgia e Radioterapia Cirurgia, Quimioterapia e Radioterapia Quimioterapia e Radioterapia**RADIOTERAPIA**

Início: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Tipo de Tumor? \_\_\_\_\_

Localização? \_\_\_\_\_ CID: \_\_\_\_\_

Estadiamento? \_\_\_\_\_

Dose Diária recebida: \_\_\_\_\_ Gy

Término: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Número de Semanas do Tratamento: \_\_\_\_\_ semanas

Número de sessões: \_\_\_\_\_ sessões

Dose Total Recebida: \_\_\_\_\_ Gy

Campos Utilizados: \_\_\_\_\_

**QUIMIOTERAPIA**

Informações: \_\_\_\_\_

**CIRURGIA**

Informações: \_\_\_\_\_

**DATA DAS COLETAS:**

Primeira: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Segunda: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Terceira: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Quarta: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**Apêndice C.: Questionário aplicado as participantes.**

Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**PREENCHIMENTO DA PARTICIPANTE VOLUNTÁRIA**

a) Nome: \_\_\_\_\_

b) Data de Nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

c) Idade: \_\_\_\_\_ anos

d) Possui hábito tabagista?  Sim  Não

Se SIM, quanto Tempo? \_\_\_\_ (\_\_\_\_) meses (anos)

Se NÃO: pule para a pergunta b).

e) Já possuiu hábito tabagista?  Sim  Não

Se SIM, quanto Tempo? \_\_\_\_ (\_\_\_\_) meses (anos)

## Apêndice D.: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido das Pacientes.

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Grupo Controle

Estamos realizando uma pesquisa intitulada: "Avaliação do Índice de Dano Celular em Pacientes Diagnosticadas com Câncer de Mama em Tratamento com Radioterapia Através das Técnicas Micronúcleo e Ensaio Cometa". A pesquisa tem como objetivo avaliar o índice de dano em células do sangue de pacientes diagnosticadas com câncer de mama em tratamento com radioterapia através das técnicas micronúcleo e ensaio cometa.

Você está sendo convidada a participar deste projeto como sujeito controle, isto é, você não tem diagnóstico de câncer de mama e seus dados serão utilizados para realizar a comparação entre pessoas saudáveis e pacientes.

A sua participação no projeto abrange apenas uma única coleta de sangue, para avaliar dano celular (técnicas ensaio cometa e micronúcleo). Estas técnicas envolvem pequenas amostras de sangue e são analisadas em um microscópio. A coleta de sangue será realizada no Centro de Pesquisa Clínica do HCPA e o local da análise das amostras será no Serviço de Genética Médica do HCPA. Além dos resultados dos exames celulares, apenas a sua idade e a informação sobre o hábito de fumar serão utilizadas na divulgação da pesquisa.

Os exames de sangue podem ocasionar um desconforto no momento da própria coleta do sangue. Não há outros riscos previstos associados a este projeto de pesquisa.

Não há benefícios previstos na sua participação no presente projeto de pesquisa, salvo os resultados destes exames de sangue que não são comumente realizados nas atividades assistenciais.

Você está livre para aceitar, ou não, participar deste projeto de pesquisa. A sua recusa ou retirada a qualquer tempo não acarretará qualquer prejuízo.

Caso tiver novas perguntas sobre o estudo, poderá ser contatada a Fis. Fernanda Rocha da Trindade, pelo telefone 33598557, ou Prof. Gilberto Schwartzmann, no telefone 33598012, do Serviço de Oncologia do HCPA e PPG em Medicina: Ciências Médicas da UFRGS. Para qualquer pergunta sobre os seus direitos como participante deste estudo, ou outras informações, o Comitê de Ética em Pesquisa poderá ser contatado pelo telefone 33598304.

HCPA / GPPG  
VERSÃO APROVADA  
21 DEZ / 2010  
JCC408 TAN

Eu, \_\_\_\_\_, autorizo a minha participação no presente projeto de pesquisa.

Caso você deseje, será chamada para apresentarmos os resultados dos exames de sangue.

- Desejo receber os resultados dos exames de sangue.  
 Não desejo receber os resultados dos exames de sangue

\_\_\_\_\_  
Assinatura da Participante

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

TCLE em duas vias, será dada uma cópia do presente TCLE à participante.

\_\_\_\_\_  
Responsável pela obtenção do TCLE

HCPA / GPPG  
VERSÃO APROVADA  
21 DEZ / 2010  
100408 TRV

## **Apêndice E.: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido das Participantes sem câncer de mama e não expostas à radiação ionizante.**

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Pacientes**

Você está sendo convidada a participar de uma pesquisa intitulada: "Avaliação do Índice de Dano Celular em Pacientes Diagnosticadas com Câncer de Mama em Tratamento com Radioterapia Através das Técnicas Micronúcleo e Ensaio Cometa". A pesquisa tem como objetivo avaliar o índice de dano em células nucleadas do sangue periférico de pacientes diagnosticadas com câncer de mama em tratamento com radioterapia através das técnicas micronúcleo e ensaio cometa e será realizada durante seu tratamento no HCPA.

O procedimento abrange quatro coletas de sangue: a primeira coleta será antes do tratamento; a segunda coleta na segunda semana de tratamento; a terceira coleta no final do tratamento e a última um mês após o tratamento. A partir de cada coleta de sangue, serão realizados exames de dano celular (técnicas ensaio cometa e micronúcleo). Estas técnicas são realizadas em pequenas amostras de sangue e analisadas em um microscópio.

As coletas de sangue serão realizadas no Centro de Pesquisa Clínica do HCPA e o local da análise das amostras será no Serviço de Genética Médica do HCPA.

Esta pesquisa visa obter informações que indiquem a ocorrência de dano nas células de pacientes com câncer de mama submetidas a tratamento com radioterapia. Além dos resultados dos exames celulares, apenas a sua idade, informações sobre o hábito de fumar, história de câncer na sua família, dados referentes ao tratamento, sua percepção de risco e coerção em relação ao seu tratamento radioterápico serão utilizados na divulgação da pesquisa. Além das coletas de sangue que podem ocasionar um desconforto no momento da coleta de sangue não haverá outros riscos associados à pesquisa.

O benefício pela participação da pesquisa é que cada paciente terá seu índice de dano celular relativo ao tratamento avaliado de acordo com as duas técnicas, sendo o seu resultado divulgado ao seu médico assistente através do seu prontuário. Você está livre para aceitar ou não participar deste projeto de pesquisa.

Caso tiver novas perguntas sobre o estudo, poderá ser contatada a Fís. Fernanda Rocha da Trindade, pelo telefone 33598557, ou Prof. Gilberto Schwartzmann, no telefone 33598012, do Serviço de Oncologia do HCPA e PPG em Medicina: Ciências Médicas da UFRGS. Para qualquer pergunta sobre os seus direitos como participante

**HCPA / GPPG**  
**VERSÃO APROVADA**  
21 / DEZ / 2010  
100408 TV



deste estudo, ou outras informações, o Comitê de Ética em Pesquisa poderá ser contatado pelo telefone 33598304.

Eu, \_\_\_\_\_, autorizo a minha participação no presente projeto de pesquisa e sei que posso me retirar do estudo a qualquer momento, sem ter que apresentar justificativa ou ter qualquer outro prejuízo com relação aos meus cuidados de saúde.

\_\_\_\_\_  
Assinatura da Participante

TCLE em duas vias, será dada uma cópia do presente TCLE à participante.

\_\_\_\_\_  
Responsável pela obtenção do TCLE

HCPA / GPPG  
VERSÃO APROVADA  
21 / 02 / 2010  
100408 TRV