

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ - REITORIA DE PESQUISA E PÓS - GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

**AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE GENÉTICA DE FUNCIONÁRIOS
DO SERVIÇO DE RADIOLOGIA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
GETÚLIO VARGAS, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO
AMAZONAS - HUGV/UFAM**

Bolsista: Karolyne Correa Lins, CNPq

**MANAUS
2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ - REITORIA DE PESQUISA E PÓS - GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

**RELATÓRIO FINAL
PIB-B/0064/2013**

**AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE GENÉTICA DE FUNCIONÁRIOS
DO SERVIÇO DE RADIOLOGIA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
GETÚLIO VARGAS, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO
AMAZONAS - HUGV/UFAM**

**Bolsista: Karolyne Correa Lins, CNPq
Orientadora: Prof^aDr^a Maria Claudia Gross**

**MANAUS
2014**

Resumo

A radiação ionizante é utilizada em vários procedimentos na área da saúde, sendo capaz de ocasionar danos às estruturas moleculares e ser promotora de anormalidades genéticas, acarretando desde uma agressão reversível a uma irreversível. Por tanto, profissionais da área de radiologia, expostos constantemente ao agente, são mais propensos a desenvolver alterações no DNA, principalmente quando considerado carga horária, tempo e condições de trabalho as quais são submetidos. A fim de analisar a integridade do material genético dos funcionários do serviço de radiologia do Hospital Universitário Getúlio Vargas da Universidade Federal do Amazonas - HUGV/UFAM, comparando com docentes/discentes de laboratórios da UFAM, o presente trabalho utilizou o teste do cometa, para evidenciar danos ao DNA ocorridos, que podem não ser observados por outros métodos, tais como o micronúcleo e alterações cromossômicas; e avaliar se os indivíduos envolvidos nesse serviço estão sofrendo exposições em níveis considerados seguros, e, desta forma, garantir a integridade física destes profissionais. A análise da correlação entre local de trabalho, idade, anos de exposição e sexo com a quantidade de cometas estatisticamente não foi significativa, com $p > 0,05$, o que pode ser devido a uma amostra quantitativamente pequena. Em números absolutos os profissionais do HUGV apresentaram número superior de danos, sendo quanto maior a carga-horária semanal, maiores os números de cometas visualizados. Contudo, a associação com o hábito etílico na amostra da UFAM foi estatisticamente significativa, $p = 0,002$, evidenciando um fator de risco relevante nessa agressão. Ademais, estudos recentes revelam que o sistema de reparo individual é o modulador desse processo, sendo a eficiência deste determinante para que o dano seja deletério ou não, podendo elucidar os resultados obtidos nesse trabalho. Assim sendo, é necessário que haja maior controle da carga-horária a qual estes profissionais são submetidos e melhores condições de trabalho, como salário e proteção, e estudos nessa área, a fim de que tais alterações possam ser amenizadas.

Abstract

The Ionizing radiation is applied in a series of procedures in health care, being capable of warning molecular structures and inducing genetic abnormalities, causing either reversible or irreversible aggressions. Therefore, radiology professionals, constantly exposed these agents, can probably develop DNA mutations, specially when considered the workload, the time and the working conditions to which they are subjected. In order to analyze the genetic integrity of radiology workers from the “Hospital Universitário Getúlio Vargas”, which is part of the “Universidade Federal do Amazonas”, HUGV/UFAM, comparing their test results with another groups formed by professors and students from the college labs, this study the comet assay to search for DNA damages that can not be observed by other methods. such as micronucleus and chromosomal abnormalities, and assess whether the individuals involved in this service are suffering exposures at levels considered safe and, using this information, guarantee the physical integrity of these professionals. The correlation analysis between the workplace, age, sex and years of exposure to the number of comets was not statistically significant, $p > 0.05$, which can be due to a small sample quantitatively. In absolute numbers, the HUGV professionals showed higher number of damages. The greater the load-hourly weekly, the larger numbers of comets visualized. However, the association with the habitual consumption of alcohol in the UFAM sample was statistically significant, $p = 0.002$, showing a significant risk factor in this aggression. Moreover, recent studies revealed that the individual repair system is the modulator of this process, so the efficiency of this determinant for the damage to be deleterious or not could clarify the results of this study. Therefore, it is necessary to better control the load-time to which these professionals are subject, as well as better working conditions such as wages and protection. Further studies are also relevant in this area, so that such damage can be mitigated.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	6
2	JUSTIFICATIVA	8
3	OBJETIVOS	10
3.1	Objetivo Geral	10
3.2	Objetivos específicos	10
4	METODOLOGIA.....	10
4.1	Ensaio do Cometa.....	11
4.1.1	Pré- cobertura das lâminas	11
4.1.2	Preparação das laminas	11
4.1.3	Coloração com Nitrato de Prata.....	11
4.2	Análise dos Dados	12
5	RESULTADOS	12
6	DISCUSSÃO	25
7	CONCLUSÃO.....	28
8	REFERÊNCIAS.....	29
9	ANEXOS	32

1 INTRODUÇÃO

O ambiente de diagnóstico por imagem inclui uma série de agressões ao DNA, tanto aos pacientes, quanto aos profissionais que lidam rotineiramente com o agente agressor, possibilitando danos reversíveis e irreversíveis, dependendo da eficiência do sistema de reparo do indivíduo e dos fatores relacionados (DE ALMEIDA *et al.*, 2007). Os efeitos causados pela radiação ionizante no material celular podem ser diretos, devido à interação com os componentes celulares, ou indiretos, por meio dos radicais livres produzidos pela radiólise da água. Consequentemente, a interação da radiação com as células acarreta diferentes tipos de respostas, que podem comprometer ou não a vida dessas células, e muitas vezes alterar a integridade genética das mesmas (SEGRETO *et al.*, 1997; SILVA *et al.*, 2011).

As lesões provocadas no DNA podem levar à modificação das bases nitrogenadas ou podem causar alterações químicas devido à formação de espécies reativas de oxigênio (SILVA *et al.*, 2011). Tais alterações podem ocorrer devido à oxidação direta dos ácidos nucléicos ou, muitas vezes, levar à formação de quebras em uma das cadeias do DNA (quebras simples - SSB "single strand break") ou, ainda, em posições aproximadamente simétricas nas duas cadeias do DNA (quebras duplas - DSB "doublestrand break"). Além disso, quebras simples podem gerar quebras duplas durante a replicação celular (BERRA *et al.*, 2006). As quebras cromatídicas geralmente são o resultado de lesões na cadeia simples do DNA que, quando não reparadas, devido a um mecanismo de reparo ineficiente, acumulam mutações e aberrações. Indivíduos com essa instabilidade genética podem apresentar uma frequência maior de células anormais, quando comparados com um genoma estável, o que aumenta, por exemplo, o risco de desenvolvimento de câncer (ESTÉCIO *et al.*, 2002).

Vale salientar que a ação das radiações no organismo humano produz uma série de efeitos, os quais representam danos diferentes para cada região afetada (DE ALMEIDA *et al.*, 2007). A radiosensibilidade é inversamente proporcional ao grau de diferenciação celular e diretamente proporcional ao número de divisões celulares. Portanto, as células humanas mais sensíveis são as células da camada mais profunda da epiderme, os

eritroblastos, as células da medula óssea e as formas imaturas dos espermatozoides, ao passo que as células nervosas ou musculares, que não se dividem e são bem diferenciadas, são mais radorresistentes (VELUDO *et al.*, 2011).

Ademais, os efeitos determinísticos apresentam um limiar de dose a partir do qual pode-se observar clinicamente as consequências. O intervalo para o aparecimento dos sintomas e severidade depende da natureza da radiação e do tempo de exposição. Por isso, tornam-se necessárias formas de radioproteção para os trabalhadores ocupacionalmente expostos à radiação ionizante (Raios-x diagnósticos, Medicina Nuclear, Radioterapia e Odontologia), a fim de minimizar o surgimento de efeitos deletérios das radiações (SEARES *et al.*, 2002).

Assim sendo, os princípios de radioproteção fornecem diretrizes básicas para as atividades operacionais que utilizam radiação ionizante, sendo estas: justificativa, otimização e limitação da dose, todos baseados no princípio fundamental conhecido como ALARA, “As Low As Reasonable Achievable”, que significa: “Tão Baixo Quanto Possivelmente Praticável”. Em consonância com esses princípios, desenvolveram-se formas de radioproteção baseadas no tempo de exposição, distância da fonte de radiação e blindagem, com a finalidade de reduzir ao máximo os efeitos deletérios da radiação (SEARES *et al.*, 2002).

Contudo, falhas graves são encontradas na realidade do serviço de diagnóstico por imagem, onde se observam atos inseguros e condições ambientais inadequadas, que se apresentam como fatores de risco e/ou agravantes. Dentre esses, destacam-se preparação e manuseio de soluções tóxicas sem utilização de equipamento de proteção individual; presença de trabalhadores em ambientes onde há insalubridade e periculosidade, devido a agentes químicos tóxicos e detecção de níveis de radiações ionizantes fora dos limites estabelecidos por lei; ambientes com ventilação inadequada; aspectos ergonômicos em postos de trabalho em desacordo com as normas regulamentadoras; equipamentos defeituosos ou mal calibrados em operação, com consequentes riscos a trabalhadores e pacientes; salas com móveis, equipamentos e acessórios localizados inadequadamente à segurança do trabalhador e à satisfação para realização de tarefas.

(FERNANDES *et al.*, 2005). Complementarmente a este quadro, alguns trabalhadores não obedecem ao tempo de exposição à radiação ionizante considerado seguro, buscando mais de um local de trabalho para ter uma melhoria no salário, sendo este quadro comum em Manaus, AM (DE OLIVEIRA, 2013).

2 JUSTIFICATIVA

As radiações ionizantes são empregadas em diversas áreas da medicina, devendo ser utilizadas de maneira correta, para que os benefícios possam ser produzidos em detrimento dos possíveis danos (MACEDO *et al.*, 2009). Em se tratando da saúde ocupacional dos trabalhadores, sabe-se que aqueles que trabalham em organizações que utilizam a radiação ionizante para controle de seus processos ou possuem esta associada a alguma etapa da sua produção, podem estar expostos aos riscos provenientes da exposição inadequada, efeitos biológicos e orgânicos da radiação, os quais variam em função do poder de penetração, da ionização específica e do tipo do tecido irradiado (PEREIRA *et al.*, 2009).

Nesse sentido, com a evolução das pesquisas na área da radiologia e estudos de populações que foram atingidas por doses altas de radiação, os limites estabelecidos de dose foram sendo sucessivamente modificados. Inicialmente, o limite recomendado pela Comissão Internacional de Proteção Radiológica (ICRP), em 1934, para trabalhadores com radiação era de 730 mSv/ano; em 1977, o valor adotado foi de 50 mSv/ano. Atualmente, recomenda-se que não seja ultrapassado o valor de 20 mSv/ano durante um período de cinco anos. Além disso, estudos indicam que se essa dose anual ultrapassar os 50mSv os danos são maiores, propondo-se a introdução de métodos de otimização para que estes valores possam ser constantemente reduzidos (COSTA *et al.*, 1999). Não obstante, sabe-se que a exposição à radiação ionizante sempre causa danos às células e não existe um valor de dose de radiação que seja considerado seguro. Alguns dos danos somáticos causados pela exposição podem ser reversíveis, porém os danos genéticos, se não corrigidos pelo sistema de reparo de DNA, são cumulativos e irreversíveis (DE SOUZA *et al.*, 2008).

Em um estudo realizado com profissionais do setor de radiologia do Hospital Universitário Getúlio Vargas, UFAM, foi constatado que a maioria das células analisadas não apresentava aberrações cromossômicas, porém foram observadas em algumas células alterações do tipo gaps, *breaks*, dicêntricos e anel cromossômico, além de incidência de micronúcleos. Esse trabalho sugere que o tempo de serviço no setor de radiologia pode estar associado com a formação de algumas alterações e aponta a necessidade de estudos complementares que possam fornecer dados mais robustos e conclusivos sobre o tema (DE OLIVEIRA, 2013).

Neste sentido, a fim de investigar a integridade do genoma dos profissionais que lidam com a radiação ionizante e avaliar se os níveis de radiação a que são expostos são considerados seguros, o presente trabalho propõe realizar o teste do cometa em funcionários do serviço de radiologia do Hospital Universitário Getúlio Vargas (HUGV) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

O ensaio do cometa é um teste utilizado para comparar danos ao DNA ocorridos que podem não ser observados por outros métodos, tais como o micronúcleo e alterações cromossômicas (HUANG *et al.*, 2005). Esse consiste em uma técnica de eletroforese para analisar danos no DNA de cada célula, individualmente, induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes (SINGH *et al.*, 1988; TICE *et al.*, 2000). As células são então incorporadas em géis de agarose e submetidas a um campo elétrico, gerando um padrão de distribuição que, após a coloração, se assemelha a um cometa, cuja extensão da cauda está diretamente relacionada com a gravidade dos danos no DNA (OSTLING E JOHANSON, 1984).

Considerando que o teste do cometa demonstra grande sensibilidade na detecção de pequenos danos no DNA, apresenta simplicidade, baixo custo e produz resultados rápidos nos estudos de genotoxicidade, esta abordagem é fundamental para a avaliação da integridade genética de funcionários do serviço de radiologia do Hospital Universitário Getúlio Vargas, da Universidade Federal do Amazonas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial genotóxico da exposição ocupacional ao raio-X em funcionários Hospital Universitário Getúlio Vargas, Manaus – AM, tendo como grupo controle discentes e docentes de laboratórios da UFAM que não são expostos a radiação iônica.

3.2 Objetivos específicos

- Investigar a integridade do material genético dos servidores do Serviço de Radiologia do HUGV/UFAM e de docentes e discentes de laboratórios de Genética da UFAM.
- Correlacionar presença de células alteradas com o estilo de vida relatado pelos indivíduos estudados.

4 METODOLOGIA

Este projeto teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) com o número CAAE 06054212.5.0000.5020 e foi desenvolvido com a colaboração de 12 profissionais que atuam no serviço de radiologia do HUGV/UFAM e de 15 discentes/docentes que atuam em laboratórios da UFAM, os quais não são expostos ocupacionalmente à radiação ionizante, apesar de estarem vulneráveis a outros compostos químicos que também são encontrados nos hospitais.

Os indivíduos foram convidados a participar da pesquisa, através da utilização de um termo de consentimento livre e esclarecido, e responderam um questionário acerca dos hábitos de vida, visando o estabelecimento do perfil dos mesmos (Anexo 1). Após a aceitação voluntária de participação na pesquisa, foram coletadas amostras de sangue (aproximadamente 1ml) por punção venosa, utilizadas para a realização do ensaio do cometa. Tais amostras foram armazenadas em tubos de vacutainer heparinizado, identificados apenas com numeração, para que as análises ocorressem “às cegas”, sendo, porém, devidamente referenciados a identificação pessoal.

4.1 Ensaio do Cometa

Para o ensaio do cometa foi utilizada a técnica alcalina descrita por SINGH *et al.* (1988) com modificações (HARTMANN *et al.* 1995; BRIANEZI *et al.* 2009).

4.1.1 Pré- cobertura das lâminas

As lâminas histológicas foram mergulhadas em gel de agarose (1,5%) mantido em banho-maria a 85 °C. Após a remoção do excesso com papel absorvente, essas foram secas a temperatura ambiente.

4.1.2 Preparação das lâminas

O sangue coletado (5 µl) foi previamente misturado com heparina e diluído em 300 µl de meio de cultura RPMI. Posteriormente, 5 µl do sangue diluído foi misturado com 48 µl de agarose 1,5% *lowmelting*, e esta solução aplicada por toda a lâmina previamente revestida com o gel de agarose, coberta com lamínula até sua solidificação. Após a solidificação e adesão das células à agarose, foi removida a lamínula, e as lâminas, dispostas em cubeta vertical com solução de lise gelada e protegida da luz por 24 horas. Posteriormente, foram incubadas por 20 minutos em solução de EDTA (1mM) e NaOH (300 mM) com pH >13, e postas em cuba de eletroforese em 25 V e 300 mA por 20 minutos. Quando retiradas do tampão de eletroforese, foram lavadas com uma solução tampão neutralizadora de Tris (Invitrogen) por 5 minutos e imediatamente com água destilada, duas vezes. Após a lavagem, secadas em temperatura ambiente e imergidas em uma cubeta com solução fixadora por 10 minutos; em seguida novamente lavadas com água destilada por três vezes, secas a temperatura ambiente e hidratadas por 5 minutos com água destilada.

4.1.3 Coloração com Nitrato de Prata

A coloração foi realizada com prata pelo método descrito por NADIN *et al.* (2001) e FUKUMASU (2006). Para isto, misturou-se em uma cubeta 32 ml de solução A (50 g Na₂CO₃ [q.s.p.] 1000 ml de água bidestilada) e 68 ml de solução B (0,2 g de NH₂NO₃, 0,2 g de AgNO₃, 1 g de ácido silicotungstênico, 500 µl de formaldeído, q.s.p. 1000 ml de água bidestilada)

por um minuto. Em seguida as lâminas foram lavadas por 5 minutos em solução STOP (1ml de ácido acético q.s.p. 1000 ml de água bidestilada) e depois em água bidestilada por um minuto, secas e observadas ao microscópio óptico.

A literatura recomenda 50 células, sendo contabilizado o número de cometas (WIKLUND *et al.* 2003) com rastreamento contínuo de toda a lâmina. Estes foram classificados conforme o tamanho da cauda em cinco classes: 0, 1, 2, 3 e 4 correspondentes a gravidade dos danos ao DNA (RIBEIRO *et al.* 2004).

4.2 Análise dos Dados

Para o tratamento estatístico dos dados obtidos foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparação entre grupos independentes. Para os dados com variáveis quantitativas foi efetuada análise de Correlação de Spearman. Todas as análises foram implementadas no programa Statistica 12 (Statsoft). O nível de significância utilizado foi de 0,05.

5 RESULTADOS

Foram analisadas amostras de 25 indivíduos (12 mulheres e 13 homens). Dentre estes, 11 técnicos de radiologia (2 mulheres e 9 homens) (**Tabela 1**); e 14 discentes/ docentes em exposição laboratorial (10 mulheres e 4 homens) (**Tabela 2**). Em um total de 237 cometas (85 Grau I, 64 Grau II, 64 Grau III e 18 Grau IV), sendo 132 encontrados nos técnicos (60 Grau I, 29 Grau II, 24 Grau III e 13 Grau IV) (**Gráfico 1**); e 105 nos indivíduos em exposição laboratorial (25 Grau I, 35 Grau II, 40 Grau III e 5 Grau IV) (**Gráfico 2**). A relação entre o número de cometas e o local, HUGV ou UFAM, não foi estatisticamente significativa ($p=0,52$) (**Gráfico 3**).

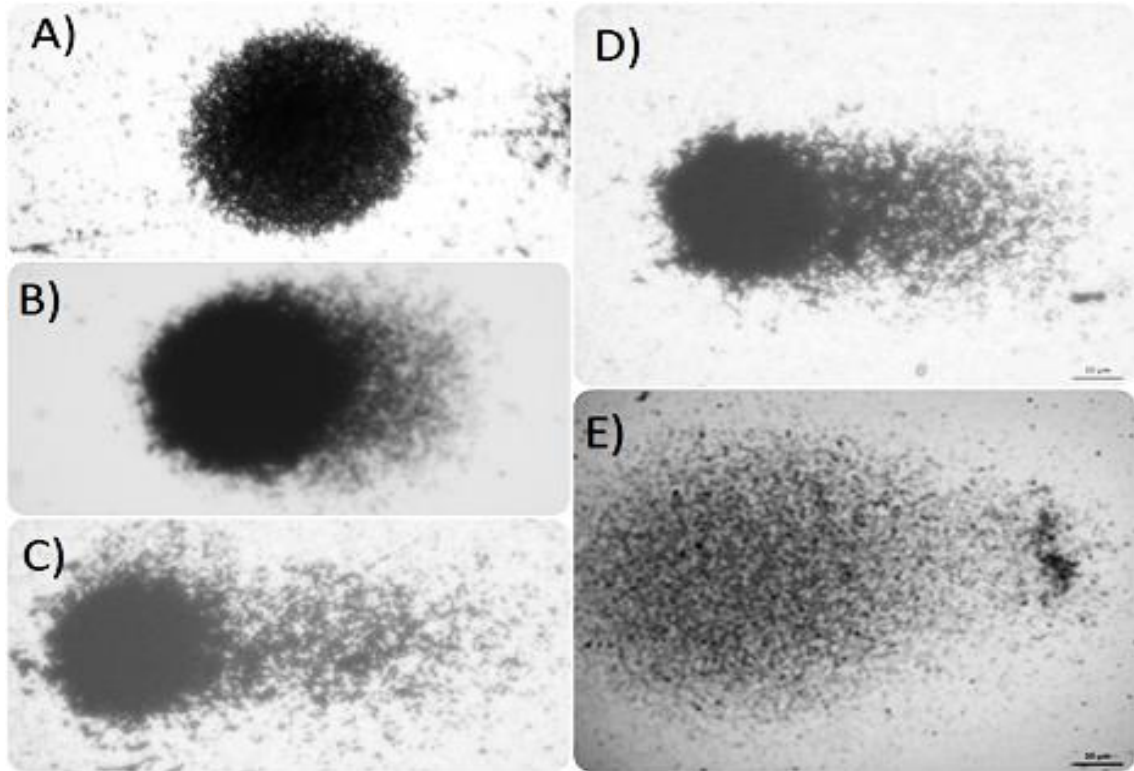


Imagem 1: Células sanguíneas submetidas à tratamento alcalino, eletroforese em gel e impregnação com nitrato de prata . A) Normal (ausência de cauda); B) Grau I; C) Grau II; D) Grau III; E) Grau IV ou Apoptose. Barra: 10 µm.

Sexo	Idade	Tempo radiologia (anos)	Exposição semanal	Fuma	Hábito etílico	Células sem danos	Tipo dos Cometa				Total de cometas
							I	II	III	IV	
M	35	16	24h	N	S	44	1	3	2	0	6
M	31	9	36h	N	S	41	6	2	1	0	9
M	41	16	28h	N	S	8	9	10	11	12	42
M	29	8	28h	N	S	48	1	0	0	1	2
M	33	8	28h	N	S	28	14	3	3	2	22
M	54	32	28h	N	S	47	1	1	1	0	3
M	40	22	48h	N	S	48	0	1	1	0	2
M	48	32	24h	N	N	39	3	5	2	1	11
M	45	18	60h	N	N	31	14	0	4	1	19
F	66	35	48h	N	N	49	0	1	0	0	1
F	41	7	24h	N	N	29	9	5	3	2	19

Tabela 1: Dados gerais dos técnicos de Radiologia (HUGV).

Sexo	Idade	Tempo de laboratório (anos)	Fuma	Hábito etílico	Células sem danos	Tipo dos Cometa				Total de cometas
						I	II	III	IV	
F	25	3,5	N	N	41	2	3	4	0	0
F	33	14	N	N	50	0	0	0	0	0
F	23	4	N	S	34	7	4	3	2	16
F	23	5	N	S	35	3	4	7	1	15
F	20	0,8	N	N	42	0	2	5	0	7
F	26	8	N	N	42	0	4	4	0	8
F	20	0,8	N	N	48	1	0	1	0	2
F	27	6	N	S	44	0	2	4	0	6
F	21	0,8	N	N	44	1	4	1	0	6
F	27	4	N	S	45	4	0	1	0	5
M	37	13	N	N	45	2	2	1	0	5
M	26	5	N	S	40	1	3	4	2	10
M	32	13	N	S	32	6	7	5	0	18
M	32	8	N	N	47	0	2	1	0	3

Tabela 2: Dados Gerais de discentes/docentes da UFAM vinculados à laboratórios de Genética.

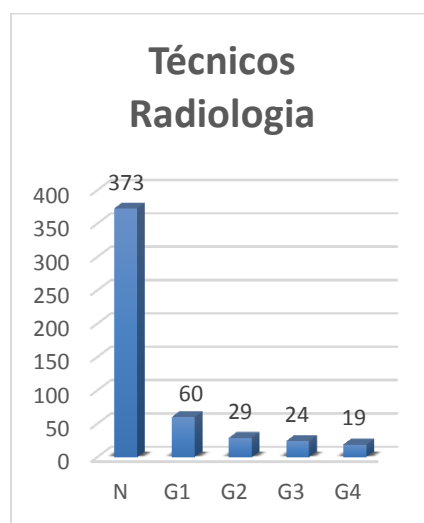


Gráfico 1: Quantidade de cometas e células normais dos técnicos radiologia (HUGV).

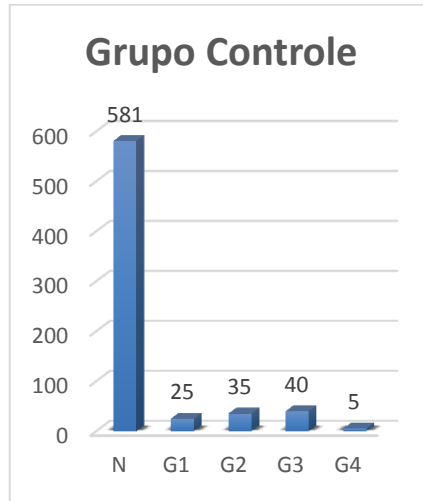


Gráfico 2: Quantidade de cometas e células normais de discentes/docentes da UFAM vinculados à laboratórios de Genética.

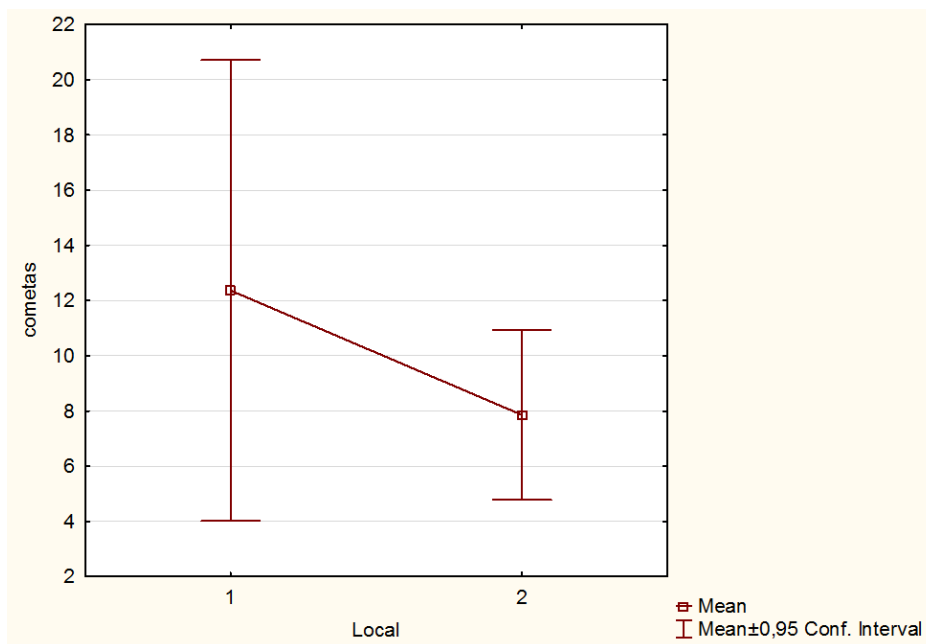


Gráfico 3: Número de cometas encontrados por local amostrado, sendo: 1= HUGV e 2= UFAM.

Em relação à idade em anos, a média é 33,4 na amostra completa, 44,09 no HUGV e 26,57 na UFAM. Quando analisada a associação entre a idade dos indivíduos amostrados e o número total de cometas, não há significância estatística. Visto que, no grupo total foi evidenciado: $r=0,0461$; $p=0,8268$; $r^2= 0,021$ (**Gráfico 4**); e separadamente, técnicos de radiologia: $r= -$

0,1912; $p=0,5732$; $r^2= 0,037$ (**Gráfico 5**) e discentes/docentes de laboratório de Genética da UFAM: $r= - 0,11$; $p=0,7082$; $r^2= 0,0121$ (**Gráfico 6**).

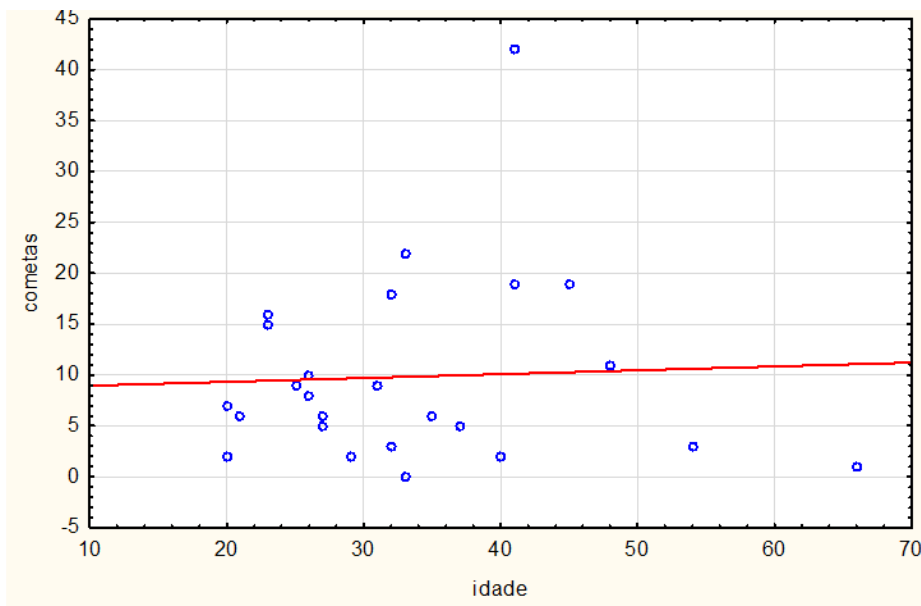


Gráfico 4: Ausência de correlação entre número de cometas e idade, utilizando indivíduos amostrados no HUGV e na UFAM ($r=0,0461$; $p=0,8268$; $r^2= 0,021$).

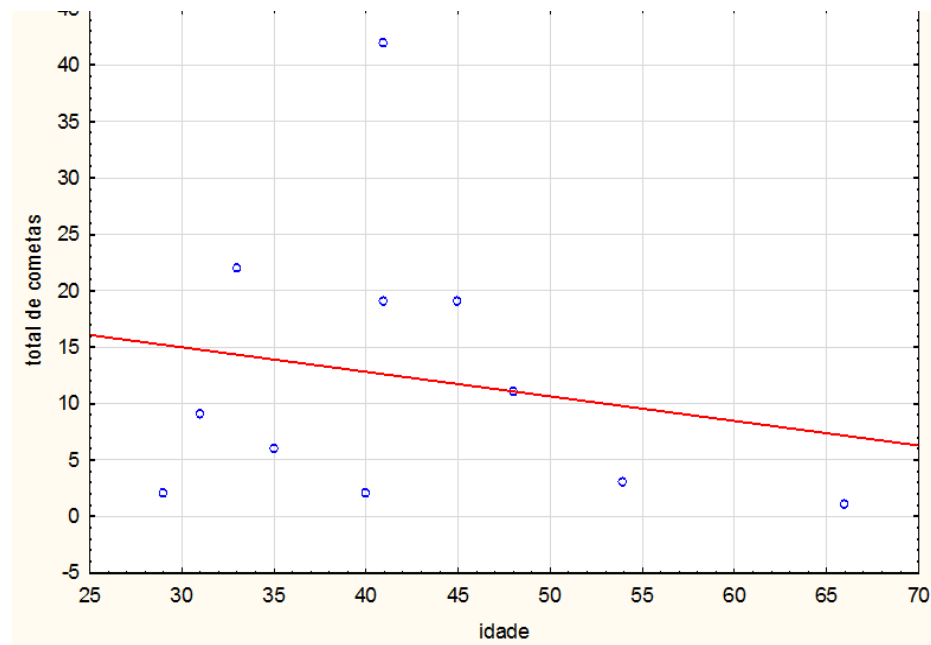


Gráfico 5: Ausência de correlação entre número de cometas e idade dos técnicos de radiologia da UFAM ($r= - 0,1912$; $p=0,5732$; $r^2= 0,037$).

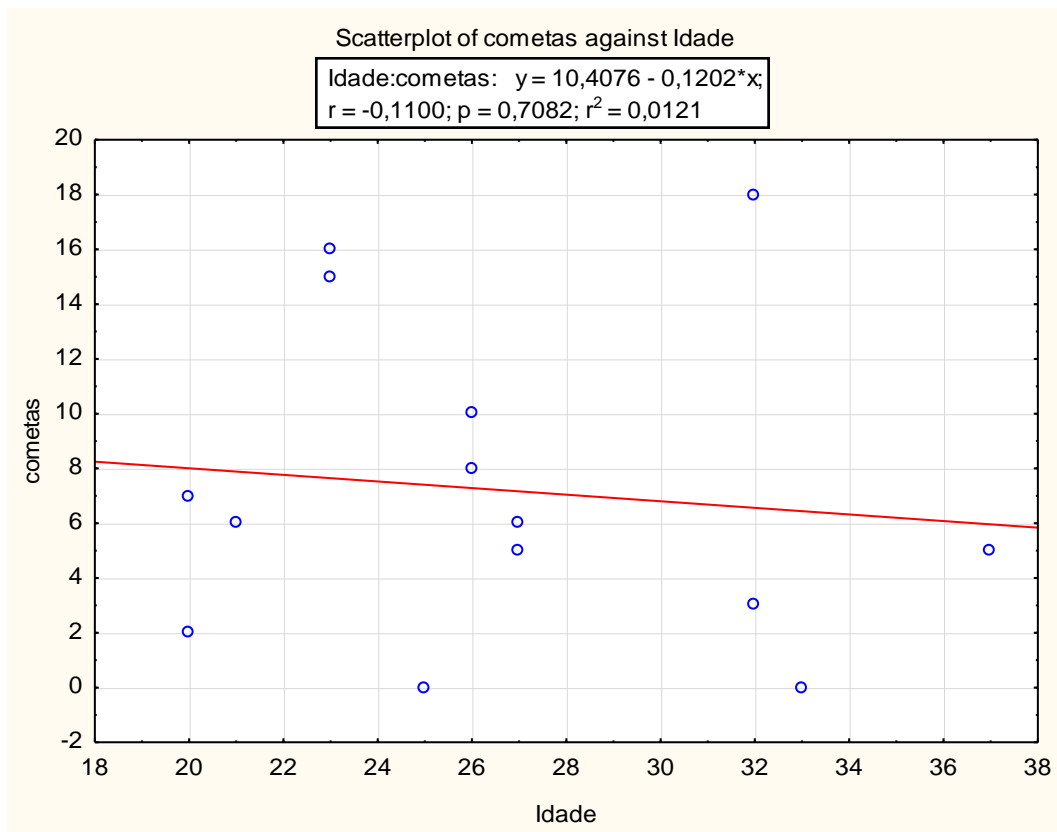


Gráfico 6: Ausência de correlação entre número de cometas e idade dos discentes e docentes vinculados a laboratórios de Genética da UFAM ($r = -0,11$; $p = 0,7082$; $r^2 = 0,0121$).

Quanto à variável sexo, a média de cometas na amostra total foi de 7,08 no sexo feminino e 11,6 no sexo masculino. No HUGV a média foi de 10 cometas para o sexo feminino e 12 para o sexo masculino (**Gráfico 7**). Já na UFAM, a média foi de 7 cometas para as mulheres e 9 para os homens (**Gráfico 8**). Ausência de significância estatística entre sexo e número de cometas foi evidenciada, tanto na amostra completa (HUGV e UFAM) ($p = 0,446$) (**Gráfico 9**), quanto no HUGV ($p = 0,637$) (**Gráfico 10**) e na UFAM ($p = 0,57$) (**Gráfico 11**).

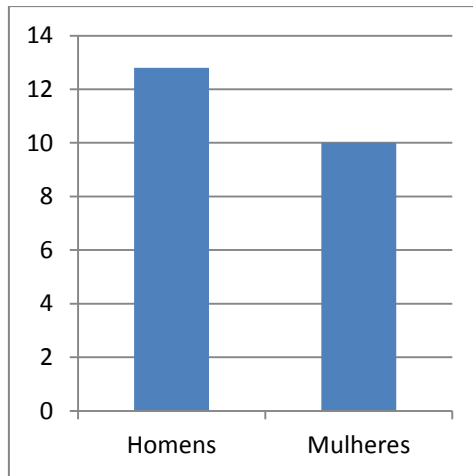


Gráfico 7: Média de cometas por sexo dentro os técnicos de radiologia do HUGV.

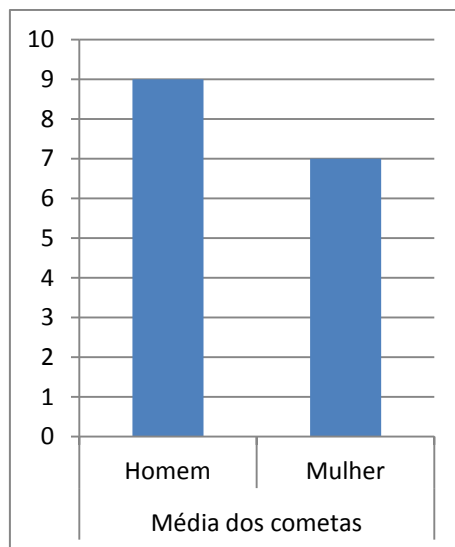


Gráfico 8: Média de cometas por sexo dentro os discentes/docentes vinculados a laboratórios de genética da UFAM.

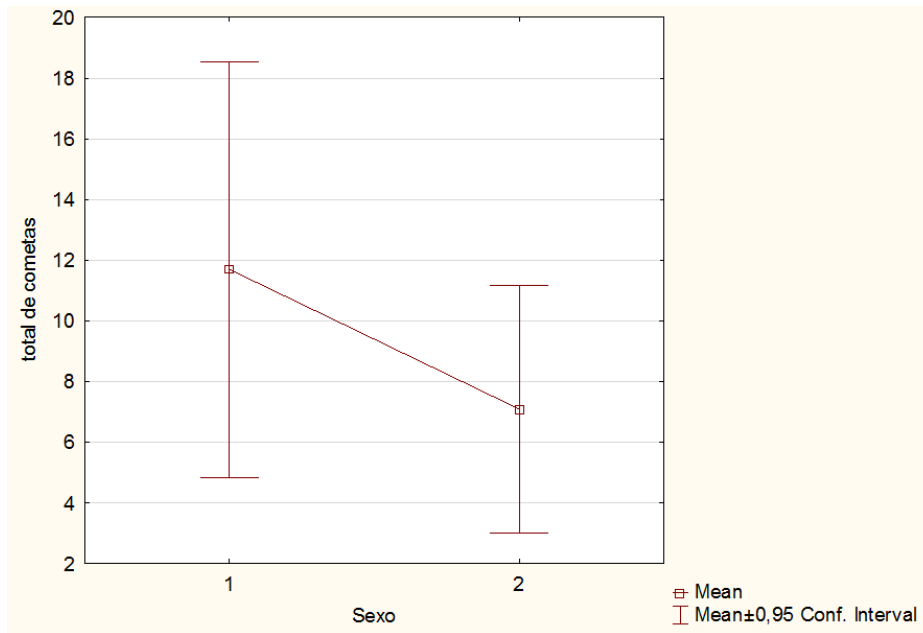


Gráfico 9 : Cometas por sexo na amostra geral, incluindo técnicos em radiologia do HUGV e discentes/docentes vinculados a laboratórios de genética da UFAM, sendo: 1=homem e 2=mulher.

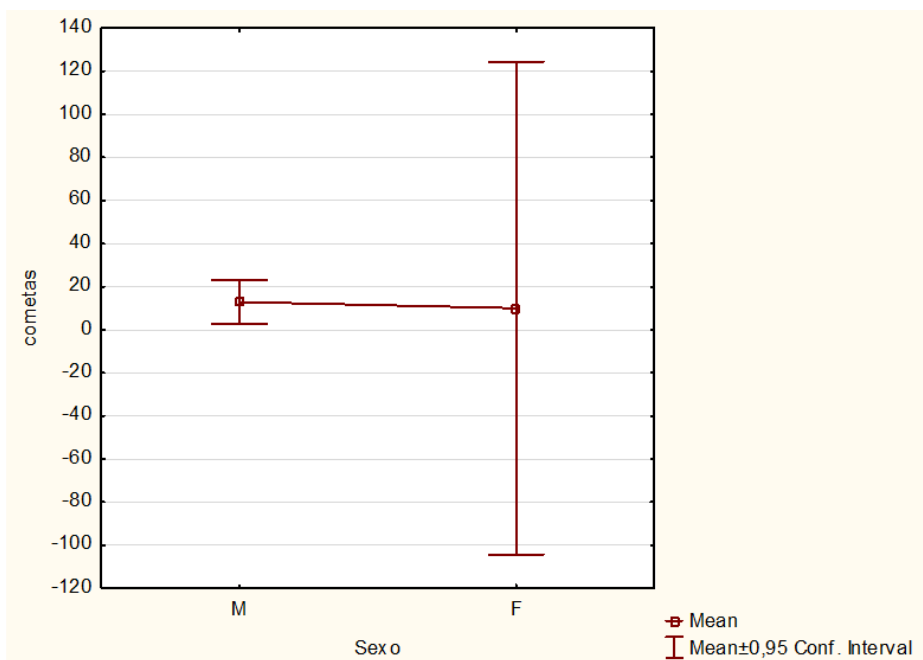


Gráfico 10: Cometas por sexo na amostra dos técnicos em radiologia do HUGV, sendo: 1=homem e 2=mulher.

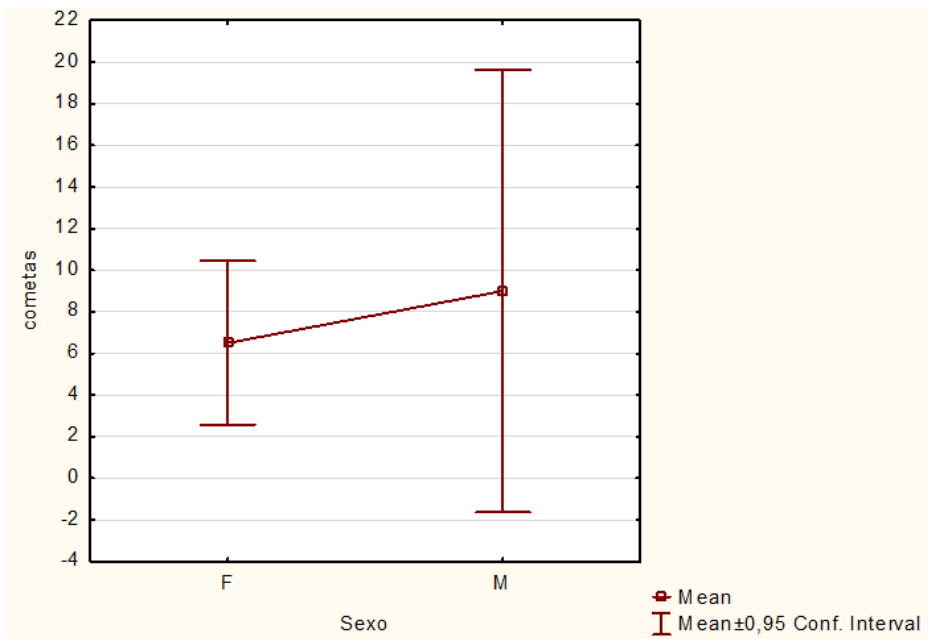


Gráfico 11: Cometas por sexo na amostra de discentes/docentes vinculados a laboratórios de genética da UFAM, sendo: M=sexo masculino e F=sexo feminino.

Outra variável analisada foi o tempo de exposição dos indivíduos. No HUGV a média de exposição radiológica foi de 18,45 anos e na UFAM foi de 6,3 anos de exposição laboratorial. A relação entre esse tempo de exposição e a quantidade de cometas não teve significância estatística, na amostra total ($r = -0,0233$; $p = 0,9118$; $r^2 = 0,0005$) (**Gráfico 12**); no HUGV, tanto em anos ($r = -0,3574$; $p = 0,2806$; $r^2 = 0,1277$) (**Gráfico 13**), quanto em horas semanais ($r = -0,0174$; $p = 0,9596$; $r^2 = 0,0003$) (**Gráfico 14**); e na UFAM ($r = 0,0722$; $p = 0,8064$; $r^2 = 0,0052$) (**Gráfico 15**). Ademais, observa-se no gráfico que a maior quantidade de cometas, em números absolutos, está presente em indivíduos com menor tempo de exposição em anos.

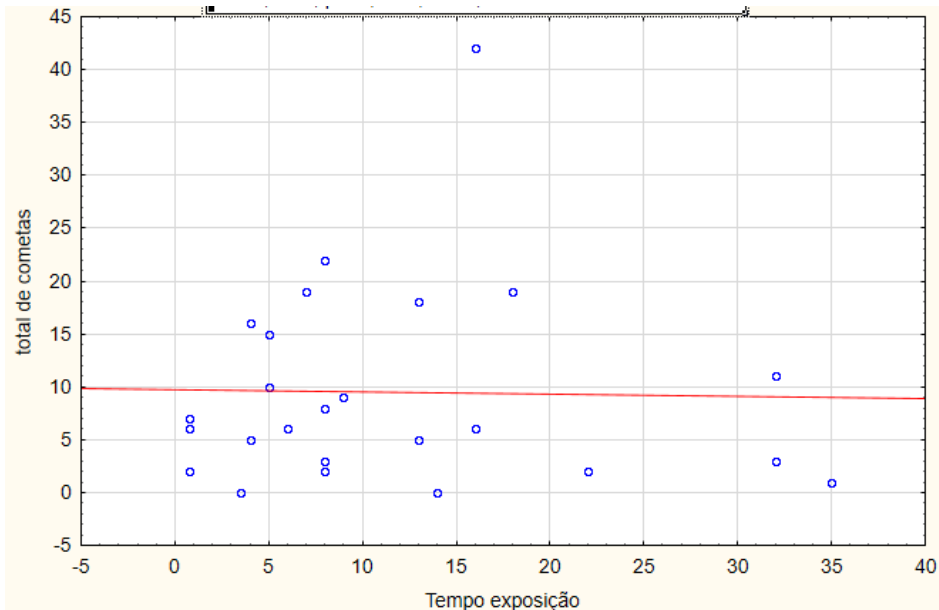


Gráfico 12: Ausência de correlação entre número de cometas e tempo de exposição ocupacional (em anos) da amostra geral, incluindo técnicos de radiologia da UFAM e discentes e docentes vinculados a laboratórios de Genética da UFAM ($r = -0,0233$; $p = 0,9118$; $r^2 = 0,0005$).

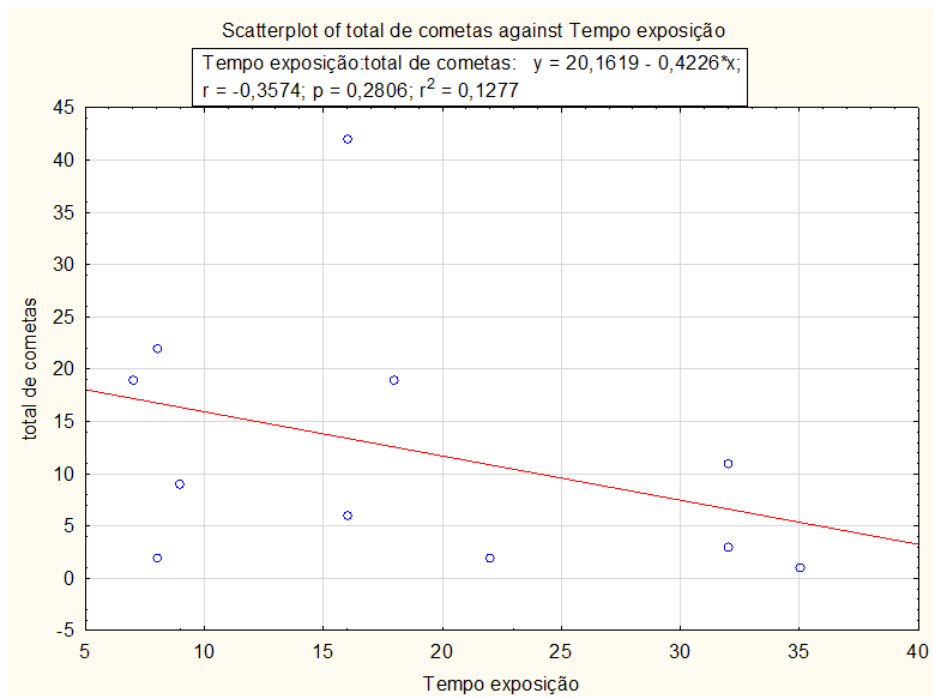


Gráfico 13: Ausência de correlação entre número de cometas e tempo de exposição ocupacional (em anos) dos técnicos de radiologia da UFAM ($r = -0,3574$; $p = 0,2806$; $r^2 = 0,1277$).

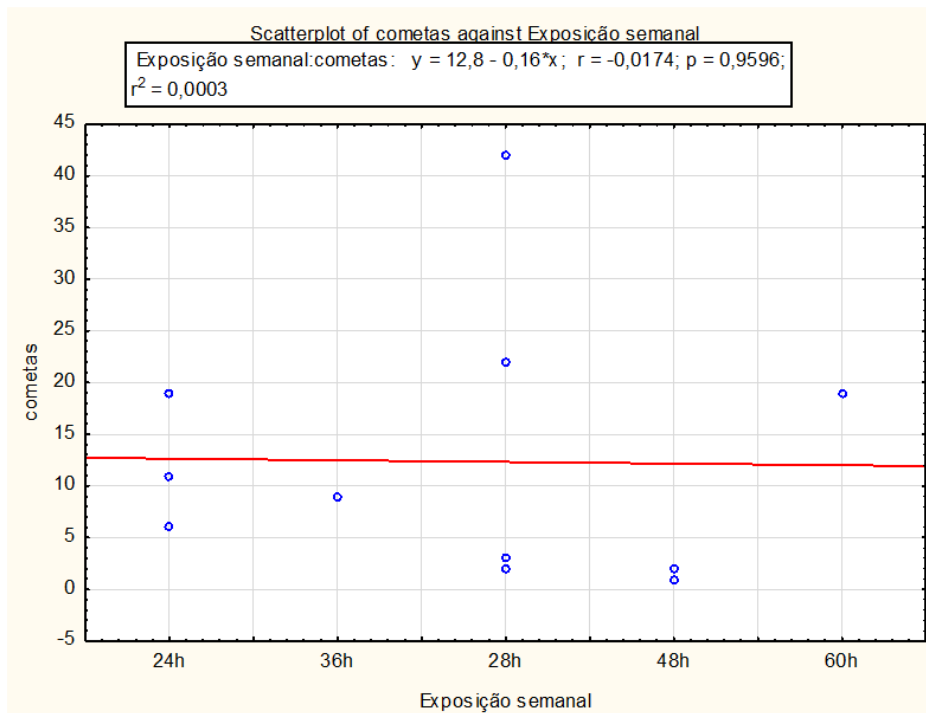


Gráfico 14: Ausência de correlação entre número de cometas e tempo de exposição semanal ao raio-X dos técnicos de radiologia da UFAM ($r = -0,0174$; $p = 0,9596$; $r^2 = 0,0003$).

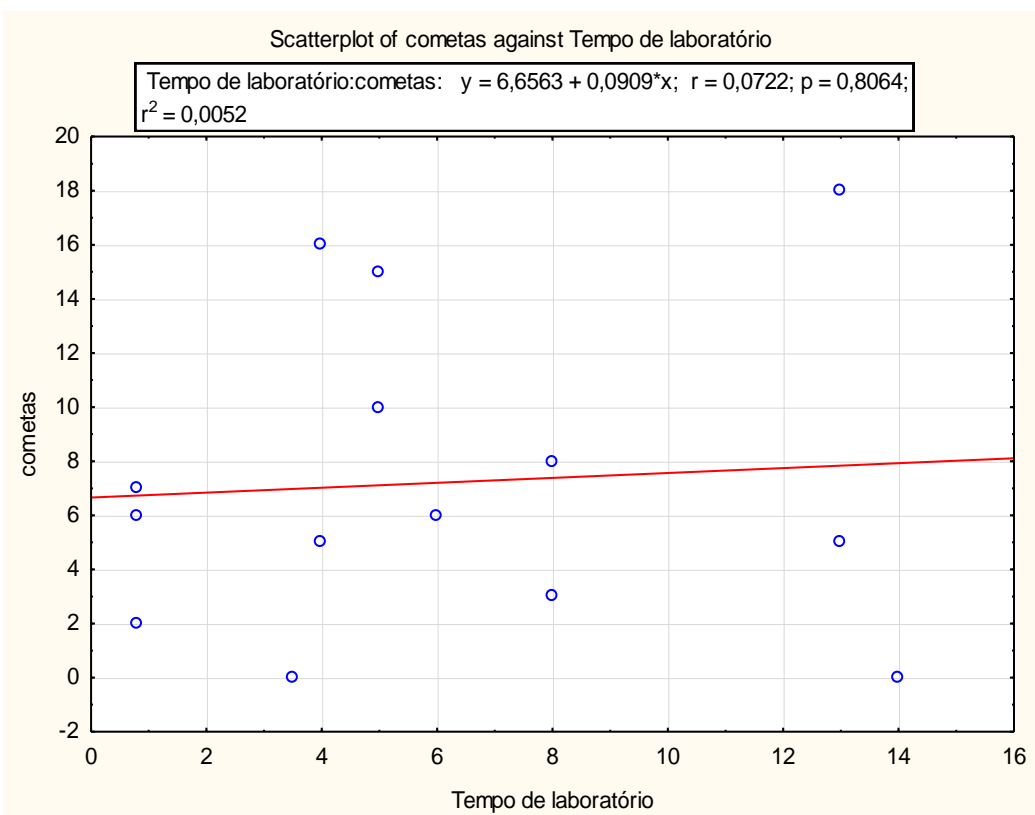


Gráfico 15: Ausência de correlação entre número de cometas e tempo de exposição ocupacional (em anos) dos discentes e docentes vinculados a laboratórios de Genética da UFAM ($r = 0,0722$; $p = 0,8064$; $r^2 = 0,0052$).

O consumo do álcool também foi analisado. Na amostra do HUGV a média foi de 13 cometas tanto para quem possui hábito etílico, quanto para quem não possui (**Gráfico 16**). Na UFAM a média ficou em 12 cometas para os que possuem e 4 para os que não possuem o hábito etílico (**Gráfico 17**). Na amostra geral (**Gráfico 18**) e no HUGV (**Gráfico 19**) a associação entre etilismo e número de cometas não teve significância estatística ($p=0,3551$ e $p=0,9247$). Contudo, se analisada a amostragem efetuada entre discentes/docentes vinculados a laboratórios de genética da UFAM, a média de cometas foi 3 vezes maior nos indivíduos que fazem uso de bebidas alcoólicas em relação aos que não o fazem, e a associação foi estatisticamente significativa ($p= 0,0239$) (**Gráfico 20**).



Gráfico 16: Média de cometas em relação ao hábito etílico HUGV

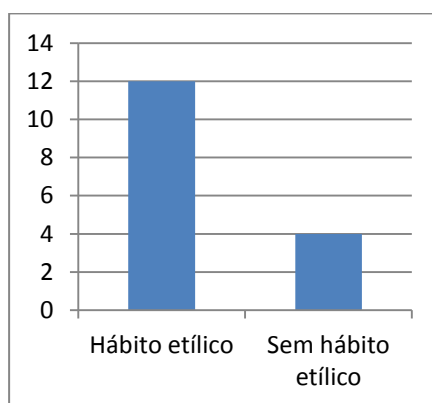


Gráfico 17: Média de cometas em relação ao hábito etílico UFAM.

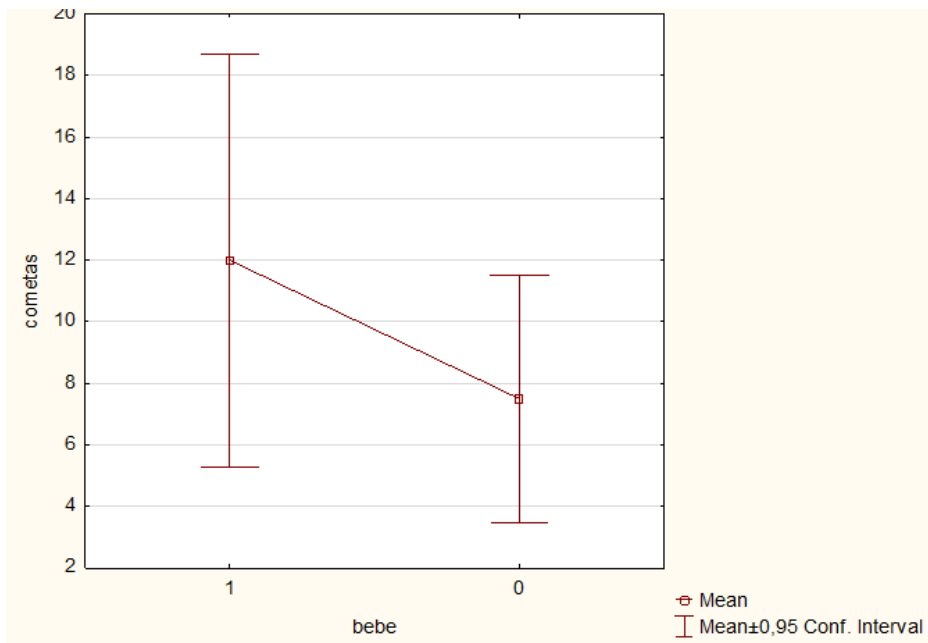


Gráfico 18: Cometas por hábito etílico na amostra total, incluindo técnicos em radiologia do HUGV e discentes/docentes vinculados a laboratórios de genética da UFAM, sendo: 1= hábito etílico e 0 = sem hábito etílico.

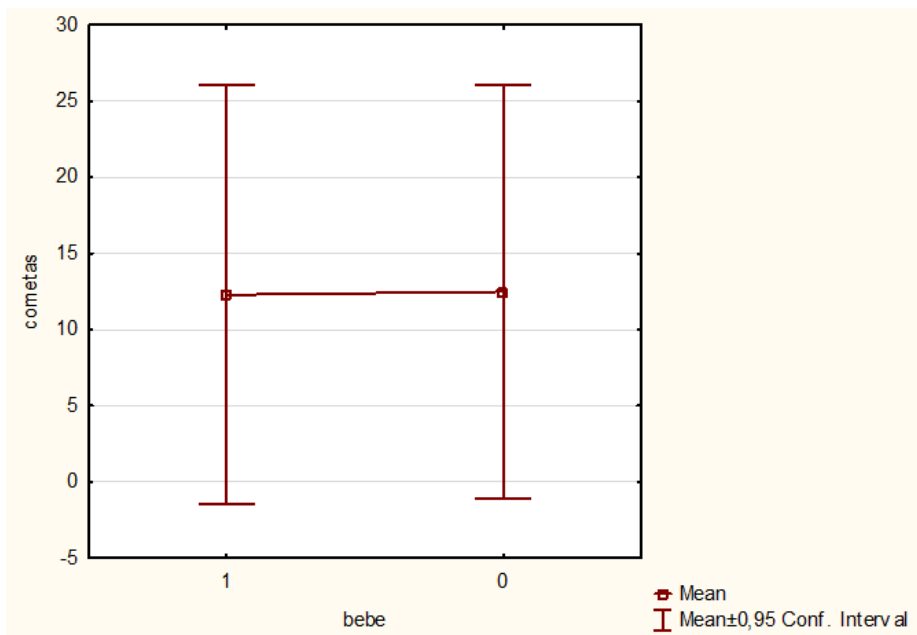


Gráfico 19: Cometas por hábito etílico dentre os técnicos em radiologia do HUGV, sendo: 1= hábito etílico e 0= sem hábito etílico.

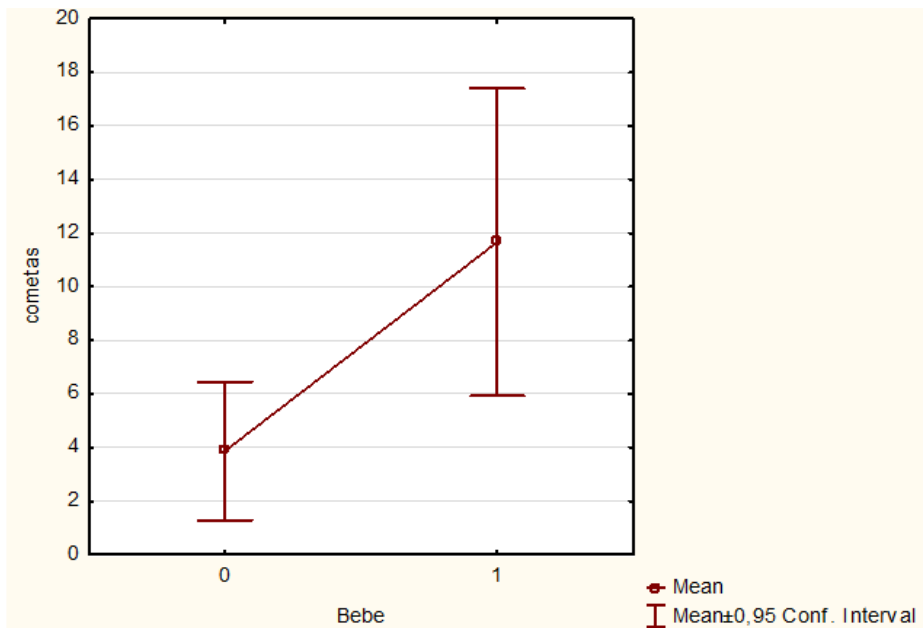


Gráfico 20: Cometas por hábito ético de docentes discentes/docentes vinculados a laboratórios de genética da UFAM, sendo: 1= hábito ético e 0 = sem hábito ético.

6 DISCUSSÃO

A exposição a agentes ambientais é um fator relacionado a uma maior quantidade de dano ao DNA, seja afetando significativamente a quantidade de mutações, acumulando lesões não reparadas e/ou diminuindo a capacidade de reparo (DA COSTA *et al.*, 2008). Em contrapartida, para a idade não existe um consenso acerca da sua influência na incidência de cometas, uma vez que alguns estudos indicam significância positiva e outros apontam para a inexistência de correlação entre aumento da idade e aumento na quantidade de cometas em um indivíduo (MOLLER *et al.*, 2000). Combinando estes dois fatores no presente estudo, a quantidade de cometas encontrados nos indivíduos mais jovens e com menor tempo de exposição anual foi expressiva. Isso pode estar relacionado ao fato de que a técnica do cometa expõe danos recentes ao material genético, podendo não guardar correlação com a memória de danos ocasionados em longo prazo (FAIRBAIN *et al.*, 1995; LIAO *et al.*, 2009).

Além disso, com relação aos técnicos de radiologia, os profissionais mais jovens parecem buscar uma melhor remuneração e, para isso, possuem uma carga-horária laboral superior. Para tanto, a maioria possui outros locais de trabalho, além do HUGV, onde prestam serviços

radiológicos, maximizando a exposição aos fatores agressores, sendo estes os agressores físicos (raio-x) e químicos (outros produtos químicos presentes nos hospitais onde trabalham).

Segundo os preceitos da lei que regula o exercício da profissão de técnico de radiologia, a jornada de trabalho deve ser de 24 horas semanais (Lei n.º 7.394, de 29 de outubro de 1985). A exposição à radiação além do que foi informado nos questionários poderia explicar, por exemplo, o indivíduo que alegou cumprir 28 horas semanais de trabalho e possuía 8 células normais e 42 cometas, número menor quando comparado a outro que informou carga de trabalho de 60 horas semanais; e ao mesmo tempo até oito vezes mais cometas do que outros indivíduos com a mesma carga-horária. Assim, a veracidade das informações coletadas fornecidas pelos profissionais de radiologia pode ser questionada, principalmente em relação à quantidade de exposição semanal, especialmente porque De Oliveira (2013) analisou os mesmos indivíduos amostrados neste trabalho e verificou um acúmulo exposicional ao raio-X superior ao declarado por alguns indivíduos no presente trabalho. No trabalho De Oliveira (2013) foram efetuadas análises de alterações cromossômicas e micronúcleos, sendo revelados danos cromossômicos dos tipos cromossomos dicêntricos, em anéis e figuras quadriradiais em alguns indivíduos, provavelmente os mesmos que apresentaram a maior incidência de cometas.

Com relação às amostras dos discentes e docentes vinculados a diferentes laboratórios de genética da UFAM, ao analisarmos três profissionais com maior tempo de exposição laboratorial (12 a 13 anos) e maiores idades (32 a 36 anos) notamos diferenças em relação ao número de cometas encontrados. Um destes indivíduos, apesar de contabilizar um total de 13 anos de exposição ao fator químico agressor, nos últimos cinco anos dedicou-se quase exclusivamente a atividade docente, tendo pouca exposição laboratorial se comparado com o seu início de carreira na pesquisa; nele a contagem de cometas foi nula. Outro indivíduo analisado apresentou cinco cometas, resultado condizente com a atividade laboratorial menos intensa desempenhada nos dois últimos anos de sua atividade profissional. O último dentre estes três profissionais analisados é um estudante de doutorado com intensa rotina laboratorial; este apresentou

danos genéticos quantitativamente mais expressivos, com 13 cometas encontrados na sua amostra sanguínea. Estes dados mostram que a forma e a intensidade de exposição laboratorial recente é o fator diferenciador, não estando estes cometas relacionados a um processo cumulativo. Além disso, outro fato que distingue estes é que o último apresenta hábito etílico, enquanto os dois primeiros não.

Entre as diferentes vias pelas quais o álcool atua, está o dano citogenético provocado pela interação dos radicais livres e acetaldeído com o DNA. Nos etilistas tais danos persistem com o tempo, mesmo quando em abstinência, devido ao ambiente oxidativo presente nas células, que torna o DNA mais susceptível a quebras por outros agentes genotóxicos (PALOMINO *et al.*, 2005). Logo, a associação estatisticamente significativa entre o hábito etílico e o número de cometas encontrados entre os discentes/docentes vinculados aos laboratórios de genética na UFAM evidencia tais alterações, sendo que as mulheres com hábito etílico apresentaram quantidade de cometa superior, apesar da incidência não ser estatisticamente significativa entre os sexos.

Estudos recentes mostram o uso preocupante de álcool entre universitários (SILVA *et al.*, 2006) e, conseqüentemente, pós-graduandos no Brasil. Considerando que 86,7% dos indivíduos amostrados nos laboratórios de genética da UFAM são graduandos e pós-graduandos, o consumo de álcool dos etilistas deste grupo pode ser maior e mais frequente se comparado com os técnicos de radiologia do grupo do HUGV. Considerando que a maior incidência de cometa é encontrada nos graduandos e pós-graduandos que apresentam hábito etílico ($p < 0,05$) é possível inferir que esta droga lícita potencializa o efeito dos químicos laboratoriais no organismo, fato que não é observado quando da associação entre hábito etílico e exposição à radiação ionizante, como no caso dos técnicos de radiologia do HUGV ($p > 0,05$).

Contudo, vale ressaltar que a diferença no acúmulo individual de cometas pode estar relacionada com a eficiência do sistema de reparo da pessoa, em que independente do nível de exposição o dano é determinado pela eficácia desse processo. GIL (2008) destaca, ainda, que o interesse da investigação nesta área tem sido focado principalmente no estudo dos

polimorfismos dos genes de reparação do DNA como um componente importante da susceptibilidade individual, considerando a reparação do DNA como um processo muito importante para a proteção do genoma. Desta forma, levando em consideração, por exemplo, um técnico ativo, com 35 anos de exposição e com apenas 1 cometa; e o indivíduo com 13 anos de laboratório e sem nenhum cometa, notamos quantidades inferiores de cometas aos demais analisados nesse estudo, e concluímos que o funcionamento correto do sistema de reparo pode ser o determinante para a instalação do dano ao material genético.

7 CONCLUSÃO

Apesar do tamanho da amostra ser pequena, e grande parte dos resultados sem significância estatística, foi possível evidenciar que a exposição à radiação pode ser um fator promotor de danos ao DNA, especialmente quando a legislação relacionada à carga horária diária não é cumprida. Em números absolutos, os danos genéticos apresentados por esses profissionais foram superiores àqueles exibidos por indivíduos em constante exposição a reagentes e técnicas laboratoriais. Ademais, o sistema de reparo é o fator individual de grande relevância para gravidade e permanência de danos. Logo, faz-se necessário maior controle da carga-horária a qual se submetem os profissionais envolvidos nos serviços de radiologia, e melhores condições de trabalho, como salário, infraestrutura adequada e equipamentos de proteção individual, a fim de que tais alterações possam ser amenizadas ou até mesmo evitadas. Além disso, este trabalho também aponta o etilismo como um fator fomentador relevante nesse processo de danos no material genético, especialmente quando relacionado a outras fontes químicas geradoras de alterações no DNA.

8 REFERÊNCIAS

- BERRA, C.M.; MENCK, C.F.M.; DI MASCIO, P. 2006. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. *Química Nova*, 29 (6): 1340.
- BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego. Lei nº 7394, de 29 de outubro de 1985. Regula o Exercício da Profissão de Técnico em Radiologia, e dá outras providências. Brasília: DOFC de 30/10/1985, P.15801.
- BRIANEZI, G.; CAMARGO, J.L.V; MIOT, H.A. 2009. Development and validation of a quantitative image analysis method to evaluate comet assay (silver staining). *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 45 (4): 325-334.
- COSTA, P. R. 1999. Modelo para determinação de espessuras de barreiras protetoras em salas para radiologia diagnóstica. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- DA COSTA, C.C. 2008. Avaliação do dano e do reparo de dna antes e depois do teste da caminhada dos seis minutos em pacientes portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- DE ALMEIDA, R.J. 2007. Estudo dos efeitos biológicos da radiação, com ênfase nos raios-X. Goiânia. Disponível em www.conter.gov.br/uploads/trabalhos/dr_ronaldo_radiologia.pdf. Acessado em 15/07/2014.
- DE OLIVEIRA, D. P. 2013. Avaliação de alterações cromossômicas e de micronúcleos por dosimetria citogenética em funcionários do serviço de radiologia do hospital universitário getúlio Vargas da universidade federal do Amazonas - hugv/ufam. Monografia. Universidade Federal do Amazonas.
- DE SOUZA, E.; DE MACEDO, J.P.S. 2008. Correlações técnicas e ocupacionais da radiologia intervencionista. *Jornal Vascular Brasileiro*, 7(4): 341-350.
- ESTÉCIO, M.R.H.; SILVA, A.E. 2002. Alterações cromossômicas causadas pela radiação dos monitores de vídeo de computadores. *Revista de Saúde Pública*, 36(3): 330-336.

FAIRBAIN, D.W.; PEGGY, L.; OLIVE, B; KIM, L.; O'NEILL, A. 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*, 339: 37-59.

FERNANDES, G.S.; CARVALHO, A.C.P.; AZEVEDO, A.C.P. 2005. Avaliação dos riscos ocupacionais de trabalhadores de serviços de radiologia. *Radiol Bras*, 38 (4): 279-281.

FUKUMASU, H.; AVANZO, J.L.; HEIDOR, R.; SILVA, T.C.; ATROCH, A.; MORENO, F.S.; DAGLI, M.L. 2006. Protective effects of guaraná (*Paullinacupana* Mart. Var. *Sorbilis*) against DEN-induced DNA damage on mouse liver. *Food and Chemical Toxicology*, 44: 862-867.

GIL, F. D. R. N. Influência de polimorfismos em genes de reparação do DNA na frequência de anomalias cromossômicas radioinduzidas. 2008. Tese de mestrado, Biologia (Biologia Molecular e Genética), Universidade de Lisboa.

HARTMANN, A.; SPEIT, G. 1995. Genotoxic effects of chemicals in the single (SCG) test with human blood cells in relation to the induction of sister chromatid exchanges (SCE). *Mutation Research*, 346: 49-56.

HUANG, X.; HALICKA, H.D.; TRAGANOS, F.; TANAKA, T.; KUROSE, A.; DARZYNKIEWICZ, Z. 2005. Cytometric assessment of DNA damage in relation to cell cycle phase and apoptosis. *Cell Proliferation*, 38: 223-243.

LIAO, W.A.; MCNUTT, M.A.; ZHU, W. 2009. The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods*, 48: 46–53.

MACEDO, H.A.; RODRIGUES, V.M.C.P. 2009. Programa de controle de qualidade: a visão do técnico de radiologia. *Radiol Bras*, 42: 37-41.

MOLLER, P.; Knudsen, L.E.; Loft, S.; Wallin, H. 2000. The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to dna-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 9: 1005–1015.

NADIN, S.B.; VARGAS-ROIG, L.M.; CIOCCA, D.R. 2001. A silver staining method for single-cell gel assay. *J Histochem Cytochem*, 9:183-6.

OSTLING, O.; JOHANSON, K.J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123-291.

PALOMINO G.M.; VOGEL, C.I.G.; COSTA, L.A.; TAKAHASHI, C.S. 2005. Utilização de biomarcadores para avaliação do dano genético induzido pelo

consumo abusivo de álcool. Resumos do 51º Congresso Brasileiro de Genética. São Paulo. ISBN 85-89109-05-4.

PEREIRA, L.M.P.B. 2009. Análise dos Aspectos Legais e Normativos de Proteção da Saúde e Segurança dos Trabalhadores com relação à Radiação Ionizante. Tese de Doutorado. Universidade Federal Fluminense.

RIBEIRO, D.A.; SCOLASTICI, C.; MARQUES, M.E.; SALVADORI, D.M. 2004. Fluoride does not induce DNA breakage in Chinese hamster ovary cells in vitro. *Brazilian Oral Research*, 3: 192-196.

SEARES, M.C.; FERREIRA, C.A. 2002. A importância do conhecimento sobre radioproteção pelos profissionais da radiologia. CEFET/SC Núcleo de Tecnologia Clínica, Florianópolis, Brasil.

SEGRETO, R.A.; SEGRETO, H.R.C. 1997. Radiação ionizante e resposta celular-atualidades; Ionizing radiation and cell response. *Radiol. Bras*, 30(6): 301-307.

SILVA, D.P.D. 2001. Estudo do efeito de radiação ionizante em metaloproteínas que ligam DNA. Dissertação de mestrado. Universidade Anova, Lisboa, Portugal.

SILVA, I.V.E.R.; MALBERGIER, A.; STEMPLIUKI, V.A.; ANDRADE, A.G. 2006. Fatores associados ao consumo de álcool e drogas entre estudantes universitários. *Rev Saúde Pública*, 40 (2): 280-288.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. 1988. A simple technique for qualification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175:184-191.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y.F. 2000. Single cell gel/Comet Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35: 206-221.

VELUDO, P.C. 2011. Efeitos da radiação X e níveis de exposição em exames imagiológicos: inquéritos a clínicos gerais. Tese de mestrado em Medicina (Saúde Pública). Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

WIKLUND, S.J.; AGURELL, E. 2003. Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay. *Mutagenesis*, 18 (2):167-175.

9 ANEXOS

Anexo 1 – Questionário aplicado antes da realização da pesquisa com profissionais da radiologia do HUGV e/ou discentes e docentes vinculados a Laboratórios de Genética da UFAM

FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS - HUGV

NOME (pode ser fictício): _____

Data de Nascimento: _____ Idade: _____ Sexo: _____

Naturalidade: _____ Cargo: _____

1 – Há quanto tempo trabalha no serviço de Radiologia do HUGV (anos)?

2 – Há quanto tempo trabalha na área de Radiologia (anos)?

3 – Atualmente, possui outros vínculos na mesma função?

4 – Carga horária diária de exposição (horas)

a) HUGV: _____ b) Outra instituição: _____

5 – Faz uso de bebida alcoólica?

6 – Tem hábito de fumar?

7 – Possui algum outro hábito que você acha que pode fazer mal a sua saúde? Gostaria de informá-lo?

Anexo 1 – Questionário aplicado antes da realização da pesquisa com profissionais da radiologia do HUGV e/ou discentes e docentes vinculados a Laboratórios de Genética da UFAM

FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS - HUGV

NOME (pode ser fictício): _____

Data de Nascimento: _____ Idade: _____ Sexo: _____

Naturalidade: _____ Cargo: _____

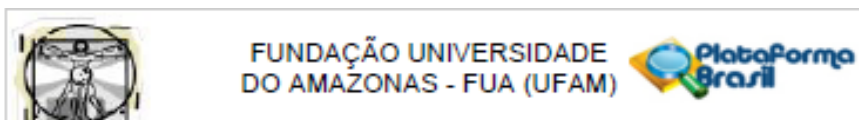
1 – Há quanto tempo trabalha em laboratórios de pesquisa (anos)?

2 – Faz uso de bebida alcoólica?

3 – Tem hábito de fumar?

4 – Possui algum outro hábito que você acha que pode fazer mal a sua saúde? Gostaria de informá-lo?

Anexo 2 – Parecer do Comitê de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Genética no Hospital Universitário Getúlio Vargas

Pesquisador: Maria Claudia Gross

Área Temática: Área 1. Genética Humana.

(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

Versão: 3

CAAE: 06054212.5.0000.5020

Instituição Proponente:

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 186.950

Data da Relatoria: 16/01/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo classificado como Área 1. Genética Humana. Esta submissão apresenta o estudo com 30 profissionais atuantes no Hospital Universitário Getúlio Vargas e visa determinar se a exposição está sendo danosa para seu material genético, como também integrar as atividades teórico-práticas de genética. Será realizado o teste de micronúcleo em profissionais da saúde expostos ao ralo X. Trata-se de um estudo genético segundo a o Item II.1.c da RESOLUÇÃO No 340, DE 8 DE JULHO DE 2004 (... pesquisa em genética de populações: estudos da variabilidade genética normal ou patológica em grupos de indivíduos e da relação entre esses grupos e uma condição particular; ...).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Espera-se verificar se os indivíduos vinculados ao HUGV que são expostos ocupacionalmente a mutágenos estão sofrendo danos no seu material genético.

Objetivo Secundário:

Utilizar testes genéticos de baixa complexidade em profissionais da saúde que atuam em áreas mais susceptíveis a promoção de alterações cromossômicas, visando estabelecer relação entre aumento da frequência de micronúcleos/ quebras cromossômicas e exposição ocupacional a mutágenos. Estabelecer um grupo de discussão acerca de genética médica na UFAM.

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

CEP: 69.057-070

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (02)3305-5130

Fax: (02)3305-5130

E-mail: cep@ufam.edu.br



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
DO AMAZONAS - FUA (UFAM)



não requer análise da CONEP, estando a pesquisadora autorizada a executar o cronograma conforme apresentado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

MANAUS, 18 de Janeiro de 2013

Assinador por:

Pedro Rodolfo Fernandes da Silva
(Coordenador)

Endereço: Rua Teresina, 4950
Bairro: Adrienópolis CEP: 69.057-070
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (02)3305-5130 Fax: (02)3305-5130 E-mail: cep@ufam.edu.br