



INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

# Efeitos Biológicos induzidos por Ressonância Magnética

Discente: Carla Sofia Pedra

Orientadora: Doutora Ana Belchior - IST

Orientadora: Doutora Sofia Nolasco - ESTeSL

Mestrado em Radiações Aplicadas às Tecnologias da Saúde

Lisboa, Setembro de 2022



INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA  
ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

# Efeitos Biológicos induzidos por Ressonância Magnética

Discente: Carla Sofia Pedra  
Orientadora: Doutora Ana Belchior  
Orientadora: Doutora Sofia Nolasco

Presidente: Doutora Maria João Carapinha – ESTeSL  
Arguente: Doutora Ana Luísa Vieira – ESTeSL  
Arguente: Doutora Isabel Guedes Bravo – IPO Porto

Mestrado em Radiações Aplicadas às Tecnologias da Saúde

(Esta versão incluiu as críticas e sugestões feitas pelo júri )

Lisboa, Setembro de 2022

## **Efeitos Biológicos induzidos por Ressonância Magnética**

Dissertação submetida no âmbito do Mestrado em Radiações Aplicadas às Tecnologias da Saúde, 12<sup>a</sup> Edição, no ramo de especialização em Imagem por Ressonância Magnética.

Carla Sofia Vaz Pedra

### **Orientadores**

Ana Lúcia Vital Belchior, PhD

Sofia Bizarro Nolasco da Silva Narciso, PhD

Lisboa, Setembro de 2022

***Mestrado em Radiações Aplicadas às Tecnologias da Saúde***

**Efeitos Biológicos induzidos por Ressonância Magnética**

A Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa tem o direito de arquivar e publicar esta dissertação de mestrado, através de exemplares impressos ou de forma digital e de a divulgar através de repositórios científicos e admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e que tal não viole nenhuma restrição imposta por artigos publicados que nela tenham sido incluídos.

## Agradecimentos

Todas as palavras que poderei dizer serão sempre poucas...

... à minha Mãe, ao meu Pai e à minha Irmã por serem sem dúvida os melhores do mundo, que me apoiaram não só neste Mestrado, mas em todas as etapas da minha vida, e claro à minha Coelhinha Oreo, e também com um agradecimento muito especial aos meus Avós que me “estragaram” com mimos e chocolates sempre...

... às minhas *Bests* Cláudia Ferreira, Manuela Pinto e Telma Mouta que tenho um enorme carinho e que estão sempre presentes em todos os meus momentos especiais...

... ao meu namorado Christopher Oliveira, por ter sido a pessoa que mais me acompanhou nestes últimos meses de trabalho, e apoiou sempre...

... à Professora Doutora Ana Belchior e Professora Doutora Sofia Nolasco Narciso, por terem aceite serem minhas orientadoras durante o terceiro semestre, e se demonstraram sempre disponíveis no esclarecimento de qualquer dúvida...

... a todos os meus colegas de Mestrado que, comigo complementaram a sua formação, por toda a disponibilidade, interajuda e amizade que ficou com alguns elementos, destacando-se a Técnica de Radiologia Vanessa Abreu e o Técnico de Radiologia Daniel Pereira ...

... ao Grupo Affidea, ao Presidente Dr. Miguel Santos que aprovou a realização da minha Tese no Grupo, e claro, à Técnica de Radiologia Rita Vidigal, Coordenadora da Unidade Affidea da Avenida da República por se ter mostrado sempre disponível a ajudar, com um especial carinho à Técnica de Radiologia Carla Almeida por toda a disponibilidade e amizade...

... ao Laboratório de Citogenética, do grupo de Proteção e Segurança Radiológica, no Campus Tecnológico e Nuclear (CTN/IST) que disponibilizou as instalações e os materiais para que fosse possível realizar este estudo...

... E como sempre por mais agradecimentos que possa referir...

... fica sempre algo por dizer...

## Abstract

**Introduction:** Magnetic Resonance Imaging (MRI) represents one of the greatest technological advances in terms of medical imaging technique used in radiology. Due to the increased number of pathologies, diagnosed by MRI, the number of patients has been increasing over the years, and consequently there is an increase of patient's exposure to non-ionizing radiation. This exposure reveals to be of concern due to the lack of knowledge about the biological effects induced by non-ionizing radiation.

**Objectives:** Quantification of the biological effects induced after MR exposure, including the detection of single-strand breaks (SSB) using the XRCC1 protein and double-strand breaks (DSB) using the histone  $\gamma$ -H2AX. Additionally, we studied the late damage by quantifying the number of induced micronuclei.

**Methods:** This is a cross-sectional, experimental, and case-control study, with two types of human Glioblastoma cell lines, the U373 MG cell line and the T98G cell line. These cell lines were exposed to magnetic fields on a Siemens Healthcare 3.0T Magnetom Skyra clinical MRI machine. Cytogenetic protocols were applied for detection of the induced biological effects.

**Results:** Regarding SSBs in both samples exposed to MRI, it is possible to verify a significant increase in XRCC1 and on the other hand, in relation to the DSBs no damage was found by  $\gamma$ -H2AX quantification. In the micronucleus (MN) quantification study, it was possible to confirm that the percentage of cells with micronuclei is considerably higher in the samples of the exposed cell lines.

**Conclusions:** It is important to analyze the adverse effects of the use of MRI at a biological level. This must be understood, recognized, and considered for the safety of patients and occupational exposure.

*Key words: Genetic damage, magnetic fields, biological effects, DNA strand breaks*

## Resumo

**Introdução:** A Ressonância Magnética (RM) representa um dos maiores avanços tecnológicos no que se refere à realização de exames de diagnóstico por imagem. Devido ao aumento do número de patologias, diagnosticadas por RM, o número de pacientes tem vindo a aumentar ao longo dos anos, e conseqüentemente há um aumento da exposição dos pacientes às radiações não ionizantes. Esta exposição revela-se preocupante devido ao desconhecimento dos efeitos biológicos induzidos pelas radiações não ionizantes.

**Objetivos:** Quantificação dos efeitos biológicos induzidos após exposição aos campos magnéticos da RM, incluindo a deteção de lesões na cadeia simples (XRCC1) e dupla do ADN ( $\gamma$ -H2AX), por técnicas de fluorescência, bem como a quantificação do número de micronúcleos induzidos.

**Métodos utilizados:** Este estudo é do tipo transversal, experimental e de caso-controlo, conta com dois tipos de amostras de linhas celulares de Glioblastomas humano, a linha celular U373 MG e a linha celular T98G. Estas linhas celulares foram expostas a campos magnéticos num equipamento clínico de RM de 3.0T, Magnetom Skyra da Siemens *Healthcare*. Após exposição das linhas celulares aos campos eletromagnéticos, foram aplicados protocolos de citogenética para deteção de lesões a cadeia simples e dupla de ADN e também protocolos de quantificação de micronúcleos induzidos.

**Resultados:** Relativamente às quebras de ligações de cadeias simples em ambas as amostras expostas à RM, é possível verificar um aumento significativo de focos XRCC1. Por outro lado em relação ao estudo das quebras de ligações em cadeias duplas não foram visualizados quaisquer focos de  $\gamma$ -H2AX. No estudo de quantificação de micronúcleos (MN), foi possível confirmar que a percentagem de células com micronúcleos é consideravelmente superior nas amostras das linhas celulares expostas.

**Conclusões:** É importante analisar os efeitos adversos do uso da RM a nível biológico, e na sua existência estes devem ser compreendidos, reconhecidos e levados em consideração para a segurança dos pacientes, Técnicos de Radiologia e restante equipa que exerce funções diárias junto do equipamento de Ressonância Magnética.

**Palavras-chave:** danos genéticos, campos magnéticos, efeitos biológicos, quebras nas cadeias de ADN.

# Índice Geral

<b>Agradecimentos</b> .....	<b>IV</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>V</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>VI</b>
<b>Índice Geral</b> .....	<b>VII</b>
<b>Índice de Tabelas</b> .....	<b>X</b>
<b>Índice de Figuras</b> .....	<b>XI</b>
<b>Lista de Símbolos</b> .....	<b>XIII</b>
<b>Capítulo I - Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1. Motivação .....	1
1.2. Objetivos e estudos realizados .....	2
1.3. Organização da tese .....	3
<b>Capítulo II - A Ressonância Magnética</b> .....	<b>5</b>
2.1. Introdução .....	5
2.2. O Equipamento utilizado.....	5
2.3. Princípios Físicos da RM .....	6
2.4. Lei de Faraday.....	7
2.5. Suscetibilidade magnética.....	7
2.5.1. Propriedades dos materiais .....	8
2.6. O Fenômeno de Ressonância .....	8
2.6.1. Tempos de Relaxação.....	9
2.6.2. Bobines.....	9
2.7. Espaço K .....	10
2.8. Sequências em RM .....	11
2.7.1. Spin Eco (SE) .....	11
2.7.2. Turbo Spin Eco (TSE) .....	12
2.7.3. Inversão Recuperação (IR) .....	13
2.7.4. Gradiente Eco (GE) .....	13
2.7.5. Difusão (DWI) .....	14

<b>2.8. Riscos associados à realização de exames de RM</b> .....	<b>15</b>
<b>2.9. Riscos associados ao B<sub>0</sub></b> .....	<b>16</b>
2.9.1. Efeitos biológicos transitórios .....	16
2.9.2. Acidentes com Projéteis .....	16
2.9.3. Efeito de torção em implantes .....	17
<b>2.10. Riscos associados aos Gradientes</b> .....	<b>18</b>
<b>2.11. Riscos associados a RF</b> .....	<b>18</b>
2.11.1. O Parâmetro SAR.....	18
2.11.2. Aquecimento dos tecidos .....	20
<b>Capítulo III- Efeitos Biológicos da Radiação não-ionizante</b> .....	<b>21</b>
<b>3.1. Introdução</b> .....	<b>21</b>
<b>3.2. ADN</b> .....	<b>21</b>
<b>3.3. Ciclo Celular</b> .....	<b>22</b>
3.3.1. Efeitos Biológicos no Ciclo Celular .....	23
<b>3.4. Biomarcadores de lesão do ADN</b> .....	<b>25</b>
3.4.1. Lesões de Cadeia Simples e de Dupla cadeia de ADN .....	25
<b>Capítulo IV - Materiais e Métodos</b> .....	<b>27</b>
<b>4.1. Introdução</b> .....	<b>27</b>
<b>4.2 Linhas celulares</b> .....	<b>28</b>
4.2.1. Meio de Cultura .....	28
<b>4.3. Protocolo de Irradiação</b> .....	<b>29</b>
4.3.1. Identificação das amostras .....	29
<b>4.4. Protocolo de Irradiação</b> .....	<b>30</b>
4.4.1. Quantificação do número de lesões no ADN .....	31
4.4.2. Detecção de lesões na cadeia simples ADN .....	32
4.4.3. Detecção de lesões na cadeia dupla ADN .....	32
4.4.4. Aquisição e análise.....	33
4.4.5. Contagem dos focos.....	34
4.4.6. Quantificação do número de Micronúcleos .....	34
<b>Capítulo V - Resultados e Discussão</b> .....	<b>36</b>
<b>5.1. Detecção de Lesões na cadeia simples do ADN (SSBs)</b> .....	<b>36</b>
<b>5.2. Detecção de Lesões na dupla cadeia do ADN (DSBs)</b> .....	<b>39</b>

5.3.	Quantificação de Micronúcleos (MN) .....	40
5.3.1.	Distribuição de MN em células BN .....	42
5.3.2.	Cálculo do índice de divisão nuclear (NDI) .....	43
<b>5.4.</b>	<b>Discussão de Resultados .....</b>	<b>45</b>
5.4.1-	Limitações à investigação.....	46
<b>Capítulo VI - Conclusão.....</b>		<b>47</b>
<b>6.1</b>	<b>Conclusão .....</b>	<b>47</b>
<b>Referências Bibliográficas .....</b>		<b>48</b>
<b>Anexos .....</b>		<b>52</b>

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.1-</b> Sequência gradiente de eco, podemos obter diferentes ponderações usando diferentes <i>Flip Angle</i> .....	14
<b>Tabela 4.1</b> - Identificação das placas de controlo, placa 1 e placa 2 para os ensaios de SSBs e DSBs.....	29
<b>Tabela 2.2-</b> Identificação das placas de 24 poços em que U é a linha U373 e T é a linha T98G.....	30
<b>Tabela 4.3</b> – Parâmetros de irradiação utilizados.....	31
<b>Tabela 4.4-</b> Volumes utilizados na Solução de lavagem e na Solução de choque hipotónico.....	34
<b>Tabela 5.1-</b> Número médio de focos XRCC1 observados nas células U373 e T98G, tanto em células de controlo (sem exposição à RM) e em células expostas à RM.....	38
<b>Tabela 5.2–</b> Distribuição da Linha celular U373, amostra de controlo (Monucleadas (Mn), binucleadas (BN), tetranucleadas (TN) e polinucleadas (Poli)).....	42
<b>Tabela 5.3-</b> Distribuição Linha celular U373, amostra irradiada (Monucleadas (Mn), binucleadas (BN), tetranucleadas (TN) e polinucleadas (Poli)).....	42
<b>Tabela 5.4-</b> Distribuição da Linha celular T98G, amostra de controlo (Monucleadas (Mn), binucleadas (BN), tetranucleadas (TN) e polinucleadas (Poli)).....	42
<b>Tabela 5.5-</b> Distribuição da Linha celular T98G, amostra irradiada (Monucleadas (Mn), binucleadas (BN), tetranucleadas (TN) e polinucleadas (Poli)).....	43
<b>Tabela 5.6-</b> Cálculo de Percentagem de MN e Índice de divisão celular da amostra controlo e da amostra irradiada das linhas celulares U373 e T98G.....	43
<b>Tabela 5.7-</b> Percentagem média de MN e $\sigma$ nas células MN.....	44
<b>Tabela 5.8-</b> A comparação da frequência MN e o NDI para células expostas e não expostas.....	45

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1-</b> Aumento demográfico relativo à realização de exames de RM.....	1
<b>Figura 2.1-</b> Equipamento de RM Magnetom Skyra 3.0T .....	5
<b>Figura 2.2.</b> Vetor de magnetização resultante da aplicação de um campo magnético externo.....	6
<b>Figura 2.3-</b> Tempos de relaxação $T_1$ (recuperação da magnetização $M_z$ , após impulso de RF de $90^\circ$ ) e $T_2$ (decaimento da magnetização $M_{xy}$ , após impulso de RF de $90^\circ$ )....	9
<b>Figura 2.4-</b> Bobines de Gradiente.....	10
<b>Figura 2.5-</b> Diagrama simplificado da sequência SE.....	11
<b>Figura 2.6-</b> Sequência Inversão Recuperação.....	13
<b>Figura 2.7-</b> Sequência de impulso GE.....	13
<b>Figura 2.8-</b> Movimentação das moléculas de água no espaço intra e extra-celulares.....	14
<b>Figura 2.9-</b> Imagens ponderadas em difusão com diferentes valores de b de paciente.....	15
<b>Figura 3.1-</b> Organização do material genético.....	21
<b>Figura 3.2-</b> Ciclo Celular.....	23
<b>Figura 3.3-</b> Regulação do Ciclo Celular.....	24
<b>Figura 3.4-</b> Lesão numa única cadeia de ADN e lesão na dupla cadeia de ADN.....	26
<b>Figura 4.1-</b> Constituição do meio de cultura.....	29
<b>Figura 4.2-</b> Imagens utilizando software Image J. <b>A-</b> Imagem original <b>B</b> e <b>C</b> Imagem decomposta em escala de cinzentos da imagem A.....	33
<b>Figura 5.1-</b> SSBs dependente de XRCC1.....	36
<b>Figura 5.2-</b> Detecção de lesões SSBs após exposição à RM Imagens de microscopia de fluorescência representativas de focos XRCC1.....	37
<b>Figura 5.3-</b> Aumento de lesões SSBs após exposição à RM.....	38
<b>Figura 5.4</b> – Representa o dano do ADN e via de reparo.....	39
<b>Figura 5.5-</b> Não foram detetadas lesões DSBs após exposição à RM. Fotografias retiradas do microscópio de fluorescência para localização de focos de DSBs.....	40
<b>Figura 5.6-</b> Imagens fotografadas diretamente do microscópio <b>A</b> – Linha celular T98G controlo. <b>B</b> – Linha celular T98G irradiada. <b>C</b> – Linha celular U373 controlo. <b>D</b> - Linha celular U373 irradiada.....	41
<b>Figura 5.7</b> - Quantificação do número médio de Mni por 1000 BN em células U373 e T98G expostas (ou não expostas) à RM.....	44
<b>Figura 5.8-</b> Distribuição média de MN por 1000 células BN em células U373 e T98G.....	45

## Lista de Abreviaturas

AC - Aberrações cromossômicas  
ADN - Ácido desoxirribonucleico  
BSA - Albumina sérica bovina  
BN - Binucleados  
CEM(s) - Campos Eletromagnéticos  
DMEM- *Dulbecco modification of Minimum Essential Media*  
DWI – Sequência de Difusão  
ETL - *Echo Train Length*  
FBS - *Fetal Bovine Serum*  
FLAIR - *Fluid attenuated inversion recovery*  
FOV - *Field of view*  
GE - Gradiente *echo*  
MN – Micronúcleos  
NDI – Índice de divisão nuclear  
Mn – Mononucleadas  
OCDE – Organização para a Cooperação do Desenvolvimento Económico  
PBS – Phosphate buffered saline  
RF - Radiofrequência  
RSR – Relação Sinal Ruido  
RM – Ressonância Magnética  
*SAR - Specific Absorption Rate*  
SDBs - Lesões de cadeia dupla  
SE- Spin eco  
*SED - Specific energy dose*  
SSBs - Lesões de cadeia simples  
SNC - Sistema nervoso central  
STIR - *Short TI inversion recovery*  
T- Tesla  
TE – Tempo de eco  
TN - Tetranucleados  
TI- Tempo de Inversão  
TR – Tempo de Repetição  
TSE- *Turbo spin echo*

## Lista de Símbolos

$A^2$  - Quadrado da área

$\alpha$ - *Flip angle*

$B_0$  - Fluxo de campo magnético

D – Tempo

$\varepsilon$  - Força eletromotriz induzida

$\Delta t$ - Intervalo de tempo

$\omega$  - Frequência angular

$\gamma$  - Razão giromagnética

$\Delta\phi$ - Variação do fluxo magnético

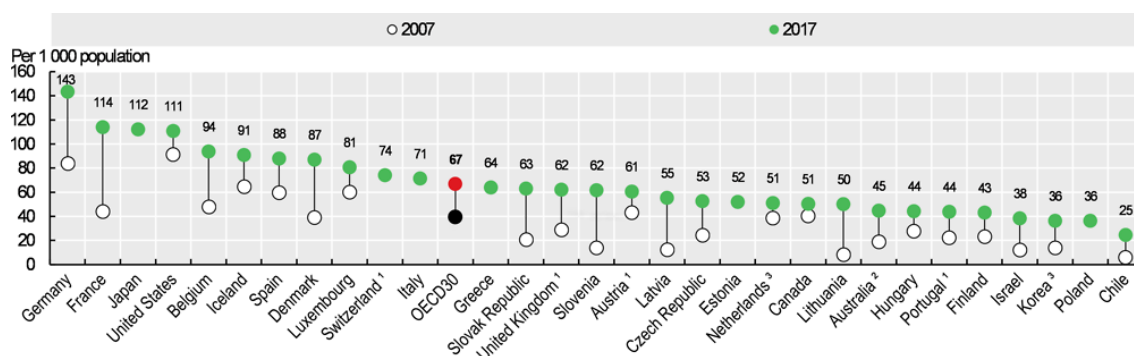
$V_T$  - Volume total

## Capítulo I - Introdução

### 1.1. Motivação

A Ressonância Magnética (RM) tem vindo a desempenhar um papel muito importante na área da saúde, devido ao aumento de doenças crónicas, ao envelhecimento da população, a um acréscimo do ritmo da inovação e a um acesso amplo à necessidade de imagens médicas, consequentemente levam a uma maior procura de exames de diagnóstico.

Segundo a Organização para a Cooperação do Desenvolvimento Económico (OCDE), a disponibilidade e utilização deste meio de diagnóstico aumentou consideravelmente nestas últimas duas décadas (figura 1.1). Deste modo, surgiu a preocupação relativamente à excessiva realização de exames de RM, muitas vezes sem qualquer vantagem clínica para o paciente.<sup>1</sup>



**Figura 1.1-** Aumento demográfico relativo à realização de exames de RM (Figura adaptada [1])

A RM é uma técnica de diagnóstico por imagem que envolve o uso de campos magnéticos e de impulsos de radiofrequência. Estes permitem criar, com grande definição, imagens do interior do corpo humano. Ao longo dos últimos anos, muito se tem discutido sobre o impacto dos campos eletromagnéticos (CEM(s)) na saúde. Assim, os efeitos biológicos que podem ser induzidos pela RM são os:

- i) Efeitos Térmicos: ocorrem no indivíduo, durante a realização de um exame de RM, devido ao aquecimento dos tecidos causado pela absorção direta de energia dos campos elétricos.
- ii) Efeitos Não-Térmicos: resultantes dos mecanismos da interação do campo magnético com o tecido humano.

Na literatura estão descritos vários estudos acerca dos efeitos biológicos induzidos pela exposição à RM.

Lee e os seus co-autores<sup>2</sup> estudaram os efeitos biológicos, em linfócitos humanos expostos a campos eletromagnéticos, utilizando o ensaio do Cometa Alcalino que permite quantificar o dano biológico no Ácido desoxirribonucleico (ADN). O estudo concluiu que o dano do ADN aumentou em média duas vezes, em células expostas a RM 3.0 Tesla (T), em comparação com as células de controlo não expostas.

Tubiana e os co-autores<sup>3</sup> avaliaram os efeitos do campo magnético utilizando sequências específicas *turbo spin echo* (TSE) e gradiente *echo* (GE), e um equipamento de RM de 3.0 T, na indução de lesões na dupla cadeia do ADN (*Double Strand Breaks - DSBs*). Segundo este artigo, podemos concluir que não foi detetado qualquer aumento significativo no número de DSBs, nas células expostas a duas sequências TSE diferentes ou uma sequência GE ou o campo estático em 3.0 T.

Vijayalaxmi e os seus co-autores<sup>4</sup> estudaram a indução de aberrações cromossómicas (AC) em linfócitos humanos. Concluíram que houve um aumento de AC após exposição dos linfócitos à RM. Este estudo utilizou apenas uma amostra, pelo que devem ser efetuados outros estudos semelhantes para uma análise mais fidedigna.

Quanto ao número de micronúcleos (MN), vários estudos concluíram que há um aumento no número de MN induzidos que é dependente da duração da exposição à RM<sup>4</sup>. Schwenzer e os seus co-autores<sup>5</sup> observaram um aumento significativo de MN imediatamente após a exposição à RM, tendo normalizado dentro de 24-120 horas. Por fim, Vijayalaxmi e os seus co-autores<sup>4</sup> estudaram diferentes tipos de mutações nas quais foram examinadas bactérias, *Salmonella typhimurium*. Não foram observados efeitos que conduzam a um aumento da mutagénese.

## 1.2. Objetivos e estudos realizados

Devido ao aumento e procura dos exames de diagnóstico por RM, é importante compreender os efeitos biológicos causados pela exposição a estes equipamentos. Existem estudos<sup>2,6,7</sup> que relatam um aumento do dano genético relativo à exposição de radiofrequência, levantando uma questão muito importante, se os usos de equipamentos de RM deveriam ser mais limitados na sua prescrição médica.

Presentemente é conhecida a radiosensibilidade celular relativa à radiação ionizante, sabendo-se que esta é tanto maior, quanto menor a diferenciação celular. No entanto, sabe-se também que o tempo de aparecimento das lesões produzidas pela

radiação varia com o tipo de célula afetada. Do mesmo modo, é necessário perceber-se também a relação entre a radiosensibilidade celular e a exposição à radiação não-ionizante, onde se encontram incluídos os campos magnéticos dos equipamentos de RM.

O aumento dos efeitos adversos associados à exposição a campos magnéticos tem sido estudado há vários anos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Os danos no ADN, especialmente as Lesões de cadeia simples (SSBs de “*single strand breaks*”), DSBs Lesões de cadeia dupla (DSBs de “*double strand breaks*”) e as aberrações cromossômicas têm sido o principal foco de investigação, uma vez que têm um maior potencial de levar à carcinogénese ou efeitos hereditários<sup>8</sup>.

O principal objetivo deste trabalho é a quantificação dos efeitos biológicos induzidos após exposição aos campos magnéticos da RM, incluindo a deteção de lesões na cadeia simples (XRCC1) e dupla ( $\gamma$ -H2AX) do ADN por técnicas de fluorescência e a quantificação do número de micronúcleos induzidos. Para atingir os objetivos descritos realizaram-se os seguintes estudos:

- Otimização dos parâmetros da RM, como por exemplo cálculo do *Specific Absorption Rate* (SAR), para a exposição das células num equipamento clínico de 3T.
- Quantificação dos efeitos biológicos imediatos, induzidos em duas linhas celulares de glioblastoma, U373 e T98G após exposição à RM;
- Quantificação dos efeitos biológicos tardios, induzidos em duas linhas celulares de glioblastoma, U373 e T98G após exposição à RM.

### 1.3. Organização da tese

O presente trabalho de investigação está organizado em seis capítulos principais divididos em vários subcapítulos de modo a garantir uma leitura organizada e de fácil perceção sobre conceitos básicos e essenciais para compreensão deste trabalho.

#### **Capítulo I: Introdução**

É apresentado uma breve justificação do tema escolhido, apresentação resumida de artigos considerados pertinentes para este trabalho e ainda os objetivos principais desta investigação.

## **Capítulo II: A Ressonância Magnética**

Tem como objetivo proporcionar um enquadramento teórico necessário ao leitor para uma melhor compreensão de toda a investigação. Deste modo, são apresentados de forma sintetizada os princípios físicos básicos de um equipamento de RM, assim como a descrição do equipamento de RM utilizado nesta investigação.

É também descrito o fenómeno de suscetibilidade magnética dos materiais e as suas propriedades, é explicada a lei da indução eletromagnética e os riscos associados à realização do exame de RM.

## **Capítulo III: Efeitos Biológicos da Radiação não- ionizante**

Neste capítulo é feita uma breve descrição da constituição do ADN e todo o processo do Ciclo Celular. São também descritos os biomarcadores de exposição utilizados neste trabalho.

## **Capítulo IV: Materiais e Métodos**

São apresentados os materiais e métodos utilizados no decorrer desta investigação. Encontra-se descrito o protocolo de exposição das células à radiação não-ionizante e também o protocolo de citogenética utilizado.

## **Capítulo V: Resultados e Discussão**

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos após a aplicação dos protocolos de citogenética, é apresentada também uma análise estatística dos mesmos, assim como uma breve discussão.

## **Capítulo VI: Conclusão**

Para além da conclusão deste estudo, são apresentadas as limitações e recomendações de estudos futuros, por último reunir-se a bibliografia e os anexos utilizados na elaboração desta investigação.

## Capítulo II - A Ressonância Magnética

---

### 2.1. Introdução

A RM é um exame de diagnóstico que utiliza uma propriedade física exibida por núcleos de determinados elementos que, ao serem submetidos a um campo magnético forte e excitados por ondas de rádio em determinada frequência (Frequência de Larmor), emitem um sinal que ao ser captado por uma antena recetora, é transformado numa imagem.

Em 1882, Nikola Tesla descobriu o campo magnético rotativo. Em 1946, o prémio Nobel foi atribuído a Felix Bloch e Edward Purcell, por terem descoberto o fenómeno da RM em sólidos e líquidos. Em 1971 Raymond Damadian demonstrou que há diferenças no tempo de relaxamento dos diferentes tecidos do corpo humano, motivando a introdução da utilização da RM na medicina como um importante método na deteção de patologias. Hoje em dia é das técnicas imagiológicas mais requisitadas na deteção, prevenção e estudo da doença<sup>9,10</sup>.

### 2.2. O Equipamento utilizado

Este estudo realizou-se num equipamento de RM Magnetom Skyra da Siemens *Healthcare*, de última geração, supercondutor de elevado fluxo de campo magnético de 3.0T, com um peso de 5755 Kg (incluindo o agente frigorígeno – Hélio).

Sendo um equipamento de última geração de tecnologia, possui uma bobine integrada da Siemens o Tim 4G, tecnologia que oferece uma excelente qualidade de imagem e rápida aquisição, trazendo maior precisão, flexibilidade e velocidade.<sup>11</sup> (figura 2.1).



**Figura 2.1-** Equipamento de RM Magnetom Skyra 3.0T (Figura adaptada [11])

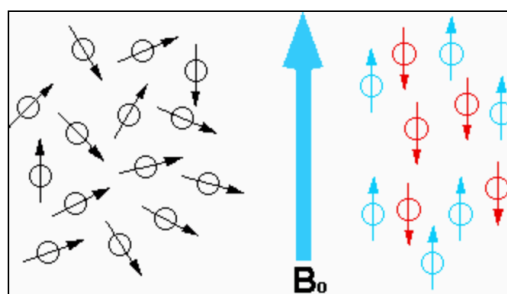
Neste trabalho utilizou-se apenas uma antena de crânio (Bobine *Head/Neck*) não sendo necessário utilizar as bobinas acopladas do equipamento. Esta antena proporciona uma excelente relação sinal ruído (SNR), constituída por 20 canais. É uma antena recetora e emissora de radiofrequência, que revela detalhes anteriormente difíceis de reconhecer, melhorando os exames de neurorradiologia, proporcionando tempo de exame reduzido e boa qualidade de imagem, permitindo ao paciente permanecer menos tempo dentro do equipamento.<sup>11</sup>

É um equipamento considerado seguro tanto para o paciente como para os funcionários que diariamente trabalham com este equipamento, não havendo relatos de acidentes até hoje.

### 2.3. Princípios Físicos da RM

O corpo humano é constituído maioritariamente por água, uma molécula constituída por dois átomos de hidrogénio ( $H^+$ ) e apenas um átomo de oxigénio ( $H_2O$ ).

O átomo de hidrogénio é o elemento com o núcleo mais simples, possui apenas um próton que consiste numa pequena partícula positivamente carregada associada a um momento angular ou também chamado de spin (o spin é caracterizado por uma rotação sob o seu próprio eixo). Em adição ao momento de spin, o átomo de  $H^+$  também possui um momento magnético, ou seja, na presença de um campo magnético estático externo  $B_0$ , os spins do  $H^+$  que têm uma posição aleatória, alinham-se ao campo magnético presente, uns de forma paralela (estado de menor energia), os restantes de forma antiparalela (estado de maior energia)<sup>12</sup> (figura 2.2).



**Figura 2.2.** Vetor de magnetização resultante da aplicação de um campo magnético externo. Os vetores azuis alinham-se paralelamente a  $B_0$  e os vetores vermelhos alinham-se de forma antiparalela. (Figura adaptada[12]).

Quando um tecido é colocado num campo magnético externo ( $B_0$ ) a magnetização tecidual atinge um valor de equilíbrio que é proporcional à intensidade de  $B_0$ , sendo assim é criada uma magnetização no eixo longitudinal (eixo z). No entanto,

os prótons não se alinham no eixo z, mas sim movimentam-se em torno de um eixo gravitacional, chamado de precessão.

No movimento de precessão de um núcleo de  $H^+$ , quanto maior o campo magnético, maior será a frequência com que os spins giram em torno do seu eixo, a este processo chama-se Frequência de Larmor, calculada segundo a seguinte expressão  $\omega = \gamma \times B$  em que a frequência angular ( $\omega$ ) é diretamente proporcional ao fluxo do campo magnético ( $B_0$ ) e a razão giromagnética ( $\gamma$ ).

Deste modo o  $H^+$  é o átomo mais apropriado para obtenção de imagens por RM<sup>13</sup>.

## 2.4. Lei de Faraday

A Lei de Faraday ou também designada por lei da Indução eletromagnética, foi descoberta pelo Físico e Químico Michael Faraday em 1831. Esta lei estipula que a variação do fluxo de campo magnético através de materiais condutores induz o aparecimento de uma corrente elétrica, demonstrando a existência de uma relação direta entre fenômenos elétricos e magnéticos, dando origem ao conceito de “eletromagnetismo”. Mais tarde, foi Neumann que procedeu à fórmula matemática  $\varepsilon = \frac{\Delta\phi}{\Delta t}$ , que se traduz pela força eletromotriz induzida ( $\varepsilon$ ) é igual à variação do fluxo magnético ( $\Delta\phi$ ) sobre o intervalo de tempo ( $\Delta t$ ).

Segundo a lei de Faraday, o movimento relativo entre o íman e a solenóide origina uma corrente elétrica<sup>14</sup>.

## 2.5. Suscetibilidade magnética

A suscetibilidade magnética é uma característica intrínseca de cada material e da sua identidade, estando relacionada com a estrutura atômica e molecular de cada átomo.

A intensidade do sinal em RM depende da suscetibilidade magnética, que é caracterizada pela capacidade que um determinado material tem de se tornar magnetizado quando é submetido à presença de um campo magnético externo. O magnetismo é uma propriedade fundamental da matéria. É gerado através de cargas em movimento, usualmente eletrões<sup>15</sup>.

### 2.5.1. Propriedades dos materiais

A suscetibilidade magnética mede a diferença relativa entre a intensidade do campo magnético registado dentro e fora de um objeto composto por um determinado material. Estas diferenças dependem da estrutura atômica ou molecular do material em causa.

Assim dividimos os materiais em:

- Materiais Diamagnéticos: apresentam uma pequena repulsão aos campos magnéticos externos, são materiais que não possuem momento magnético só por si.
- Materiais Paramagnéticos: apresentam uma ligeira atração a campos magnéticos externos, aumentando a intensidade do campo magnético externo em que são induzidos. No entanto não possuem nenhum momento magnético só por si.
- Materiais Ferromagnéticos: possuírem uma elevada suscetibilidade magnética, sendo materiais que possuem momentos magnéticos espontâneos mesmo na ausência de um campo magnético externo.

A maioria dos tecidos humanos possui um comportamento diamagnético ou fracamente paramagnético<sup>16</sup>.

## 2.6. O Fenómeno de Ressonância

O fenómeno de RM só ocorre quando é introduzida energia no sistema de spins nucleares, com a frequência próxima da de Larmor. O sinal em RM só acontece na presença de um novo campo magnético de ação  $B_1$  (onda RF), que vai interferir nos spins que estão sob ação de  $B_0$ . Quanto mais longa for a aplicação do campo  $B_1$ , maior vai ser o ângulo que  $M_0$  (magnetização global) faz com  $B_0$ , o fenómeno de ressonância forma-se assim, existindo a igualdade entre a frequência de  $B_1$  e a precessão em torno de  $B_0$ .

Só existe cedência de energia se  $B_1$  e  $M_0$  atuarem perpendicularmente entre si. Em RM a emissão de energia é induzida pela interação do núcleo com o meio, ou com outros núcleos.

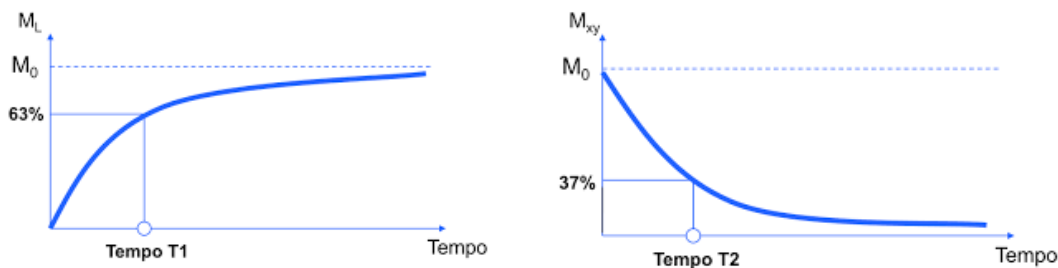
Assim, quando termina um impulso de RF, a  $M_0$  não fica a precessar em torno de  $B_0$ , esta, tende a regressar ao alinhamento inicial de  $B_0$ .

Consequentemente, o sistema vai libertar energia para o meio por processos de relaxação, caracterizados pelas constantes de relaxação  $T_1$  e  $T_2$ .

### 2.6.1. Tempos de Relaxação

Relaxação  $T_1$ , também designada por longitudinal ou spin-rede. A constante de tempo do processo de relaxação  $T_1$  é o tempo que decorre até a magnetização longitudinal recuperar 63% do seu valor inicial. Para ocorrer relaxação  $T_1$ , os núcleos têm de perder energia, transferindo energias para outros núcleos por colisões que provocam aquecimento. No entanto, estes valores são mínimos e essa energia é rapidamente dissipada.

Relaxação  $T_2$ , relaxação transversal ou ainda chamada de relaxação spin-spin, é caracterizada pela taxa de decaimento da magnetização transversal. A constante de tempo do processo de relaxação  $T_2$  é o tempo que decorre até a magnetização transversal atingir 37% do seu valor inicial, ou seja, existe desmagnetização<sup>17</sup> (figura 2.3).



**Figura 2.3-** Tempos de relaxação  $T_1$  (recuperação da magnetização  $M_z$ , após impulso de RF de  $90^\circ$ ) e  $T_2$  (decaimento da magnetização  $M_{xy}$ , após impulso de RF de  $90^\circ$ ) (Figura adaptada[17])

### 2.6.2. Bobines

Para se produzir sinal em RM vai ser necessário o contributo de um novo campo magnético denominado  $B_1$  (onda de RF), no qual interfere com os spins sob a ação de  $B_0$ . Assim, para se conseguir sinal em RM são necessárias as bobines de RF. Por outro lado, para se adquirir imagem, são também necessárias as bobines de gradiente. Existindo assim, dois tipos de bobines, as bobines de RF e as bobines de gradiente.

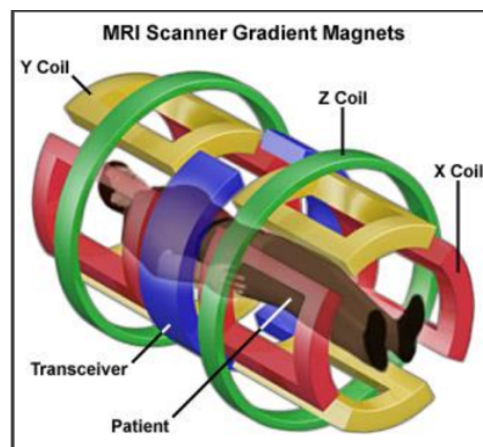
As bobines de RF têm um papel fundamental na transmissão de potência e na captação do sinal induzido pelos spins que compõem a amostra. Estas bobines afetam diretamente a qualidade de imagem através da homogeneidade do campo e da relação sinal ruído, têm também como missão transmitir impulsos de RF, podendo também ser recetoras de sinal proveniente do tecido biológico. Existem diversas bobines de RF com uma grande quantidade de canais e funções, também conhecidas por antenas, distinguindo-se as antenas de superfície, são antenas recetoras que se adaptam à zona

anatômica em estudo, permitem FOV (*field of view*) mais pequenos. E as antenas de volume que permite estudar grandes áreas<sup>17</sup>.

Quanto às bobines de gradiente, a sua função é fazer a localização espacial do sinal em ressonância. Este tipo de bobines é constituído por *loops* de fios ou folhas finas de material condutor de forma cilíndrica, separados por correntes opostas, criando campos magnéticos de diferentes polaridades. (figura 2.4)

Assim existem três pares de gradientes dentro do magneto:

- ▶ Gradiente de seleção de corte:  $G_z$ , determina a espessura de corte
- ▶ Gradiente de codificação em fase:  $G_y$ , variação linear de prótons ao longo de  $B_0$ , com a fase de excitação provocada por  $B_1$ .
- ▶ Gradiente de codificação em frequência:  $G_x$ , codificação do espectro de frequências de ressonância localizados no eixo dos x.



**Figura 2.4-** Bobines de Gradiente: Seleção de corte ( $G_z$ ), Codificação em fase ( $G_y$ ) e codificação em frequência ( $G_x$ ) (Imagem adaptada [18])

## 2.7. Espaço K

Todas as informações usadas para a apresentação das imagens em RM são adquiridas primariamente no espaço K, representando o domínio das frequências espaciais.

O espaço K não é um local físico no equipamento, é algo abstrato, possível de ser entendido como uma matriz que contém uma série de informações relativas das frequências e fases de sinais recolhidos. Os gradientes de codificação em fase e em frequência atuam em diferentes direções correspondendo respetivamente aos eixos de coordenadas X e Y, sendo formada uma matriz. A cada ponto da matriz corresponde

uma intensidade de sinal e uma posição que representa a amplitude do sinal recebido num determinado tempo.

Assim, a periferia do espaço K contém informações sobre a resolução espacial do objeto, enquanto as linhas centrais representam o contraste da imagem. Deste modo, a imagem como a vemos é obtida através da Transformada de Fourier.

A direção do preenchimento do Espaço K está relacionada com a polaridade positiva ou negativa do gradiente. É importante salientar que quanto maior o número de linhas do Espaço K, maior a quantidade de sinal recolhido. Consequentemente o tempo necessário para adquirir uma imagem também será maior<sup>17,19,20</sup>.

## 2.8. Sequências em RM

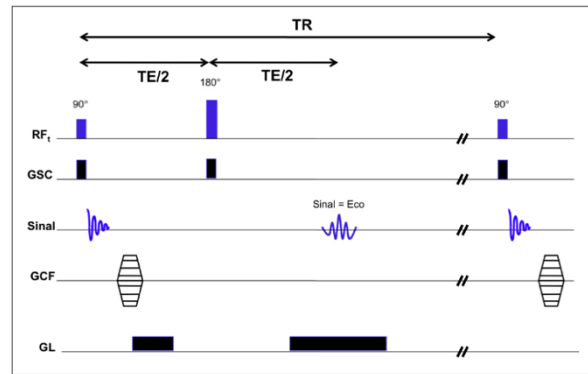
Um bom contraste dos tecidos consegue-se ajustando o tempo, ordem, amplitude e frequência de repetição dos impulsos de RF, o que pode ser feito ao ajustarmos os gradientes do campo magnético.

As sequências em RM baseiam-se em dois grandes grupos:

- Spin Eco : Inversão recuperação
- Eco Gradiente

### 2.7.1. Spin Eco (SE)

Um aspeto fundamental para a aquisição do sinal que irá produzir a imagem é a formação de ecos, que foi observado e descrito por Hahn em 1950 e é a base para estudarmos impulsos de sequências. Hahn descreveu que, se estimularmos os prótons com um impulso de RF inicial de  $90^\circ$  e, após um determinado tempo ( $t$ ), enviarmos um segundo impulso de  $180^\circ$ , com o objetivo de eliminar a falta de homogeneidade de campo observaremos que, além do surgimento de sinal na bobine após o primeiro impulso, também haverá o surgimento de um segundo sinal, que será um eco do primeiro<sup>17</sup> (figura 2.5).



**Figura 2.5-** Diagrama simplificado da sequência SE, mostrando a ativação dos gradientes de seleção de corte (GSC), codificação em fase /GCF e codificação em frequência (GL). (Figura adaptada[17])

Os contrastes numa imagem SE, variam consoante o TR (tempo de repetição de um impulso dentro de uma sequência) e o TE (tempo de eco é o tempo que decorre desde a aplicação de um impulso até à leitura do sinal).

**Tabela 2.1-** Ponderações em SE conseguidas através da alteração dos parâmetros TR e TE. (Tabela adaptada[21])

Ponderação	TR (ms)	TE (ms)
T1	Curto (<500)	Curto (5 - 25)
T2	Longo (>1500)	Longo (>90)
DP	Longo (>1500)	Curto (5 - 25)

A sequência SE tem como vantagem uma boa razão sinal ruído e ajuda a minimizar efeitos de suscetibilidade. No entanto, tem a desvantagem de ter tempos de aquisição longos e o SAR mais elevado do que na sequência GE, apenas se adquirir imagens ponderadas em  $T_2$ , e não  $T_2^*$  <sup>17</sup>.

## 2.7.2. Turbo Spin Eco (TSE)

A sequência de TSE, baseada na tradicional SE, é descrita como uma aquisição rápida dos processos de relaxação. Nesta sequência é utilizado impulsos consecutivos de 180° designados por ETL (*Ehco Train Lenght*), utilizando um único TR. Isto permite o preenchimento de uma linha do Espaço K a cada eco recolhido, diminuindo consideravelmente o tempo de aquisição total de uma sequência.

Os diversos impulsos de 180° alteram a interação entre os átomos de  $H^+$  e as moléculas de gordura, provocando um  $T_2$  mais longo fazendo com que, na imagem, a gordura apareça mais brilhante.

Esta técnica apresenta um aumento do SAR, uma vez que damos mais impulsos num curto espaço de tempo originando maior deposição de energia.

O número de cortes em cada TR é da do por:  $N_{slices} = \frac{TR}{ETL \times IES}$  sendo o IES o espaço entre os ecos<sup>17</sup>.

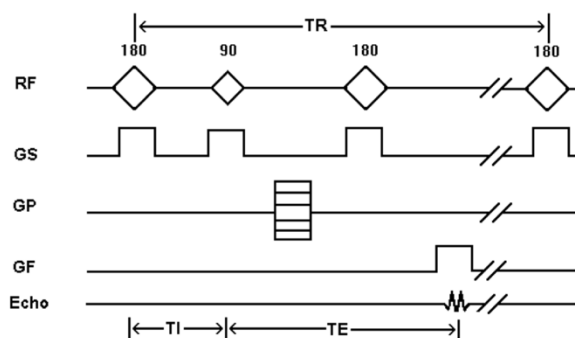
### 2.7.3. Inversão Recuperação (IR)

Nesta técnica é possível a saturação física dos tecidos, pode ser adicionada antes de qualquer outra sequência. Tem como objetivo selecionar o tecido que queremos manipular, consoante da escolha do tempo de inversão (TI) adequado.

Deste modo surgem duas sequências muito utilizadas:

- ▶ STIR (*short time inversion recovery*) utilizada para supressão da gordura (TI curto 100-175 ms).
- ▶ FLAIR (*Fluid attenuated inversion recovery*) utilizada para a supressão de fluidos (TI longo 1700 – 2200 ms).

Esta sequência acontece quando é aplicado um pré-impulso de RF inicial de 180° que inverte a magnetização longitudinal. O tempo de inversão é então desde que aplicamos esse impulso de 180° até os 90° seguintes. Este tempo determina o tecido que vai ter o sinal anulado (figura 2.6)<sup>22</sup>.

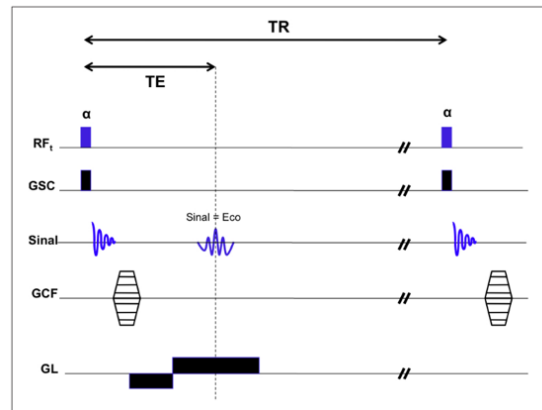


**Figura 2.6-** Sequência Inversão Recuperação

GS: Gradiente de seleção de corte  
GP: Gradiente de codificação em fase  
GF: Gradiente de codificação em frequência  
(Figura adaptada [22])

### 2.7.4. Gradiente Eco (GE)

As sequências de impulso gradiente eco (GE) são semelhantes à SE. Neste caso, em vez de se usar um impulso de RF de 180° para que os spins tornem ao estado de fase, utiliza-se impulso de RF de modo a rodar a magnetização de um ângulo  $\alpha$  designado de *Flip Angle*. Deste modo o *Flip Angle* inicial pode ser inferior a 90°, assim ao utilizar impulso de RF com menos energia, o SAR também será menor do que nas sequências SE. Como é uma técnica mais rápida que a anterior pode ser usada em protocolos de imagens dinâmicas e aquisições 3D (figura 2.7).



**Figura 2.7-** Sequência de impulso GE. O pulso de excitação de  $90^\circ$  é substituído por um flip angle ( $\alpha$ ) e invés de um impulso de RF de  $180^\circ$ , é utilizado um gradiente codificador de frequência ou de leitura (GL) para desfasar e logo a seguir colocar os spins na sua posição inicial. (Figura adaptada [17])

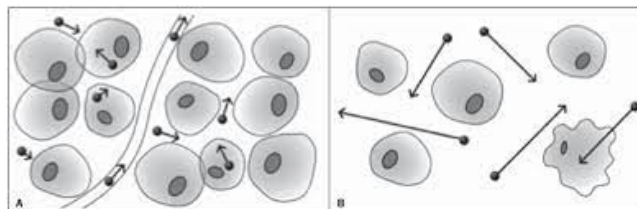
**Tabela 2.1-** Sequência gradiente de eco, podemos obter diferentes ponderações usando diferentes *Flip Angle*. (Tabela adaptada [21])

Ponderação	Flip Angle (FA)	TR (ms)	TE (ms)
T1	Elevado ( $70^\circ$ )	Curto (<50)	Curto (mín.)
T2*	Reduzido (10 - $20^\circ$ )	Longo (>100)	Longo (20)
DP	Reduzido (10 - $20^\circ$ )	Longo (>100)	Curto (mín.)

### 2.7.5. Difusão (DWI)

A sequência de difusão é baseada no Movimento Browniano, caracterizado como o movimento ao acaso das moléculas de água através dos tecidos biológicos, o que resulta na perda de sinal nesta sequência (figura 2.8).

A barreira à difusão das moléculas de água mais conhecida é a membrana celular. Outros exemplos de barreiras são os componentes estruturais, conexões celulares e conexões tecidulares, tais como o citoesqueleto, as macromoléculas e os organelos<sup>23</sup>.

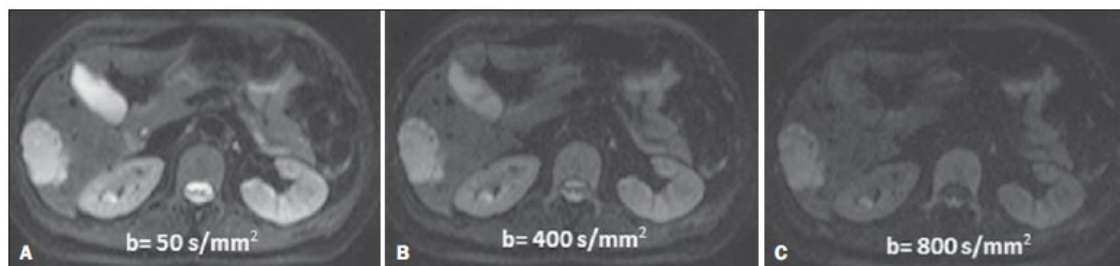


**Figura 2.8-** Movimentação das moléculas de água no espaço intra e extra-celulares. Em (A) – Existência de maior quantidade de células, (B) menor quantidade de células permite a sua movimentação pelo meio. (Figura adaptada[23])

Um dos parâmetros utilizados na DWI é o valor de  $b$ , que regula os níveis de sensibilidade desta sequência. Assim, utilizando-se valores de  $B$  baixos, entre  $b=0$

$s/mm^2$ ,  $b=50 s/mm^2$  e  $b= 100 s/mm^2$ , consegue-se observar mais “imagem anatômica” com atenuação dos vasos e do liquor. Para valores de  $b$  mais elevados entre  $b=800 s/mm^2$  e  $b=1000 s/mm^2$  tecidos com elevada densidade celular aparecem com hipersinal. Assim, a sensibilidade à difusão de uma sequência de DWI é tanto maior quanto maior for o valor de  $b$  (figura 2.9).<sup>24</sup>

A sequência de difusão, permite detetar pequenas variações à difusão em tecidos normais ou alterados por processos patológicos, mostrando áreas de restrição.



**Figura 2.9-** Imagens ponderadas em difusão com diferentes valores de  $b$  de paciente. A imagem com o valor de  $b 50 s/mm^2$  é mais "anatômica", com atenuação dos efeitos da perfusão. (B, C) observa-se, progressivamente, atenuação da intensidade do sinal dos tecidos normais, entretanto, o hemangioma persiste com alto sinal. (Figura adaptada [24])

## 2.8. Riscos associados à realização de exames de RM

Existem cuidados e considerações gerais a ter em conta aquando da realização de um exame de RM, sendo importante a triagem dos doentes, acompanhantes ou outros profissionais de saúde que possam acompanhá-los, realizando um questionário de segurança – Consentimento informado – onde se encontram perguntas de extrema importância que o paciente deve responder com veracidade. Em anexo (1) encontra-se um exemplo de questionário de consentimento informado obrigatório que é facultado ao paciente antes da realização do exame de RM<sup>24</sup>.

Existem indefinições relativamente ao impacto dos CEM(s) poderem induzir efeitos biológicos. Estes efeitos encontram-se divididos em duas categorias:

- › Efeitos térmicos que ocorrem no indivíduo durante a realização de um exame de RM, como o aquecimento dos tecidos causado pela absorção direta de energia dos campos elétricos medido através da SAR<sup>25</sup>.
- › Efeitos não-térmicos resultantes dos mecanismos da interação do campo magnético com o tecido humano, são efeitos bioquímicos ou eletrofísicos que não estão relacionados com o aumento da temperatura. Estima-se que

radiações de baixa frequência e potência podem alterar as cadeias de ADN causando mutações a nível das células<sup>25</sup>.

## 2.9. Riscos associados ao $B_0$

Os riscos associados ao  $B_0$  podem ser sentidos tanto pelo profissional de saúde como pelos pacientes, oscilam com a sensibilidade de cada pessoa e consequentemente a duração e o efeito tendem a ser mais intensos quanto maior for a intensidade do campo magnético<sup>17</sup>.

Existem alguns relatos de pacientes e profissionais de saúde que, em equipamentos a partir dos 3.0T, apresentam sintomas transitórios, tais como: vertigens e sabor metálico na boca. Isto pode ocorrer quando as pessoas se movem através das várias linhas de fluxo ou quando um paciente é rapidamente posicionado para o isocentro do equipamento<sup>17</sup>.

### 2.9.1. Efeitos biológicos transitórios

Existem relatos de pacientes que referem a sensação de se estarem a deslocar numa trajetória curva quando o técnico o coloca no isocentro do equipamento, podendo existir uma ligação entre a intensidade e a duração dos efeitos com a velocidade com que paciente é centrado. Por este motivo, é recomendado que aquando da realização de exames de RM de elevado campo, a mesa seja movimentada com cuidado.

Também podem ocorrer distúrbios visuais sob forma de “flashes”, isto acontece devido à Lei de Faraday, quando a movimentação de um condutor através de um campo magnético externo existe a indução de uma corrente elétrica nesse condutor, acontece o mesmo quando o nervo ótico (sendo o condutor) é estimulado provocando o aparecimento de “flashes” à medida que o paciente é movido através do campo magnético estático.

De um modo geral, os efeitos biológicos transitórios não necessitam de grande preocupação de um ponto de vista de segurança, todos os efeitos deste tipo relatados foram revertidos depois de alguns minutos, não existindo relatos de efeitos adversos na saúde do paciente ou do trabalhador em equipamentos até 8.0T<sup>27</sup>.

### 2.9.2. Acidentes com Projéteis

São acontecimentos que é possível evitar, com maior vigilância, presença de sinalização e formação adequada a todos os profissionais. São acidentes que ocorrem e podem ser muito graves.

Acontece que a força necessária para acelerar algo com propriedades ferromagnéticas em direção ao isocentro do equipamento é proporcional ao produto da densidade de fluxo do magneto (intensidade do campo) e a variação espacial do gradiente do campo magnético estático. Em equipamentos de alto campo, materiais ferromagnéticos à distância de vários metros podem ser acelerados em direção do magneto, resultando em projeteis de elevadas velocidades terminais<sup>27</sup>.

No caso de um acidente com um projétil de grandes dimensões, é muito provável que se tenha de baixar consideravelmente o campo magnético dentro da sala ou provocar um “quenching” (procedimento de segurança que libera o gás hélio através de um duto especial, chamado de “Tubo Quench”, ou seja é um tubo de exaustão de emergência) do magneto supercondutor, principalmente se existir vidas em risco<sup>26</sup>.

Objetos de menores dimensões podem também provocar danos aos pacientes devido à elevada energia cinética com que são projetados, e mesmo na ausência de perigo imediato para o paciente ou trabalhadores, estes podem numa fase posterior prejudicar gravemente a qualidade da imagem e provocar artefactos<sup>27</sup>.

### 2.9.3. Efeito de torção em implantes

Para além dos efeitos de atração ferromagnética, dispositivos implantados como stents, clips, neuro estimuladores, pacemakers, entre outros, podem sofrer efeito de torção quando sujeitos a  $B_0$ .

Qualquer material ferromagnético está sob efeito de uma força rotacional que vai comprometer o material a orientar-se de modo a ficar alinhado com as linhas de fluxo do campo magnético. Para implantes como clips aneurismáticos, esse efeito de torção poderá ser exercido durante a totalidade da duração do exame. Próteses ortopédicas e parafusos intravertebrais, encontram-se afixados ao osso ou a tecidos fibróticos e são deste modo muito difíceis de sofrer movimentos relacionados com forças de torção mesmo que estes materiais sejam ferromagnéticos.

Os Pacemakers e respetivos componentes podem também ser afetados por estas forças de rotação, fazendo com que estes se movam quando expostos a campos magnéticos. Atualmente estes dispositivos possuem cada vez menos material ferromagnético. Isto permite aos pacientes portadores de este tipo de dispositivos poderem realizarem exames de RM sob determinadas condições, verificando sempre antes de cada exame a certificação do material externo presente<sup>17,28</sup>.

Todos os dispositivos ou implantes médicos devem possuir uma certificação em como são compatíveis com a realização de exames de RM. Até esta certificação ser conseguida, o exame deve ser adiado ou até cancelado até nova informação.

## 2.10. Riscos associados aos Gradientes

O risco associado aos gradientes mais comum que pode ocorrer é estimulação nervosa, uma vez que estes são aplicados nas três direções ortogonais (X, Y e Z) e a polaridade do campo magnético do gradiente pode ser alternada rapidamente várias vezes por segundo. Isto faz com que seja gerada uma corrente elétrica nos tecidos biológicos por indução, tal como descrito na Lei de Faraday.

Assim, uma corrente elétrica induzida que exceda determinado valor limite num determinado intervalo de tempo, irá provocar uma estimulação muscular ou nervosa involuntária.

As orientações de segurança definem que, para o modo de operação normal, o sistema gradiente deve operar a níveis que não excedam os 80% do valor médio de limite para estimulação nervosa periférica e que nunca ultrapassem os 100%<sup>29</sup>.

## 2.11. Riscos associados a RF

A energia contida num fóton de radiação eletromagnética é diretamente proporcional à sua frequência e inversamente proporcional ao seu comprimento de onda. A RF utilizada em RM possui desta forma uma energia significativamente inferior à encontrada em radiologia convencional.

No entanto, durante a excitação dos núcleos de hidrogénio com recurso aos impulsos de RF, faz com que exista uma transferência e depósito de energia nos tecidos biológicos sob forma de energia térmica. Estes mecanismos estão relacionados com o facto de os tecidos humanos serem condutores, formando-se correntes de Eddy locais segundo a Lei de indução eletromagnética de Faraday<sup>29</sup>.

### 2.11.1. O Parâmetro SAR

Existe alguma dificuldade em medir alterações de temperatura nos diferentes órgãos do corpo humano durante um exame de RM. A exposição às RF é assim caracterizada pela Taxa de Absorção Específica (SAR, do inglês *Specific Absorption Rate*). A Taxa de absorção específica é uma grandeza que determina a taxa de potência absorvida pelo tecido por unidade de massa. Entre os fatores que alteram a taxa de absorção estão os calores específicos do tecido e densidade do mesmo<sup>29</sup>.

A energia é medida em joules (J) e a razão à qual ela é absorvida requer um registro temporal em segundos (s) e a massa do tecido respectivo em kilogramas (kg). A unidade dosimétrica para o SAR é assim de Watts por kilograma (W/kg).

Para calcular o SAR, temos de ter em atenção que o SAR é proporcional à condutividade elétrica do tecido ( $\sigma$ ), sendo maior em tecidos com alto teor de água, como sangue e urina, e menor no caso do osso, gordura e pulmão. Objetos de metal desconhecidos no corpo são frequentemente bons condutores de calor, aumentando significativamente os níveis de aquecimento, podendo ser perigosos para o paciente.

O SAR também é proporcional ao quadrado da área ( $A^2$ ), da seção transversal do corpo. Portanto, pacientes mais volumosos correm mais risco de sentirem a temperatura do corpo a aumentar. O SAR é proporcional ao quadrado da frequência de RF ( $\omega$ ). Normalmente, a RF é escolhida para corresponder à frequência de Larmor, que, por sua vez, é diretamente proporcional à intensidade do campo estático  $B_0$ . Então, não fazendo variar mais nenhum parâmetro o SAR depende do quadrado de  $B_0$ . Isto acontece porque *flip angle* ( $\alpha$ ) é proporcional à amplitude média do impulso de RF ( $B_1$ ). Como SAR é proporcional a  $B_1^2$ , também é proporcional a  $\alpha^2$ . Assim, um impulso de  $180^\circ$  criaria 4x mais SAR do que um impulso de  $90^\circ$ . Por fim, o SAR é proporcional ao tempo (D) que uma sequência de impulsos de RF está a ser transmitida. Assim, sequências mais intensas (com muitos impulsos de RF aplicados em um curto período de tempo) geram altos níveis de SAR.

Em Suma, a equação simplificada do cálculo do SAR é dada por:

$$SAR = \frac{(\sigma \cdot A^2 \cdot \omega^2 \cdot B_1^2 \cdot D)}{2\rho} \quad [W/Kg]$$

O valor do SAR é um valor influenciado por diversos fatores: tipo de impulso de RF, frequência da onda de RF, zona anatómica em estudo, intensidade do campo magnético e do *flip angle*. A medição do SAR durante um exame de RM é um cálculo estimado.

Os limites do SAR levam em consideração que a temperatura do tecido não ultrapasse  $1,0^\circ\text{C}$ . Por este motivo, previamente à realização de um exame, é necessário indicar o peso do paciente nos equipamentos de RM. Assim, o sistema é capaz de estimar o SAR para uma dada sequência.

Na calibração pre-scan são aplicados pequenos impulsos de RF que são necessários para a criação de  $\alpha$  de  $90^\circ$  e  $180^\circ$ . A quantidade de energia requerida para todos os impulsos na sequência é somada, dividida pelo tempo de repetição e depois dividida pela massa do paciente, de forma a poder ser calculado o SAR de corpo inteiro<sup>29</sup>.

Se o limite de SAR for atingido durante um exame de RM, o equipamento notifica o utilizador que o exame não pode continuar. Nestes casos, poderá ser avaliado o custo

risco-benefício de forma a ser determinado se é seguro continuar com a aquisição de imagens ou não<sup>17,30,31</sup>.

### 2.11.2. Aquecimento dos tecidos

Na realização de um exame de RM pode acontecer aquecimento dos tecidos provocando queimaduras nos pacientes devido a posicionamentos em “circuitos fechados” como é o exemplo de o paciente ficar com as duas mãos dadas e colocadas em cima do abdómen. Assim, são formados circuitos biológicos por estruturas anatómicas que permitem uma passagem de correntes elétricas induzidas nos tecidos.

De forma a evitar este tipo de perigo para a segurança do paciente, deve ser garantido um posicionamento correto deste no magneto de forma que estes “circuitos” não sejam criados.

Para reduzir este efeito, pode-se:

- Usar intensidades de campo magnético mais baixas, já que deste modo a deposição de energia decresce devido ao facto de a frequência dos impulsos necessária à excitação dos spins ser inferior.
- Reduzir impulsos de saturação, pois estes tipos de pulsos aumentam de forma significativa o SAR
- Aumentar o tempo de repetição também reduz o número de excitações de RF por unidade de tempo,
- Reduzir o número de cortes, reduzindo o número de impulsos de RF necessárias por TR
- Evitar a utilização de TSE ou reduzir o ETL nas respetivas sequências<sup>29</sup>.

## Capítulo III- Efeitos Biológicos da Radiação não-ionizante

### 3.1. Introdução

A célula é a unidade básica e funcional de todos os organismos conhecidos. Muitas células passam por processos de diferenciação de modo a executarem diversas funções no organismo. É no núcleo da célula que se encontra o ADN, um composto orgânico que possui todas as informações genéticas que coordenam o desenvolvimento de todos os seres vivos.

Embora os níveis de radiação não-ionizante não afetem a estrutura molecular de uma célula, esta pode afetar o tecido biológico e causar danos no genoma.

### 3.2. ADN

Nos cromossomas a molécula de ADN encontra-se condensada, é a molécula mais radiosensível, e onde podemos encontrar toda a informação genética, que coordenam todo o desenvolvimento e crescimentos de todos os seres vivos. (figura 3.1)

O ADN é uma molécula em cadeia dupla, antiparalela e enrolada em forma de hélice. As cadeias são constituídas por nucleótidos que na mesma cadeia estão ligados por ligações fosfodiéster e entre cadeias por pontes de hidrogénio. Os nucleótidos contêm uma base azotada que poderá ser a Timina (T), a Adenina (A), a Citosina (C) ou a Guanina (G), sendo que o emparelhamento das bases, entre cadeias, ocorre sempre entre A-T e G-C.

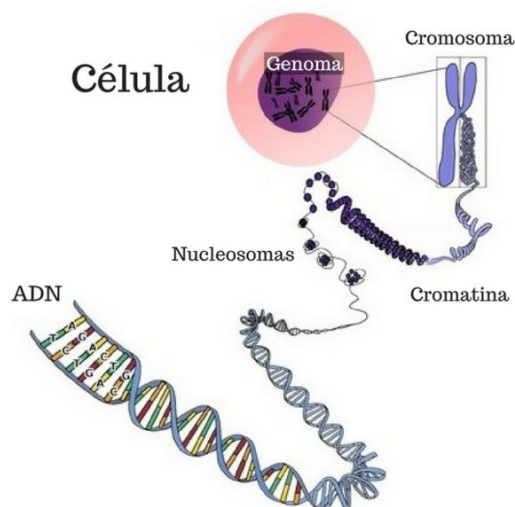


Figura 3.1- Organização do material genético (Figura adaptada[32])

A cromatina é constituída por ADN e proteínas (histonas e não histonas). Os nucleossomas são a unidade fundamental da cromatina, sendo constituídos por um octâmero de histonas (2 H2A, 2 H2B, 2 H3 e 2 H4), que formam uma estrutura em forma de cilindro à volta do qual 147 pb de DNA estão enrolados. As histonas podem sofrer modificações pós-tradicionais (fosforilação, metilação e acetilação), essas modificações geram um “código de histonas” que permite regular a condensação da cromatina e consequentemente a expressão dos genes.

Diariamente ocorrem danos no ADN, o tipo de dano assim como a sua gravidade depende do agente que afeta a molécula. A maior parte dos danos são reparáveis em poucas horas, e existem danos impossíveis de serem reparados, por norma este tipo de danos afetam ambas as cadeias de ADN<sup>32</sup>.

Existem artigos que referem que as lesões ao nível do ADN mais comuns estão relacionadas com a exposição à radiação ionizante e à radiação eletromagnética<sup>3</sup>.

### 3.3. Ciclo Celular

O ciclo celular é caracterizado pelo conjunto de fases que a célula atravessa com o objetivo de se multiplicar, originando células novas, com a mesma informação genético da célula progenitora.

O Ciclo celular é constituído por três etapas fundamentais: Interfase, Mitose e Citocinese (figura 3.2).

A Interfase é a etapa que consiste na replicação do material genético, é a fase mais demorada do ciclo, que se divide em três etapas Fase G1, onde ocorre principalmente a síntese de proteínas, Fase S, onde ocorre a duplicação do ADN, e Fase G2, onde ocorre o crescimento celular envolvido no processo de divisão celular.

A Mitose é caracterizada como a divisão do material genético, sendo constituída por quatro fases: Prófase, Metáfase, Anáfase e Telófase.

- › Prófase é a etapa mais longa da mitose, a cromatina sofre compactação condensação, tornando os cromossomas mais curtos, originando uma individualização dos cromossomas. Os cromossomas ficam assim constituídos por dois cromátídeos unidos por um centrómero.
- › Metáfase, os cromossomas têm o seu nível máximo de condensação e dispõem-se no plano equatorial unidos pelo fuso acromático.
- › Anáfase, ocorre a rutura do centrómero e os cromátídeos de cada cromossoma separam-se, originando cromossomas com apenas um cromátídeo. Nesta fase

inicia-se a ascensão polar, assim, no fim desta fase, cada polo da célula contém um conjunto de cromossomas iguais, tendo um cromatídeo cada.

- ▶ Telófase, inicia-se a organização dos núcleos-filhos, forma-se um invólucro nuclear em torno dos cromossomas de cada núcleo-filho. No final desta fase a célula apresenta dois núcleos idênticos entre si, e idênticos ao núcleo que os originou.

A Citocinese é o último processo do ciclo celular, caracterizada pela divisão do citoplasma após a divisão celular, originando duas células filhas geneticamente idênticas<sup>33</sup>.

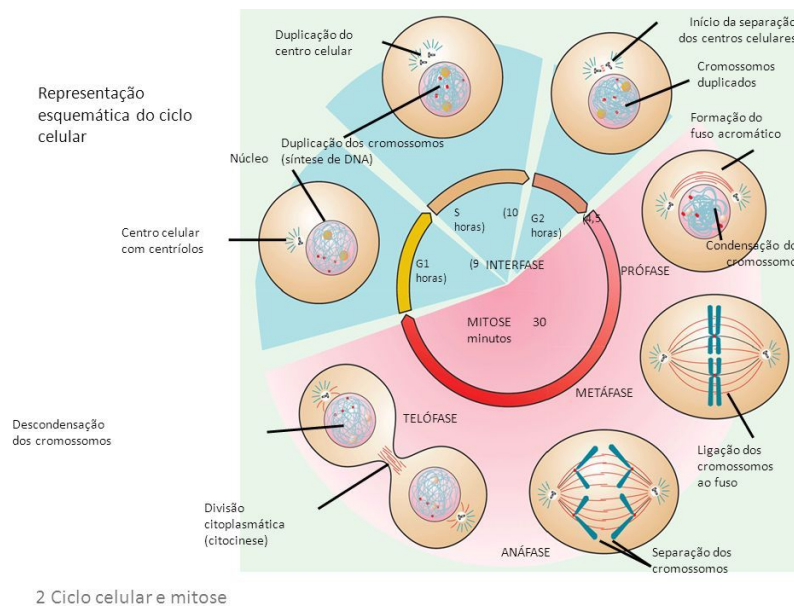


Figura 3.2- Ciclo Celular (Figura adaptada[33])

É importante que durante o ciclo celular o processo ocorra sem erros, no caso de isso acontecer, existem mecanismos de regulação do Ciclo celular que funcionam como *checkpoints* e caso seja detetada alguma anormalidade, o ciclo celular é interrompido e a célula ou consegue reparar os danos ou entra em apoptose. Estes mecanismos atuam em três pontos principais, no final da fase G1, no final da fase S e durante a mitose. Se por alguma razão, estes mecanismos falharem, pode ocorrer a proliferação de células neoplásicas ou com mutações genéticas<sup>34,35</sup>.

### 3.3.1. Efeitos Biológicos no Ciclo Celular

É durante o ciclo celular que os efeitos biológicos podem ocorrer, uma vez que as células são radiosensíveis, dependendo da sua diferenciação celular, ou seja, quanto mais diferenciada for a célula, menor é o risco de ocorrerem erros durante o ciclo

celular. Isto pode acontecer quando um indivíduo é exposto à radiação, ionizante ou não-ionizante.

A radiosensibilidade é mais suscetível na fase G1 (mais propriamente no final da fase G1, início da fase S) e mitose. Isto deve-se ao fato da cromatina (complexo de ADN e proteínas que se encontram no núcleo da célula) se encontrar mais condensada o que resulta numa maior probabilidade de interação com a radiação. Sendo que o ADN é o constituinte celular mais radiosensível (figura 3.3).

- › Final da Fase G1: Se a célula não se dividir, vai entrar na fase G0 ( a fase G0 é uma fase estacionária em que a célula pode ficar meses ou anos), se a célula se dividir mas as moléculas de ADN não apresentarem forma adequada para prosseguir no ciclo, então, a célula tenta a sua reparação, caso os danos sejam irreparáveis desencadeia-se a apoptose, por outro lado, se a célula se dividir e não forem encontrados danos a nível ADN a célula prossegue no ciclo celular passando para a fase S.
- › Final da Fase G2, o *checkpoint* relativo à replicação do ADN, caso exista alguma anomalia na replicação do ADN proveniente de fatores externos como por exemplo a radiação, o ciclo celular é interrompido, a célula tenta a sua reparação, caso os danos sejam irreparáveis, e a célula entra em apoptose. Se não forem detetados danos genéticos o ciclo celular prossegue para a fase mitótica.
- › Durante a mitose, mais propriamente entre a metáfase e a anáfase, onde é contabilizado o número de cromossomas das células-filhas. Se por algum motivo os cromossomas não se alinharem de forma adequada ou não migrarem para os pólos opostos da célula de forma equitativa, de um modo geral o ciclo é interrompido e a célula entra em apoptose. Por outro lado, se neste checkpoint não forem encontrados erros, o ciclo celular segue para a citocinese.

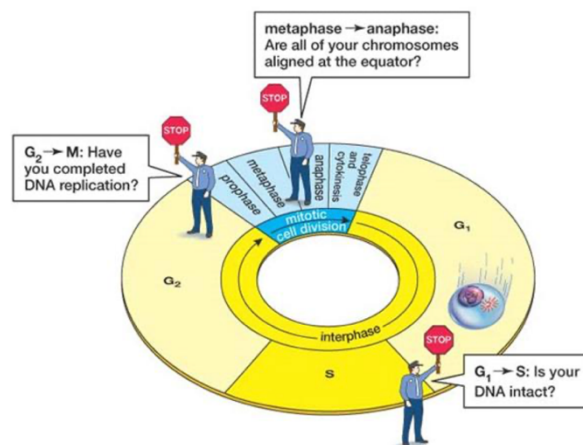


Figura 3.3- Regulação do Ciclo Celular (Figura adaptada[36])

A proliferação de células com lesões a nível genético, pode ocorrer nesta última fase, se os mecanismos de regulação do ciclo celular falharem, e se após a citocinese originarem duas células cujo número de cromossomas é diferente entre si e diferente da célula-mãe ou com o mesmo número de cromossomas mas com mutações, então se essas células se conseguirem reproduzir vão originar uma proliferação de células com mutações que podem originar neoplasias.

A persistência do dano induzido ao ADN é uma questão fundamental na avaliação do risco genético, uma vez que pode se acumular nas células-alvo e iniciar processos de instabilidade do ADN que podem desencadear alguns episódios como mutações, micronúcleos e aberrações cromossómicas<sup>6</sup>.

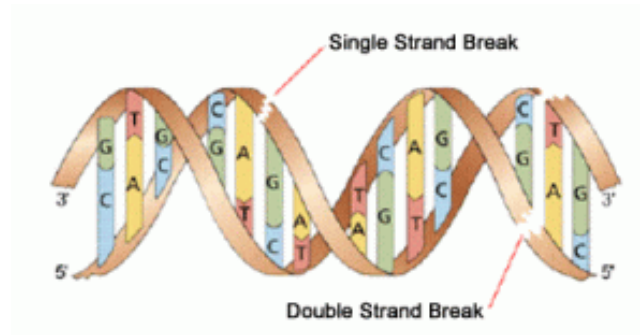
A energia mais elevada que a radiofrequência deposita nos tecidos está 6 ordens de magnitude abaixo do limite de ionização de moléculas que são conhecidas por causar efeitos biológicos, como no caso da radiação ionizante<sup>4</sup>.

### 3.4. Biomarcadores de lesão do ADN

#### 3.4.1. Lesões de Cadeia Simples e de Dupla cadeia de ADN

O ADN sofre constantes agressões por parte de forças endógenas, responsáveis pelo metabolismo celular como as espécies reativas de oxigénio que podem causar a oxidação de bases e quebra no ADN. Existem fontes exógenas de dano que podem ser tanto físicas como químicas. A radiação ultravioleta e a radiação ionizante são exemplos de fontes genotóxicas físicas, já as fontes químicas, estão relacionadas com os tratamentos de quimioterapia.

As lesões na cadeia simples (SSBs) de ADN são as mais fáceis de reparar porque a cadeia intacta serve de molde à reparação, pode acontecer ao fim de algumas horas após o dano ter ocorrido, no entanto as lesões de cadeia dupla (SDBs) são mais problemáticas, uma vez que a reparação é mais complexa (muitas vezes envolvendo inserção ou deleção de nucleótidos) e os danos provocados podem ser transmitidos aos descendentes e originar graves problemas de saúde (figura 3.4).



**Figura 3.4-** Lesão numa única cadeia de ADN e lesão na dupla cadeia de **ADN** (Figura adaptada [39] )

Entre os mecanismos de sinalização, em resposta aos danos do ADN, que ocorrem por mecanismos de transdução de sinais que se iniciam com proteínas específicas atraídas por histonas, têm o importante papel de localizar a lesão, incluem-se: a proteína **XRCC1** e a histona **H2AX**.

## Capítulo IV - Materiais e Métodos

---

### 4.1. Introdução

Para a realização do presente trabalho de investigação, com o tema “Efeitos Biológicos induzidos por Ressonância Magnética” procedeu-se inicialmente a uma revisão de literatura entre Maio e Junho de 2021, com a realização de um Estado de Arte elaborada com base em artigos científicos.

Após a aprovação por parte da Comissão de Ética da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, com a respetiva autorização do Grupo Affidea - Clínicas de Imagiologia, juntamente com a consentimento do Laboratório de Citogenética, do grupo de Proteção e Segurança Radiológica, no Campus Tecnológico e Nuclear (CTN/IST), iniciou-se uma pesquisa mais aprofundada sobre o tema.

De Fevereiro a Abril de 2022 estudaram-se os protocolos que melhor se adequavam ao trabalho e em Maio de 2022 realizou-se o trabalho experimental.

Não foi contemplado nenhum apoio financeiro para a concretização desta investigação, onde todo o equipamento, reagentes e recursos utilizados neste âmbito foram disponibilizados pelas duas instituições.

Assim, a recolha de dados necessária para este trabalho de investigação dividiu-se em três etapas principais:

**Etapa I:** Colocação das células em cultura, o que permite manter as células em microambiente controlado, mantendo, assim, as características do tecido de origem, uma vez que as células são mantidas fora do tecido original, desta forma mantêm-se estéreis e controladas relativamente à temperatura, pH, humidade, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e oxigénio (O<sub>2</sub>).

**Etapa II:** Exposição das amostras às RF, colocando-as no isocentro do equipamento de RM. Este estudo realizou-se num equipamento de RM 3.0T usado diariamente para a execução de exames com fins de diagnóstico médico.

**Etapa III:** Aplicação de técnicas citogénicas nas amostras expostas a RF. Estudo realizado em ambiente laboratorial, com material esterilizado que implica conhecimentos laboratoriais de manuseio de instrumentos de modo a não contaminar as amostras e conseqüentemente danificar a recolha de dados e obtenção de resultados.

## 4.2 Linhas celulares

A realização deste estudo é do tipo transversal, experimental e de caso-controle contando com duas amostras de linhas celulares diferentes, não probabilística.

Foram selecionadas duas linhas celulares independentes, uma linha celular designada de U-373 MG e uma segunda linha celular T98G. Ambas as linhas são de células cancerígenas da Glia cerebral denominadas de Glioblastomas.

Linhas celulares de glioblastomas foram as escolhidas devido ao número elevado de exames de RM de crânio que se efetuam anualmente.

A RM é o exame de eleição para estudo de diversas patologias do cérebro e sistema nervoso central, uma vez que permite a diferenciação da substância branca e cinzenta, líquido, vasos sanguíneos e ossos. Permitindo assim, através de várias sequências especializadas, identificar patologias que não são visíveis noutro tipo de exames. Deste modo é possível o diagnóstico precoce de doenças como: acidente vascular cerebral, esclerose múltipla, neoplasias, meningite, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, epilepsia, distúrbios psicológicos, anomalias como: abscessos, nódulos, massas, entre muitas outras, ajudando na recuperação e bem-estar do paciente.

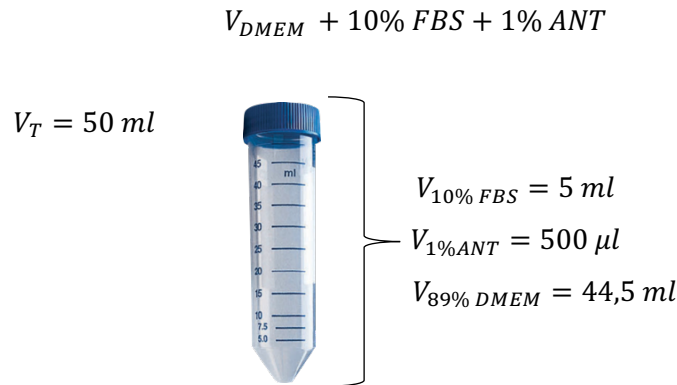
Neste estudo, as linhas celulares, U373 e T98G, foram expostas ao protocolo clínico correspondente a um exame de Crânio-encefálico. Deste modo, utilizou-se também uma bobine de crânio para potenciar o sinal, do mesmo modo que as sequências utilizadas foram as correspondentes a um exame standard clínico de crânio-encefálico.

- ▶ **Linha Celular U373MG:** Derivado de astrocitoma, células de glioblastoma humano derivado de um tumor maligno. Neste estudo estas células foram designadas de linha celulares U.
- ▶ **Linha Celular T98G:** Derivado de células multiforme de glioblastoma humano proveniente de um tumor maligno. Neste estudo estas células foram designadas de linhas celulares T.

### 4.2.1. Meio de Cultura

Em ambiente controlado e esterilizado foi colocado num tubo de centrifuga um volume total ( $V_T$ ) de 50 ml de Dubelcco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de *Fetal Bovine Serum* (FBS) e 1% de antibiótico (penicilina/streptomicina)

(Invitrogen/Gibco) (Figura 4.1). As células foram colocadas e mantidas em frascos T25. Em cada passagem foi utilizada tripsina-EDTA (2 mg/mL, Gibco) durante 5 minutos, na incubadora de células. Para cada ensaio citogenético as células foram colocadas em cultura de acordo com o descrito nas secções seguintes.



**Figura 4.1-** Constituição do meio de cultura, DMEM suplementado num Tubo de centrifuga de 50 ml

### 4.3. Protocolo de Irradiação

#### 4.3.1. Identificação das amostras

A identificação de cada amostra existente em cada poço é um dos processos mais importantes de modo a facilitar a identificação de cada linha celular assim como qual procedimento citogenético utilizado. (Tabela 4.1)

Para o estudo das SSBs (XRCC1) e DSBs ( $\gamma$ -H2AX) foram utilizadas laminas *Millicell EZ SLIDE* que nos permitiu cultivar, fixar, corar e visualizar a amostra num único dispositivo, sendo bastante fácil de remover os poços e obter as laminas necessárias para estudo ao microscópio. Foram então utilizadas três laminas na qual uma serviu como controlo (placa de controlo), e as restantes duas laminas foram irradiadas (placa 1 e placa 2). (Tabela 4.1)

**Tabela 4.1** - Identificação das placas de controlo, placa 1 e placa 2 para os ensaios de SSBs e DSBs.

Placa de Controlo

Controlo (C)	1U	2T	3U	
	5U	6T	7T	



- 1, 2 → XRCC1
- 3, 5, 6, 7 →  $\gamma$ -H2AX

Placa 1

U373 T98G	1U	2T	3U	
	5U	6T	7T	



- 1, 2, 3 → XRCC1
- 5, 6, 7 →  $\gamma$ -H2AX

Placa 2

U373 T98G	1U	2T	3U	
	5U	6T	7T	



- 1, 2, 3 →  $\gamma$ -H2AX
- 5, 6, 7 → XRCC1

Para o estudo de micronúcleos, foram utilizadas 4 placas de 24 poços com 50,000 células, na qual foram irradiadas 2 placas e outras 2 serviram de controlo.

No esquema seguinte estão identificados os poços utilizados neste estudo. Esta identificação é idêntica para as 4 placas (tabela 4.2).

**Tabela 4.2-** Identificação das placas de 24 poços em que U é a linha U373 e T é a linha T98G

U			T		
U			T		
U			T		

#### 4.4. Protocolo de Irradiação

A irradiação constou de duas exposições independentes com tempos de aquisição (TA) de 17 minutos.

Na prática clínica exames de RM geralmente levam entre 15 a 20 minutos, mas pode chegar a 2 horas de exame dependendo da área em estudo, e do número de exames que o paciente tem agendado. Ambas as irradiações foram adquiridas através dos mesmas condições e parâmetros técnicos. (tabela 4.3)

**Sequências de aquisição neste estudo:** T1 IR, DP/T2 (TSE), T2 IR, T2 Coronal Resolve (DWI) e SWI.

**Tabela 4.3** – Parâmetros de irradiação utilizados

	TR (ms)	TE (ms)	TI (ms)	TA (s)	RF (W)	SAR (W/Kg)
T1 IR	1800	11	818	146	57.1	1.34
DP/T2	4770	11		159	60.6	1.42
T2 IR	8000	94	2500	218	34.2	0.80
T2 Cor	4130	99		142	54.2	1.27
RESOLVE	7620	62		169	15.8	0.37
SWI	27	20		194	1.6	0.04
TOTAL				1028	223,5	

Em cada exposição foram colocados no interior da bobine de crânio 1 *Millicell EZ SLIDE* e uma placa de 24 poços.

No interior da bobine de crânio foi colocado um fantoma com um peso aproximado de 2 Kg e 30 cm, foram colocadas também esponjas para retificar e estabilizar a região onde seriam colocadas as amostras.

A temperatura da sala de RM constante a marcar os 23°C, as amostras de linhas celulares foram colocadas no interior da bobine de RF de crânio que foi levada para o isocentro do equipamento e procedeu-se há irradiação das linhas celulares.

Iniciou-se o exame com o *scout*, para proceder à localização das amostras. E posteriormente aplicou-se as sequências já descritas, foram anotados e todos os parâmetros principais de aquisição de cada sequência. (Anexo 2)

No final de cada irradiação obtemos o SAR total de 42.6 W/Kg e o *Specific energy dose* (SED) de 332 J/Kg. O cálculo do SED, é mencionado pelo equipamento, sendo calculado da seguinte forma:  $SED = SAR \times TA$  com as unidades em J/KG.

#### 4.4.1. Quantificação do número de lesões no ADN

#### 4.4.2. Detecção de lesões na cadeia simples ADN

A deteção de lesões na cadeia simples foi feita recorrendo à deteção da proteína XRCC1. XRCC1 é uma proteína que está envolvida na reparação por excisão das bases de ADN. Após a exposição, para a quantificação do XRCC1, aplicou-se o protocolo descrito de seguida.

1. As células, depois de lavadas com PBS, foram fixadas em formaldeído (Sigma) a 4% em *Phosphate buffered saline* (PBS) por 15 minutos. Após esse tempo foram lavadas com PBS.
2. Fez-se a permeabilização das células com Triton X-100 (Sigma) à temperatura ambiente por 5 minutos, o que permite lesar a membrana.
3. Fez-se a lavagem com albumina sérica bovina (BSA, Invitrogen), e em seguida o bloqueio com 4% de BSA por 1 hora. O bloqueio com a BSA é para reduzir respostas inespecíficas por parte do anticorpo. Faz-se um bloqueio com uma solução rica em proteínas para que as reações inespecíficas ocorram com as proteínas da BSA e não com o anticorpo que vamos utilizar.
4. As células foram incubadas com anticorpo monoclonal XRCC1 (Invitrogen) na diluição de 1:100 em 1% de BSA em PBS a por 1 hora, à temperatura ambiente.
5. Após a incubação com o anticorpo primário as células foram lavadas com PBS e incubadas com Texas-Red (anti-mouse secondary antibody, Invitrogen) a 1 mg/mL, durante 1h à temperatura ambiente.
6. As linhas celulares foram novamente lavadas com PBS (3x), e colocou-se um meio de montagem (Vectashield) com DAPI (corante do DNA).

#### 4.4.3. Detecção de lesões na cadeia dupla ADN

A deteção de lesões na cadeia dupla foi feita recorrendo à deteção da proteína  $\gamma$ -H2AX.  $\gamma$ -H2AX é uma histona conhecida que responde ao dano do ADN em dupla cadeia, sinalizando para reparação, recrutando proteínas de reparação do ADN.

Após a exposição, para a quantificação do  $\gamma$ -H2AX, aplicou-se o protocolo descrito de seguida.

1. As células foram fixadas em formaldeído (Sigma) a 4% em *Phosphate buffered saline* (PBS) por 15 minutos. Após esse tempo foram lavadas com PBS.
2. Fez-se a permeabilização das células com Triton X-100 (Sigma) em temperatura ambiente por 5 minutos, o que permite lesar a membrana.
3. Fez-se a lavagem com albumina sérica bovina (BSA, Invitrogen), e em seguida o bloqueio com 4% de BSA por 1 hora. O bloqueio com a BSA é para reduzir respostas inespecíficas por parte do anticorpo. Faz-se um bloqueio com uma solução rica em

proteínas para que as reações inespecíficas ocorram com as proteínas da BSA e não com o anticorpo que vamos utilizar.

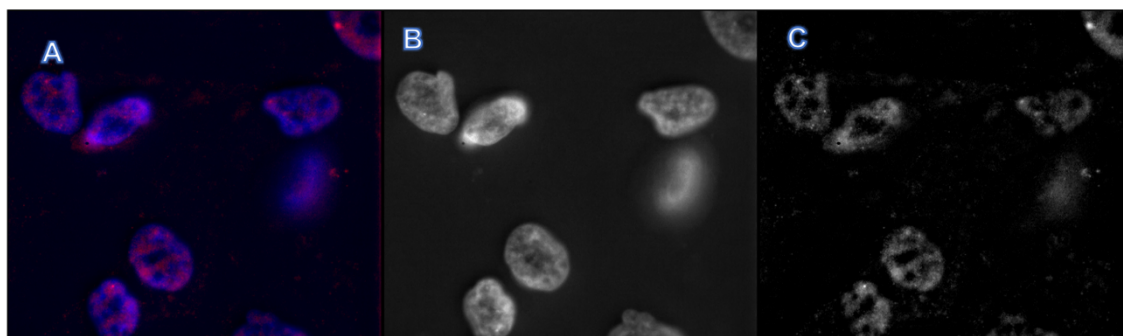
4. As células foram incubadas com anticorpo monoclonal anti- $\gamma$ -H2AX primary antibody (mouse anti- $\gamma$ -H2AX (ser139), Stressgen) na diluição de 1:100 em 1% de BSA em PBS a por 1 hora, à temperatura ambiente.
5. Após a incubação com o anticorpo primário as células foram lavadas com PBS e incubadas com FITC (anti-mouse secondary antibody, Invitrogen) a 1 mg/mL, durante 1h à temperatura ambiente.
6. As linhas celulares foram novamente lavadas com PBS (3x), e colocou-se um meio de montagem (Vectashield) com DAPI (corante do DNA).

#### 4.4.4. Aquisição e análise

As células foram analisadas com um microscópio de fluorescência (Zeiss, Axioplan). As imagens foram adquiridas através da utilização do programa informático ISIS e utilizando uma ampliação de 64X e com filtro vermelho – Texas-Red, com o objetivo de visualizar pequenos focos vermelhos coincidentes com quebras das ligações de cadeia simples do ADN.

Igualmente, para a deteção das lesões da dupla cadeia do ADN, as células foram analisadas por microscopia de fluorescência utilizando uma ampliação de 64X, com a utilização de filtro verde – FITC.

Subsequentemente, as imagens foram divididas em 2 canais individuais, numa escala de cinzentos, utilizando o programa Image J (Figura 4.2). A contagem dos focos foi realizada através do *CellProfiler*, um software que permite medir fenótipos de várias imagens automaticamente, com algoritmos avançados de análise através de uma pipeline que é capaz de medir características biológicas em imagens obtidas por microscopia de fluorescência.



**Figura 4.2-** Imagens utilizando software Image J. **A-** Imagem original **B** e **C** Imagem decomposta em escala de cinzentos da imagem A (Imagem original do estudo).

#### 4.4.5. Contagem dos focos

Foi criada uma pipeline no programa Cell profiler, utilizando como template o ExampleSpeckles. Inicialmente, é feita uma contagem manual em imagem selecionadas para que a pipeline a utilizar para as restantes imagens possa ser validada. Após validação, a mesma pipeline é utilizada para a detecção dos focos em todas as imagens para cada uma das experiências.

Após essa análise é calculado o número médio, e o respetivo desvio-padrão, de focos em cada amostra, utilizando o programa Microsoft Excel.

#### 4.4.6. Quantificação do número de Micronúcleos

Após a irradiação das células na RM, as linhas celulares foram colocadas novamente na incubadora com atmosfera húmida, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas.

Após 22 horas da irradiação, foi adicionado citocalasina-b a 2mg/ml, com o objetivo de interromper o ciclo celular na citocinese, resultando na formação de células multinucleadas. Após 24 horas de incubação com citocalasina-b, as células foram lavadas com PBS e colocadas em tripsina-EDTA (2 mg/mL, Gibco) durante 5 minutos. As células foram depois colocadas em solução num tubo de cultura celular. Após este processo, realizou-se a técnica para detecção de micronúcleos. Inicialmente, fazem-se duas lavagens, com uma solução de lavagem (ver tabela 4.4) e uma lavagem com uma solução de choque hipotónico (ver tabela 4.4).

**Tabela 4.4-** Volumes utilizados na Solução de lavagem e na Solução de choque hipotónico

Solução de lavagem	Solução de choque hipotónico
Para um volume total de 120 mL	
$V_{RPMI} = 117,6 \text{ mL}$	$V_{RPMI} = 15,6 \text{ mL}$
$V_{FBS} = 2,4 \text{ mL}$	$V_{FBS} = 1,6 \text{ mL}$
	$V_{H_2O_d} = 62,8 \text{ mL}$

Descrição da técnica para detecção de micronúcleos:

1. Fez-se uma centrifugação de 800 rpm por 10 minutos e desprezou-se o sobrenadante
2. Após ressuspender o precipitado, adicionar 5 ml de solução de lavagem e misturar suavemente por inversão. Centrifugar 800 rpm, 7 minutos.

3. Após ressuspender o precipitado, adicionar 5 ml de solução de lavagem e misturar suavemente por inversão. Centrifugar 800 rpm, 7 minutos.
4. Retirar sobrenadante com pipeta e adicionar ao precipitado, 5 ml de solução de choque hipotónico. Centrifugar imediatamente 800 rpm, 5 min
5. Com uma pipeta Pasteur, de vidro, aspirar o máximo de sobrenadante, depois homogeneizar e fazer esfregaços: 1 gota da suspensão no início da lamina seca, com outra lamina fazer esfregaço da gota. Foram realizadas 3 laminas por cultura.
6. Após 24 h o esfregaço está seco, e é fixado em Carnoy (Sigma) a -20°C, 20 minutos; ficam a secar ao ar na horizontal
7. Depois de bem secas, corar em Giemsa 4% em PBS pH 6,8 durante 8 minutos. Lavar em água corrente forte e secar ao ar (na vertical).
8. Fechar com um meio de montagem de lamelas, *Entellan* (Merck).

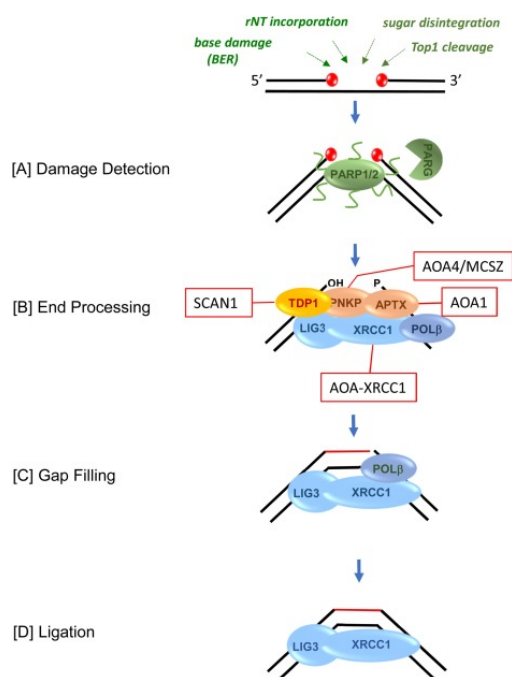
Todas as lâminas foram devidamente identificadas e guardadas numa caixa apropriada para o efeito, há temperatura ambiente. Depois de secas, procedeu-se à visualização dos dados e às contagens necessárias através do microscópio.

## Capítulo V - Resultados e Discussão

### 5.1. Detecção de Lesões na cadeia simples do ADN (SSBs)

O Exame de RM induz danos ao DNA em células de glioblastoma humano. A capacidade da RM para induzir a formação de SSBs in vivo foi avaliada usando o ensaio XRCC1. A exposição à ressonância magnética levou a um aumento significativo no número médio de focos para ambas as linhagens celulares (Figura 5.1), em média duas vezes em comparação com as células de controle não expostas.

As lesões na cadeia simples do ADN foram observadas no microscópio de fluorescência com a utilização do Texas-Red.

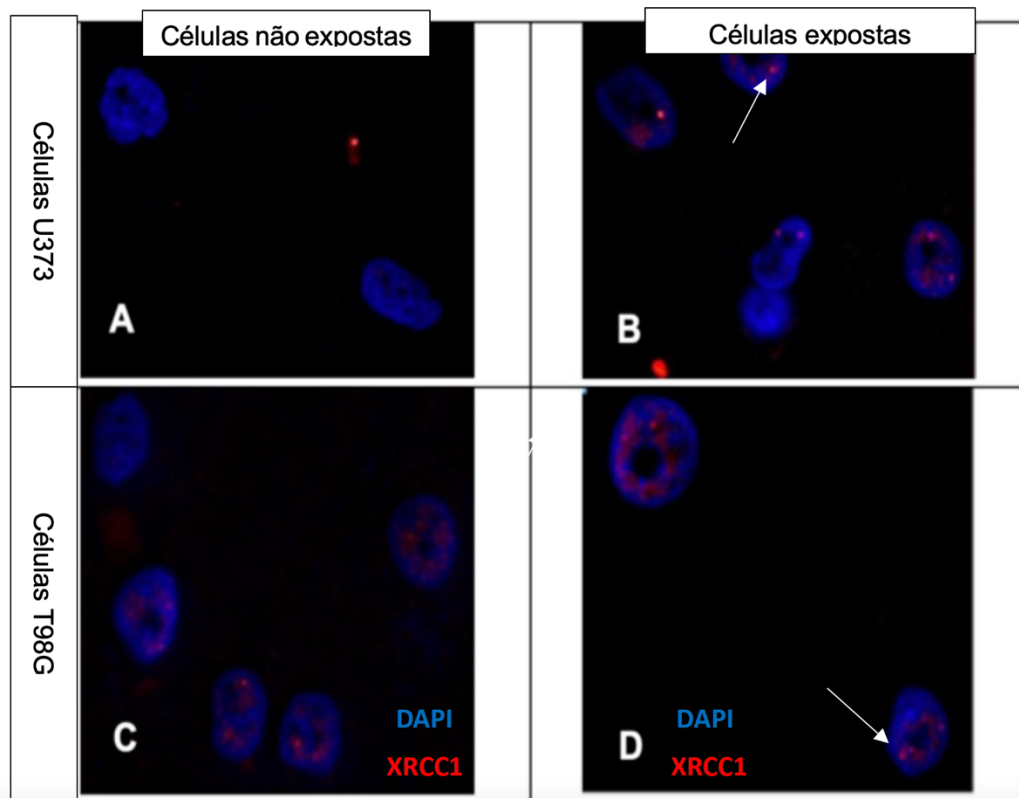


**Figura 5.1-** SSBs dependente de XRCC1 (Figura adaptada [40] )

- A- Detecção de uma lesão e ativação de PART1 e PART2 e na ribosilação do ADT
- B- Processamento final. Existe o recrutamento de XRCC1 e de outras proteínas necessárias para a conversão de diferentes tipos de terminais danificados em terminais convencionais.
- C- Preenchimento de espaços com a substituição no nucléio ausente.
- D- Ligação do ADN pelo LIG3

Na Figura 5.2 estão algumas imagens representativas deste trabalho. Nesta imagem é possível observar o DNA corado de azul devido ao DAPI e é possível observar um aumento significativo de focos correspondentes à proteína XRCC1, uma proteína que está envolvida na reparação eficiente de SSBs de ADN originadas pela exposição à radiação. Esta proteína não possui atividade enzimática, mas atua como uma proteína que interage com múltiplas enzimas de reparação. XRCC1 está envolvida na reparação de SSBs, reparação de excisão de bases e reparação de excisão de nucleotídeos.

Notavelmente, os danos no DNA induzidos na linhagem celular U373 pareciam menos pronunciados do que os danos observados na linhagem celular T98G. A partir de nossos resultados, podemos observar que as células T98G são mais sensíveis à radiação não ionizante, como também observado para a radiação ionizante



**Figura 5.2- Detecção de lesões SSBs após exposição à RM** Imagens de microscopia de fluorescência representativas de focos XRCC1: (A) e (B) células U373 não expostas e expostas à RM, respectivamente e (C) e (D) células T98G não expostas e expostas à RM, respectivamente. A coloração DAPI foi usada para visualizar o núcleo, enquanto a imunocoloração para XRCC1 foi usada para detecção de focos. As células foram visualizadas sob imersão em óleo com ampliação de 64X.

#### 5.1.1. Quantificação do número de focos XRCC1

A contagem dos focos foi realizada através do *CellProfiler*, um software que permite medir fenótipos de várias imagens automaticamente, com algoritmos avançados de análise através de uma pipeline que é capaz de medir características biológicas em imagens obtidas por microscopia de fluorescência. Neste caso a pipeline utilizada permite a identificação e contagens dos focos XRCC1.

Para a análise estatística, foi calculada a média ( $\bar{x}$ ) e o desvio padrão ( $\sigma$ ) dos focos XRCC1 existentes na amostra de controlo e na amostra irradiada das linhas U373 e linha T98G. Ao observarmos o gráfico *Box plot* de distribuição das amostras de controlo e amostra exposta a campos magnéticos da linha celular U373, podemos verificar que a média de focos XRCC1 detetados é superior na

amostra exposta. Relativamente às amostras das linhas celulares T98G, podemos analisar que a média de focos XRCC1 localizados é significativamente maior do que nas amostras expostas a Campos magnéticos.

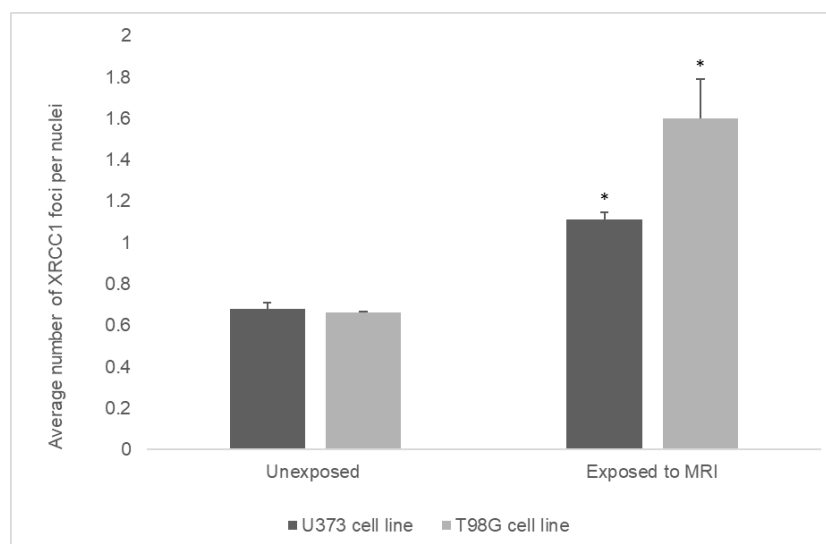
Quando expostas à radiação ionizante, as células T98G apresentam uma maior radiosensibilidade quando comparadas com as células U373.

No que diz respeito à radiação não-ionizante não existem dados disponíveis na literatura, pelo que trabalho futuro é necessário para perceber os mecanismos associados a esta exposição.

**Tabela 5.1-** Número médio de focos XRCC1 observados nas células U373 e T98G, tanto em células de controlo (sem exposição à RM) e em células expostas à RM. Os valores médios e o desvio padrão foram obtidos de duas experiências independentes.

	Linha celular U373		Linha celular T98G	
	média	Desvio padrão	média	Desvio padrão
<b>Controlo</b>	0,68	0,028284	0,66	0,00495
<b>Exposto à RM</b>	1,11	0,035	1,6	0,19

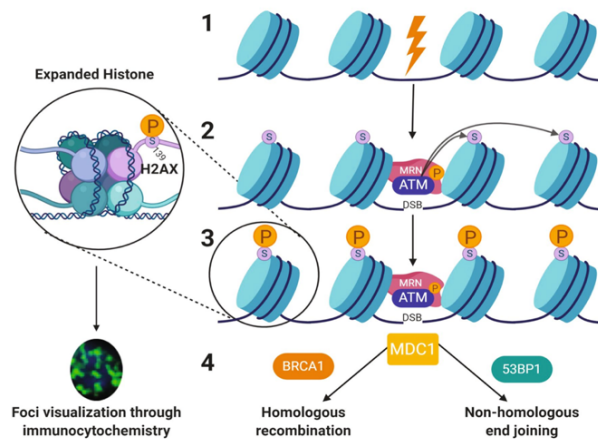
Para uma melhor observação dos resultados, no gráfico (figura 5.3) seguinte estão ilustrados os resultados expressos na tabela.



**Figura 5.3-** Aumento de lesões SSBs após exposição à RM. Número médio de focos XRCC1 observados nas células U373 e T98G, em células controlo (sem exposição à RM) e em células expostas à RM. Os valores médios e o desvio padrão foram obtidos de duas experiências independentes. Quantificação do número médio de focos XRCC1 em células não expostas e em células expostas à RM. A significância estatística foi calculada usando o teste t de Student bicaudal com células não expostas como controlo (\* $p < 0,05$ ). Os resultados foram calculados a partir de réplicas biológicas independentes ( $n=2$ ) e são dados como média  $\pm$  S.E.M.

## 5.2. Detecção de Lesões na dupla cadeia do ADN (DSBs)

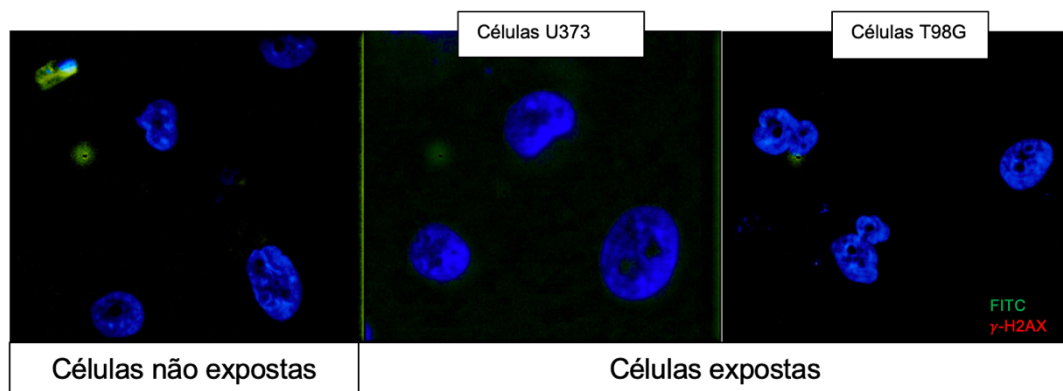
A histona H2AX está no centro das respostas celulares às DSBs contribuindo na formação dos nucleossomas, na remodelação da cromatina e na reparação do ADN. A fosforilação da proteína histona H2AX, para formar focos  $\gamma$ -H2AX, representa diretamente a reparação de DSBs, deste modo a ação desta proteína é visível com a utilização de microscopia de fluorescência que documenta a fosforilação local por meio de formação de focos que ao serem induzidos por radiação ionizante são chamados de focos nucleares nas proximidades das SDBs que permite a monitorização da sua indução e reparação. (figura 5.4)



**Figura 5.4** – Representa o dano do ADN e via de reparo. (Figura adaptada [42] )

- 1- Agentes externos como a radiação ionizante induzem SDBs em histonas envolvidas no ADN.
- 2- As SDBs do ADN recrutam o complexo MRN composto por proteínas que recrutam e ativam a ATM quinase.
- 3- ATM quinase fosforila a proteína H2AX na histona expandida criando focos fosforilados que podem ser visualizados através de ensaios  $\gamma$ -H2AX. \
- 4- O mediador (MDC1) da proteína 1 do checkpoint do dano de ADN é recrutado para SDB e angaria as proteínas BRCA1 e 53BP1 para direcionar o dano do ADN e repará-lo por recombinação homóloga.

Após a análise das lamínas ao microscópio de fluorescência das linhas celulares U373 e a linha celular T98G das amostras obtidas, verificou-se que não existiam focos de lesão da dupla cadeia do ADN. Estes focos não foram verificados tal como é possível observar na figura 5.5.



**Figura 5.5-** Não foram detetadas lesões DSBs após exposição à RM. Fotografias retiradas do microscópio de fluorescência para localização de focos de DSBs.

### 5.3. Quantificação de Micronúcleos (MN)

Micronúcleos (MN) são fragmentos de DNA lesado, não incorporados no núcleo, após a divisão celular permanecem no citoplasma, representando agentes genotóxicos. Os MN podem ter origem em fragmentos acêntricos ou/de cromossomas inteiros que não são capazes de migrar com o resto dos cromossomas durante a anáfase da divisão celular.

Na pesquisa de MN em técnica que é realizada *in vitro* pode-se observar células binucleadas, que exibem dois núcleos principais, formadas pelo bloqueio da citocinese através da utilização de um composto de origem fúngica (citocalasina B), que possui a capacidade de inibir a citocinese sem inibir a cariocinese<sup>44</sup>. (Figura 5.6)

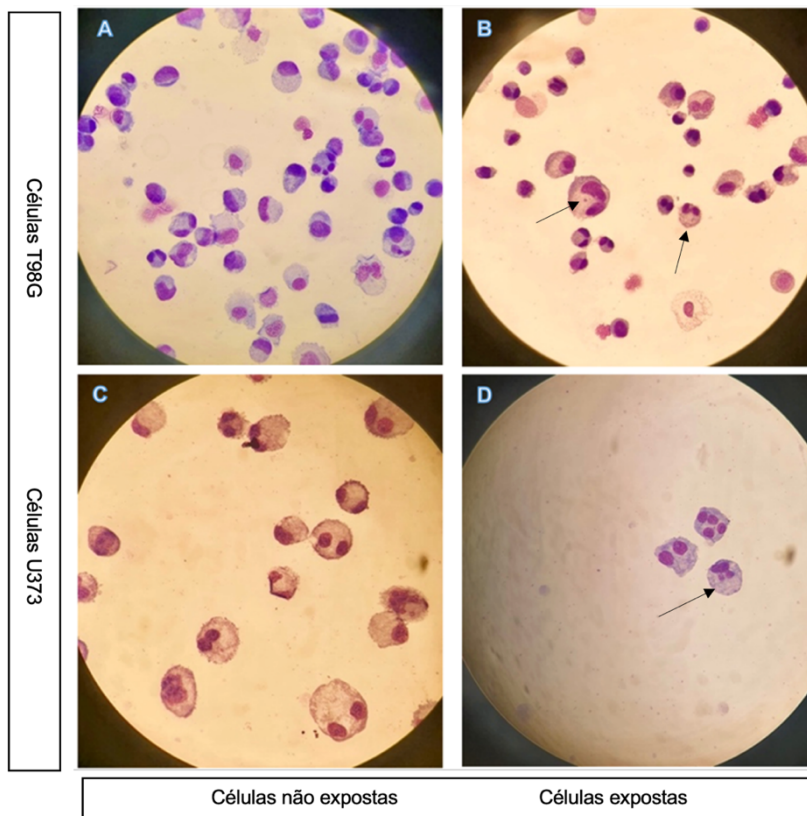
Os MN representam agentes genotóxicos quando não estão incorporados no núcleo da célula, advém de vários fatores externos e podem ocorrer durante a Anáfase, no entanto é esperado que no decorrer desta análise fossem encontrados MN na amostra de controlo em ambas as linhas celulares em estudo, embora em menor quantidade que nas amostras expostas a CEMs, uma vez que existe um fator externo a lesar a integridade do núcleo da célula.

Relativamente ao estudo do dano genético ao nível das cadeias de ADN e a quantificação de MN foram os principais focos de pesquisa de muitos investigadores, uma vez que o aumento de dano em células somáticas pode levar à carcinogénese e/ou morte celular, enquanto lesões semelhantes em células germinativas podem ser transmitidas às gerações futuras<sup>6</sup>.

A contagem dos MN faz-se colocando as lamínas individualmente ao microscópio onde o objetivo inicial é contabilizar um total de 500 células, englobando células Monucleadas (MN), binucleadas (BN), trinucleadas (TN) e polinucleadas (Poli);

assim como contabilizar os micronúcleos existentes nas referidas células. Neste estudo, contabilizaram-se 1000 células binucleadas tendo sido registado o número de micronúcleos. Para esta contagem utilizou-se uma folha de registo de micronúcleos. (Anexo 3).

As figuras seguintes mostram um aumento do número de micronúcleos de ambas as amostras irradiadas comparativamente com as amostras de controlo. (figura 5.6)



**Figura 5.6-** Imagens fotografadas diretamente do microscópio A – Linha celular T98G controlo. B – Linha celular T98G irradiada. C – Linha celular U373 controlo. D - Linha celular U373 irradiada (imagem original do estudo)

Os resultados revelaram um aumento significativo no número total de micronúcleos (MNi) após a RM nas células U373, quando comparado às células não expostas, o que não ocorreu na linhagem celular T98G ( $p=0,9895$ ). Além disso, as células expostas ao exame de RM exibiram maior dano celular expresso pela ocorrência de múltiplos MNi por célula BN, quando comparadas aos seus próprios controles.

Neste estudo, para além da percentagem de MN foi calculado o índice de divisão nuclear para cada amostra.

### 5.3.1. Distribuição de MN em células BN

Nas tabelas seguintes (Tabela 5.2, 5.3, 5.4 e 5.5) é apresentada a distribuição de MN contabilizando as 1000 células binucleadas (BN) das amostras de controlo e das amostras irradiadas, das linhas celulares U373 e T98G.

Analisando as tabelas, é possível verificar a existência de uma maior quantidade de MNs em ambas as amostras irradiadas, também há evidências que as células BN com apenas um MN são as mais frequentes, sendo detetada a maior quantidade nas linhas celulares expostas a campos magnéticos.

**Tabela 5.2**– Distribuição da Linha celular U373, amostra de controlo (Monucleadas (Mn), binucleadas (BN), tetranucleadas (TN) e polinucleadas (Poli))

Distribuição de MN						
Nº de células	MN	0	Mn	BN	TN	Poli
1000	129	926	45	13	6	10
1000	179	904	53	18	10	15
1000	151	918	46	15	9	12
1000	112	930	48	8	8	6

**Tabela 5.3**- Distribuição Linha celular U373, amostra irradiada (Monucleadas (Mn), binucleadas (BN), tetranucleadas (TN) e polinucleadas (Poli))

Distribuição de MN						
Nº de células	MN	0	Mn	BN	TN	Poli
1000	330	814	110	31	22	23
1000	260	857	86	21	12	24
1000	231	866	83	21	14	16
1000	242	857	91	21	15	16

**Tabela 5.4**- Distribuição da Linha celular T98G, amostra de controlo (Monucleadas (Mn), binucleadas (BN), tetranucleadas (TN) e polinucleadas (Poli))

Distribuição MN						
Nº de células	MN	0	Mn	BN	TN	Poli
1000	111	936	40	9	7	8
1000	109	930	46	11	11	2
1000	98	943	35	9	7	6
1000	128	929	40	15	6	10

**Tabela 5.5-** Distribuição da Linha celular T98G, amostra irradiada (Monucleadas (Mn), binucleadas (BN), tetranucleadas (TN) e polinucleadas (Poli))

Distribuição MN						
Nº de células	MN	0	Mn	BN	TN	Poli
1000	171	904	57	16	10	13
1000	131	922	50	13	5	10
1000	115	926	50	12	7	5
1000	411	830	71	21	14	17

### 5.3.2. Cálculo do índice de divisão nuclear (NDI)

Para a análise da quantificação dos micronúcleos (MN) é necessário calcular o índice de divisão nuclear (NDI). O NDI fornece uma medida do estado proliferativo da fração de células viáveis. É considerado um indicador de efeitos citostáticos.

Tal como referido anteriormente, foram inicialmente contabilizadas 1000 células viáveis para determinar a frequência de células Mn, BN, TN e Poli. De acordo com a seguinte fórmula  $NDI = \frac{M_1+2M_2+3M_3+4M_4}{N}$ , onde  $M_1$  a  $M_4$  representam o número de células com 1 e 4 núcleos e o N é o número total de células viáveis pontuadas. Todas as culturas atingiram *NDI*s entre 1,4 e 1,7.

O valor de NDI mais baixo possível é de 1, isto ocorre se todas as células viáveis não se conseguirem dividir durante o período de bloqueio da citocinese, estas células são as mononucleadas. Se todas as células completarem uma divisão celular, são as binucleadas, o valor de NDI é 2.0.<sup>24</sup>

**Tabela 5.6-** Cálculo de Percentagem de MN e Índice de divisão celular da amostra controlo e da amostra irradiada das linhas celulares U373 e T98G

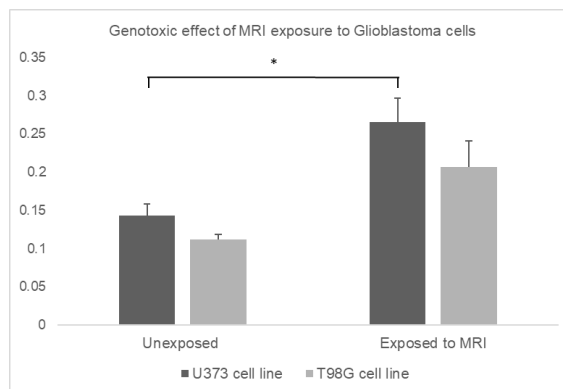
	U373 C1	U373 C2	U373 C3	U373 C4	U373 I1	U373 I2	U373 I3	U373 I4
%MN	57,6	54,8	49,2	44,4	49,6	53,2	60,6	62,8
NDI	1,692	1,704	1,67	1,73	1,836	1,748	1,898	1,92
	T98G C1	T98G C2	T98G C3	T98G C4	T98G I1	T98G I2	T98G I3	T98G I4
%MN	48,8	48,8	47,6	54,2	42	62,4	56,4	39,8
NDI	1,588	1,602	1,642	1,656	1,526	1,726	1,684	1,756

Na tabela 5.7, verificamos que existe um aumento na % de MN nas amostras irradiadas, comparativamente às amostras de controlo. Também comprovado no gráfico 5 onde a linha celular U373 exposta a campos magnéticos se evidencia.

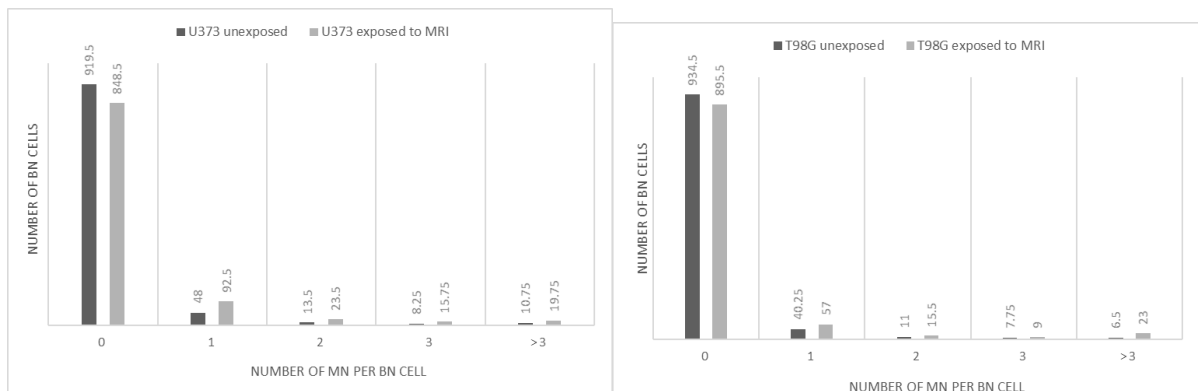
**Tabela 5.7-** Percentagem média de MN e  $\sigma$  nas células MN

	$\bar{x}$ (%)	Desvio Padrão ( $\sigma$ )
<b>U373 Controlo</b>	51,5	5,882176468
<b>U373 Irrradiada</b>	56,55	6,191122677
<b>T98G Controlo</b>	49,85	2,954657341
<b>T98G Irrradiada</b>	50,15	10,99499886

Segundo análise estatística, todos os dados foram apresentados como valores médios  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M.). A análise estatística foi realizada usando o software Origin. As diferenças estatísticas entre as amostras de tratamento e controlo foram avaliadas pelo teste t de *Student* bicaudal. O limite para significância estatística foi estabelecido em  $p=0,05$ .



**Figura 5.7** - Quantificação do número médio de Mni por 1000 BN em células U373 e T98G expostas (ou não expostas) à RM.



**Figura 5.8-** Distribuição média de MN por 1000 células BN em células U373 e T98G, respetivamente, não expostas (controlo) e expostas à RM. A significância estatística foi calculada usando o teste t de *Student* bicaudal com células não expostas como controlo ( $*p<0,05$ ). Os resultados foram calculados a partir de réplicas biológicas independentes ( $n=2$ ) e dados como a média  $\pm$  S.E.M

O NDI foi menor para células expostas a U373 e T98G quando comparadas com os próprios controles (células não expostas),  $p=0,074$  e  $p<0,05$ , respectivamente. (tabela 5.8)

**Tabela 5.8-** A comparação da frequência MN e o NDI para células expostas e não expostas.

Variáveis	Células U373		Células T98G	
	Não expostas	Expostas a RM	Não expostas	Expostas a RM
<b>MN frequência</b>	0.143±0.016	0.266±0.031	0.110±0.031	0.207±0.034
<b>NDI</b>	1.604±0.018	1.490±0.049	1.745±0.038	1.602±0.035

## 5.4. Discussão de Resultados

O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial genotóxico da ressonância magnética em prática clínica por meio de ensaios citogenéticos. Nos últimos anos, surgiram alguns estudos com o objetivo de avaliar as possíveis lesões relacionadas e/ou causadas pela EMF gerada durante o exame de diagnóstico por RM. No entanto, os dados disponíveis sobre os possíveis efeitos do exame de diagnóstico por ressonância magnética relevantes para pacientes e trabalhadores não são suficientes para tirar conclusões e/ou diretrizes de segurança.

O nosso estudo avaliou os efeitos biológicos em células GBM humanas expostas a um protocolo cerebral de rotina clínica. Os dados gerais sugerem que a RM induz potenciais efeitos genotóxicos em células GBM.

Como apontado anteriormente, os SSBs estão entre as lesões de DNA mais frequentes, sendo um perigo para a instabilidade genética e sobrevivência celular. No presente trabalho, avaliamos o número de SSBs quantificando a expressão de XRCC1. O nossos resultados estão de acordo com Lee et al<sup>44</sup> mostrando um aumento do número de SSBs após exposição à RM 3T. Também observamos uma diferença significativa entre as linhagens celulares utilizadas. Embora exista falta de conhecimento sobre a sensibilidade celular à radiação não ionizante, é provável que o T98G expresse uma sensibilidade maior. Isso pode ser relevante em casos de acompanhamento do paciente pós-tratamento e para terapias guiadas por RM.

Da literatura, e ao nosso conhecimento esta é a primeira vez que tal estudo, utilizando células GBM, é realizado, por este motivo, não temos dados para comparar. Uma das lacunas no conhecimento sobre a quantificação de SSBs é o seu reparo. Com

base em nossos dados, concordamos totalmente e planejamos fazer como trabalhos futuros.

Também investigamos se o aumento do número de DNA SSBs poderia estar correlacionado com a estabilidade genética, uma vez que alguns estudos, principalmente usando linfócitos, revelaram um aumento do número de MN em células expostas à RM<sup>44,45</sup>. Ao contrário do dano inicial ao DNA, as células U373 expressaram um dano celular maior quando comparadas às células T98G. É provável que a maior sensibilidade observada no T98G não esteja relacionada com a eficácia do reparo do DNA.

As células T98G têm quase o dobro de cromossomos que T98, sugerindo que é uma variante poliplóide de T98. Esta pode ser uma das razões pelas quais esta linhagem celular revela um número maior de lesões imediatamente após a exposição e não após uma divisão celular.

#### 5.4.1- Limitações à investigação

Durante a elaboração deste trabalho, aconteceram algumas questões que nos limitaram na nossa pesquisa.

Primeiramente por ter sido uma experiência pioneira através a utilização de linhas celulares de Glioblastomas, não existiam outras bases de comparação dos resultados.

A ideia proposta inicialmente focava-se na utilização de linfócitos saudáveis de sangue humano, colhido a Técnicos de Radiologia com exercício de funções na área da RM. No entanto, o número reduzido de voluntários não permitia a credibilidade e exequibilidade da experiência.

Assim, optou-se pela utilização de linhas celulares já existentes em laboratório, selecionando-se linhas celulares de astrócitos saudáveis. No entanto, no dia antecedente à realização da exposição a CEM, as linhas celulares que se encontravam numa incubadora com ambiente e meio controlado, morreram, devido à sua maior sensibilidade.

Para dar continuidade à realização da experiência, foi necessário alterar as linhas celulares para linhas celulares de glioblastomas, uma vez que são células tumorais com maior resistência.

## Capítulo VI - Conclusão

---

### 6.1 Conclusão

Todos os organismos vivos estão constantemente expostos a campos eletromagnéticos de ocorrência natural que existe na superfície da Terra. Esses campos são fracos, discretos, não-ionizantes e a população geralmente não têm consciência de sua existência.

Neste estudo foi analisada a presença de alguns tipos de danos do ADN, nomeadamente SSBs, SDBs e quantificação de micronúcleos; em células expostas a campos magnéticos.

Os resultados obtidos permitem mostrar uma maior quantidade de focos da proteína XRCC1 nas amostras que foram submetidas a radiação não-ionizante, indicando um aumento de SSBs nestas condições. No entanto, não foram observados focos da histona  $\gamma$ -H2AX, indicando a ausência de DSBs em células submetidas à radiação não-ionizante. Apesar de promissores, estes são resultados preliminares que carecem de confirmação.

Verificámos também a existência de um aumento de MN em ambas as linhas celulares irradiadas.

A exposição ocupacional é algo que como profissionais de saúde na área da Radiologia nos devemos cismar diariamente. Sendo por isso importante consciencializar o Profissional de Saúde sobre os níveis de exposição e efeitos na saúde derivados da exposição a campos magnéticos com radiofrequências associadas de modo a prevenir e a minimizar os riscos na saúde para a equipa técnica, deste modo, para uso seguro destes equipamentos, é importante estudar os efeitos biológicos da exposição às radiofrequências, existindo assim uma necessidade urgente de realizar mais estudos para avaliar o risco à saúde da exposição de longo prazo à RM, principalmente do Técnico de Radiologia que executa funções diárias nestes equipamentos.

Em resumo, este foi o primeiro estudo celular mostrando que a ressonância magnética induz danos celulares em células GBM. No entanto, muitos dos mecanismos celulares e/ou moleculares subjacentes ao comportamento observado precisam ser melhor elucidados.

## Referências Bibliográficas

- (1) Published in OCED library- <https://www.oecd-ilibrary.org/sites/eadc0d9d-en/index.html?itemId=/content/component/eadc0d9d-en#figure-d1e25641>. Acesso: 23 de Abril 2022.
- (2) Lee, J., Kim, M., Kim, Y., et al. (2011) “Genotoxic Effects of 3 T Magnetic Resonance Imaging in Cultured Human Lymphocytes”. *Bioelectromagnetics* 32:535-542.
- (3) Tubiana, M., Aurengo, A., Averbeck, D., and Masse, R. (2006). The debate on the use of a linear no threshold for assessing the effects of low doses. *J. Radiol. Prot.*, 26:317-324.
- (4) Vijayalaxmi, Fatahi, M., Speck, O. (2015) Magnetic resonance imaging (MRI): A review of genetic damage investigations. *Mutation Research*, 764, 51-63,
- (5) Schwenzer, Nina F. et al. 2007. “Detection of DNA Double-Strand Breaks Using  $\gamma$ H2AX after MRI Exposure at 3 Tesla: An in Vitro Study.” *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 26(5): 1308–14.
- (6) Ballardin, M., Casella M., et al. (2008) Is the genotoxic effect of magnetic resonance negligible? Low persistence of micronucleus frequency in lymphocytes of individuals after cardiac scan. *Mutation Research*, 645, 39-43.
- (7) Fiechter, M., Stehli, J., Fuchs, T., et al. (2013) Impact of cardiac magnetic resonance imaging on human lymphocyte DNA integrity. *European Heart Journal*, 34, 2340-234
- (8) Hill, M. A., O'Neill, P., & McKenna, W. G. (2016). Comments on potential health effects of MRI-induced DNA lesions: quality is more important to consider than quantity. *European Heart Journal Cardiovascular Imaging*, 17(11), 1230–1238. <https://doi.org/10.1093/ehjci/jew163>
- (9) Published in Brasilrad- <https://brasilrad.com.br/artigos/uma-breve-historia-da-imagem-por-ressonancia-magnetica-mri/> . Acesso: 18 Novembro 2021
- (10) Publisher in URM- <https://urmgv.com.br/historia-da-ressonancia-magnetica/> . Acesso: 30 de Dezembro
- (11) Published in Siemens Healthineers- <https://www.siemens-healthineers.com/br/magnetic-resonance-imaging> . Acesso: 22 Dezembro 2021
- (12) Publisher in Planet Chimica- [tps://www.pianetachimica.it/NMR/problemi/teoria\\_nmr\\_1.htm](https://www.pianetachimica.it/NMR/problemi/teoria_nmr_1.htm) pesquisado em Setembro 2021.
- (13) (BLOCH, F. et al. The nuclear induction experiment. *Physical Review*, New York, v.70, n.7-8, p.474-485, 1946. Disponível em: [http://prola.aps.org/abstract/PR/v70/i7-8/p474\\_1](http://prola.aps.org/abstract/PR/v70/i7-8/p474_1). Doi: 10.1103/PhysRev.70.474. -


- PURCELL, E.M. et al. Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid. *Physical Review*, New York, v.69, n.1-2, p.37-38, 1946.)
- (14) Hessel, R., Freschi, Agnaldo A., Santos, F. (2015) “Lei da indução de Faraday: Uma verificação experimental” *Revista Brasileira de Ensino de Física* v.37, n 1
- (15) R. De and O. Nunes, (2018) “Desenvolvimento de um sistema de reconhecimento de padrões para simular imagens de ressonância Magnética com contraste” Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa/Instituto Politécnico de Lisboa.
- (16) Published in Classificação dos materiais- <https://www.preparaenem.com/fisica/classificacao-dos-materiais-magneticos.htm> Acesso: 20 Novembro 2021
- (17) Mazzola, Alessandro A. 2009. “Ressonância Magnética: Princípios de Formação Da Imagem e Aplicações Em Imagem Funcional.” *Revista Brasileira de Física Médica* 3(1): 117–29.
- (18) Published in Tecnologia em radiologia- <https://tecnologiaemradiologia.wordpress.com/seguranca-em-ressonancia-magnetica-boas-praticas-do-tecnologo-em-radiologia/>) Acesso: 5 Dezembro 2021
- (19) Mezrich R. A perspective on k-space. *Radiology*. 1995;195:297-315.
- (20) Jornada, Tiago da Silva, Camila Hitomi Murata, and Regina Bitelli Medeiros. 2016. “Influence of Partial K-Space Filling on the Quality of Magnetic Resonance Images.” *Radiologia Brasileira* 49(3): 158–64.
- (21) Published in Ampola digital- <https://ampoladigital.wordpress.com/2017/01/26/ponderacoes-em-rm/>. Acesso: 20 Novembro 2021
- (22) Published in Ampola digital- <https://ampoladigital.wordpress.com/2017/01/26/inversion-recovery/>. Acesso 20 Novembro 2021
- (23) Guimaraes, Marcos Duarte et al. 2014. “Ressonância Magnética Funcional Na Oncologia: Estado Da Arte.” *Radiologia Brasileira* 47(2): 101–11.
- (24) Sammet, S. (2016). Magnetic resonance safety. *Abdominal Radiology*, 41(3), 444–451. <https://doi.org/10.1007/s00261-016-0680-4>
- (25) Viegas, M F, I M Martin, D V Ferreira, and C Otani. “Medidas Da Radiação Não-ionizante Na Cidade de São José Dos Campos, SP .” *Nita*: 1–12.
- (26) Published in Ressonância Magnética e riscos- <https://nexxto.com/ressonancia-magnetica-e-riscos-do-queenching/> Acesso: 7 Janeiro 2022
- (27) Published in Md Saúde- <https://www.mdsaude.com/exames-complementares/ressonancia-magnetica/>. Acesso 7 Janeiro 2022

- (28) Published in Repositório Faculdade de Medicina de Lisboa <https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/46551/1/CarlosDSantos.pdf>. Acesso: 8 Janeiro 2022.
- (29) Mazzola, Alessandro A., Krine I. Stieven, Guilherme Hohgraefe Neto, and Georgina de Melo Cardoso. 2019. "Artigo de Revisão Segurança Em Imagem Por Ressonância Magnética." *Revista Brasileira de Física Médica* 13(1): 76–91.
- (30) Viegas, M F, I M Martin, D V Ferreira, and C Otani. "Medidas Da Radiação Não-ionizante Na Cidade de São José Dos Campos, SP ." *Nita*: 1–12.
- (31) Published in MR questions- <https://mriquestions.com/what-is-sar.html?fbclid=IwAR1JovSa-fere54zvGGDpCDhTe-Xe6qdGldWsPvetCSIErmBR8-LLKgWJMw>. Acesso: 15 Janeiro 2022
- (32) Published in toda a materia- <https://www.todamateria.com.br/cromossomos/> Acesso: 15 Janeiro 2022
- (33) Published in Universidade Católica Brasileira- <http://professor.pucgoias.edu.br/SiteDocente/admin/arquivosUpload/18497/material/9.%20Ciclo%20celular.pdf> Acesso: 20 Março 2022
- (34) I. Silva Neto, Benedito Rodrigues da. et.all (2019) "Conceitos básicos da Genética" Atena Editora Ano 2019
- (35) Nepomuceno, Leandro L., Ferreira, Lu s J., et.all (2017) "Mecanismos de reparo aos danos do DNA nos pontos de checagem do ciclo celular. 10.18677
- (36) Noubissi, Felicite K. et al. 2021. "Detection and Quantification of  $\gamma$ -H2AX Using a Dissociation Enhanced Lanthanide Fluorescence Immunoassay." *Scientific reports* 11(1): 8945. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88296-3>.
- (37) Published in UFRGS - <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/199526/001086091.pdf?sequence=1> Acesso: 12 Fevereiro 2022
- (38) <https://meristemjournays.wordpress.com/2015/10/30/genetic-modification-with-a-twist/> Acesso: 2 Abril 2022
- (39) Caldecott, Keith W. 2019. "XRCC1 Protein; Form and Function." *DNA Repair* 81(July): 102664. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.102664>.
- (40) Noubissi, Felicite K. et al. 2021. "Detection and Quantification of  $\gamma$ -H2AX Using a Dissociation Enhanced Lanthanide Fluorescence Immunoassay." *Scientific reports* 11(1): 8945. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88296-3>.
- (41) Kinner, Andrea, Wenqi Wu, Christian Staudt, and George Iliakis. 2008. "Gamma-H2AX in Recognition and Signaling of DNA Double-Strand Breaks in the Context of Chromatin." *Nucleic acids research* 36(17): 5678–94.

- (42) Noubissi, Felicite K. et al. 2021. "Detection and Quantification of  $\gamma$ -H2AX Using a Dissociation Enhanced Lanthanide Fluorescence Immunoassay." *Scientific reports* 11(1): 8945. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88296-3>.
- (43) Dietz, J. et al. 2000. "Pesquisa de Micronúcleos Na Mucosa Esofágica e Sua Relação Com Fatores de Risco Ao Câncer de Esôfago." *Revista da Associação Médica Brasileira* 46(3): 207–11.
- (44) Lee JW, Kim MS, Kim YJ, Choi YJ, Lee Y, Chung HW. (2011) Genotoxic effects of 3 T magnetic resonance imaging in cultured human lymphocytes. *Bioelectromagnetics*. Oct;32(7):535-42. doi: 10.1002/bem.20664. Epub 2011 Mar 15. PMID: 21412810.
- (45) Simi S, Ballardín M, Casella M, De Marchi D, Hartwig V, Giovannetti G, Vanello N, Gabbriellini S, Landini L, Lombardi M. (2008) Is the genotoxic effect of magnetic resonance negligible? Low persistence of micronucleus frequency in lymphocytes of individuals after cardiac scan. *Mutat Res*. Oct 14;645(1-2):39-43. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2008.08.011. Epub 2008 Aug 30. PMID: 18804118.

## Anexos

## Anexo 1- Questionário de consentimento informado facultado ao paciente antes da realização de um exame de RM.

<b>QUESTIONÁRIO/TERMO DE RESPONSABILIDADE TAC/RESSONÂNCIA MAGNÉTICA</b>	
---	---

*Agradecemos o preenchimento deste inquérito. Pretendemos obter informação para garantir as melhores condições de segurança na realização do seu exame. Esclareça qualquer dúvida junto de um dos nossos colaboradores. Muito obrigado.*

Grupo I (Responda pf. se vai fazer Ressonância e/ou TAC)	Não	Sim	
Fez algum exame de TAC ou Ressonância Magnética antes?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	→ TAC <input type="checkbox"/> RM <input type="checkbox"/> Em que ano? _____
Fez algum exame com injeção de contraste?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	→ Fez reação alérgica? S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>
Já foi operado(a)?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	→ Tipo de cirurgia: _____ Ano: _____
Tem doenças nos rins (insuficiência renal)?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	→ Faz diálise? S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> → Tipo: Hem <input type="checkbox"/> Per <input type="checkbox"/>
Está grávida?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	→ Quantas semanas?
Tem dispositivo intra-uterino (DIU)?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	→ Qual?
Tem asma, bronquite asmática ou falta de ar frequente?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	→ Usa broncodilatadores (spray)? S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>
Tem diabetes?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	→ Toma Metformina (Risidon®)? S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>
Usa bomba de infusão de insulina?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Tem alergias (medicamento, alimento, poeiras/outros)?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	→ Qual?
Tem/teve perfurações no esófago/estômago/intestinos?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	↳

Grupo II (Continuar a responder pf. se vai fazer Ressonância)	Não	Sim		
Tem claustrofobia?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<div style="border: 1px dashed gray; padding: 10px; margin: 0 auto; width: 80%;"> <p style="font-size: small;">Cole aqui a etiqueta de identificação (para a usar pela brácea)</p> </div>	
Tem <i>pacemaker</i> (pilha no coração)?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Tem clips metálicos (cranianos, aórticos ou outros)?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Tem suturas metálicas e/ou agrafes cirúrgicos?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Tem válvulas cardíacas não biológicas (próteses)?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Tem <i>piercings</i> ou tatuagens?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Tem derivação ( <i>shunt</i> ) espinal ou ventricular?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
É soldador ou mecânico?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Fez cirurgia a cataratas com inclusão de lente intra-ocular?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Tem lentes de contacto?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Tem aparelho auditivo?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Tem placas ou parafusos metálicos após fratura?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		→ Onde e há quanto tempo?
Tem prótese dentária?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		→ Amovível? S <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/>
Tem partículas de metal (chumbo, limalhas, outros)?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		→ Qual a localização?

**USO DE CONTRASTE**

Para melhor esclarecimento da sua situação clínica, durante a realização do exame pode ser necessária a administração de produto de contraste. Embora os contrastes atuais sejam muito seguros, à semelhança do que acontece com outros produtos farmacológicos, a sua administração não é completamente isenta de riscos. Em casos pouco frequentes a administração de contraste por via endovenosa poderá desencadear uma reação adversa, de gravidade variável. Embora em casos extremos as reações possam ser graves ou muito graves, na esmagadora maioria dos casos as reações são ligeiras, de curta duração e autolimitadas. No cumprimento de normas estabelecidas, solicitamos a sua atenção para esta informação e autorização, caso seja necessário efectuarmos esta administração. Mais informamos que o uso de contraste pode ter custos adicionais, de acordo com a tabela de preços em vigor, que serão debitados ao Utente após a realização do exame.

Declaro ter tomado conhecimento da presente informação e ter obtido os esclarecimentos que julguei necessários. No caso de existirem razões clínicas fundamentadas e seja necessário no meu próprio interesse, AUTORIZO a injeção endovenosa de contraste

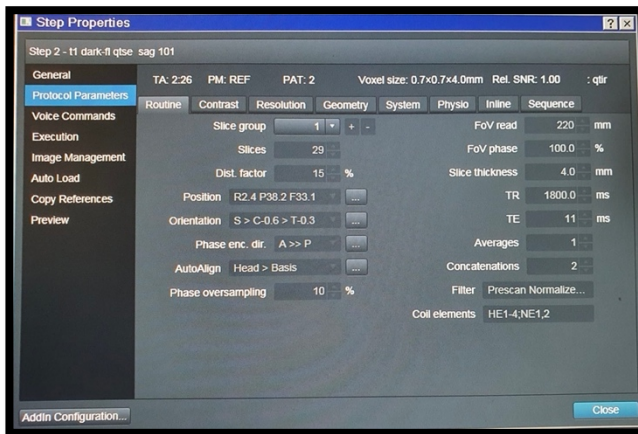
SIM  NÃO

Nome \_\_\_\_\_ Sexo \_\_\_\_\_ Idade \_\_\_\_\_ Peso (Kg) \_\_\_\_\_ Altura (cm) \_\_\_\_\_  
M  F

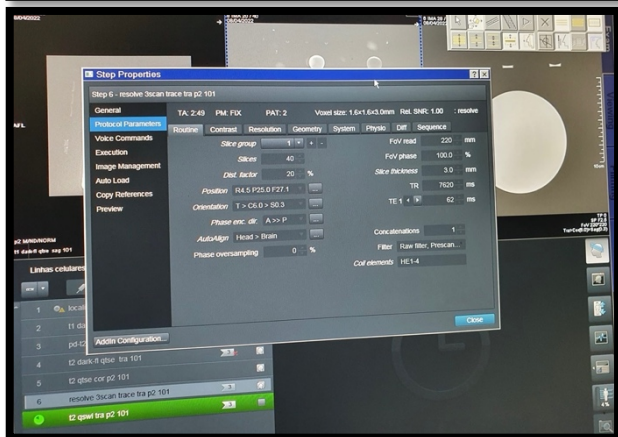
Assinatura conforme documento de identificação (utente ou acompanhante) \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

NOTA - Se assinou em nome do utente, indique-nos grau de parentesco/relação: \_\_\_\_\_ Contato telefónico: \_\_\_\_\_

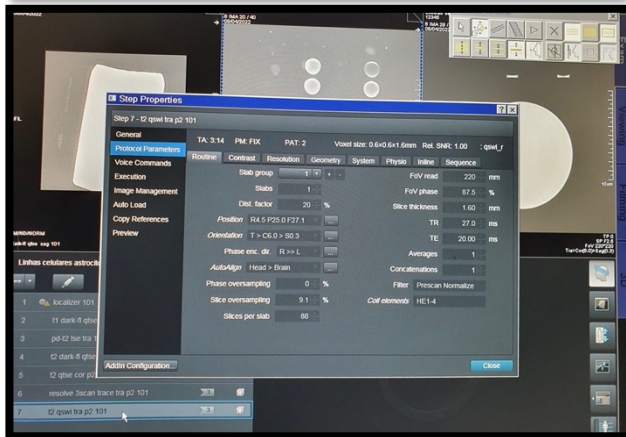
Anexo 2- Fotografias obtidas durante a realização da irradiação.



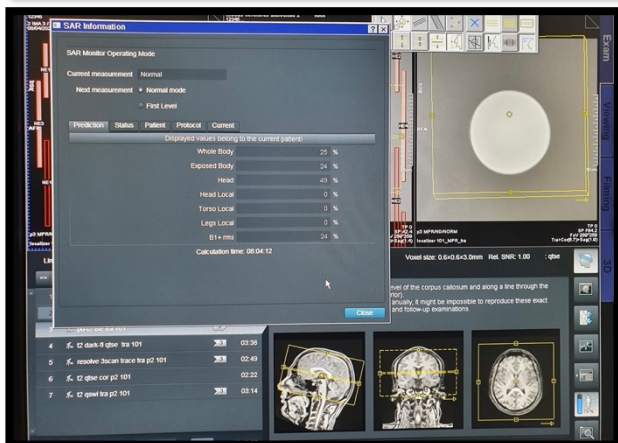
- Sequência T1 dark fl – tse
- Plano sagital



- Sequência de Difusão (DWI) ou no caso da Siemens sequência resolve
- Plano axial



- Sequência T2 SWI
- Plano Axial



- Informação relativa ao SAR, fornecida. É na região do crânio que o SAR é mais elevado 49%, devido ao estudo ser realizado com bobine de crânio.

**Anexo 3-** Registo das 500 células totais e a contagem de 1000 células binucleadas e respetivos micronúcleos das amostras de controlo e irradiadas das linhas U373 e T98G.

	U373 – Controlo.1			U373 – Controlo.2			U373 – Controlo.3			U373 – Controlo.4		
<b>MN</b>	185	1Mni	18	193	1Mni	15	212	1Mni	12	212	1Mni	13
		2Mni	7		2Mni	7		2Mni	3		2Mni	3
<b>BN</b>	1000	1Mni	45	1000	1Mni	53	1000	1Mni	46	1000	1Mni	48
		2Mni	13		2Mni	18		2Mni	15		2Mni	8
		3 Mni	6		3 Mni	10		3 Mni	9		3 Mni	8
		> 3 Mni	10		> 3 Mni	15		> 3 Mni	12		> 3 Mni	6
<b>TN</b>	23	1 Mni	2	26	1 Mni	5	37	1 Mni	6	51	1 Mni	6
		2 Mni			2 Mni	2		2 Mni			2 Mni	1
		3 Mni			3 Mni			3 Mni	1		3 Mni	1
		> 3 Mni			> 3 Mni			> 3 Mni	2		> 3 Mni	
<b>Poli</b>	4	1Mni	2	7	1Mni	3	5	1Mni	1	14	1Mni	2
		2Mni			2Mni	1		2Mni			2Mni	
		3 Mni			3 Mni			3 Mni			3 Mni	
		> 3 Mni			> 3 Mni			> 3 Mni	1		> 3 Mni	1

**Tabela 3-** Contagem de micronúcleos em células MN, BN e TN e Poli na amostra de controlo da linha celular U373.

26	U373 – Irradiada.1			U373 – Irradiada.2			U373 – Irradiada.3			U373 – Irradiada.4		
<b>MN</b>	176	1Mni	23	190	1Mni	34	137	1Mni	18	123	1Mni	19
		2Mni	7		2Mni	11		2Mni	5		2Mni	9
<b>BN</b>	1000	1Mni	110	1000	1Mni	86	1000	1Mni	83	1000	1Mni	91
		2Mni	31		2Mni	21		2Mni	21		2Mni	21
		3 Mni	22		3 Mni	12		3 Mni	14		3 Mni	15
		> 3 Mni	23		> 3 Mni	24		> 3 Mni	16		> 3 Mni	16
<b>TN</b>	58	1 Mni	8	24	1 Mni	5	42	1 Mni	6	43	1 Mni	5
		2 Mni	3		2 Mni	3		2 Mni	4		2 Mni	0
		3 Mni	2		3 Mni	1		3 Mni			3 Mni	3
		> 3 Mni	3		> 3 Mni	4		> 3 Mni	3		> 3 Mni	
<b>Poli</b>	18	1Mni	3	20	1Mni	5	20	1Mni	5	20	1Mni	5
		2Mni	3		2Mni	1		2Mni	1		2Mni	
		3 Min	1		3 Min			3 Min			3 Min	2
		> 3 Mni	2		> 3 Mni			> 3 Mni	2		> 3 Mni	2

**Tabela 4-** Contagem de micronúcleos em células MN, BN e TN e Poli na amostra Irradiada da linha celular U373.

	T98G – Controlo.1			T98G – Controlo.2			T98G – Controlo.3			T98G – Controlo.4		
<b>MN</b>	234	1Mni	8	231	1Mni	13	226	1Mni	13	206	1Mni	15
		2Mni	1		2Mni	7		2Mni	4		2Mni	4
<b>BN</b>	1000	1Mni	40	1000	1Mni	46	1000	1Mni	35	1000	1Mni	40
		2Mni	9		2Mni	11		2Mni	9		2Mni	15
		3 Mni	7		3 Mni	11		3 Mni	7		3 Mni	6
		> 3 Mni	8		> 3 Mni	2		> 3 Mni	6		> 3 Mni	10
<b>TN</b>	16	1 Mni	2	18	1 Mni	1	29	1 Mni	2	16	1 Mni	7
		2 Mni			2 Mni	1		2 Mni			2 Mni	1
		3 Mni	1		3 Mni			3 Mni			3 Mni	1
		> 3 Mni			> 3 Mni			> 3 Mni			> 3 Mni	2
<b>Poli</b>	6	1Mni	1	7	1Mni	2	8	1Mni		8	1Mni	2
		2Mni			2Mni	1		2Mni			2Mni	
		3 Mni			3 Mni			3 Mni			3 Mni	1
		> 3 Mni			> 3 Mni			> 3 Mni			> 3 Mni	

**Tabela 5-** Contagem de micronúcleos em células MN, BN e TN e Poli na amostra de controlo da linha celular T98G

	T98G – Irrradiada.1			T98G – Irrradiada.2			T98G – Irrradiada.3			T98G – Irrradiada.4		
<b>MN</b>	267	1Mni	22	165	1Mni	8	226	1Mni	14	219	1Mni	25
		2Mni	10		2Mni	2		2Mni	6		2Mni	5
<b>BN</b>	1000	1Mni	57	1000	1Mni	50	1000	1Mni	50	1000	1Mni	71
		2Mni	16		2Mni	13		2Mni	12		2Mni	21
		3 Mni	10		3 Mni	5		3 Mni	7		3 Mni	14
		> 3 Mni	13		> 3 Mni	10		> 3 Mni	5		> 3 Mni	17
<b>TN</b>	16	1 Mni	4	18	1 Mni	2	21	1 Mni	5	71	1 Mni	6
		2 Mni	2		2 Mni			2 Mni			2 Mni	2
		3 Mni			3 Mni			3 Mni	1		3 Mni	3
		> 3 Mni	1		> 3 Mni			> 3 Mni	1		> 3 Mni	2
<b>Poli</b>	7	1Mni	2	5	1Mni	1	6	1Mni	1	12	1Mni	5
		2Mni			2Mni			2Mni			2Mni	
		3 Mni			3 Mni			3 Mni	1		3 Mni	1
		> 3 Mni	1		> 3 Mni			> 3 Mni			> 3 Mni	1

**Tabela 6-** Contagem de micronúcleos em células MN, BN e TN e Poli na amostra Irrradiada da linha celular T98G