



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

HUEMAKOU RIMAUD DJIDONOU

**ESTIMATIVA DE FREQUÊNCIA DE DICÊNTRICOS A PARTIR
DA EXPOSIÇÃO A ALTA TAXA DE DOSE POR RADIAÇÃO
GAMA**

Recife
2023

HOUEMAKOU RIMAUD DJIDONOU

**ESTIMATIVA DA FREQUÊNCIA DE DICÊNTRICOS A PARTIR
DA EXPOSIÇÃO A ALTA TAXA DE DOSE POR RADIAÇÃO
GAMA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientadora: Ora. Mariana Esposito
Mendes

Coorientadora: Ora. Fabiana Farias de
Lima Guimarães

Recife
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Djidonou, Houemakou Rimaud.

Estimativa da frequência de dicêntricos a partir da exposição a alta taxa de dose por radiação gama. / Houemakou Rimaud Djidonou. - Recife, 2023.
56 p. : il., tab.

Orientador(a): Mariana Esposito Mendes

Cooorientador(a): Fabiana Farias de Lima Guimarães

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2023.

Inclui referências, anexos.

1. Biodosimetria. 2. Raio Gama. 3. Ensaio de dicêntrico. I. Mendes, Mariana Esposito. (Orientação). II. Guimarães, Fabiana Farias de Lima. (Coorientação). IV. Título.

500 CDD (22.ed.)

HOUEMAKOU RIMAUD DJIDONOU

**ESTIMATIVA DA FREQUÊNCIA DE DICÊNTRICOS A PARTIR DA
EXPOSIÇÃO A ALTA TAXA DE DOSE POR RADIAÇÃO GAMA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de
Graduação em Biomedicina da
Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Aprovada em: 22/09 / 2023

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof. Ora Mariana Esposito Mendes
CRCN-NE/CNEN

Coorientadora: Prof. Ora Fabiana Farias de Lima Guimarães
CRCN-NE/CNEN

Prof. Ora. Ana Mendonça de Albuquerque Melo
UFPE/Departamento de Biofísica e Radiobiologia

Prof. MSc. Juliana Vieira de Barros Arcoverde
UFPE/Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana - CCS/UFPE

Dedico este trabalho à minha mãe, Augustine (*in memoriam*), e ao meu pai, Japhet, por todo o amor, apoio e incentivo dados durante toda minha vida escolar, acadêmica e pessoa.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, aos meus pais, Japhet e Augustine, que sempre estiveram presentes em minha vida. Agradeço por todos os ensinamentos, os esforços e investimentos para que eu tenha uma educação de qualidade.

À minha orientadora, Ora. Mariana Esposito por ter me acolhido e dado, a oportunidade e o privilégio, de fazer parte do seu grupo de pesquisa, assim por todo o conhecimento passado no laboratório.

À minha coorientadora Ora. Fabiana Lima, pelo acolhimento e assistência, ensinamentos no Laboratório de Oosimetria Biológica do CRCN-NE.

Aos meus grandes amigos de curso, Marcos, Carlos, Lucas, Almir, Agenor, Anndressa por me acolherem na universidade e me proporcionarem grande momentos de felicidade durante a graduação.

Aos colegas de laboratório de Oosimetria Biológica do CRCN, pelo auxílio na execução do meu projeto e por todo o incentivo demonstrado ao longo desses anos.

Ao Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN-NE), pela disponibilidade técnica na execução deste trabalho.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

DJIDONOU, Houemakou Rimaud. **ESTIMATIVA DA FREQUÊNCIA DE DICÊNTRICOS A PARTIR DA EXPOSIÇÃO A ALTA TAXA DE DOSE POR RADIAÇÃO GAMA.** 2023. 56. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

RESUMO

Desde a sua descoberta, a radiação ionizante tem sido utilizada amplamente na sociedade e conseqüentemente, este uso proporcionou o aumento da probabilidade de ocorrências de exposições ocupacionais e de acidentes que podem colocar em risco a vida da população. Na interação com o tecido biológico, a radiação ionizante pode induzir lesões em nível atômicos e moleculares, resultando em alterações cromossômicas instáveis e estáveis. Deste modo, as técnicas citogenéticas ajudam na avaliação dos danos causados pela radiação, para que as medidas e procedimentos de proteções radiológicas sejam colocadas em prática. O objetivo deste trabalho foi analisar através da técnica de dicêntrico, as alterações cromossômicas em linfócitos humanos após exposição à radiação gama de alta taxa dose. Para tal, o sangue de um voluntário foi coletado, separada em três alíquotas de sangue, sendo, uma considerada controle (não irradiada) e mantida à temperatura ambiente do laboratório (20 - 22 °C), e duas alíquotas, consideradas amostras irradiadas. As amostras irradiadas foram expostas a uma fonte de ^{60}Co (irradiador Gammacell 220) localizada no Departamento de Energia Nuclear (DEN-UFPE) com taxas de dose de 17,8 Gy/min, com diferentes doses 2 Gy e 3 Gy respectivamente. Após o processo de irradiação, os linfócitos das amostras foram cultivados em meio de cultura no Laboratório de Dosimetria Biológica do Centro Regional de Ciências Nucleares (CRCN) para obtenção de preparações citológicas para análises das alterações cromossômicas. Em seguida, as lâminas foram confeccionadas a partir do precipitado de células ressuspenso em solução fixadora, para verificar a existência de alterações cromossômicas, tais como cromossomos dicêntricos, em anel e os fragmentos acêntricos isolados. Os dados obtidos para cada dose absorvida foram testados por meio do teste u de Papworth, a fim de verificar se a distribuição celular referente a cada dose exposta se comportava conforme a distribuição de Poisson. Os resultados encontrados da frequência das alterações cromossômicas foi 0,155 no sangue irradiado com 2 Gy, 0,203 no de 3Gy e 0 no sangue controle, confirmando a especificidade e sensibilidade do ensaio do cromossomo dicêntrico para diferenciar amostras irradiadas de não irradiada.

Palavras-chave: Biodosimetria. Raio Gama. Ensaio de dicêntrico. Linfócitos.

DJIDONOU, Houemakou Rimaud. **ESTIMATION OF DICENTRIC FREQUENCY FROM EXPOSURE TO HIGH DOSE RATE GAMMA RADIATION.** 2023. 56. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

ABSTRACT

Since its discovery, ionizing radiation has been widely used in society and, consequently, this use has directly increased the likelihood of occupational exposures to professionals and accidents that can put people's lives at risk. When interacting with biological tissue, ionizing radiation induces lesions at the atomic and molecular levels, resulting in unstable and stable chromosomal alterations. Cytogenetic techniques therefore help to assess the damage caused by radiation, so that radiological protection measures and procedures can be taken. The aim of this work is to analyze chromosomal changes in human lymphocytes after exposure to high-dose-rate gamma radiation using the dicentric assay. To this end, the blood of a volunteer was collected, separated into three blood aliquots, one of which was considered contrai (non-irradiated) and kept at room temperature in the laboratory (20 - 22 °C), and the other two aliquots were considered irradiated samples. The irradiated samples were exposed to a ^{60}Co source (Gammacell 220 irradiator) located at the Departamento de Energia Nuclear (DEN-UFPE) at dose rates of 17.8 Gy/min, with different doses of 2 Gy and 3 Gy respectively. After the irradiation process, the lymphocytes from the samples were grown in culture medium at the Laboratório de Dosimetria Biológica do Centro Regional de Ciências Nucleares (CRCN) to obtain cytological preparations for analysis of chromosomal alterations. Slides were then made from the cell precipitate resuspended in fixative solution to check for chromosomal changes such as dicentric chromosomes, ring chromosomes and isolated acentric fragments, to determine the cell distribution for each dose exposed. The data obtained for each absorbed dose was tested using Papworth's u-test. The results found for the frequency of chromosomal alterations were 0.155 in the blood irradiated with 2 Gy, 0.203 in the 3Gy blood and 0 in the contrai blood, confirming the specificity and sensitivity of the dicentric test to differentiate between irradiated and non-irradiated samples.

Key words: Biodosimetry. Gamma ray. Dicentric assay. Lymphocytes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mecanismo de interação da radiação com a matéria.	18
Figura 2 - Caracterização do Efeito fotoelétrico.	19
Figura 3 - Ilustração do Efeito Compton.	20
Figura 4 - Ilustração da Produção de pares.	21
Figura 5 - Relação entre RBE e LET.	23
Figura 6 - Representação das ações direta e indireta da radiação ionizante.	24
Figura 7 - Estimativa do tempo de latência para aparecimento de câncer após exposição.	26
Figura 8 - Relações típicas entre dose e severidade do dano para efeitos determinísticos numa população de indivíduos.	27
Figura 9 - Representação das fases do ciclo celular.	29
Figura 10 - Representação do ciclo celular e ação da Fitohemaglutinina (PHA).	34
Figura 11 - Metáfase contendo dicêntricos associado ao fragmento acêntrico.	36
Figura 12 - Uma metáfase espalhada com dois anéis (com setas), fragmentos dicêntricos e acêntricos.	36
Figura 13 - Curvas de calibração construídas in vitro com diferentes qualidades de radiação.	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuições intercelulares de dicêntricos com suas respectivas frequências, índice de dispersão e valores de χ^2	41
Tabela 2 - Frequência de alterações cromossômicas instáveis para o sangue irradiado com fonte de ^{60}Co a dose de 2 e 3 Gy	42
Tabela 3 - Distribuição celular de Dicêntricos mais Anel cromossômico	43
Tabela 4 - Distribuição celular de Fragmentos isolados	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BER	Base Excision Repair - Reparo por Excisão de Base
CRCN-NE	Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
DBS	<i>Double-strand Break</i> - Quebras de Fita Dupla
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> - Ácido Desoxirribonucleico
Gy	Gray - Unidade de Dose Absorvida
HR	<i>Homologous Recombination</i>
IAEA	<i>International Atomic Energy Agency</i>
LET	<i>Linear Energy Transfer</i> - Transferência Linear de Energia
Mev	Mega elétron-volt
NER	<i>Nucleotide Excision Repair</i> - Reparo por Excisão de Nucleotídeos
NHEJ	<i>Non-homologous end-Joining</i> - União de Extremidades Não Homólogas
RBE	<i>Relative Biological Effectiveness</i> - Efetividade Biológica Relativa
SSA	<i>Single Strand Annealing</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Radiação Ionizante	15
2.2 Aplicação Das Radiações Ionizantes.....	16
2.3 Interação Da Radiação Ionizante Com a Matéria	18
2.4 Interação Da Radiação Ionizante Com O Tecido Biológico	21
2.4.1 Dose absorvida e taxa de dose	21
2.4.2 Transferência linear de energia-LET.....	22
2.4.3 Efetividade biológica relativa-RBE.....	23
2.5 Efeitos Biológicos Da Radiação Ionizante	24
2.5.1 Efeitos estocásticos e determinísticos	25
2.5.2 Efeitos somáticos e hereditários.....	27
2.5.3 Efeitos imediatos e tardios	27
2.6 Ciclo Celular	28
2.7 Mutação e Reparo.....	30
2.7.1 Reparo por excisão de base (BER - <i>base excision repair</i>)	31
2.7.2 Reparo por Excisão de nucleotídeos (NER - <i>Nucleotide excision repair</i>)	32
2.7.3 Reparação de DSBs (double-strand breaks)	32
2.8 Linfócitos Humanos	33
2.9 Biodosimetria.....	34
2.9.1 Ensaio de Dicêntricos	35
2.9.2 Curva de Calibração	37
3 OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo Geral.....	38
3.2 Objetivos Específicos	38
4 METODOLOGIA.....	39

	12
4.1 Seleção de Doador e Coleta de Amostra	39
4.2 Irradiação das Amostras.....	39
4.3 Cultivo de Células.....	39
4.4 Preparação de Lâminas.....	40
4.5 Análise Microscópica	40
4.6 Análise de Dados	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	46
ANEXOS	53
ANEXO A	54
ANEXO 8.....	55

1. INTRODUÇÃO

Um dos grandes avanços da Radiobiologia foi a descoberta dos raios X em 1895, pelo físico Wilhelm Conrad Roentgen, enquanto ele estudava raios catódicos em um tubo de descarga de gás com a finalidade de detectar radiação eletromagnética de alta frequência prevista por Heinrich Hertz (Glasser, 1993). Em 1901, foi concedido a ele o prêmio Nobel de Física e os trabalhos de Roentgen ajudaram na descoberta de outros tipos de radiações ionizantes. Em 1896, Henri Becquerel descobriu que sais de urânio emitiam raios semelhantes aos raios X em seu poder penetrante, demonstrando que essa radiação parecia surgir espontaneamente do próprio urânio. No ano de 1898, influenciada por essas duas importantes descobertas, Marie Curie descobriu que o tório, o polônio e o rádio também emitiam radiações. Dois anos após, baseado no experimento de Rutherford e estudando o urânio e o rádio, o físico e químico francês Paul Villard descobre a radiação eletromagnética de alta frequência: o raio gama (γ) (Lima, 2014). Os raios γ são ondas eletromagnéticas de alta frequências e baixa comprimento de onda produzidos em processos de decaimento nuclear. Por suas características físico-químicas, essa radiação é considerada a mais perigosa ao ser humano (Lima, 2014).

As radiações ionizantes mais conhecidas são as partículas alfa (α), beta (β), pósitron e nêutrons, e as que são formadas por ondas eletromagnéticas. Desde sua descoberta, as radiações ionizantes têm sido utilizadas amplamente na sociedade, principalmente nas áreas relacionadas à medicina, indústria, agricultura e outras. A radiação possibilita o diagnóstico e tratamento de patologias, conservação dos alimentos, destruição de agentes tóxicos, entre outras aplicações (Patrício et al., 2012).

O uso das radiações proporcionou diretamente o aumento na probabilidade de ocorrência de acidentes e exposições ocupacionais dos profissionais, além do risco de exposição da população à radiação ionizante. Os profissionais da área da saúde, mais precisamente os que trabalham em setores de radioterapia e radiodiagnóstico contribuem para ocorrências de exposição ocupacionais (Okuno, 2018; Batista et al., 2019). Com o objetivo de diminuir os riscos de saúde dos trabalhadores e da população, a Comissão Internacional de Proteção Radiológica definiu medidas que são adotadas por todos os países (ICRP, 2007). No Brasil, a Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) é o órgão responsável pela política nacional de energia

nuclear. A comissão tem por objetivo estabelecer normas e regulamentos em radioproteção além de regular, licenciar e fiscalizar a produção e o uso desta forma energia nuclear no Brasil (Frutuoso, 2015).

Os indivíduos ocupacionalmente expostos, visando um controle de suas exposições, utilizam aparelhos sensíveis à radiação denominados dosímetros. Esses dosímetros são importantes na quantificação da dose de exposição individual recebida pelos profissionais. Porém, em casos de acidentes nucleares ou radiológicos de grande escala, onde os indivíduos do público não usam dosímetros, necessita-se o uso de métodos de triagem para que os indivíduos expostos à doses mais elevadas tenham prioridade na intervenção médica devido ao alto risco de efeitos biológicos severos (IAEA, 2011).

Este tipo de avaliação está ao encargo da dosimetria biológica, que permite estimar a dose absorvida através de técnicas citogenéticas. Estas técnicas analisam as alterações geradas pela exposição à radiação na molécula de DNA e os danos no cromossomo através de marcadores biológicos. As alterações mais estudadas são as aberrações cromossômicas instáveis, tais como os cromossomos dicêntricos, micronúcleos, anel e fragmentos cromossômicos. E com base nos estudos destas alterações, são construídas curvas de calibração dose-resposta para a estimativa de Dose absorvida. Uma vez que a IAEA recomenda que cada laboratório dosimétrico tenha sua própria curva de calibração (IAEA, 2011).

Portanto, este trabalho teve como objetivo analisar, por meios da técnica do cromossomo dicêntrico, as alterações cromossômicas instáveis em linfócitos humanos expostos à radiação gama sob uma alta taxa de dose.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Radiação Ionizante

A radiação é definida como a propagação de ondas eletromagnéticas ou partículas em determinada velocidade. Essas ondas podem ser emitidas por fontes naturais ou por elementos radioativos. Segundo o físico francês Louis de Broglie, a onda eletromagnética é emitida e propaga-se em forma de partículas de energia (E) chamadas de fótons. A energia E de cada fóton é calculada a partir da equação 1:

$$E = h\nu = hc/\lambda \quad (1)$$

onde, h é a constante de Planck e vale $6,63 \cdot 10^{-34} \text{ m}^2 \cdot \text{kg/s} = 4,14 \cdot 10^{-15} \text{ eV} \cdot \text{s}$; c é a velocidade da luz, ν é a frequência da onda eletromagnética e λ é o comprimento de onda (OKUNO, 2013).

Em relação aos efeitos e energia gerados pela radiação, classifica-se a radiação em dois grupos: a radiação ionizante e não ionizante. As radiações não-ionizante são consideradas como radiação de baixa frequência e baixa energia, provenientes de fontes naturais e não naturais. As principais radiações não-ionizantes são: a luz visível, radiação infravermelha, ondas de rádio. (CNEN, 2006).

Entretanto, as radiações ionizantes, como as ondas eletromagnéticas ou partículas, possuem energia suficiente para ionizar as moléculas, capazes de arrancar elétrons de átomos, provocando alterações estruturais. Os elétrons estão ligados a átomos por força elétrica de diferentes valores dependendo da posição atômica ao núcleo, ou seja, os elétrons mais próximos do núcleo possuem maior força de atração e são carregados negativamente. Portanto, a ionização é possível somente quando a radiação possui energia maior que a força de atração entre o elétron e o núcleo do átomo. Consequentemente, nesse processo de ionização, o átomo perde elétrons e torna-se um íon positivo liberando os íons negativos (OKUNO, 2013; Okuno; Yoshimura, 2016).

Relacionado à definição, as partículas carregadas eletricamente como as partículas α , β , nêutrons e pósitrons, são consideradas radiação ionizante, quando possuem energia suficiente para causar ionização de átomos e perdem suas energias durante a trajetória. E, de todas as ondas eletromagnéticas, somente os raios X e γ são consideradas ondas ionizantes e perdem toda ou quase toda energia numa única interação com átomos (Okuno, 2013).

A classificação das radiações ionizantes é importante, porque as radiações possuem diferentes mecanismos de interação com a matéria. O conjunto das radiações ionizantes usualmente estudadas, segundo Yoshimura (2009), compreende: (a) Partículas eletricamente carregadas: essas partículas possuem energia cinética superior a energias de ligações de elétrons atômicos. Essas partículas podem ser originadas da emissão por núcleos atômicos (partículas α e β e os produtos de fissão nuclear, por exemplo), por átomos (elétrons Auger), produtos de reações nucleares; (b) Nêutrons livres, que são sempre instáveis e alcançam a estabilidade por desintegração beta; (c) Radiação eletromagnética com energia de fóton acima de 12 eV (Yoshimura, 2009; Okuno, 2013).

Os raios X e γ são consideradas radiações ionizantes por possuir alta frequência do espectro eletromagnético e conseqüentemente energia (Yoshimura, 2009). Os raios X são produzidos por processo de ajustes na estrutura eletrônica, e tem origem na eletrosfera ou no freamento de partículas carregadas no campo eletromagnético do núcleo atômico ou dos elétrons (Tauhata et al., 2003; Pereira, 2014). Em contraste, a radiação γ representa um extremo do espectro magnético, na faixa do curto comprimento de onda e da alta energia. Os raios γ são originados de desexcitações nucleares por núcleos instáveis logo em seguida à emissão de radiação α ou β (Tauhata et al., 2003).

2.2 Aplicação Das Radiações Ionizantes

Os elementos radioativos têm sido usados frequentemente em diferentes áreas da sociedade, principalmente na indústria e na medicina. A descoberta dos Raios X por Roentgen revolucionou o mundo da radioatividade, e teve um papel fundamental na compreensão dos sistemas biológicos de um ser humano (Ambrosio et al., 2017).

Um dos grandes avanços é a descoberta da estrutura do DNA usando o Raio X pela cientista Rosalind Franklin, através dos modelos estabelecidos pelos pesquisadores Francis Harry Compton Crick e James Dewey Watson (Gonçalves,

2017). A radiação ionizante tornou-se uma ferramenta indispensável na vida do homem, utilizada desde o diagnóstico até o tratamento do ser humano. Portanto, desde a descoberta das radiações ionizantes, vários hospitais já usavam a radiação ionizante, principalmente os raios X, como uma ferramenta de radiodiagnóstico, a fim de visualizar o "interior" do corpo humano (Lima et al., 2009).

No radiodiagnóstico, as radiações ionizantes são utilizadas na radiografia, mamografia e mapeamento com radiofármacos. A função principal é a visualização de um órgão, a fim de verificar possíveis anormalidades na estrutura ou na função. As radiações ionizantes são usadas em diferentes modalidades de radioterapia (braquiterapia, teleterapia e a rádio cirurgia), importante no tratamento dos tumores e células neoplásicas (Sawada, 2006; Cândido, 2017).

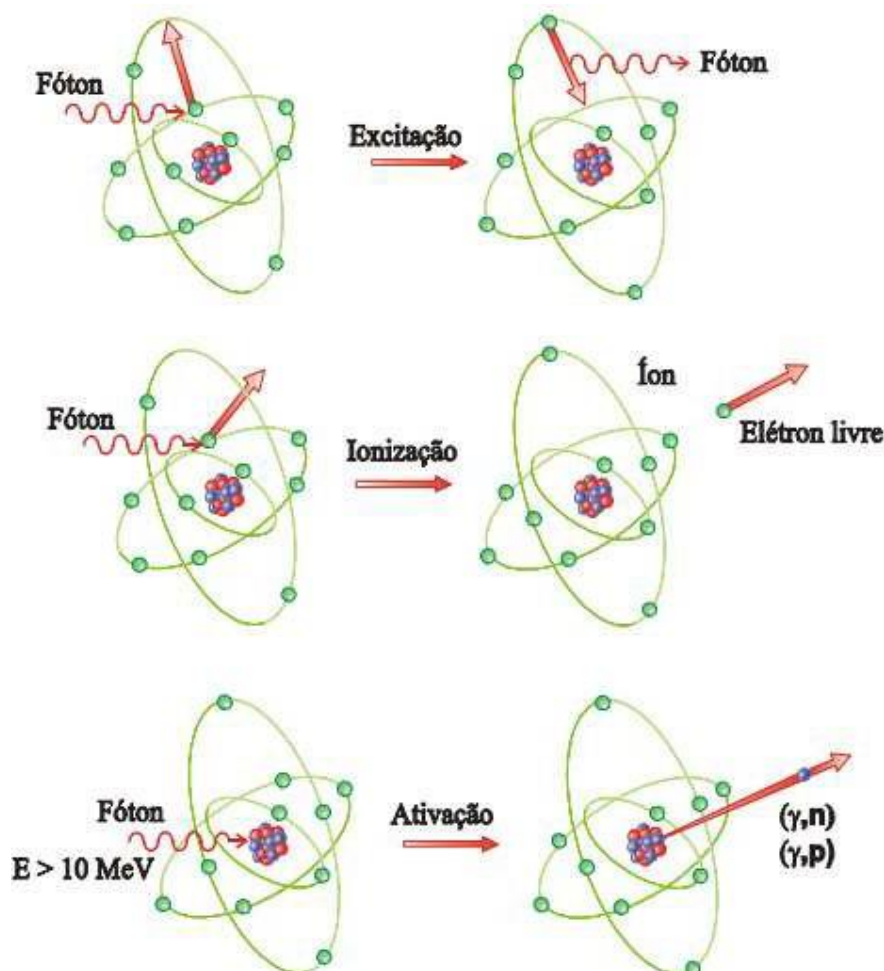
Na indústria, as principais fontes de radiação usadas são os irradiadores de raios γ e aceleradores de elétrons. Geralmente, essas fontes desempenham um papel importante na preservação e desinfecção de produtos alimentícios, esterilização de produtos farmacêuticos, médicos, cirúrgicos e na produção de energia (Pino et al., 2013).

O uso frequente aumenta proporcionalmente o acontecimento de incidentes ou acidentes ocupacionais ou até de acidentes radiológicos ou nucleares, onde a população, além dos profissionais, é exposta à radiação ionizante (Valuckas et al., 2007; Santos, M; Almeida, 2013). Coeytaux et al. (2015) realizaram uma revisão na literatura dos acidentes nucleares registrados dos anos 1980-2013 pelos diferentes órgãos reguladores de energias nucleares, como a Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA) e a Comissão Internacional de Proteção Radiológica (ICRP). Foram relatados 648 acidentes de exposição, sendo 2390 pessoas expostas no quais 190 morreram devido à superexposição. A maioria desses acidentes foram no setor da indústria (27%) e no setor médico através do uso de radioterapia (32%) ou fluoroscopia (31%).

2.3 Interação Da Radiação Ionizante Com a Matéria

A interação das radiações ionizantes com a matéria consiste na transferência de energia para o meio irradiado através das partículas que foram encontradas em sua trajetória (Nouailhetas, Yannick et al., 2005). Fisicamente, as radiações ao interagirem com um material, podem nele provocar excitação atômica ou molecular, ionização ou ativação do núcleo como representado na figura 1. Esses eventos ocorrem a nível atômico e, dependendo da energia transferida ser superior ou inferior à energia de ligação do elétron com o restante da estrutura atômica, transforma o átomo em íon positivo (Yoshimura, 2009; Tauhata et al., 2013).

Figura 1 - Mecanismo de interação da radiação com a matéria.



Fonte: Tauhata et al., 2003.

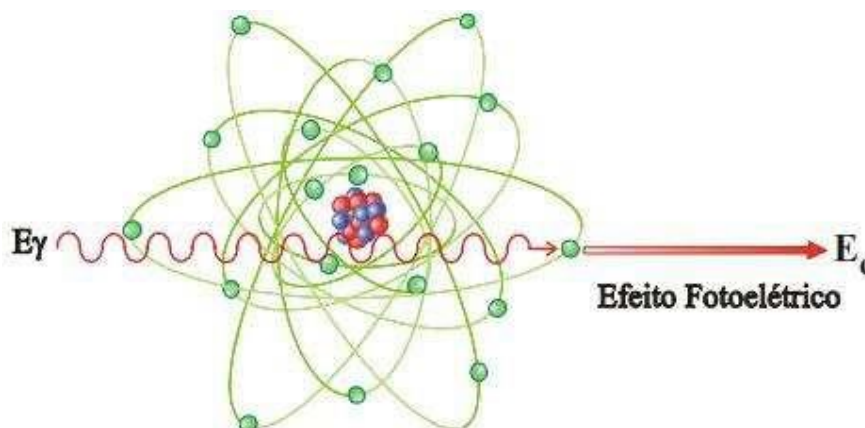
A excitação atômica acontece quando os elétrons são deslocados de seus orbitais de equilíbrio, e por insuficiência de energia retornarem, emitem a energia

excedente sob a forma de luz ou raios X características. Já, a ionização resulta na quebra de ligações químicas (Tauhata et al., 2013; Nouailhetas, 2005).

As características comuns das ondas eletromagnéticas ionizantes são: caráter ondulatório, ausência de carga e massa de repouso e alto poder de penetração em um material, percorrendo grandes espessuras antes de sofrer a primeira interação. Diferente da radiação particulada, as ondas eletromagnéticas ionizantes têm um poder de penetrabilidade muito maior e a probabilidade de interação depende também da energia da radiação, que deve estar em um intervalo de 10 MeV a 50 MeV. Excluindo as reações nucleares, os principais modos de interação das radiações eletromagnéticas ionizantes são: o efeito fotoelétrico, o efeito Compton e a produção de pares (Tauhata et al., 2003).

O efeito fotoelétrico predomina em baixas energias e consiste em uma interação entre o fóton e o átomo, caracterizada pela absorção da radiação eletromagnética ionizante em um único elétron orbital com transferência total de toda sua energia (Figura 2). Nesse processo, o átomo é ionizado e como consequência perde um elétron, surgindo assim um fotoelétrico que é ejetado pelo átomo com uma energia cinética (Tauhata et al., 2013; Pereira, 2014).

Figura 2 - Caracterização do Efeito fotoelétrico.

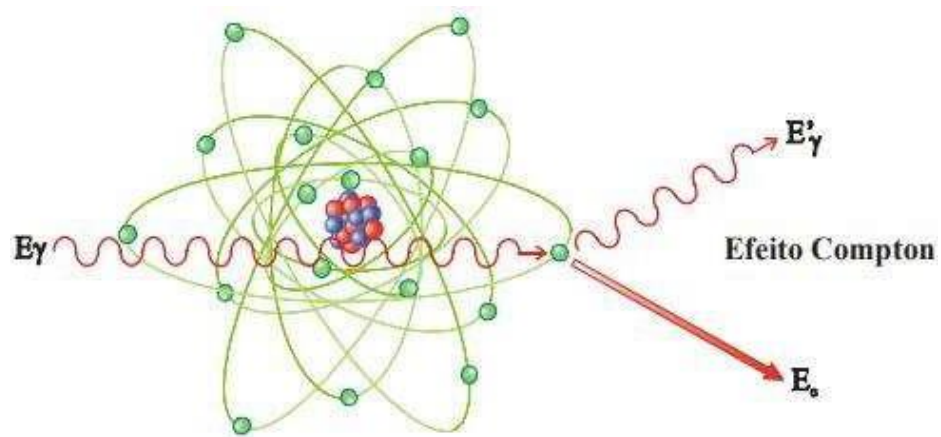


Fonte : Tauhata et al., 2013.

Essa perda de elétron ocorre, geralmente, nas camadas mais interna do átomo e é prontamente preenchida por outro elétron de camadas externas, levando a geração de fótons de raios X característicos, de elétrons rápidos e de elétrons de Auger (Mendes, 2014; Silva, 2020; Yoshimura, 2009).

No efeito Compton, a onda eletromagnética ioniza o átomo interagindo com um de seus elétrons mais externos (elétrons livres). Consequentemente, ocorre transferência parcial da energia e do momento do fóton para o elétron, assim um fóton com a energia restante é espalhado em outra direção (Tauhata *et al.*, 2013).

Figura 3 - Ilustração do Efeito Compton.

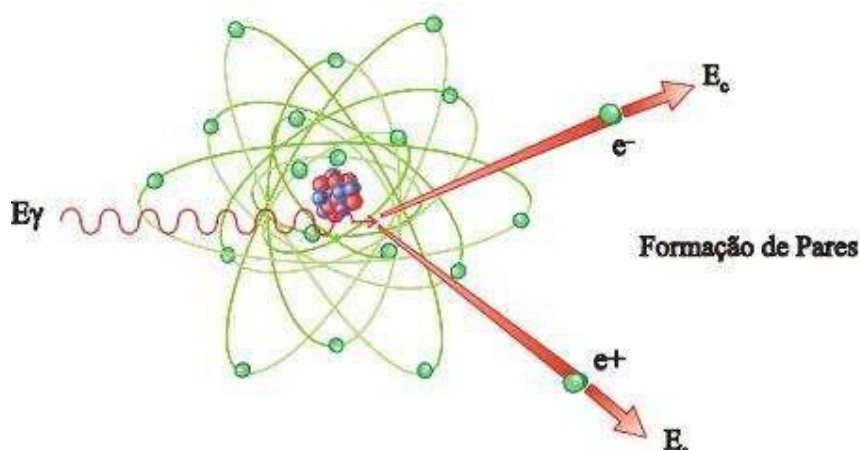


Fonte: Tauhata *et al.*, 2013.

Por seguinte, o efeito Compton leva ao desequilíbrio entre os íons negativos e positivos do átomo, que tenta restabelecer o equilíbrio eletrônico e, nesse processo de restabelecimento do equilíbrio acontecem perdas de configurações fundamentais, resultando na formação de elétron rápido, moléculas estranhas não pertinentes ao seu meio (Furtunato, 2015; Yoshimura, 2019).

A produção de pares é considerada como uma das principais formas de absorção da onda eletromagnética com energia superior a 1,02 MeV. Neste processo, fótons interagem com o campo elétrico nuclear de átomos com número atômico elevado e é absorvido, tendo toda sua energia convertida em um par elétron-pósitron.

Figura 4 - Ilustração da Produção de pares.



Fonte : Tauhata et al., 2013.

2.4 Interação Da Radiação Ionizante Com O Tecido Biológico

As moléculas biológicas são constituídas, principalmente, por átomos de carbonos, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio. Como citado, a ionização acontece quando a energia da radiação é superior a energia de ligação dos elétrons. No caso da interação da radiação ocorrer com átomos pertencentes a moléculas biológicas, os elétrons serão arrancados, provocando alterações bioquímicas e estruturais nas moléculas importantes (água, proteínas, DNA, RNA) dos sistemas biológicos (Nouailhetas, Yannick et al., 2005).

Essas alterações são as razões que levam aos danos no organismo do indivíduo exposto à radiação ionizante. A gravidade de tais danos vai depender da dose absorvida, taxa de dose absorvida, Transferência Linear de Energia (**LET** - Linear Energy Transfer) e Efetividade Biológica Relativa (RBE, Relative Biological Effectiveness) (IAEA, 2011).

2.4.1 Dose absorvida e taxa de dose

A dose absorvida, considerada como a quantidade de energia absorvida em um sistema, é uma grandeza dosimétrica fundamental expressa pela razão entre a energia absorvida e a massa do volume de material atingido (IAEA, 2011). Durante a transferência de energia, nem toda a energia é absorvida pelos sistemas biológicos. Portanto, o efeito de radiação sobre um determinado tecido é proporcional à quantidade de energia absorvida e não à quantidade de energia no qual foi exposto.

Então, a dose absorvida relaciona a energia absorvida com os danos biológicos e, vale para qualquer meio e qualquer tipo de radiação (Okuno, Yoshimura, 2016).

Outro fator importante a considerar numa exposição à radiação ionizante é a taxa da dose absorvida. A taxa de dose absorvida é definida como a dose absorvida por unidade de tempo, ou seja, a energia das partículas ionizante transferida para a matéria em um dado intervalo de tempo (IAEA, 2011).

A taxa de dose absorvida é importante nos efeitos biológicos produzidos pela radiação. Pois, a taxa de dose influencia no ciclo celular do indivíduo exposto e, provavelmente, os tecidos atingidos pela radiação podem se regenerar se for depositado uma dose absorvida alta, mas com uma taxa de dose baixa. No entanto, se a mesma dose absorvida alta for depositada com uma taxa alta dose de radiação, os efeitos da radiação serão seletivos onde alguns tecidos serão mais danificados e com regeneração tardia do que outros (Shields Warren, 1980; IAEA, 2011).

2.4.2 Transferência linear de energia-LET

A LET é definida como a energia depositada na matéria pela radiação ionizante por unidade de distância percorrida (KeV/ μ m). A LET se refere à densidade linear de todas as formas de energias transferidas, incluindo a excitação e ionização. Quando as radiações ionizantes atravessam os sistemas biológicos, elas perdem energia gradualmente através de vários processos de interação no caminho. Essa taxa de perda depende da energia e do tipo de radiação, bem como a densidade do material biológico (IAEA, 2011; Rodrigues, 2014).

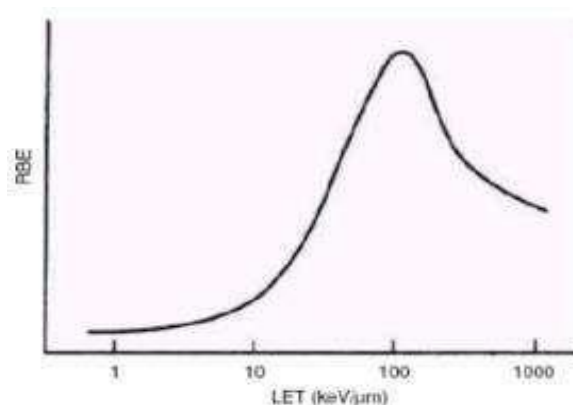
As radiações são classificadas em radiação baixa ou alta LET. As partículas carregadas geralmente possuem uma LET maior que as ondas eletromagnéticas ionizantes. Além disso, as radiações de alta LET são caracterizadas por indução não aleatória de quebras duplas do DNA, aumentando a taxa da morte celular e frequência de células com múltiplas ou nenhuma alteração, resultando numa distribuição não aleatória (IAEA, 2001; Rodrigues *et al.*, 2005).

Entretanto, para radiações de baixa LET, a ionização nos sistemas biológicos é randomicamente distribuída entre as células, e as lesões de DNA serão também randômicas entre as células. Portanto, as células possuem uma probabilidade igual e aleatória de serem atingidas por um ou vários fótons e, também, de gerarem alterações cromossômicas (IAEA, 2001).

2.4.3 Efetividade biológica relativa-RBE

O RBE é usado para quantificar a qualidade da radiação nos sistemas biológicos. Os valores são obtidos pela razão das doses absorvidas necessárias para que dois tipos de radiação produzam o mesmo efeito biológico em condições idênticas de irradiação (ICRP, 2007; IAEA, 2011).

Figura 5 - Relação entre RBE e LET.



Fonte: IAEA, 2011.

Portanto, o RBE varia de acordo com o sistema celular, taxa de dose. Para a radiação ionizante, o RBE aumenta com a elevação da LET de determinadas radiações e atinge o pico em cerca de 100 Kev/μm. Esse valor do RBE, de pois de atingir o pico, diminui em células com capacidade elevada de reparação de DNA, enquanto o valor RBE aumenta constantemente com a LET em células com reparo deficiente ou tardia. Isto explica por que o valor de RBE é menor para exposições únicas de alta taxa de dose e maior para múltiplas pequenas frações de radiação (IAEA, 2011). Entretanto, a RBE não depende apenas da LET, mas também da dose, da taxa de dose, do fracionamento da dose e até mesmo da idade da pessoa exposta e suas condições fisiológicas no momento da exposição, sendo assim, a RBE pode ser expressa pela equação 2:

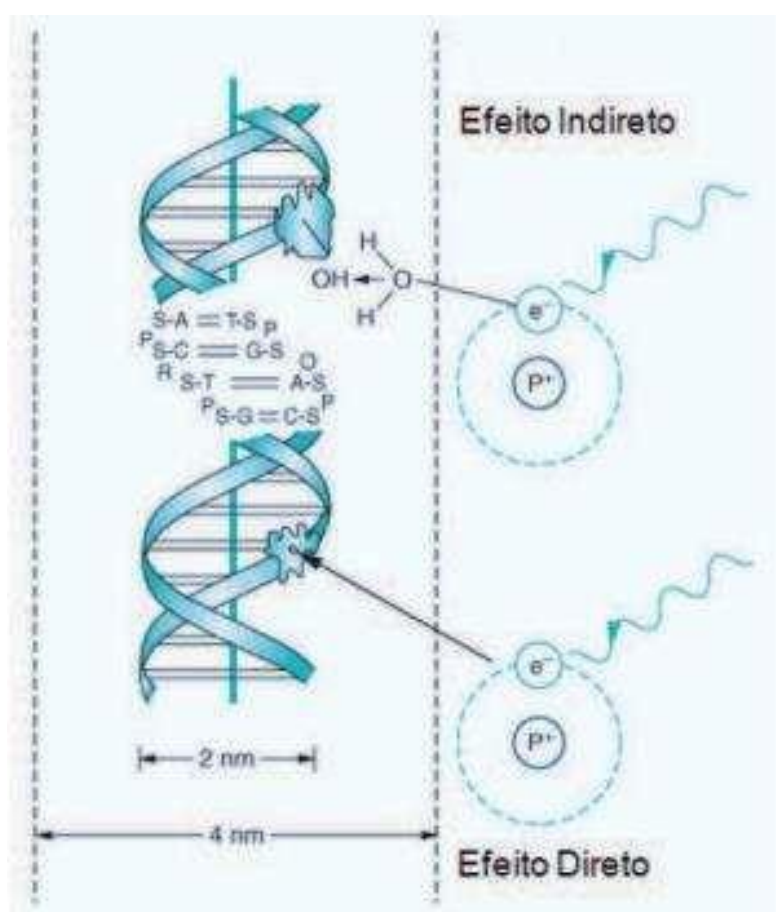
$$RBE = \frac{Dose_{referência}}{Dose_{radiação A}}$$

onde, Dose referência é a dose da radiação de referência necessária para produzir uma resposta específica e Dose radiação A , a dose da radiação A necessária para produzir igual resposta (Tauhata et ai., 2003).

2.5 Efeitos Biológicos Da Radiação Ionizante

Os efeitos biológicos causados pela radiação dependem da taxa de exposição, área exposta e da variação de sensibilidade celular. As radiações ionizantes podem interagir diretamente ou indiretamente com os sistemas biológicos. Os efeitos diretos estão ligados à capacidade da radiação de transferir energia à molécula biológica alvo, ioniza-lá e assim, causa uma alteração na função biológica da molécula (Lemes, 1997; Pryor, 1976). Basicamente, os efeitos diretos da radiação ionizante dependem da qualidade da radiação aplicada e da radiosensibilidade da molécula alvo. Essa molécula alvo poderá ser o DNA, portanto a radiação ioniza os átomos do DNA quebrando as ligações químicas existentes entre as bases e a desoxirribose (Ravanat et al., 2014; Nouailhetas, 2016).

Figura 6 - Representação das ações direta e indireta da radiação ionizante.



Fonte: Adaptado de Hall et al., 2012.

Os efeitos indiretos consistem na ionização de moléculas simples e a criação de radicais livres. O organismo é composto por uma quantidade grande de água, e por estar em grande concentração a água acaba sendo a intermediária da radiação com

os sistemas biológicos. A ionização da água, chamada de radiólise, gera a formação de radicais livres como hidrogênio molecular (H_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroxila ($OH\cdot$) (Almeida, 2007). Esses radicais são altamente reativos às moléculas das células, como o DNA, lipídios e outros constituintes subcelulares (IAEA, 2011).

Os radicais livres formados apresentam uma instabilidade, e no processo reativo há tentativa de alcançar a estabilidade ao se ligarem a outro elétron no organismo. Entre todos os radicais livres formados no organismo, as espécies reativas de oxigênio (ROS) representam a classe mais importante, são moléculas altamente reativas que comprometem a funcionalidade de organelas celulares, danificando o DNA (Andrade et al., 2010). Portanto, a radiação com um agente exógeno, em contato com o DNA, provoca agressões físicas e químicas, gerando lesões. Essas lesões podem ser de vários tipos como, ligações cruzadas, quebra da fita simples, quebra da dupla fita, quebras cromossômicas, deleção ou substituição de sequências de nucleotídeos, dentre outros (Silva et al., 2020; Ferreira, 2021).

As lesões induzidas pelos processos reativos provocam alterações estruturais na molécula de DNA, resultando em impedimento dos processos de replicação e transcrição. Em consequência, as sequências de nucleotídeos se alteram e uma falha no reparo dessas lesões pode desencadear processo mutagênicos (Delunardo, 2010; Pizzaia, 2013).

Os efeitos biológicos podem ser classificados em função do valor da dose e forma de resposta, em função do tempo de manifestação e do nível orgânico atingido. Desse jeito, em função da dose e forma de resposta, são classificados em estocásticos e determinísticos; em termos do tempo de manifestação, em imediatos e tardios; em função do nível de dano, em somáticos e genéticos (Tauhata et al., 2003).

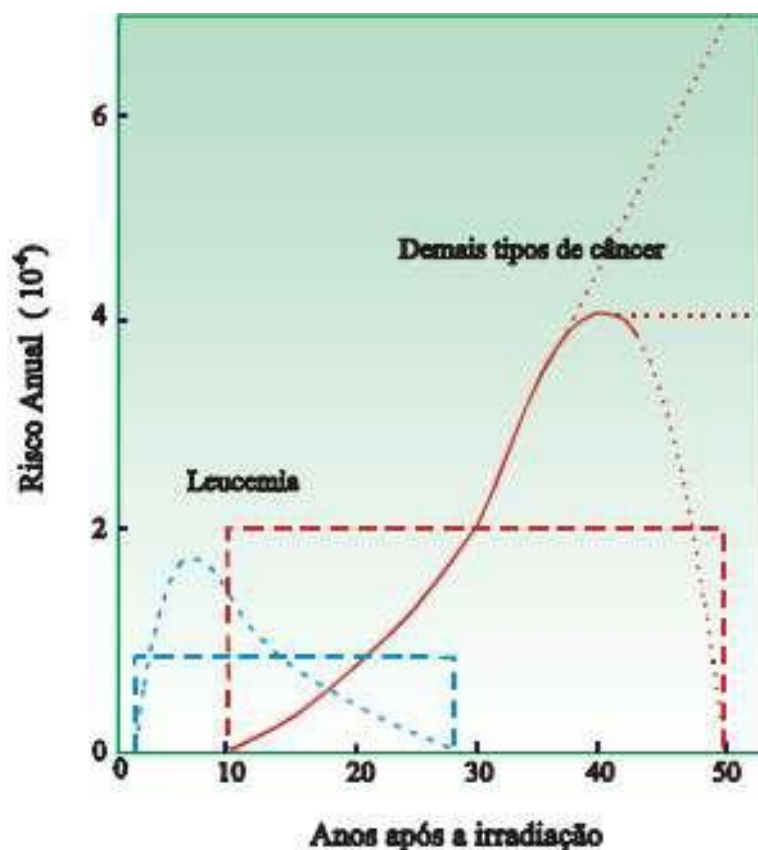
2.5.1 Efeitos estocásticos e determinísticos

Os efeitos estocásticos são efeitos para os quais não existe um limiar de dose, cuja probabilidade de ocorrência de danos é proporcional à dose de radiação recebida. Ou seja, os efeitos estocásticos podem surgir pela exposição a doses baixas estabelecidas pelas normas de proteção radiológicas. Entre estes efeitos, destaca-se o câncer, acúmulo de mutações e alterações com um tempo prolongado (Tauhata et al., 2013).

A probabilidade de ocorrência de um câncer radioinduzido depende da quantidade de clones de células modificadas no tecido ou órgão. O período de

aparecimento do câncer após a exposição à radiação pode chegar até 40 anos, já no caso da leucemia pode levar entre 5 e 7 anos, com período de latência de 2 anos, como representado na Figura (Tauhata et al., 2003).

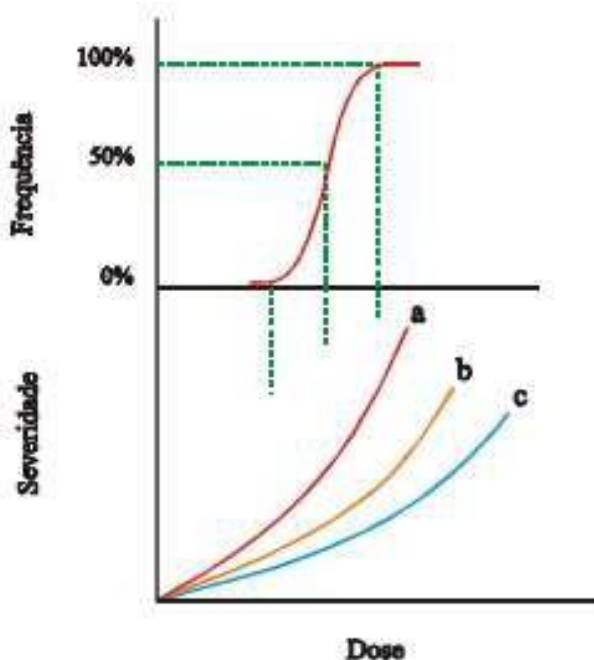
Figura 7 - Estimativa do tempo de latência para aparecimento de câncer após exposição.



Fonte: Tauhata et al., 2003.

Os efeitos determinísticos são aqueles causados pela irradiação total ou localizada de um tecido. Diferente dos efeitos estocásticos, existe um limiar de dose, abaixo do qual as alterações são insuficientes para prejudicar os sistemas biológicos. Portanto, os efeitos determinísticos são provocados por dose acima do limiar permitido, onde a gravidade ou a severidade dos efeitos aumenta com a dose aplicada. Além da gravidade, os efeitos determinísticos variam também com a frequência de um dado efeito, aumentando em função da dose (Tauhata et al., 2003). Quando as alterações causadas pela radiação não podem ser compensadas, alguns feitos clínicos como leucopenia, náuseas, anemia catarata, esterilidade, hemorragia etc. podem aparecer (Azevedo, 2005; Cazarin, 2005).

Figura 8 - Relações típicas entre dose e severidade do dano para efeitos determinísticos numa população de indivíduos.



Fonte: Tauhata *et al.*, 2003.

2.5.2 Efeitos somáticos e hereditários

Os efeitos somáticos surgem do dano nas células dos corpos e afetam somente a pessoa irradiada. Os efeitos são dependentes da dose absorvida, da taxa de absorção, da região e área do corpo irradiada (Tauhata *et al.*, 2003). Esses efeitos podem ser classificados em duas categorias: efeitos imediatos (agudos), que são observados em horas, dias ou semanas após exposição, e os efeitos a longo prazo (tardios), são observados depois de anos (Okuno, 2005).

Outrossim, os efeitos genéticos são efeitos que surgem no descendente da pessoa irradiada, quando os órgãos genitais (reprodutores) são expostos às radiações ionizantes. Os efeitos não dependem da taxa de absorção da dose e tem caráter cumulativo (Tauhata *et al.*, 2003).

2.5.3 Efeitos imediatos e tardios

Os efeitos imediatos são os primeiros efeitos biológicos que ocorrem de poucas horas até sessenta dias após a exposição. Esses efeitos podem ser produzidos apenas com a grande quantidade de radiação absorvida, dependendo da área do corpo e da taxa de radiação. Se as doses forem muito altas, as lesões serão severas. Porém, para doses baixas não haverá efeitos imediatos, mas existe possibilidade de

lesões a longo prazo (Tauhata *et al.*, 2003).

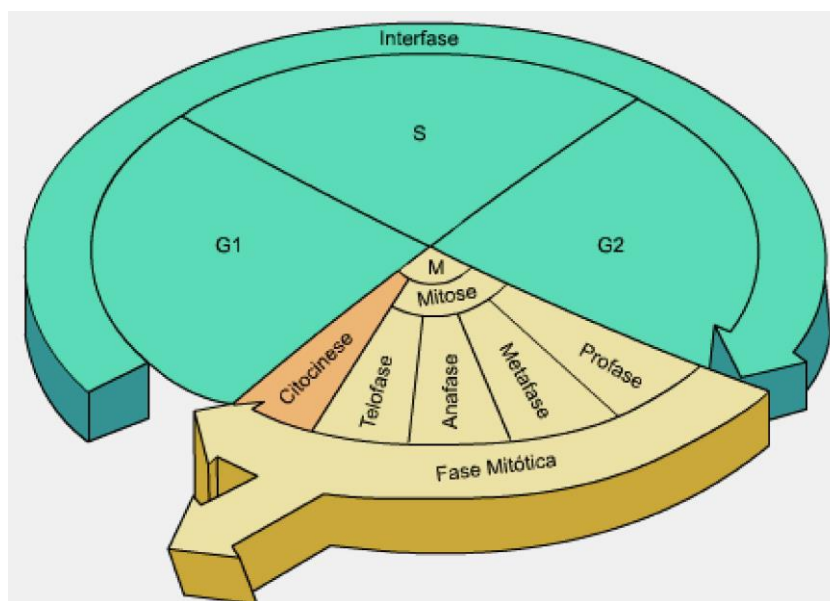
Os efeitos retardados ou tardios são os efeitos biológicos que aparecem depois de anos ou mesmo décadas. Um dos efeitos mais incidentes é o câncer, e aparecem os sintomas quando o grau de danos causado pela radiação é severo, irreparável e até mesmo letal (Tauhata *et al.*, 2003).

2.6 Ciclo Celular

O ciclo celular consiste em uma sequência de acontecimentos que levam ao crescimento e divisão da célula de forma contínua e repetitiva. Este processo de divisão celular é muito importante, pois permite a renovação celular, de tecidos e de órgãos, uma vez que as células do organismo não têm estrutura e funcionamento permanentes (Tauhata *et al.*, 2003; Djokovic-Davidovic *et al.*, 2016).

O estudo clássico da divisão celular estabelece duas etapas no ciclo celular, a mitose e a interfase (que é o tempo entre duas mitoses) (Figura 9). A mitose é subdividido em quatro fases: prótase, metáfase, anáfase e telófase. A interfase é considerada a fase mais ativa, onde acontece grande atividade metabólica, crescimento celular, duplicação do DNA e reparo do DNA. A interfase é subdividida em três fases: fase G1, G2 e S (IAEA, 1996; IAEA, 2021; Snustad; Simons, 2012).

Figura 9 - Representação das fases do ciclo celular.



Fonte: Tauhata et al., 2013.

A fase G1 é o período de biossíntese de RNA, proteínas e enzimas. Nesta fase, a célula cresce de volume até o ponto de restrição, que após avaliação, evolui para a fase seguinte ou é encaminhada para fase G0. A fase S, é a fase de síntese do DNA, onde cada cromossomo é duplicado passando a ser formado por duas cromátides ligadas pelo centrômero. A fase G2 é a fase que precede a fase de reprodução celular, a mitose. Essa fase permite a formação de estruturas e biomoléculas essenciais para que ocorra perfeitamente a mitose. Também, nesta fase G2 pode ocorrer eventos de reparo caso haja algum erro no mecanismo de replicação (Snustad; Simmons, 2012; Tauhata *et al.*, 2013;)

Cada fase tem seus processos distintos; no início da prótase, os cromossomos não aparecem duplicados, embora o DNA seja duplicado na interfase. No meio da prótase, os cromossomos aparecem duplicados. Na metáfase, os cromossomos começam a se alinharem num plano equatorial e se acoplando às fibras do fuso mitótico. Os cromossomos se separam e se movem para os pólos da célula na anáfase; finalmente surgem duas células filhas na telófase, ambas contendo o mesmo material genético da célula inicial (Tauhata *et al.*, 2013). No núcleo de cada célula contém a informação hereditária organizada na forma de cromossomo e, esses cromossomos podem ser facilmente visualizados e identificados nas células somáticas durante a metáfase.

2.7 Mutação e Reparo

A molécula de DNA desempenha funções importantes em todo o organismo, portanto é necessário manter a integridade da molécula. O processo de ionização pode alterar a estrutura das moléculas, através da ionização dos átomos, provocando quebra de ligações químicas. Dos danos celulares, os mais importantes são os relacionados à molécula do DNA (Tauhata *et al.*, 2013). Durante a fase G1 da interfase, o DNA está mais propenso a lesões por radiações ionizantes que podem provocar ruptura da fita dupla. As quebras de dupla ligação que ocorrem durante a replicação e devem ser reparadas antes do término da fase G2 (Nepomuceno *et al.* 2017).

A radiação ionizante induz a alteração da fisiologia da célula, levando à morte fisiológica ou à morte celular, num processo bastante fisiológico característico, denominado apoptose (Story *et al.*, 1992, Filippovich *et al.*, 1988). A apoptose, em condições normais, é considerada um processo de morte celular programada, essencial para manutenção e eliminação das células defeituosas. Portanto, durante a apoptose a célula sofre alterações morfológicas características, como retração da célula, perda da aderência com a membrana, fragmentação internucleossômica do DNA, condensação cromática e formação de corpos apoptóticos (Grivicic; Regner; Da Rocha, 2007).

Esse processo apoptótico é regulado por uma complexa sequência de mecanismos, alguns dos quais envolvidos com a regulação do ciclo celular, mitose e diferenciação celular. Em caso de exposição à radiação ionizante, a radiação pode induzir prematuramente a apoptose celular através da alteração de controle fisiológico (Allan, 1992; Hurle, 1988). Pois, quando a dose de radiação é elevada, muitas células de tecidos atingidas podem não suportar a energia recebida, acelerando os processos de ciclo celular na tentativa de manter a estabilidade funcional. (Tauhata *et al.*, 2003).

O organismo, para manter a homeostasia, pode tentar fazer os reparos dessas alterações na molécula de DNA mediados por enzimas. Quando algum erro é detectado, há uma pausa na replicação para que ocorra o reparo do DNA ou para que haja a indução de morte celular (Reinhardt, Schumacher, 2012). Se o reparo é eficiente e um tempo curto, o DNA pode voltar a sua composição original. No entanto, num reparo propenso a erro, podem surgir mutações nas sequências de bases ou rearranjos mais grosseiros, provocando a morte reprodutiva da célula ou até alteração do material genético das células sobreviventes (Tauhata *et al.*, 2013).

Algumas mutações não implicam em mudanças detectáveis na atividade metabólica da célula, outras podem causar a morte celular, porém não detectáveis; e por fim, algumas são potencialmente perigosas conduzindo ao processo carcinogênico (Ribeiro et al., 2003). As mutações podem se apresentar tanto em nível gênico, quanto em nível cromossômico (alterações cromossômicas). As mutações gênicas, referem-se a mudanças de uma ou poucas subunidades na molécula do DNA, por substituição, perda ou ganho de nucleotídeo, alterando geralmente apenas o funcionamento de um gene (Beiguelman, 2008). Já as alterações cromossômicas, são modificações que podem provocar desorganização da informação genética como um todo até chegar a impedir a viabilidade do organismo no qual se manifestam (Fagundes, 2012).

Portanto, o reparo dos danos ao DNA constitui um importante enfoque de estudo, visto que a sua perpetuação em células tumorais faz parte do conjunto de eventos que determina a evolução do câncer, bem como sua resposta ao tratamento. O sistema de reparo do DNA é constituído por diversas proteínas especializadas, com objetivo de reparar o dano ao DNA para que a célula siga seu ciclo. Dependendo do tipo de lesão, o sistema de reparo pode ser classificado em: reparo direto, reparo por excisão de bases (BER), reparo por excisão de nucleotídeos (NER); reparo de mal pareamento que corrige os pequenos loops de inserções e deleções. Os reparos diretos ocorrem em lesões induzidas por radiação, a fim de corrigir os danos a bases de nucleotídeos (Chatterjee, Walker, 2017; Knijnenburg et al., 2018; Escovar, 2021).

2.7.1 Reparo por excisão de base (BER - *base excision repair*)

O reparo por excisão de base é essencial para o funcionamento normal do metabolismo celular, sendo o principal evento para reparar o DNA após sofrer processos oxidativos, de desaminação e alquilação. Ou seja, as alterações que não modificam a estrutura da dupla hélice da molécula de DNA, como quebras simples, são reparadas por excisão de base (Nepomuceno et al., 2017; Sharma, Dianov, 2007; Cortez, 2018).

Segundo Lutz (2017), o BER é um processo multienzimático, que requer a participação de quatro principais enzimas: DNA glicólise, AP endonuclease, DNA polimerase e DNA ligase. O BER atua como um processo ativo de reparo, com o DNA glicosilase, que tem função de reconhecer e remover as bases danificadas, resultando na formação de sítios purínicos/pirimidínicos.

2.7.2 Reparo por Excisão de nucleotídeos (NER - *Nucleotide excision repair*)

O NER desempenha um papel importante na integridade da molécula de DNA, e é a via responsável por reparar danos que modificam a estrutura do DNA de forma significativa. O reparo pela via NER se inicia pela identificação de uma lesão volumosa, que impede o pareamento correto das fitas (Laporte, 2019). O reparo é realizado pela clivagem da ligação fosfodiéster da fita anormal dos dois lados da lesão com alguns nucleotídeos a mais como margem de segurança. A DNA helicase remove o oligonucleotídeo lesado e a DNA polimerase preencher o espaço vazio, em consequência a DNA ligase é responsável em ligar a fita ao fragmento que foi sintetizado (Alberts et al., 2017; Jagirdar et al., 2013).

2.7.3 Reparação de DSBs (double-strand breaks)

Existem três vias principais de reparo das DSBs: união de extremidades não-homólogas (NHEJ, *non-homologous end joining*), recombinação homóloga (HR, *homologous recombination*) e anelamento de fita simples (SSA, *single-strand annealing*). As vias HR e SSA são dependentes do ciclo celular e exigem a presença de sequência homóloga (Taleei; Nikjoo, 2013).

A via HR utiliza uma cromátide irmã nas fases S e G2 como molde para uma troca genética, tornando a via muito precisa e com raras possibilidades de erros, dessa forma as DSBs podem ser reparadas nas fases S e G2 sem que haja qualquer perda de informação, através da recombinação entre a fita danificada e a homóloga não danificada (Isbir et al., 2015).

A via SSA remove sequências de bases distorcidas, podendo levar à grandes deleções. As distorções são criadas entre as sequências repetidas após o anelamento (Taleei; Nikjoo, 2013). Enquanto na via NHEJ, considerada principal via de reparação em células de mamíferos e ativa ao longo do ciclo celular, as primeiras etapas do reparo do DNA se assemelham à via HR. Nessa via a DSB é reconhecida pelas proteínas Ku70/80 e a sinalização é mediada pela DNA-PK (proteína quinase dependente de DNA), assim, o processo de reparação é iniciado (Tuimala et al., 2004). NHEJ é mais propensa a erros por ligar diretamente as extremidades das DSBs nas fases G0 e G1, além de ser potencialmente mutagênica, à medida que, é capaz de evitar a morte celular provocando alterações na molécula de DNA (Mladenov; Iliakis, 2011; Isbir et al., 2015).

2.8 Linfócitos Humanos

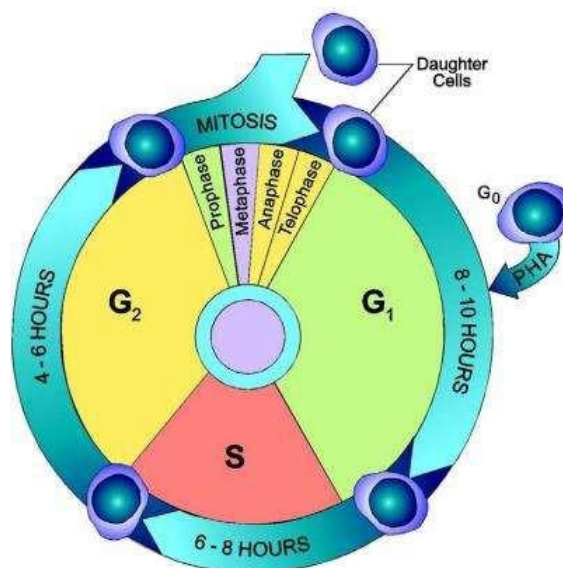
Os linfócitos são considerados células do sistema imune do organismo, responsáveis pela resposta adaptativa. Classificados em dois tipos: os linfócitos T e B. Ambos originam-se de células primordiais *stem ce/1s* do saco vitelínico que eventualmente se fixa na medula óssea. Indiferenciadas, os linfócitos T saem da medula óssea em direção ao timo, onde sofrem processos de maturação, de diferenciação e se tornam imunologicamente ativados. Diferentes dos linfócitos T, os linfócitos B saem da medula óssea ativados, pronto para reconhecimento de antígenos, promovendo uma série de reações contra invasores (IAEA, 1996; Silva, 1997; IAEA, 2011; Abbas; Lichtman; Pillai, 2015).

A concentração dos linfócitos no sangue periférico depende da idade, etnia, fatores ambientais e presença de patógenos, sendo que 60-70% são do tipo T e 10-15% do tipo B nos adultos. Nas crianças e recém-nascidos, a concentração pode estar acima do normal. Em idosos, pode ser encontrada uma concentração baixa dos linfócitos T. Os linfócitos têm um tempo de vida média de 3 anos, incluindo alguns com duração de vida de várias décadas (Silva, 1997, IAEA, 2011).

Ademais, a maioria dos linfócitos T pertencem ao *pool* de redistribuição celular e circulam em diferentes órgãos até o sangue periférico. Essa característica dos linfócitos é importante, pois quando os linfócitos forem expostos a um agente químico, físico ou mutagênico em qualquer parte do corpo, as alterações induzidas pelo agente serão observadas nos linfócitos do sangue periférico (Carrano, Natarajan, 1988, Silva, 1997).

Além disso, os linfócitos têm uma sensibilidade uniforme à radiação ionizante e a maioria está na fase de pré-síntese de DNA (G0) do ciclo celular, ou seja, com cromossomos não replicados. Os linfócitos circulantes não estão em mitose, se comportam como células sincronizadas. Portanto, as alterações induzidas pela radiação ionizante serão consequentemente do tipo cromossômica, e, os linfócitos podem ser estimulados por agente mitogênicos a sofrer mitoses, como a fitohemaglutinina (Carrano, Natarajan, 1988; IAEA, 2011).

Figura 10 - Representação do ciclo celular e ação da Fitohemaglutinina (PHA).



Fonte: IAEA, 2011.

A fitohemaglutinina é uma proteína derivada do feijão preto *Phaseolus vulgaris*, tem como função ativar a mitose dos linfócitos, transformando-os em células blásticas. Nesse processo de transformação, ocorre aumento do volume celular, nuclear e citoplasmático dos linfócitos. Assim, os linfócitos podem fornecer células em divisão para contagem de aberrações cromossômicas (IAEA,1996, Bender *et al.*,1988; Silva, 1997).

2.9 Biodosimetria

A Biodosimetria é uma técnica dosimétrica com objetivo principal de investigar os efeitos biológicos induzidos pela radiação através da estimativa da dose recebida por um indivíduo. A técnica é útil na quantificação da dose absorvida em caso de acidentes nucleares, uma vez que grande parte dos casos as pessoas expostas não usam o dosímetro físico. Segundo Amaral (2002), a dosimetria biológica utiliza dois métodos, que são: a contagem de alterações cromossômicas instáveis e o uso de sondas fluorescentes para visualização de alterações cromossômicas estáveis. Essas alterações são resultados de lesões induzidas pela radiação ionizante no DNA.

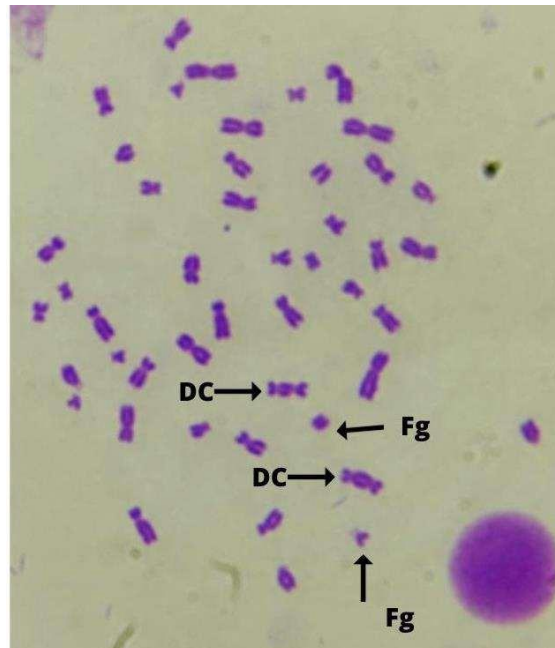
As alterações cromossômicas instáveis (cromossomos dicêntricos, anéis cromossômicos e fragmentos) surgem a partir de rupturas de filamentos duplos (DSB) ou reparo incorreto do DNA, induzidas pela exposição à radiação ionizante. A análise dessas alterações tem sido empregada na avaliação de indivíduos expostos à

radiação, sendo amplamente estudada em linfócitos provenientes do sangue periférico humano (IAEA, 2011). Dentre as técnicas que podem ser aplicadas para a análise citogenética, destacam-se o ensaio de cromossomos dicêntricos, considerado padrão ouro da biodosimetria, e a técnica de micronúcleos (MN) com bloqueio da citocinese celular (CBMN - *Cytokinesis-Block Micronucleus*) (Thierens; Vral, 2009; IAEA, 2011).

2.9.1 Ensaio de Dicêntricos

O ensaio de dicêntricos é considerado o padrão ouro da biodosimetria. Os cromossomos dicêntricos são altamente específicos à radiação ionizante, com um nível basal populacional de 1 a cada 1000 células, o que permite sua análise para doses a partir de 0,1 Gy, inclusive para radiações de baixa LET (IAEA, 2001). A quebra de dois cromossomos diferentes por parte da radiação produz uniões invertidas entre as extremidades cromossômicas e consequente troca de material genético. Ao final, obtém-se um cromossomo com dois centrômeros (dicêntricos), acompanhado de um fragmento acêntrico formado pelas porções acêntricas desses cromossomos (Figura 12) (IAEA, 2011).

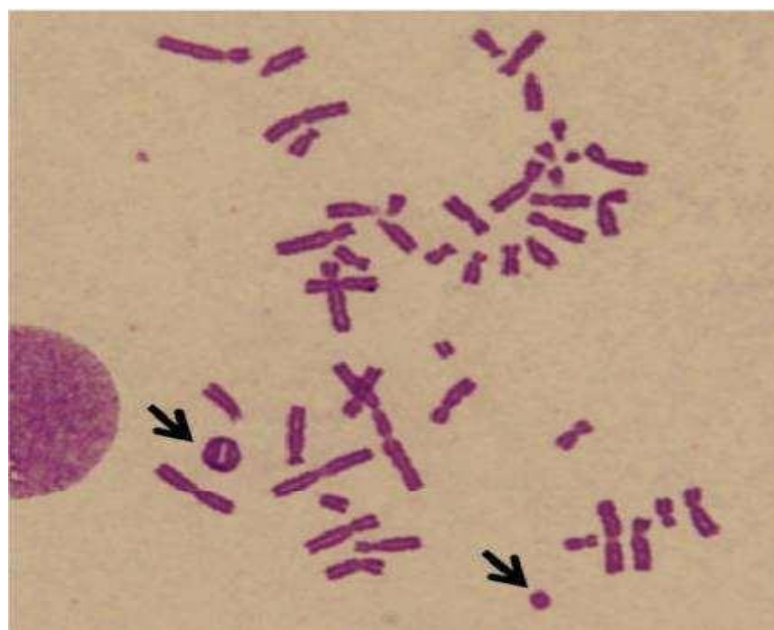
Figura 11 - Metáfase contendo dicêntricos (DC) associado ao fragmento acêntrico.



Fonte: O Autor, 2023.

Além dos dicêntricos, alguns pesquisadores os combinam com a análise dos anéis cromossômicos e fragmentos isolados na estimativa da dose. Esses anéis são raros, formados pela troca entre duas quebras em braços separados do mesmo cromossomo e acompanhado por um fragmento acêntrico (IAEA, 2011).

Figura 12 - Uma metáfase espalhada com dois anéis (com setas), fragmentos dicêntricos e acêntricos.



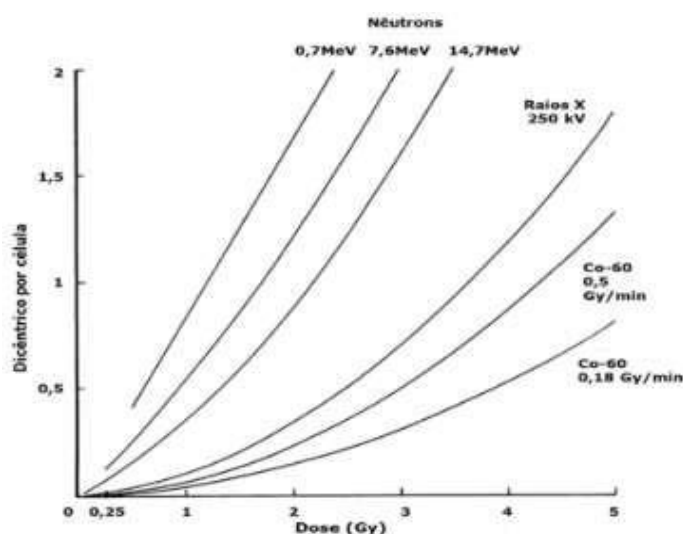
Fonte: IAEA, 2011.

2.9.2 Curva de Calibração

As curvas de calibração são construídas com objetivo de estabelecer uma relação entre a dose absorvida pelo organismo e às frequências de alterações cromossômicas contabilizadas em uma análise. A curva de calibração é considerada específica e tem uma alta sensibilidade para determinação de doses, em um intervalo de dia a cerca de seis meses. Uma desvantagem dos cromossomos dicêntricos é o dano ser instável e pode ser eliminado dos linfócitos presentes no sangue periférico (IAEA, 2011; Roy *et al.*, 2012; Aguiar, 2015).

As primeiras curvas de calibração foram construídas *in vitro* no laboratório NRPB (Lloyd *et al.*, 1977) para raios X, radiação γ de fonte de cobalto-60 e nêutrons (Figura 14). Os dados sobre a produção das alterações (Y) obtidas nesse laboratório foram mostradas representando uma função matemática da forma: $Y = C + aD + D^2$ para radiação de baixa LET (raios X e radiação γ), onde a e e são os coeficientes linear e quadrático, respectivamente e que determinam a forma e inclinação da curva, Y é a frequência da alteração, C determina o número espontâneo (*background*) das alterações e D corresponde à dose absorvida de radiação. No caso de nêutrons (radiação de alta LET), as curvas obtidas foram do tipo linear: $Y = C + aD$.

Figura 13 - Curvas de calibração construídas *in vitro* com diferentes qualidades de radiação.



Fonte: (Lloyd & Dolphin, 1977).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar, por meios da técnica de dicêntricos, as alterações cromossômicas instáveis em linfócitos humanos após exposição com diferentes doses absorvidas à radiação gama sob uma alta taxa de dose.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar as alterações cromossômicas em linfócitos humanos após exposição à radiação gama com diferentes doses absorvidas;
- Estudar a distribuição intracelular das alterações cromossômicas instáveis para cada dose absorvida.

4 METODOLOGIA

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Dosimetria Biológica do Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste - CRCN-NE, e faz parte de um projeto aprovado para coleta de dados pelo Comitê de Ética envolvendo pesquisas com seres humanos da Universidade Federal de Pernambuco sob o número de CAAE09186813.7.0000.5208 e do parecer consubstanciado 269.483 (**Anexo A**).

4.1 Seleção de Doador e Coleta de Amostra

Um voluntário, não-fumante foi selecionado, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Anexo B**). Segundo critério utilizado por Gajendiran, et. al. (2001) foi realizada anamnese por meio de questionário para verificar se nos últimos seis meses antes da coleta o voluntário havia sido exposto à radiação terapêutica, raios X diagnóstico, vacinação virai ou consumiu drogas ilícitas. Posterior a este questionário, realizamos a coleta de 15 ml de sangue periférico por coleta de sangue a vácuo. A coleta foi realizada por punção venosa, em tubos *vacutainers* contendo heparina sódica na concentração de 5000U/ml.

4.2 Irradiação das Amostras

As amostras de sangue foram separadas em três alíquotas de 5 ml, sendo uma considerada controle (não irradiada) e mantida à temperatura ambiente do laboratório (20 - 22°C), e as outras duas amostras foram encaminhadas para a irradiação.

A exposição à radiação ocorreu no Departamento de Energia Nuclear (DEN-UFPE) numa fonte de ^{60}Co (irradiador Gammacell 220) com uma taxa de dose absorvida de 17,8 Gy/min. Para realizar a exposição das amostras uma Barreira de polietileno de 4 mm foi utilizada para assegurar o equilíbrio eletrônico das amostras irradiadas em Kerma no ar e os valores foram convertidos em absorvida a fim de que resultassem nas amostras valores de duas diferentes doses (2 e 3 Gy).

4.3 Cultivo de Células

Para a cultura de linfócitos foram adicionadas 0,5 ml de sangue total nos frascos de cultura contendo 4 ml de meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 1 ml de soro bovino fetal (Biological Industries) e 0,2 ml de fitohemaglutinina (Biological Industries). Em seguida, os frascos foram mantidos na estufa a 37°C, por 48 horas. Após 46 horas foi adicionado 0,1 ml de colchicina 0,0016% (Biological Industries). Ao

completar 48 horas de cultivo, o material foi centrifugado por 6 minutos a 1800 rpm, o sobrenadante foi desprezado adicionando 8 ml de KCl previamente aquecido a 37°C, para que ocorresse o choque hipotônico. Após a hipotonia, os tubos foram colocados em banho-maria a 37°C por 15 minutos. Em seguida, os tubos foram novamente centrifugados por 6 minutos a 1800 rpm, o sobrenadante foi retirado e adicionado o fixador metanol-ácido acético (3:1) até completar 8 ml. Para a preparação de lâminas teste, foram realizadas tantas centrifugações e trocas de fixador quanto o necessário para que o conteúdo da cultura estivesse transparente.

4.4 Preparação de Lâminas

Após o processo de fixação, foram confeccionadas lâminas a partir do precipitado de células ressuspenso em 1 ml de solução fixadora. Em seguida, a suspensão de células foi gotejada em dois pontos na lâmina e colocado para secar à temperatura ambiente durante 24h. Em seguida, as lâminas foram coradas com Giemsa a 5% durante 7 min para posterior análise cromossômica.

4.5 Análise Microscópica

A contagem de alterações cromossômicas foi realizada diretamente no microscópio óptico (Leica DM500). As lâminas foram examinadas na sua totalidade e as metáfases viáveis foram contadas por grupo (controle e irradiado). Entende-se por viáveis aquelas metáfases que não mostram nenhuma sobreposição de cromossomos, com 46 centrômeros. Uma metáfase contendo um dicêntrico deve ter seu fragmento acêntrico associado e no total 46 centrômeros. Do mesmo jeito, um anel cromossômico deve ter seu fragmento acompanhando, porém aumenta o número total de peças cromossômicas para 47 na metáfase e 46 centrômeros (IAEA, 2011).

4.6 Análise de Dados

Os dados obtidos a partir da leitura das lâminas foram submetidos a testes estatísticos para avaliação do comportamento das alterações cromossômicas. Ao estabelecer a média e a variância de cada amostra foi possível avaliar a conformidade ao modelo de Poisson, sendo utilizados o índice de dispersão e o teste u de Papworth (IAEA, 2011).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao total, o número de células metafásica analisadas foi de 861, sendo 417 para o grupo controle e 444 para o grupo irradiado com as doses de 2 e 3 Gy. Os números totais de células de alterações cromossômicas do grupo controle foram somados para determinar o *background*, representado a dose zero Gy.

A tabela 1 mostra as frequências dos dicêntricos em diferentes amostras, o grupo controle e amostras irradiadas com feixe γ .

Tabela 1 - Distribuições intercelulares de dicêntricos com suas respectivas frequências, índice de dispersão e valores de u .

Dose (Gy)	Total de células	Dic	y	Distribuição celular de Dic			Var	Var/Y	u
				0	1	2			
0	417	0	0,000	417	0	0	0,000		
2	375	58	0,155	322	48	5	0,158	1,020	0,282
3	69	14	0,203	56	12	1	0,194	0,954	-0,280

Dic - Dicêntrico, Y - Frequência, Var - Variância, u - índice de dispersão.

Analisando as amostras controles, observa-se que o grupo controle não apresenta nenhuma alteração de dicêntricos, portanto, a frequência de dicêntrico foi menor (0) em relação às amostras irradiadas (Tabela 1). Ademais, para as amostras irradiadas, as frequências de dicêntricos foram diferentes, com valores de 0,155 e 0,203 para amostras irradiadas com as doses 2 Gy e 3 Gy, respectivamente. As amostras irradiadas com dose 3 Gy apresentaram uma frequência de dicêntrico relativamente alta. Portanto, observa-se um aumento das frequências com a elevação das doses.

Observa-se que as amostras irradiadas apresentam células com mais de uma alteração cromossômica. Portanto com os valores da frequência e variância, foi possível estabelecer os seus respectivos índices de dispersão e todos os pontos foram testados para avaliar sua conformidade ao modelo de Poisson com o teste u . Para as duas doses absorvidas (2 e 3 Gy), os valores de u estão dentro do intervalo esperado de $\pm 1,96$ com nível de confiança de 95% (Tabela 1). Portanto, as células tiveram um comportamento esperado para radiação de baixa LET.

Os dados obtidos relacionados à frequência dos dicêntricos são compatíveis com análises realizadas por diferentes pesquisadores (Barquinero, 1995; Top et al., 2000; Senthamizh Chelva, 2006; Mendonça et al., 2013; Martins et al., 2013. Porém,

existe na literatura uma escassez de experiências com alta taxa de dose (>5 Gy/min) com feixe y.

As frequências de dicêntricos verificadas nos trabalhos de Barquinero (1995), Top et al. (2000), Senthamizh Chelva (2006); Mendonça et al. (2013), e Martins et al. (2013) confirmam a regra que as frequências de dicêntricos são proporcionais ao aumento da dose absorvida (Tabela 2).

Tabela 2 - Frequência de alterações cromossômicas instáveis para o sangue irradiado com fonte de ^{60}Co a dose de 2 e 3 Gy.

	Taxa de dose	Dose (Gy)	Frequência de Dicêntricos
Lloyd et al. (1986)	0,5 Gy/min	1,98	0,34
		3,06	0,78
Barquinero (1995)	1,2 Gy/min	2	0,31
		3	0,56
Top, A., Colijkun, M., & Orta, T. (2000)	42.5 cGy/min.	2	0,22
		3	0,48
Senthamizh Chelva (2006)	1,4 Gy/min	2	0,275
		3	0,602
Martins, V.; Antunes, A. C.; Gil, O. Monteiro (2013)	180 - 126 mGy/min	2	0,211
		3	0,467
Este trabalho	17,8 Gy/min	2	0,155
		3	0,203

Comparando as frequências (Tabela 2), nota-se uma predominância de valores menores entre este trabalho e os dos outros autores, mesmo que exista uma diferença não significativa entre os valores. Essa pequena diferença pode ser atribuída a diversos fatores como os critérios de leitura e experiências dos operadores, número de células analisadas e a taxa de dose.

A distribuição celular dos dicêntricos dos trabalhos listados na tabela 2 confirmam a presença de células com mais de uma alteração. Portanto, em radiação ionizante de baixa LET, a taxa de dose é um dos principais fatores relacionados com as consequências biológicas da dose absorvida. Porém, neste trabalho as frequências estão baixas, o que indica que será necessário contabilizar mais metáfases viáveis para ter maior precisão sobre a frequência de dicêntricos.

Além dos dicêntricos, as metáfases analisadas apresentaram outros tipos de alterações cromossômicas instáveis como os anéis cromossômicos e os fragmentos isolados. As tabelas 3 e 4 apresentam, respectivamente, a distribuição dos anéis

cromossômicos e dos fragmentos isolados. Os anéis cromossômicos são alterações cromossômicas raras comparadas aos outros tipos de alterações instáveis em linfócitos humanos (IAEA, 2011). E na análise microscópica deste trabalho, os anéis cromossômicos só apareceram nas amostras irradiadas com 2 Gy, com uma frequência de 0,200. Observa-se, portanto, um aumento da frequência de anéis em relação a doses absorvidas, de 0,200 para 0,275 em amostras irradiadas com 3 Gy. Contudo, as frequências das alterações de dicêntricos mais anéis seguiram a normalidade esperada, aumentando com o aumento da dose absorvida. Na distribuição de dicêntricos mais anéis, foi observado um comportamento normal das alterações, uma vez que os valores de u estão dentro do referencial.

Tabela 3 - Distribuição celular de Dicêntricos mais Anel cromossômico.

Dose (Gy)	Total de células	Dic	Y	Distribuição celular de Dic + Anel				Var	Var/Y	u
				0	1	2				
0	417	0	0,000	417	0	0		0,000		
2	375	75	0,200	306	63	6		0,195	0,973	-0,373
3	69	19	0,275	51	17	1		0,237	0,861	-0,830

Tabela 4 - Distribuição celular de Fragmentos isolados.

Dose (Gy)	Total de células	Frag isolados	Y	Distribuição celular de Frag isolados						Var	Var/Y	u
				0	1	2	3	4				
0	417	1	0,002	416	1	0	0	0		0,002	1,000	
2	375	68	0,181	310	62	2	1	0		0,177	0,978	-0,307
3	69	18	0,261	59	6	2	1	1		0,512	1,963	5,779

Dic - Dicêntrico, Y - Frequência, Var - Variância, u - índice de dispersão.

Os trabalhos de Martins, V.; Antunes, A. C.; Gil, O. Monteiro (2013) obtiveram dados similares referente à frequência dos anéis cromossômicos. Anota-se uma frequência de 0,2321 para amostra de 2 Gy e 0,516 para amostras de 3 Gy. Porém, analisando a distribuição e a conformidade desses dados pelo modelo de Poisson, os autores observaram que existe uma sobredispersão entre os dados das amostras irradiadas de 2 e 3 Gy, com valores de u superior a $\pm 1,96$.

Na análise dos fragmentos isolados (Tabela 4), as frequências se apresentam mais elevadas comparado às frequências dos dicêntricos. A frequência de fragmentos isolados na amostra controle constata-se elevada em comparação às frequências de dicêntricos. Os fragmentos isolados não têm significado dosimétrico quando sozinhos,

pois podem ser produzidos de formas independentes de presença de dicêntricos ou de anel cromossômicas por diferentes efeitos mutagênicos, não necessariamente a radiação ionizante. Portanto, é aconselhável a utilização dos fragmentos isolados associados a outras alterações cromossômicas (IAEA, 2011).

No estudo da distribuição, observa-se uma sobredispersão entre as doses absorvidas. E o valor de u das amostras irradiadas com 3 Gy apresentam uma sobredispersão significativa, com valor muito distante do zero.

Vale salientar que a estimativa da frequência dos dicêntricos é influenciada pela dose absorvida. Em casos de dose absorvida muito alta, a divisão celular é significativamente bloqueada e o ciclo celular atrasado. Portanto, a quantidade de células metafásicas contabilizadas neste trabalho não são suficientes para a análise e, conseqüentemente, as células achadas apresentam um aumento significativo de alterações cromossômicas. A Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA, 2011) recomenda a contabilização de pelo menos 500 metáfases por amostra, a fim de reduzir as incertezas estáticas.

Outro assim, neste trabalho, seguimos o padrão de cultura estabelecido descrito pela IAEA. O tempo normal da cultura dos linfócitos é de 48 horas, e na análise estatística as células metafásicas devem apresentar pelo menos 46 cromossomos para serem contabilizadas. Observa-se durante a análise microscópica, várias metáfases incompletas apresentando dicêntricos. Para resolver esse problema, na literatura é descrito o uso de colcemid e um tempo prolongado de cultura de 52-72 horas, a fim de induzir células metafásicas suficientes (Chen et al., 2011).

6. CONCLUSÃO

- A técnica do cromossomo dicêntrico apresentou diferença entre o grupo controle e irradiado. E as frequências de dicêntricos se apresentaram dentro do intervalo esperado tanto em sangue controle e no sangue irradiado.
- As distribuições intercelulares dos dicêntricos e dos dicêntricos mais anéis se comportaram de acordo com o modelo de distribuição de Poisson, enquanto a distribuição dos fragmentos isolados com dose 3 Gy apresentou tendência a uma sobredispersão significativa.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8ª edição, Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- AGUIAR, LEANDRO ALVARO DE ALCANTARA. CORRELAÇÃO DE LONGO ALCANCE NO ELETROCORTICOGRAMA COMO UM BIOINDICADOR DE EXPOSIÇÃO CEREBRAL À RADIAÇÃO IONIZANTE. 2015.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., ... & Hunt, T. **Biologia molecular da célula**. Artmed Editora, 2017.
- ALLAN, D. J. Radiation-induced apoptosis: its role in a MADCaT (mitosis-opoptosis-differentiation-calcium toxicity) scheme of cytotoxicity mechanisms. **International journal of radiation biology**, v. 62, n. 2, p. 145-152, 1992.
- ALMEIDA, Pedro Silva de. Dosimetria biológica: avaliação da exposição às radiações ionizantes através de efeitos biológicos induzidos. 2007.
- AMARAL, Ademir. Trends in biological dosimetry: an overview. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, p. 119-124, 2002.
- AMBROSIO, André Luis Berteli; FRANCHINI, Kleber Gomes. Cristalografia macromolecular: a biologia sob a ótica dos raios X. **Ciência e Cultura**, v. 69, n. 3, p. 29-36, 2017.
- ANDRADE, E. R.; MELO-STERZA, F. A.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A. Consequências da produção de espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 34, n. 2, p. 79- 85, 2010.
- AZEVEDO, Ana Cecília Pedrosa de. Radioproteção em serviços de saúde. **FIOCRUZ-Rio de Janeiro**, 2005.
- BARQUINERO, J.F.; BARRIOS, L.; CABALLÍN, M. R.; MIRÓ, R.; RIBAS, M.; SUBIAS, A.; EGOZCUE, J. Establishment and validation of a dose-effect curve for y-rays by cytogenetic analysis. *Mutât Res.*, v. 326, p.65-69, 1995.
- BATISTA, Vinícius Martins Dias et ai. Proteção radiológica na perspectiva dos profissionais de saúde expostos à radiação. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 72, p. 9-16, 2019.
- BEIGUELMAN, Bernardo. Genética de populações humanas. **Ribeirão Preto: SBG**, v. **235**, 2008.
- BENDER, Michael A. et ai. Current status of cytogenetic procedures to detect and quantify previous exposure to radiation. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 196, n. 2, p. 103-159, 1988.

CÂNDIDO, R. M.; LOPES, H.; LIMA, V. A. Modalidades da radioterapia: teleterapia, braquiterapia e radiocirurgia. **Institutional Repository Academic and Intellectual Production**, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2017.

CARRANO, A. V.; NATARAJAN, A. T. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 204, n. 3, p. 379-406, 1988.

CAZARIN, Gisele. Doenças hematológicas e ambiente: estudo do registro de condições de risco em serviço especializado. **Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz**, 2005.

CHATTERJEE, Nimrat; WALKER, Graham C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 58, n. 5, p. 235-263, 2017.

Chen, Y., Yan, X. K., Ou, J., Wang, Z. D., Zhang, X. Q., Zeng, F. G., & Zhou, P. K. Biological dose estimation for accidental supra-high dose gamma-ray exposure. **Radiation measurements**, v. 46, n. 9, p. 837-841, 2011.

CNEN-BRAZILIAN NUCLEAR ENERGY COMMISSION et ai. **Diretrizes Básicas de Proteção Radiológica**. CNEN-NN-3.01 publication, Rio de Janeiro, Brazil, 2006.

COEYTAUX, Karen et ai. Reported radiation overexposure accidents worldwide, 1980-2013: a systematic review. **Plos one**, v. 10, n. 3, p. e0118709, 2015.

CORTEZ, Carizy Ranna Sousa Aquino et ai. Os mecanismos de reparo do DNA face à mutação proposta por fatores endógenos e exógenos: revisão integrativa de literatura. 2018.

DELUNARDO, Frederico Augusto Cariello. **Danos genotóxicos, mutagênicos e morfológicos em Hippocampus reidi exposto ao petróleo**. 2010. Tese de Doutorado. brasil.

DJOKOVIC-DAVIDOVIC, Djokovic-Davidovic, J., Milovanovic, A., Milovanovic, J., Antic, V., & Gajic, M. Analysis of chromosomal aberrations frequency, haematological parameters and received doses by nuclear medicine professionals. **J BUON**, v. 21, n. 1307-15. PMID,p.27837637,2016.

ESCOVAR, Carlos Eugênio Santiago. Avaliação do sistema de reparo por excisão de bases na metástase hepática do câncer colorretal. 2021.

FAGUNDES, Caio T. et ai. Transient TLR activation restares inflammatory response and ability to contrai pulmonary bacterial infection in germfree mice. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 3, p. 1411-1420, 2012.

FERREIRA, Rosinete. Caracterização de aberrações cromossômicas em estudos de genotoxicidade e mutagenicidade. **Revista científica Intelletto**, v. 6, n. 1, 2021.

FILIPPOVICH, 1. V. et ai. Effect of the inducers of cellular differentiation and of ionizing radiation of thymus lymphocytes: chromatin degradation and programmed cell death. **International Journal of Radiation Biology**, v. 53, n. 4, p. 617-628, 1988.

FURTUNATO, Clayton; ROMANO, Déborah. INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO COM A MATÉRIA: "aloe vera (babosa) como coadjuvante no tratamento radioterápico da mama". **Revista da UI_IPSantarém**, 2015.

FRUTUOSO, Claudia Celeste. Análise aplicada da norma cnen para instalações de medicina nuclear. 2015.

GAJENDIRAN, NATARAJAN; TANAKA, KIMIO; THIRUKAZHUKUNDRAM SUBRAMANIAM, KUMARAVEL; KAMADA NANA O. Neutron-induced adaptive response studied in go human lymphocytes using the comet assay. **Journal of radiation research**, v. 42, n. 1, p. 91-101, 2001.

GLASSER, Otto. Wilhelm Conrad Röntgen and the early history of the Roentgen rays. **Norman Publishing**, 1993.

GONÇALVES, Marco Aurélio Clemente; PINHEIRO, Mariele Regina. Três momentos da ciência, três desfechos surpreendentes: similaridades e disparidades no percurso do descobrimento. **Rev. Ciênc. Desenvol**, v. 10, n. 1, p. 197-208, 2017.

GRIVICICH, Ivana; REGNER, Andréa; DA ROCHA, Adriana Brondani. Morte celular por apoptose. **Revista brasileira de cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

Hall EJ, Giaccia AJ. **Radiobiology for the Radiologist**. 7th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2012.

HURLE, J. M. Cell death in developing systems. **Methods and Achievements in Experimental Pathology**, v. 13, p. 55-86, 1988.

IAEA, International Basic Safety Standards for Protection against Ionizing Radiation and for the Safety of Radiation Sources, BSS-115, **IAEA**, Vienna, 1996.

IAEA, Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies, **IAEA-EPR**, Vienna, 2011.

ISBIR, T. et ai. DNA repair-based therapy in oncology and neurodegeneration. In: Advances in DNA Repair. **IntechOpen**, 2015.

JAGIRDAR, Kasturee; Harrison, M., Lim, W., Muscat, G. E., Sturm, R. A., & Smith, A. G.I. The NR4A2 nuclear receptor is recruited to novel nuclear foci in response to UV irradiation and participates in nucleotide excision repair. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e78075, 2013.

KNIJNENBURG, Theo A; Wang, L., Zimmermann, M. T., Chambwe, N., Gao, G. F., Cherniack, A. D. Genomic and molecular landscape of DNA damage repair deficiency across the cancer genome atlas. **Cell reports**, v. 23, n. 1, p. 239-254. e6, 2018.

LAPORTE, Gustavo Andreazza. Influência do reparo do DNA nos aspectos clinicopatológicos e prognósticos do câncer colorretal esporádico. 2019.

LEMES, Marisa. The use of apoptosis in human lymphocytes peripheral as alternative methods in biological dosimetry of radiation effects from cobalt-60. 1997.

LIMA, Luís Spencer. Radiação gama. **Revista de Ciência Elementar**, v. 2, n. 4, 2014.

LIMA, Rodrigo da Silva; AFONSO, Júlio Carlos; PIMENTEL, Luiz Cláudio Ferreira. Raios-x: fascinação, medo e ciência. **Química Nova**, v. 32, p. 263-270, 2009.

LLOYD, D. C.; EDWARDS, A. A.; PROSSER, J. S. Chromosome aberrations induced in human lymphocytes by in vitro acute X and gamma radiation. **Radiation protection dosimetry**, v. 15, n. 2, p. 83-88, 1986.

LLOYD, D. C.; DOLPHIN, G. W. Radiation-induced chromosome damage in human lymphocytes. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 34, n. 4, p. 261-273, 1977.

LUTZ, Bruna Schwengber. Análise da expressão dos genes de reparo do DNA no carcinoma papilar da tireoide. 2017.

MARTINS, V.; ANTUNES, A. C.; GIL, O. Monteiro. Implementation of a dose-response curve for γ -radiation in the Portuguese population by use of the chromosomal aberration assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 750, n. 1-2, p. 50-54, 2013.

MENDES, Mariana Esposito. **Verificação da taxa de alterações cromossômicas em sangue humano irradiado em faixa gama**. 2014. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

MENDONÇA, Julyanne C.G., Mendes, Mariana E., Lima, Fabiana F., & Santos, Neide (2013). Analysis of the frequency of unstable chromosome aberrations in human lymphocytes irradiated with ^{60}Co . **INAC 2013: International nuclear atlantic conference**, Brazil.

MLADENOV, Emil; ILIAKIS, George. Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 711, n. 1-2, p. 61-72, 2011.

NATARAJAN A.T., G. Obe, Mutagenicity testing with cultured mammalian cells: cytogenetic assays, in J.A. Heddle (Ed.), **Mutagenicity: New Horizons in Genetic Toxicology**, Academic Press, New York, pp. 171-213, 1982.

NEPOMUCENO, L., Ferreira, J. L., Cruz, V., Gabriel, G., & Araújo, E. Mecanismo de Reparo aos Danos no DNA nos Pontos de Checagem do Ciclo Celular. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, n. 25, p. 811, 2017.

NOUAILHETAS, YANNICK et al. Radiações Ionizantes e a vida. **Rio de Janeiro: CNEN**, 2005.

NOUAILHETAS, Y. **Apostila Educativa - Radiação Ionizante e a vida**. Rio de Janeiro, RJ. Comissão Nacional de Energia Nuclear, 2016. Disponível em: . Acesso em 6 jun. 2016.

OKUNO, Emico. **Radiação ultravioleta: características e efeitos**. Editora Livraria da Física, 2005.

OKUNO, Emico. Efeitos biológicos das radiações ionizantes: acidente radiológico de Goiânia. **Estudos avançados**, v. 27, p. 185-200, 2013.

OKUNO, Emico; YOSHIMURA, Elisabeth Mateus. **Física das radiações**. Oficina de Textos, 2016.

OKUNO, Emico. **Radiação: efeitos, riscos e benefícios**. Oficina de Textos, 2018.

PATRÍCIO, MARIA DA CONCEIÇÃO MARCELINO; SILVA, VIRGÍNIA MIRTES DE ALCÂNTARA; DE MELO FILHO, ANTÔNIO ANTUNES. A radioatividade e suas utilidades. **POLÊM! CA**, v. 11, n. 2, p. 252-260, 2012.

PEREIRA, Alexandre Marcelo. A FÍSICA DAS RADIAÇÕES EM SALA DE AULA: DO PROJETO À PRÁTICA. **Mestre em ensino de Física Dissertação**, 2014.

PINO, Eddy Segura; GIOVEDI, Claudia. Radiação ionizante e suas aplicações na indústria. **UNILUS Ensino e Pesquisa**, v. 2, n. 2, p. 47-52, 2013.

PIZZAIA, D. Genotoxicidade do cádmio em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.). Tese -Genética e Melhoramento, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

PROTECTION, Radiological. ICRP publication 103. **Ann ICRP**, v. 37, n. 2.4, p. 2, 2007.

PRYOR, William A. The role of free radical reactions in biological systems. In: **Free radicals in biology**. Academic Press, 1976. p. 1-49.

Ravanat, J. L., Breton, J., Douki, T., Gasparutto, D., Grand, A., Rachidi, W., & Sauvaigo, S. Radiation-mediated formation of complex damage to DNA: a chemical aspect overview. **The British journal of radiology**, v. 87, n. 1035, p. 20130715, 2014.

REINHARDT, H. Christian; SCHUMACHER, Björn. The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. **Trends in Genetics**, v. 28, n. 3, p. 128-136, 2012.

RIBEIRO, Lucia Regina; MARQUES, Edmundo Kanan; SALVADOR!, Daisy Maria Fávero. **Mutagênese ambiental**. Editora da ULBRA, 2003.

RODRIGUES, A. S; liveira, N. G., Gil, O. M., Léonard, A., & Rueff, J. Use of cytogenetic indicators in radiobiology. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 115, n. 1-4, p. 455-460, 2005.

RODRIGUES, Sane Simone Oliveira Fonseca et al. Estudo das distribuições de LET, QF e RBE para feixes de fótons de baixa energia em meios biológicos usando o método de Monte Carlo. 2014.

ROY, L., Gregoire, E., Gruel, G., Roch-Lefevre, S., Voisin, P., Busset, A., ... & Voisin, P. Effect of lymphocytes culture variations on the mitotic index and on the dicentric yield following gamma radiation exposure. **Radiation protection dosimetry**, v. 151, n. 1, p. 135-143, 2012.

SANTOS, Mónica; ALMEIDA, Armando. Radiações Ionizantes e Saúde Ocupacional. 2013.

SAWADA, Namie Okino; DIAS, Adriana Marques; ZAGO, Mareia Maria Fontão. O efeito da radioterapia sobre a qualidade de vida dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 4, p. 323-329, 2006.

SENTHAMIZH CHELVA. S. Biodosimetry using chromosome aberrations in human lymphocytes. **Radiation Protection Dosimetry**, 2006.

SILVA, E. C. de S., CAVALCANTI, M. B., & CARNEIRO, P. F. P. (2014). Radioterapia versus Radiossensibilidade Individual. *Caderno De Graduação - Ciências Biológicas E Da Saúde - UNIT - PERNAMBUCO*, 1(3), 111-117. Recuperado de <https://periodicos.set.edu.br/facipesaude/article/view/1722>.

SILVA, Thainá Ferreira Dantas. **Interação da radiação ionizante de fonte artificial com tecido biológico com ênfase no dna: uma revisão de literatura**. 2020. Tese de Doutorado. [sn].

SILVA, MARCIA A. da. Dosimetria biológica em proteção radiológica. Elaboração de curvas dose-resposta para o Cosup60 e Csup137. 1997.

SILVA, Laís Melo da. **Análise de danos citogenéticos em linfócitos humanos expostos ao Radônio-222**. 2022. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

SHARMA, Ricky A.; DIANOV, Grigory L. Targeting base excision repair to improve cancer therapies. **Molecular aspects of medicine**, v. 28, n. 3-4, p. 345-374, 2007.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. **Fundamentos da genética**. 6a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

STORY, M. D. et al. A role for calcium in regulating apoptosis in rat thymocytes irradiated in vitro. **International journal of radiation biology**, v. 61, n. 2, p. 243-251, 1992.

TAUHATA, Luiz; Salati, P. A., Oi Prinzio, R., & Oi Prinzio, A. R. **Radioproteção e dosimetria: fundamentos**. CBPF, 2003.

TAUHATA, L. L., SALATI, L., OI PRINZIO, R., & OI PRINZIO, M. A. R. R. Radioproteção e Dosimetria: Fundamentos. 9ª. Ed. Rio de Janeiro/Brasil: Instituto de Radioproteção e Dosimetria, 2013.

TALEEI, Reza; NIKJOO, Hooshang. The non-homologous end-joining (NHEJ) pathway for the repair of DNA double-strand breaks: 1. A mathematical model. **Radiation research**, v. 179, n. 5, p. 530-539, 2013.

THIERENS, Hubert; VRAL, Anne. The micronucleus assay in radiation accidents. **Annali Dell Istituto Superiore Di Sanita**, v. 45, n. 3, p. 260-264, 2009.

TOP, Asil; COŞKUN, Münevver; ORTA, Tuncay. Biological dosimetry of Co-60 gamma radiation. **Türk J Haematol**, v. 17, n. 4, p. 189-196, 2000.

TUIMALA, Jarno; Szekely, G., Wikman, H., Jarventaus, H., Hirvonen, A., Gundy, S., & Norppa, H. Genetic polymorphisms of DNA repair and xenobiotic-metabolizing enzymes: effects on levels of sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 554, n. 1-2, p. 319-333, 2004.

VALUCKAS, Konstantinas Povilas; ATKOCIUS, Vydmantas; SAMERDOKIENĖ, Vitalija. Occupational exposure of medical radiation workers in Lithuania, 1991-2003. **Acta Medica Lituanica**, v. 14, n. 3, 2007.

WARREN, Shields. Effects of radiation on normal tissues. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 30, n. 6, p. 350-355, 1980.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Cytogenetic dosimetry: applications in preparedness for and response to radiation emergencies**. International Atomic Energy Agency, 2011.

YOSHIMURA, Elisabeth Mateus. Física das Radiações: interação da radiação com a matéria. **Revista Brasileira de Física Médica**, v. 3, n. 1, p. 57-67, 2009.

ANEXOS

ANEXO A

Cópia do parecer do Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Seres Humanos da UFPE

L

UN VE3RSH1A□E IrE:DEAAL DE
IPÊRNAMBIJOO CENTRO DE
CIIÊNCIAS OA SAÚEJE / UFPE-



PARECER_CôNSU AttC1ADO bD CEP'

DA.IIOI DO PRDJ.EUO □E IREEQUJr.IA

Título da Pesquisa: Implementação do Serviço de Dosimetria Biológica no Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste - CRCN-NE/CNEN

Pesquisador: Fabiana Farias de Lima Guimarães

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 09188813.7.0000.5208

Instituição Proponente: 'h!PI:IONAL DE EJ,,,ERIIIIA.1111.a.EAR

Patrocinador Principal: 00 S.R,O IULCJONAL □E 9'ERGIA. NU:::!!..SJII

JM.□OI:100 PARECER

Número do Parecer: 269.483

Data da Relatoria: 08/05/2011

Apresentação do Projeto:

O documento intitulado "Implementação do Serviço de Dosimetria Biológica" do Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste, CRCN-NE/CNEN, apresenta a proposta de implementação do serviço de dosimetria biológica no Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste, CRCN-NE/CNEN, sob a coordenação da Dra. Fabiana Farias de Lima Guimarães.

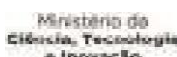
O uso das radiações ionizantes vem crescendo no país, haja vista a implantação de centros de produção de radiofármacos, serviços de radioterapia em pleno funcionamento, uso de fontes de radiação ionizante em irradiador de grande porte, serviços de prospecção de petróleo, serviços de radiografia industrial, entre outras atividades. Com isso, o número de indivíduos ocupacionalmente expostos às radiações na Região Nordeste irá aumentar e, como vários acidentes têm sido reportados pela Agência Internacional de Energia Atômica AIEA - nas diversas áreas de aplicação das radiações ionizantes, uma avaliação rápida e precisa da estimativa de dose recebida pelo indivíduo exposto excessivamente, é de grande importância para a equipe médica. Contribuindo, desta forma, na escolha de qual estratégia mais eficiente no tratamento. Esse projeto possibilitará que haja o primeiro laboratório de pesquisa do Nordeste, bem como o primeiro serviço de dosimetria biológica para gama e nêutrons do Brasil, evitando, em caso de necessidade, que o indivíduo supostamente exposto precise recorrer ao serviço existente na Região Sudeste, e tenha gastos relacionados a esse deslocamento. Da mesma forma, o projeto

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-800
UF: PE **Município:** Recife **UFPE**
Telefone: (81) 3128-8000 **E-mail:** cepca@ufpe.br

2011

ANEXO B

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

O(A) senhor(a) está sendo convidado(a) para participar da pesquisa "Implementação do Serviço de Dosimetria Biológica no Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste – CRCN-NE/CNEN".

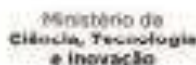
Sua participação não é obrigatória e, a qualquer momento, o(a) senhor(a) pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição.

Este estudo tem por objetivo principal avaliar as alterações cromossômicas (nos cromossomos estão contidos a informação genética) nas células de adultos saudáveis cujas amostras sanguíneas voluntariamente cedidas serão irradiadas ou não por 1 radiações. No caso das irradiadas, a partir de variações na dose, serão elaboradas curvas de resposta biológica em relação à dose de radiação absorvida para diferentes tipos de radiação. No caso das não irradiadas, serão fornecidas informações acerca do background genético de alterações cromossômicas da população residente no Estado de Pernambuco à comunidade científica.

Tal pesquisa é necessária, pois, diariamente, sejam por motivos médicos ou ocupacionais, a população é cada vez mais exposta às radiações, sendo necessário um estudo mais aprofundado que forneça informações que possam ser correlacionadas com os possíveis danos causados aos indivíduos.

Sua participação nessa pesquisa consistirá em fornecer amostras de sangue (10 ml), por punção venosa, em seringas estéreis descartáveis contendo heparina sódica na concentração de 5000U/mL, após assinatura deste termo. Seu material será usado exclusivamente para efeito desta pesquisa. O(a) Sr(a), também responderá um questionário para verificação do seu estado geral de saúde, apontando se nos últimos seis meses antes da coleta houve alguma exposição à radiação terapêutica ou raios X diagnóstico; aplicação de vacinas; ou consumo de drogas ilícitas. Essas informações são necessárias, pois os fatores citados podem alterar os resultados.

Os riscos inerentes a sua participação são mínimos. Durante a coleta, que obedecerá aos requisitos de segurança e assepsia, o(a) senhor(a) poderá sentir uma



ardência local e, eventualmente, após coleta poderá se formar um hematoma (mancha roxa) no local, que desaparecerá em poucos dias. Ressaltamos que, em momento algum, o(a) senhor(a) será exposto(a) a quaisquer fontes radioativas. O benefício direto é a possibilidade de fornecer a informação quanto aos níveis espontâneos de alterações cromossômicas que o(a) Sr(a) possui, caso seja de seu interesse. Essa informação será enviada pós análise por meio de um documento/carta padrão via correio ou e-mail. Além disso, esse projeto possibilitará que haja o primeiro laboratório de pesquisa do Nordeste, bem como o primeiro serviço de dosimetria biológica para nêutrons do Brasil.

Garantimos que todas as medidas serão tomadas para assegurar a total privacidade dos seus dados pessoais, uma vez que são de caráter sigiloso e que, em nenhuma hipótese, seus dados pessoais serão levados a público. Esses dados ficarão sob a guarda da pesquisadora responsável, Dra. Fabiana Farias de Lima, no Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste, sito à Av. Prof. Luiz Freire, nº 200, Cidade Universitária, Recife-PE. Eles serão guardados por um período de 5 (cinco) anos após o término da pesquisa, os quais posteriormente serão destruídos. O acesso e a análise dos dados coletados se farão apenas pelos pesquisadores e assistentes envolvidos no projeto.

O (A) senhor(a) receberá uma cópia deste documento onde consta o telefone e o endereço institucional da pesquisadora principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento. Caso deseje saber se este projeto foi avaliado por um Comitê de Ética, ou mesmo fazer alguma denúncia sobre procedimentos antiéticos o(a) senhor(a) poderá contatar o Comitê de Ética em Pesquisa (Avenida da Engenharia s/n – 1º andar, sala 4, Cidade Universitária, Recife, PE, CEP: 50740-600, telefone 2126-8588, email: cepccs@ufpe.br).

Recife, ____ de _____ de 201 ____

Pesquisadora responsável: Fabiana Farias de Lima Guimarães

Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste

Av. Professor Luiz Freire, 200, CDU, Recife/PE

Fone: (81) 3797-8024

Email: fflima@cnen.gov.br