

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

Mariana Esposito Mendes

**Verificação da taxa de alterações cromossômicas em
sangue humano irradiado em feixe gama**

Recife

2014

Mariana Esposito Mendes

**Verificação da taxa de alterações cromossômicas em
sangue humano irradiado em feixe gama**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Profa Dra Neide Santos

Coorientador: Dra Fabiana Farias de Lima

Recife

2014

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Mendes, Mariana Esposito

Verificação da taxa de alterações cromossômicas em sangue humano irradiado em faixa gama / Mariana Esposito Mendes. – Recife: O Autor, 2014.

75 f.: il.

Orientadora: Neide Santos

Coorientadora: Fabiana Farias de Lima

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro da Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Genética, 2014.

Inclui bibliografia e anexos

1. Citogenética 2. Radiação – dosimetria I. Santos, Neide (orient.) II. Lima, Fabiana Farias de (coorient.) III. Título.

576.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-101

Mariana Esposito Mendes

**Verificação da taxa de alterações cromossômicas em
sangue humano irradiado em feixe gama**

Aprovado em 17/02/2014

Banca Examinadora:

Dra. Neide Santos
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Éderson Akio Kido
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Monica Stuck de Oliveira
Comissão Nacional de Energia Nuclear

Recife
2014

**Aos meus avôs, Maria do Socorro, Romildo,
Lúcia e Álvaro.**

Agradecimentos

Aos meus pais, Rosane e Alexandre, por todo apoio e incentivo dados durante minha vida escolar, acadêmica e pessoal, ensinando-me os valores morais e éticos, sendo bons exemplos.

Aos meus avôs maternos, Maria do Socorro e Romildo (Seu Pires), esses que estão conosco até hoje. Com eles conheci o amor verdadeiro, fazer pelo outro sem esperar nada em troca, sempre com suas simples demonstrações de carinho e de afeto.

Aos meus avôs paternos, Lúcia e Álvaro, infelizmente não conheci meu avô Álvaro, mas acredito que se assemelhava ao meu pai em termos de caráter, me enchendo de orgulho e a minha avó Lúcia, não mais presente fisicamente, mas em minha memória ela continua viva, especialmente com a lembrança do seu cheirinho de avó.

À minha irmã, Catarina, que me acompanha desde antes do nascimento, por sempre me apoiar e me aconselhar em todas as decisões tomadas.

Aos meus familiares que me proporcionaram inúmeros momentos de alegria e em especial meus primos.

Ao, meu querido Rodolfo, por estar presente em todos os momentos bons e não tão bons. E pelo amor verdadeiro, crescido em meio de conversar, respeito e muito amor.

À Dr^a Fabiana Farias de Lima pela confiança e pelo apoio ao meu trabalho, sem isso não seria capaz de terminá-lo.

À Prof^a Dr^a Neide Santos por me aceitar como sua aluna de Mestrado, ajudando no meu desenvolvimento como futura pesquisadora.

À Prof^a Dr^a Ana Mendonça por ajudar no desenvolvimento desse trabalho e como colaboradora aos projetos do Laboratório.

Aos meus queridos colegas alunos da sala RP-22 do CRCN-NE por todo apoio acadêmico e pessoal e que, em meio a tanta bagunça, fazemos ciência. E também agradeço as minhas amigas, Priscilla e Julyanne, sempre dispostas a resolverem os problemas corriqueiros do trabalho, fazendo parte fundamental no desenvolvimento desse estudo.

Ao corpo técnico do Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CNEN/CRCN-NE), sempre prestativos e aptos a solucionar os problemas diários intrínsecos ao desenrolar das atividades científicas.

A todos os meus amigos que, ao longo desses anos, estiveram presentes, mesmo com o tempo curto para eles.

Aos professores da Pós-Graduação em Genética por transmitirem o seu conhecimento e sempre dispostos a ajudar.

Ao Centro Regional de Ciências Nucleares, pela disponibilidade técnica na execução desse trabalho.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

“O conhecimento nunca está terminado. É uma teia que vamos tecendo a partir da superação dos limites: eu respeito o limite do outro e estabeleço com ele o pacto do cuidado, ao mesmo tempo em que ambos avançamos”. E arrematou: “não posso negar o que o outro é e nem encarar o não saber como limite. Toda

estranheza cai por terra se dividimos nossas
necessidades" (Pe. Fábio Melo).

Resumo

O estudo citogenético das alterações cromossômicas é usado como um biomarcador na estimativa de dose absorvida pelo organismo de indivíduos envolvidos em exposição à radiação ionizante. Na literatura está estabelecida que a frequência dos dicêntricos tem uma relação com o valor de dose absorvida pelos linfócitos do sangue periférico por meio de curvas de calibração dose-resposta. O objetivo desse trabalho foi verificar as frequências das alterações cromossômicas instáveis em linfócitos do sangue humano irradiado em feixe gama com diferentes doses absorvidas e, posteriormente, estabelecer diferentes curvas de calibração dose-resposta. A irradiação foi realizada no Departamento de Energia Nuclear (DEN-UFPE) com uma fonte de ^{60}Co . As amostras sanguíneas tiveram seus linfócitos cultivados em meios de cultura e, após os processamentos, foram obtidas as metáfases. As alterações cromossômicas analisadas foram os cromossomos dicêntricos, em anel e os fragmentos acêntricos isolados. Houve um aumento das frequências de alterações cromossômicas instáveis com o aumento da dose absorvida e a melhor relação dose resposta obtidas foram com os dicêntricos. As curvas de calibração de dicêntricos e de dicêntricos + anéis apresentaram bons ajustes com os valores dos coeficientes $Y = 0,0027 + 0,0030D + 0,0470D^2$ ($X^2 = 14,4$) e $Y = 0,0026 + 0,0047D + 0,0503D^2$ ($X^2 = 18,26$), respectivamente, determinados pelo programa Dose Estimate. Com o estabelecimento dessas curvas de calibração, torna-se possível a estimativa de dose absorvida após acidentes radiológicos ou nucleares envolvendo humanos.

Palavras-chave: Dicêntricos; Dosimetria Biológica; Radiação Gama

Abstract

The cytogenetic analysis of chromosomal abnormalities is used as a biomarker to estimate the dose absorbed by the organism of individuals involved in exposure to ionizing radiation. In the literature it is established that the frequency of dicentric chromosomes has a relationship with the absorbed dose by peripheral blood lymphocytes using the dose-response calibration curves. The aim of this study was to determine the frequency of unstable chromosomal aberrations in human blood lymphocytes irradiated with different absorbed doses gamma beam and, posteriorly, establish different dose-response calibration curves. The irradiation was performed at the Department of Nuclear Energy (DEN - UFPE) with a ^{60}Co source, resulting in different absorbed doses. The blood samples had their lymphocytes grown in culture media, after processing, the metaphase cells were obtained. Chromosomal aberrations analyzed were the dicentric chromosome, rings and acentrics isolated. There was an increased frequency of chromosomal aberrations with increasing absorbed dose and the best dose-response was obtained with dicentrics. The calibration curves using dicentrics and dicentrics + rings presented good fits with the coefficients values of $Y = 0.0027 + 0.0030D + 0.0470D^2$ ($X^2 = 14.4$) and $Y = 0.0026 + 0.0047D + 0.0503D^2$ ($X^2 = 18.26$), respectively, determined by Dose Estimate program. With the establishment of these calibration curves, it becomes possible to estimate the dose absorbed after radiological or nuclear incidents involving humans.

Key words: Biological Dosimetry; Dicentric; Gamma radiation

Lista de Ilustrações

Figura 1. Esquema hipotético para instabilidade genômica induzida pela radiação.	12
Figura 2. Danos induzidos no DNA pela radiação ionizante.	14
Figura 3. A exposição das células à radiação ionizante dá origem a DNA DSBs, SSBs e modificações de base.	17
Figura 4. Fotografias de metáfases mitóticas com alterações cromossômicas.	23
Figura 5. Curvas de calibração construídas <i>in vitro</i> com diferentes qualidades de radiação.	25
Figura 6. Metáfases mitóticas viáveis e com diferentes alterações cromossômicas instáveis.	33
Figura 7. Curvas de calibração obtidas pelo Programa Dose Estimate.	46

Lista de Tabelas

Tabela 1. Relação entre a contagem absoluta de linfócitos e a dose absorvida após a exposição.	22
Tabela 2. Amostras de sangue irradiadas com suas respectivas doses absorvidas, taxa de dose absorvida, tempo e data de exposição.	31
Tabela 3. Número de alterações cromossômicas instáveis nas amostras irradiada com diferentes doses absorvidas (Gy) e suas respectivas amostras controle.	37
Tabela 4. Frequências (médias) obtidas das diferentes alterações cromossômicas nas amostras controle referentes a cada dose absorvida.	37
Tabela 5. Frequências (médias) obtidas das diferentes alterações cromossômicas em relação à dose absorvida.	38
Tabela 6. Distribuições intercelulares de dicêntricos, dicêntricos + anéis e de fragmentos isolados com suas respectivas médias, índices de dispersão e valores de u .	39
Tabela 7. Coeficientes das curvas de calibração com seus respectivos valores de desvio padrão, de X^2 e de valor de p obtidos pelo programa R, Dose Estimate e CABAS na presença do controle (zero Gy).	41
Tabela 8. Valores de p determinados pelo programa R e pelo Dose Estimate para cada coeficiente C , α e β nas curvas de calibração das diferentes alterações cromossômicas na presença do controle (zero Gy).	43
Tabela 9. Coeficientes das curvas de calibração com seus respectivos valores de desvio padrão, de X^2 e de valor de p obtidos pelo programa R, Dose Estimate e CABAS na ausência do controle (zero Gy).	44
Tabela 10. Valores de p determinados pelo programa R e pelo Dose Estimate para cada coeficiente C , α e β nas curvas de calibração das diferentes alterações cromossômicas na ausência do controle (zero Gy).	45
Tabela 11. Coeficientes obtidos pelos três programas de ajuste de curvas com a presença do controle (zero Gy) e as razões α/β para cada alteração cromossômica analisada.	46
Tabela 12. Coeficientes das curvas de calibração dose-resposta para dicêntricos relatadas na literatura para ^{60}Co .	56

Lista de Abreviaturas

Item	Definição
AP	<i>Apurinic/apyrmidinic sites</i> - Sítios Apurínicos ou Apirimidínicos
BER	<i>Base Excision Repair</i> – Reparo por Excisão de Base
CABAS	<i>Chromosomal Aberration Calculation Software</i>
CRCN-NE	Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste
DSB	<i>Double-strand Break</i> – Quebras de Fita Dupla
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> – Ácido Desoxirribonucléico
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridation</i> - Hibridização <i>in situ</i> Fluorescência
GGR	<i>Global Genome Repair</i> - Reparação Genômica Global
Gy	Gray - Unidade de Dose Absorvida
HR	<i>Homologous Recombination</i> – Recombinação Homóloga
IAEA	<i>International Atomic Energy Agency</i>
KeV	Kiloeletron volt – Unidade de Energia Cinética do Elétron
LET	<i>Linear Energy Transfer</i> - Transferência Linear de Energia
MeV	Megaeletron volt – Unidade de Energia Cinética do Elétron
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
SBS	<i>Single-strand Break</i> - Quebras de Fita Simples
SSA	<i>Single-strand Annealing</i> - Anelamento de Fita Simples
TCR	<i>Transcription-couple Repair</i> - Reparação de Transcrição Acoplada
α	Coeficiente Linear
β	Coeficiente Quadrático
γ	Radiação Gama

Sumário

Resumo

Abstract

Lista de ilustrações

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas

1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	3
2.1 Radiação ionizante	3
2.1.1 Transferência Linear de Energia	4
2.1.2 Interação da radiação γ com a matéria	5
2.2 Interação da radiação γ com o tecido humano	7
2.2.1 Mecanismos de ação da radiação ionizante	8
2.2.2 Radiossensibilidade celular	9
2.2.3 Efeitos genômicos induzidos pela radiação ionizante	12
2.3 Lesões radioinduzidas no DNA e seus mecanismos de reparo	13
2.3.1 Reparo por excisão de base	15
2.3.2 Reparo por excisão de nucleotídeos	16
2.3.3 Reparação de DSBs	17
2.4 Dosimetria biológica	19

2.4.1 Linfócitos humanos	20
2.4.2 Dosimetria citogenética	22
2.4.3 Curva de calibração dose-resposta	24
3. Objetivos	29
3.1 Geral	29
3.2 Específicos	29
4. Material e Métodos	30
4.1 Seleção de doador e coleta de amostras	30
4.2 Irradiação das amostras	30
4.3 Cultivo de células e preparação das lâminas	31
4.4 Análise microscópica	33
4.5 Análise dos dados	34
5. Resultados	36
6. Discussão	48
7. Conclusões	59
8. Referências Bibliográficas	60
9. Anexos	65
10. Currículo Lattes atualizado (correspondente ao período do curso)	69

1. Introdução

A dosimetria biológica tem como finalidade avaliar ou estimar a dose absorvida pelo organismo de indivíduos envolvidos ou com suspeita de envolvimento em evento de exposição à radiação ionizante. A estimativa de dose absorvida é baseada na análise de marcadores biológicos sensíveis e específicos à radiação e que melhor reflitam os danos biológicos causados pela mesma. A técnica que melhor reúne essas condições é a contagem das alterações cromossômicas radioinduzidas, tendo os cromossomos dicêntricos como o principal biomarcador.

No Brasil, atualmente, existem cinco laboratórios de dosimetria biológica e a Região Nordeste conta com dois laboratórios, sendo um deles o Laboratório de Dosimetria Biológica (LDB) do Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste - CRCN-NE/CNEN. Entretanto, até o momento esse laboratório não possui curvas de calibração dose-resposta para radiação gama utilizando os dicêntricos como biomarcadores. Na prestação de serviço em dosimetria biológica, a IAEA (*International Atomic Energy Agency*) recomenda que cada laboratório estabeleça sua própria curva de calibração dose-resposta, pois há diferenças inerentes aos protocolos, bem como, diferenças na interpretação das alterações cromossômicas pelos observadores. A interpretação da dose absorvida utilizando uma curva de calibração produzida em outros lugares pode introduzir incertezas extras na estimativa.

A ausência de curvas de calibração próprias nos laboratórios da Região Nordeste é de extrema preocupação, haja vista que há um público-alvo de indivíduos ocupacionalmente expostos que trabalham em centros de pesquisa,

em produção de radiofármacos, em serviços de irradiação de grande porte, em prospecção de petróleo, entre outros, que não contam com a prestação desse serviço de biodosimetria para exposição à radiação gama. Com isso, é preciso recorrer aos serviços de dosimetria biológica em outras regiões do Brasil.

2. Revisão da Literatura

2.1 Radiação Ionizante

A radiação é geralmente definida como a energia que se propaga através do espaço. Os materiais radioativos são substâncias que emitem radiação ionizante em um esforço de alcançar a estabilidade nuclear. A estabilidade de um determinado nuclídeo é o resultado do balanceamento entre o número de nêutrons e de prótons presentes no seu próprio núcleo atômico. Os elementos radioativos instáveis que apresentam um elevado número de nêutrons em relação ao número de prótons sofrem processos de ajustes que convertem um nêutron em um próton, denominado de decaimento beta, resultado da emissão de elétrons carregados negativamente ou de partículas betas. O inverso pode ocorrer quando o núcleo tem um número maior de prótons em relação ao número de nêutrons. Há a conversão desse excesso de prótons em nêutrons, emitindo uma partícula positiva chamada de pósitron (elétron carregado positivamente) (IAEA, 2004; Christensen *et al.*, 2014).

Alguns núcleos de metais decaem pela produção de partículas alfa que consistem em dois prótons e dois nêutrons, idêntico ao núcleo do átomo de hélio, sendo, então, a partícula alfa mais pesada que a partícula beta. Esses decaimentos, frequentemente, não resolvem por completo a questão da instabilidade nuclear e alguns núcleos ainda permanecem com excesso de energia (instáveis). Esse excesso necessita ser liberado que, por sua vez, é feito pela emissão de um novo tipo de radiação, denominada de raios gama (γ) (IAEA, 2004).

Os raios γ , bem como os raios X, são fótons (radiações eletromagnéticas) que não possuem massa. Por essa razão, eles não são muito eficientes na ionização dos átomos, sendo muito mais penetrantes do que partículas alfa e beta. Geralmente, os raios γ são mais energéticos do que os raios X e são considerados mais penetrantes. Essa radiação é classificada de baixa transferência de energia (IAEA, 2011; Christensen *et al.*, 2014).

Como as radiações ionizantes são apresentadas de diversas formas, variando de ondas eletromagnéticas (radiações de baixa densidade de ionização) até partículas eletricamente carregadas (densamente ionizantes), elas são classificadas de acordo com sua densidade de ionização em termos de transferência linear de energia (Loucas *et al.*, 2013).

2.1.1 Transferência Linear de Energia (LET)

A Transferência Linear de Energia (LET, *Linear Energy Transfer*) é definida como a quantidade média de energia depositada, por colisão de uma partícula carregada, por unidade de comprimento de trajetória.

Os raios X ou a radiação γ (via elétrons secundários) depositam quantidades médias de energia muito pequenas por unidade de comprimento e, por isso, exigem um maior número de interações em seu percurso para produzir uma mesma dose absorvida que as partículas carregadas com alto poder de ionização, tais como, partículas alfa, íons pesados e nêutrons. Desta forma, as primeiras são consideradas radiações de baixa LET e as últimas, de alta LET (Loucas *et al.*, 2013).

Radiações de alta LET também produzem elétrons secundários de baixa LET que emanam radialmente da trajetória principal. No caso das partículas alfa

de energia mais baixa, esses elétrons secundários têm o comprimento de raios limitado em alguns nanômetros, o que impede a sua interação com os danos produzidos por outras trajetórias primárias (independentes) (Cucinotta *et al.*, 2000; Loucas *et al.*, 2013). Devido a essas características, as radiações de baixa LET resultam em uma distribuição aleatória de ionizações dentro de um volume alvo, enquanto as radiações de alta LET produzem espaçadas ionizações que são densamente distribuídas (IAEA, 2011).

A energia depositada na matéria pelas partículas ionizantes por unidade de massa do material irradiado no espaço de interesse é chamada de dose absorvida (D), sendo, definida pela equação 1.

$$D = \frac{d\bar{\varepsilon}}{dm} \quad (1)$$

onde, $d\bar{\varepsilon}$ é a energia média cedida pelas radiações ionizantes à matéria em um elemento de volume, e dm , é a massa da matéria no elemento de volume (UNSCEAR, 1958; IAEA, 2011).

2.1.2 Interação da radiação γ com a matéria

A radiação γ interage com a matéria por meio de alguns mecanismos, dentre eles: a absorção fotoelétrica, o efeito ou espalhamento Compton e a produção de par. Esses três mecanismos de interação conduzem à transferência parcial ou total da energia do fóton de radiação γ para o elétron, resultando em alterações na trajetória do fóton, onde o fóton pode desaparecer ou mudar de direção (Knoll, 1999).

No processo de absorção fotoelétrica, um fóton interage com um elétron do átomo do meio absorvedor, resultando no seu desaparecimento por completo. Em seu lugar surge um fotoelétron que é ejetado pelo átomo com uma energia cinética bem definida. Para raios γ , com energia suficiente, a origem mais provável do fotoelétron é o orbital mais próximo ao núcleo, a camada eletrônica K do átomo. Além do fotoelétron, o átomo alvo se torna ionizado com a perda desse elétron e a vacância originada é imediatamente preenchida por algum elétron de camadas eletrônicas mais externas. Esse último processo leva à geração de fótons de raios X característicos.

No espalhamento Compton, o fóton, ao interagir com o átomo, é desviado de sua trajetória inicial por um ângulo relacionado com a quantidade de energia transferida ao elétron (que se assume estar inicialmente em repouso), conhecido como elétron de recuo. A energia transferida para o elétron pode variar desde zero a uma grande fração da energia dos raios γ incidentes de tal forma que pequenos ângulos de espalhamento do fóton correspondem a uma pequena fração da energia transmitida (Knoll, 1999).

O processo de produção de par só ocorre se a energia do raio γ for superior a duas vezes a energia de repouso da massa do elétron (1,02 MeV), de modo que a probabilidade de ocorrência dessa interação é muito baixa até que a energia dos raios γ se aproximem a vários MeV. Assim, o processo de produção de par está predominantemente confinado aos raios γ de alta energia. Na interação com os núcleos de número atômico elevado, o fóton desaparece e surge um par elétron-pósitron (antipartícula do elétron) e todo o excesso de energia transportada pelo fóton (acima de 1,02MeV) é transformado em energia cinética no pósitron e no elétron. Em seguida, o processo de aniquilação

acontece, onde um pósitron encontra um elétron no meio absorvedor, resultando no desaparecimento de ambas as partículas, com isso, dois fótons de aniquilação são produzidos (Knoll, 1999).

2.2 Interação da radiação γ com o tecido humano

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. O fóton incidente no tecido pode interagir por meio do efeito fotoelétrico e/ou pelo efeito Compton. O principal efeito prejudicial da radiação decorre da sua capacidade de ejetar elétrons das diversas moléculas presentes no interior das células causando, desse modo, danos celulares. Esse efeito é caracterizado pelo processo de transferência de energia que conduz à ionização, a excitação de átomos e a quebra das ligações químicas (Lara *et al.*, 2013).

A taxa de dose absorvida¹ é um fator importante no efeito biológico produzido. Se for depositada uma dose absorvida alta no tecido devido à irradiação de uma fonte com uma taxa de dose baixa, é provável que o tecido possa ser regenerado, compensando, assim, qualquer efeito biológico causado nas células somáticas e nenhum resultado ou efeito poderá ser percebido. No entanto, se a mesma dose absorvida alta for depositada, mas com uma taxa de dose absorvida maior, o efeito demonstrará uma ação seletiva, onde alguns tecidos serão mais danificados do que outros. Esse efeito é um fator de grande importância na radioterapia de tumores (Shields Warren, 1980; IAEA, 2011).

¹ Taxa de dose absorvida - É a taxa na qual a energia das partículas ionizantes é transferida para um alvo de interesse em um determinado intervalo de tempo, ou seja, é a dose absorvida por unidade de tempo (IAEA, 2011).

A eficácia de diferentes tipos de radiação em induzir um determinado efeito biológico é comumente representada pelo termo "efetividade biológica relativa" (RBE, *Relative Biological Effectiveness*), que é definido pela razão das doses necessárias para que dois tipos de radiações, sendo um o de referência e outro o de interesse, produzam o mesmo nível de efeito (Dennis *et al.*, 1987; IAEA, 2011).

Para a radiação ionizante, o valor de RBE aumenta com a elevação da LET (maior LET – maior RBE), com picos de 100-200 KeV/μm, e depois diminui em células com capacidade elevada de reparação de DNA, enquanto que o valor RBE constantemente aumentada com a LET em células com reparo deficiente. Os nêutrons de alta energia relativa são classificados como radiação de alta LET, entretanto, foi visto que os nêutrons têm valores variados de RBE. Por outro lado, alguns estudos observaram que há valores baixos de RBE (~1) que podem induzir a apoptose em linfócitos humanos (Vral *et al.* 1998 & Ryan *et al.* 2006 apud Okumura *et al.*, 2013).

Assim, as variações do valor de RBE são influenciadas por uma série de fatores, tais como a taxa de dose absorvida, as linhagens celulares irradiadas, o padrão de LET, a energia da radiação, além da dose absorvida total depositada no tecido (Okumura *et al.*, 2013).

2.2.1 Mecanismos de ação da radiação ionizante

Em meados de 1950, foram publicados trabalhos que determinavam duas teorias sobre os mecanismos de ação da radiação em organismos vivos: as teorias de ação direta e indireta (UNSCEAR, 1958). Esses conceitos podem ser aplicados na produção de quebras de fita dupla (DSB, *Double-strand break*) no DNA (Lara *et al.*, 2013), logo:

- (1) **A ação direta:** As DSBs são resultantes de uma única deposição de energia que produz simultaneamente a lesão nas duas fitas do DNA. Outro possível mecanismo de ação direta é a formação de DSBs resultantes de duas ou mais diferentes interações da radiação com a célula.
- (2) **A ação indireta:** Por essa ação, as DSBs resultam de um único ataque dos radicais livres. Há evidência que esse seja o mecanismo dominante de formação de DSB pelas radiações de baixa LET.

A ação direta é essencialmente dependente das características físicas do processo de interação, tais como as propriedades da radiação (LET) e o tamanho do alvo (DNA). Neste caso, o tamanho do alvo é constante em todas as células humanas. Teoricamente, 30-40% das DSBs produzidas são geradas devido a esse mecanismo de ação e os restantes 60-70% podem ser determinados pelas propriedades biológicas das células, incluindo a capacidade de reparo, o estado conformacional da cromatina, a atividade proliferativa, o grau de diferenciação celular e/ou fase do ciclo celular. Portanto, uma característica importante da biologia das radiações é a condição química do ambiente do DNA que determina uma influência marcante sobre a sua radiosensibilidade da célula (Lara *et al.*, 2013).

2.2.2 Radiossensibilidade celular

Os efeitos nocivos dos raios X tornaram-se rapidamente evidentes após a descrição dessa forma de radiação por Roentgen em 1895. Foram publicados relatórios descrevendo os efeitos biológicos agudos, dentre eles, membros e dedos inchados, descamação da pele e grave dermatite, seguido por relatos de efeitos biológicos tardios, incluindo carcinoma e defeitos congênitos (Brownet *et*

al., 1936, Goldstein & Murphy, 1929 apud Jeggo & Lavin, 2009). Esses efeitos tardios foram confirmados em uma ampla escala após o acidente com as bombas atômicas no Japão e, também, após uma série de exposições acidentais que ocorreram na última parte do século XX (Awa *et al.*, 1987; Miller, 1995; Neel *et al.*, 1977 apud Jeggo & Lavin, 2009).

No início do século XX, Jean Alban Bergonie e Louis Tribondeau determinaram que "a radiosensibilidade das células está ligada a sua taxa de proliferação" (Bergonié & Tribondeau, 1906 apud Foray *et al.*, 2012). Em um congresso realizado em Lyon em 1906, Bergonié afirmou que havia dois tipos de erros que poderiam afetar a aplicação médica dos raios X: (1) "as incertezas na avaliação da dose de radiação" e (2) "as diferenças entre a sensibilidade dos pacientes". O segundo erro foi resumido pelo termo de "idiosincrasia", já se acreditava que era devido à predisposição hereditária ou adquirida (Bordier, 1906 apud Foray *et al.*, 2012). O termo "idiosincrasia" foi logo substituído pelo termo "radiosensibilidade" que foi introduzido por Cláudio Regaud e Antoine Lacassagne (Regaud & Lacassagne, 1927 apud Foray *et al.*, 2012).

A Lei proposta por Bergonié e Tribondeau (1906) afirma que as células que estão em divisão ativa (ou têm um índice mitótico alto) e que são células imaturas (indiferenciadas) são muito mais radiosensíveis do que os outros tipos celulares. Geralmente, o inverso é verdadeiro: as células que não estão em divisão ativa e que são bem diferenciadas se tornam células mais radiorresistentes do que as demais, entretanto, os linfócitos maduros são exceção a essa regra (Trowell, 1952 apud Neff & Cassen, 1968).

Estudos feitos com análise sistemática de radiosensibilidade cromossômica revelaram a susceptibilidade diferencial dos cromossomos na

indução de alterações cromossômicas. O tamanho do cromossomo, em geral, é proporcional ao conteúdo de DNA. Luomahaara *et al.* (1999) estudaram um grupo de pessoas expostas acidentalmente à radiação na Estônia em 1994, sendo analisado nesse trabalho: a distribuição de pontos de quebras nos cromossomos 1, 2 e 4 (maiores cromossomos humanos) em proporção ao conteúdo de DNA e a localização de quebras ao longo dos cromossomos. O estudo revelou que o rendimento de quebras está relacionado com o seu teor de DNA (maior o tamanho dos cromossomos, mais danos são visualizados) e que, tanto nas pessoas expostas acidentalmente quanto em linfócitos irradiados *in vitro*, a localização do ponto de ruptura não foi considerada aleatória.

Por outro lado, outros estudos (Knehr *et al.*, 1996; Barquinero *et al.*, 1999; Sommer *et al.*, 2005) propõem que os cromossomos com maior conteúdo de DNA são menos suscetíveis à taxa de alterações cromossômicas em comparação com os cromossomos menores. A relativa maior sensibilidade à radiação dos cromossomos pequenos pode ser explicado devido à distribuição não aleatória dos pontos de quebra ao longo dos cromossomos, como observado por Loumahaara *et al.* (1999). No trabalho de Pathak *et al.* (2009) também foi observado que o cromossomo 2 foi mais radiosensível que o cromossomo 1, entretanto, os autores afirmam a necessidade de mais estudos que podem resultar em maiores implicações na radiobiologia, na radioterapia e até mesmo na pesquisa sobre o câncer, abrindo caminhos para a identificação de biomarcadores específicos para cada cromossomo.

Os eventos de ionização não se limitam apenas ao DNA e seu ambiente imediato. Os radicais livres gerados pela radiação também podem alterar as proteínas e os lipídios das membranas celulares. A exposição de células à

radiação ionizante pode resultar na parada do ciclo celular antes da reparação do DNA, levando à produção de mutações, de transformações e de morte celular (Ward, 1981; Wallach, 1972 apud Jeggo & Javin, 2009).

2.2.3 Efeitos genômicos induzidos pela radiação ionizante

A instabilidade genômica induzida pela radiação é observada em células somáticas e germinativas, sendo a instabilidade um termo que descreve o aumento da taxa de alterações adquiridas no genoma, podendo ser medida através das alterações cromossômicas, alterações no nível de ploidia, formação de micronúcleos, entre outros métodos. A exposição à radiação ionizante desestabiliza o genoma, iniciando, assim, uma cascata de acontecimentos genômicos que resultam no aumento da taxa de mutação e de alterações cromossômicas nas células irradiadas descendentes (Figura 1) (Morgan, 2012).

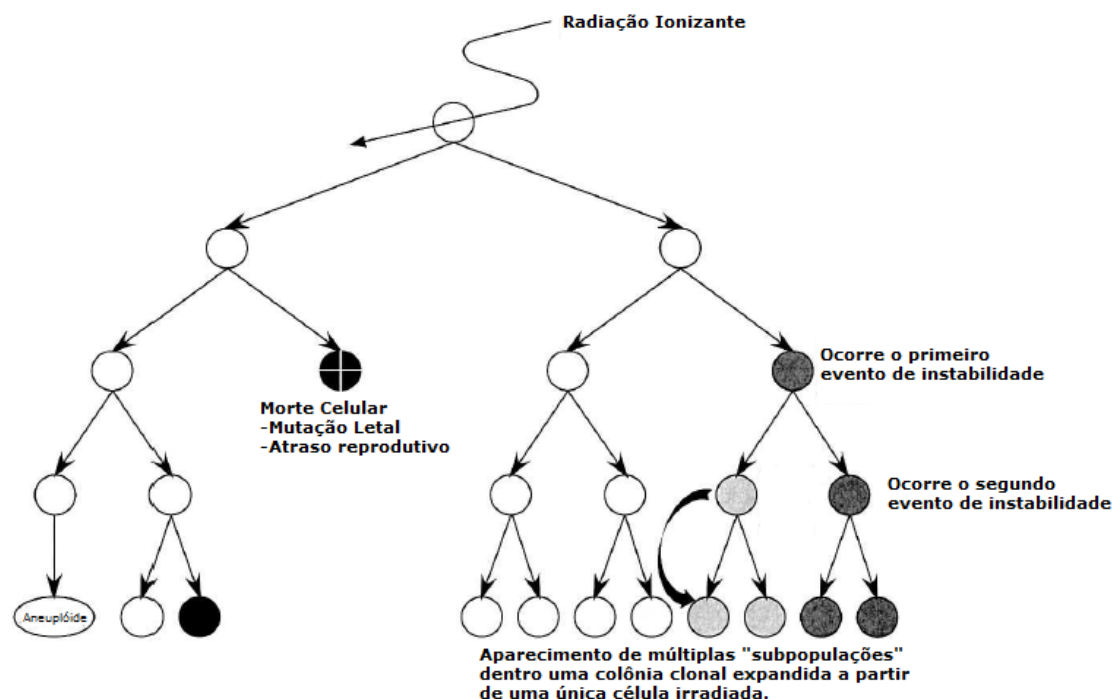


Figura 1. Esquema hipotético para instabilidade genômica induzida pela radiação. Os eventos de instabilidade podem ocorrer na descendência da célula irradiada. Durante a expansão clonal, um número de células filhas morre (círculos pretos) ou pode resultar em rearranjos cromossômicos, alterações, gaps, etc (círculos cinza) (Fonte: Morgan, 2012).

Enquanto os vários fenótipos associados à instabilidade genômica radioinduzida estão relativamente bem caracterizadas, os eventos moleculares, bioquímicos e celulares, que iniciam e perpetuam a instabilidade, permanecem desconhecidos. Os danos induzidos diretamente no DNA, como as DSBs, provavelmente não são responsáveis por esse acontecimento. Já as respostas deficientes de reparo aos danos no DNA, as alterações na expressão dos genes ou o desequilíbrio na homeostase celular são os mais propensos a estarem envolvidos na persistência do fenótipo instável (Morgan, 2012).

2.3 Lesões radioinduzidas no DNA e seus mecanismos de reparo

Danos ao DNA induzidos pela radiação ionizante incluem: quebra de fita única (SSB, *single-strand break*), quebra de fita dupla (DSB) e modificação de bases via oxidação, alquilação, desaminação ou perda de resíduos de base na produção de sítios apurínico ou apirimidínico (AP). Todas essas modificações podem levar indiretamente à produção de SSBs e/ou DSBs. Há também as ligações cruzadas envolvendo DNA-DNA e interações DNA-proteína (Figura 2) (Kavanagh *et al.*, 2013).

A maioria das lesões localizadas no DNA é reparada com sucesso, contudo algumas raras lesões desencadeiam a eventual morte celular. Algumas lesões são mais graves do que outras, por exemplo, a quebra de fita dupla (DSB) no DNA é considerada a lesão mais grave. A variedade de lesões no DNA induzidas pela radiação está descrito em uma escala de severidade de lesão. A gravidade não inclui só o tamanho físico da lesão de DNA, mas também a sua

capacidade de reparação. Após um intervalo de poucas horas de reparação, as lesões não reparadas são classificadas com maior gravidade (Lara *et al.*, 2013).

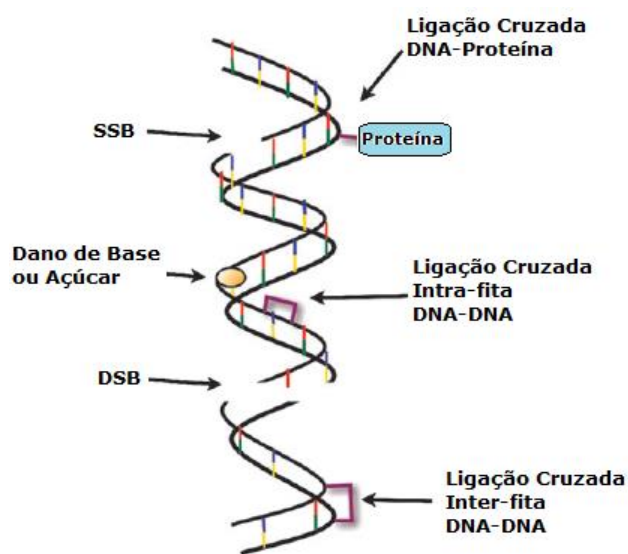


Figura 2. Danos induzidos no DNA pela radiação ionizante. (SSB, *single-strand break*; DSB, *double-strand break*) (Fonte: Kavanagh *et al.*, 2013).

Apesar da sua estabilidade físico-química inerente, o genoma somático está sujeito a danos que podem ser reparados ou conservados ao longo do tempo de vida celular. Para atender a esse desafio, as células desenvolveram mecanismos de manutenção dos seus telômeros, bem como, a existência de sobreposição de vias de reparo para neutralizar as modificações estruturais no DNA (Kamileri *et al.*, 2012).

Um cuidadoso equilíbrio deve ser mantido entre a reparação eficaz dos danos no DNA que conduzem a estabilidade genética e a sobrevivência da célula. A instabilidade genética ou genômica é a consequência de uma reparação defeituosa ou incompleta que resulta no desenvolvimento de doenças como o câncer, doenças hereditárias, entre outras (Kavanagh *et al.*, 2013).

O genoma dos mamíferos é protegido contra agentes genotóxicos por uma rede de resposta aos danos no DNA e esses mecanismos são acionados por

meio de sensores específicos na detecção das lesões no DNA. O passo seguinte é o início de um sinal de cascata de transdução, incluindo moléculas efetoras que ativam várias vias de proteção ao genoma, ou seja, vias ligadas aos reparos no DNA, controle do ciclo celular, apoptose, transcrição e remodelação da cromatina (Lagerwerf *et al.*, 2011).

2.3.1 Reparo por excisão de base

O reparo por excisão de bases (BER, *base excision repair*) é um mecanismo pelo qual as células reparam lesões de nucleotídeos derivadas de dano de base ocasionada por espécies reativas de oxigênio, por radiação, por produtos químicos genotóxicos, por desaminação espontânea ou por ocorrência natural de sítios desprovidos de bases (apirimidínicos e apurínicos – AP). Os sítios AP e de quebra de fita simples do DNA (SSB), que necessitam de processamento final, podem ser reparados por meio dessa via, uma vez que são formados como intermediários na via de BER (Xu *et al.*, 2008). O sistema de BER detecta, eficientemente, o dano de base dentre uma enorme quantidade de bases normais no DNA, remove-o e, por fim, restaura a base normal para a manutenção da integridade do genoma (Hitomi *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2008).

O BER ocorre, de maneira geral, em duas etapas: primeira, há o reconhecimento específico do dano e a sua excisão é realizada por glicosilase direcionadas para lesões de bases distintas; e em segunda etapa, há um reconhecimento do dano geral durante a produção dos produtos intermediários, em seguida, os sítios AP 3' terminal são processados por nucleases de estrutura específica, tais como FEN-1, seguida de síntese de reparo do DNA e de ligação (Hitomi *et al.*, 2007).

Comparando esse tipo de mecanismo de reparo de DNA como o reparo por excisão de nucleotídeos (NER, *nucleotide excision repair*) os sistemas BER são verticalmente bem conservados, de bactérias aos seres humanos. Nas células, no entanto, o BER atua em redes complexas de proteínas, que variam entre os diferentes tipos de organismos e que são dependentes de outras regulações metabólicas do DNA, incluindo a replicação e transcrição (Hitomi *et al.*, 2007).

2.3.2 Reparo por excisão de nucleotídeos

O sistema de reparo por excisão de nucleotídeos (NER, *nucleotide excision repair*) está envolvido na remoção de uma grande variedade de lesões que distorcem a hélice do DNA, tais como dímeros de pirimidina e de fotoprodutos que são produzidos pela exposição à luz ultravioleta, além das ligações cruzadas intracadeia (*intrastrand cross-links*). Mais de 30 proteínas estão envolvidas nesse sistema de reparo (Sugasaw *et al.*, 2001; Bergink *et al.*, 2006).

Defeitos no NER promovem a fotossensibilidade extrema e predisposição ao câncer de pele observada na síndrome Xeroderma Pigmentoso. Sete grupos de complementação do Xeroderma Pigmentoso foram identificados, o que representa genes XPA-G de reparações distintas (De Laat *et al.*, 1999; Bergink *et al.*, 2006).

A ocorrência do NER nos eucariotos envolve pelo menos duas subvias distintas: a reparação genômica global (GGR, *global genome repair*) e a reparação de transcrição acoplada (TCR, *transcription-coupled repair*). A subvia GGR pode operar em qualquer local no genoma, e a sua eficácia varia de acordo com o tipo de lesão, por exemplo, os fotoprodutos são eliminados do genoma

muito mais rápido do que os dímeros de pirimidina. Em contraste, a TCR remove especificamente lesões que bloqueiam RNA polimerases sobre as fitas de transcrição de genes ativos. Ao contrário do GGR, essa subvia elimina diferentes lesões em taxas similares e contribui para a rápida recuperação da atividade transcricional após o dano no DNA, garantindo a manutenção normal das funções celulares e de sua sobrevivência (Sugasaw *et al.*, 2001; Bergink *et al.*, 2006).

2.3.3 Reparação de DSBs

Existem três vias principais de reparo das DSBs: união de extremidades não-homólogas (NHEJ, *non-homologous end joining*), recombinação homóloga (HR, *homologous recombination*) (Figura 3) e anelamento de fita simples (SSA, *single-strand annealing*) (Taleei & Nikjoo, 2013).

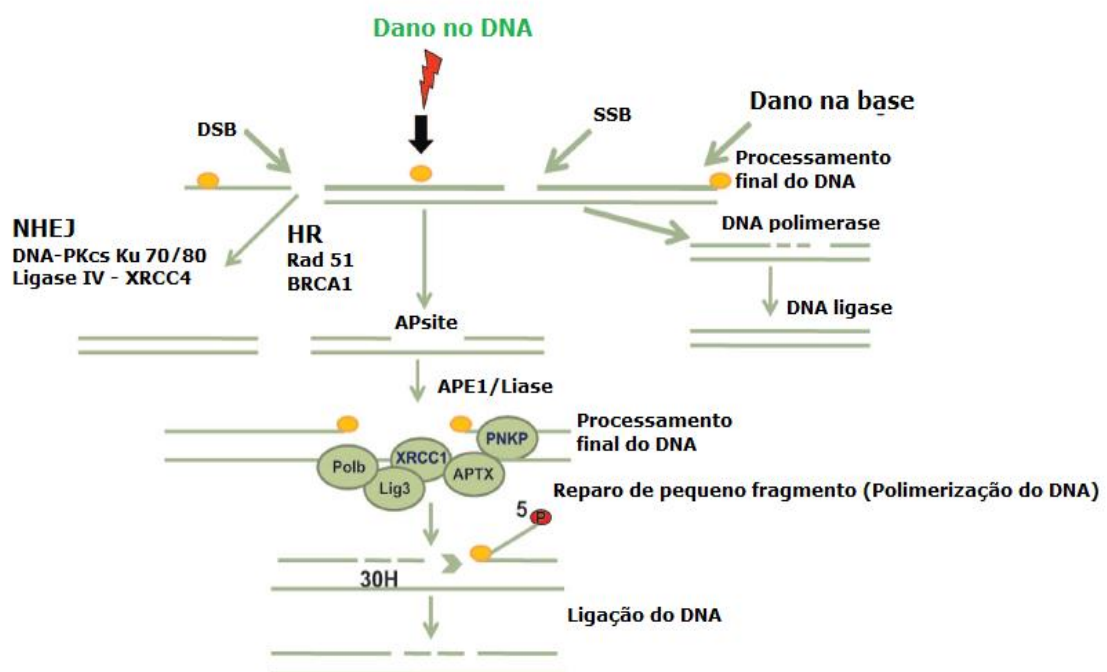


Figura 3. A exposição das células à radiação ionizante dá origem a DNA DSBs, SSBs e modificações de base. As DSBs são reparadas por NHEJ na fase G1 ou HR em fases S/G2 final. As SSBs são reparadas pela ligação do DNA se as extremidades 3'OH adjacente e o grupos 5'-fosfato forem geradas. Os sítios apurínico/apirimidínico são clivados por endonuclease (Ape1/lyase). Dano em cada extremidade requer processamento final e diferença de enchimento pela DNA polimerase β . (Fonte: Jeggo & Lavin, 2009).

Entre essas vias, a HR e a SSA são dependentes do ciclo celular e exigem a presença de sequências homólogas. Na verdade, a HR tem uma homologia mais exigente, o que está de acordo com o seu recurso de reparo mais conservado, com isso, oferece mais proteção ao genoma. As principais proteínas envolvidas no HR e nas vias de SSA são as MRE11/RAD50/NBS1 (MRN), a proteína de replicação A (RPA), proteínas da família Rad51, Rad52 e Rad54 e as proteínas de susceptibilidade ao câncer de mama (BRCA1 e BRCA2) (Taleei & Nikjoo, 2013).

Em princípio, a via SSA remove sequências de bases distorcidas (*overhanging*) e, por conseguinte, pode levar a grandes deleções. As distorções são criadas entre as sequências repetidas após o anelamento do DSB (Taleei & Nikjoo, 2013).

A NHEJ é a principal via de reparação em células de mamíferos e é ativa ao longo do ciclo celular. A via de reparo NHEJ emprega um grande conjunto de proteínas incluindo Ku70, Ku80, a proteína quinase DNA-dependente de subunidade catalítica (DNA-PKcs), a Artemis, a Polimerase λ , a Polimerase μ , a XRCC4 e a ligase IV (LIG IV). Os reparos via NHEJ conseguem agir em uma ampla variedade de DSBs com distintas estruturas de quebra e de sequências, sua atuação é predominantemente durante a fase G1 quando o reparo via HR não está disponível. Comparando a fidelidade genômica do reparo via HR com a via NHEJ, a fidelidade da via NHEJ é menor, já que utiliza pouco ou nenhum modelo homólogo que possa assegurar que a fita reparada reflita a sequência de DNA original. Da mesma forma que o processo de HR, a reparação via NHEJ segue um motivo básico: excisão da base danificada, repolimerização/reparo e ligação (Santivani & Xia, 2013; Taleei & Nikjoo, 2013).

2.4 Dosimetria biológica

A dosimetria biológica, que foi desenvolvida para confirmar a dosimetria física ou para avaliar a dose absorvida na ausência de outras medidas, é utilizada em eventos envolvendo radiação ionizante onde os seres humanos estejam presentes, como os acidentes nucleares e os radiológicos. Pode ser utilizada também nos casos de suspeitas de exposição à radiação ionizante que precisem de confirmação. Foi a partir dessas situações que surgiu a necessidade de estimar a dose absorvida pelo organismo desses indivíduos por intermédio de marcadores biológicos (IAEA, 2011).

Desde a década de 60, a análise de alterações cromossômicas radioinduzidas vem sendo utilizada na avaliação de dose absorvida. Atualmente, o ensaio de cromossomos dicêntricos é considerado o “padrão ouro” da biodosimetria e, com os avanços obtidos dessa técnica, é possível estabelecer a conversão da frequência (média) de dicêntricos observados em uma determinada dose absorvida (Di George *et al.*, 2011; IAEA, 2011).

Nos casos em que a dosimetria física não esteja disponível ou quando os valores obtidos forem duvidosos ou não informativos, a determinação da dose absorvida utilizando um método biológico é crítico, tornando-se um dado essencial que irá auxiliar os médicos na predição de quais serão as prováveis consequências para a saúde do indivíduo exposto e, com isso, qual o tratamento médico deverá ser adotado. Esse prognóstico pode ser feito tanto para os efeitos biológicos precoces, como as lesões de pele ou depleção hematopoiética quanto para os efeitos biológicos tardios, tais como ulcerações, fibrose, necrose, dentre outros (Di George *et al.*, 2011; Gruel *et al.*, 2013).

Foram desenvolvidos alguns ensaios citogenéticos e, atualmente, a aplicação de cada um desses métodos já está bem definida. Por exemplo, o estudo dos cromossomos dicêntricos é o método de escolha para exposições agudas, enquanto que a análise de translocação através da técnica de FISH (*Fluorescent in situ hybridization*) é mais apropriada para a exposição remota e crônica; o ensaio de anéis PCC (*Premature chromosome condensation*) é usado em situações de exposição à doses altas e o ensaio de micronúcleos, por ser mais rápido, tem a vantagem de ser usado como triagem nos casos de exposições de inúmeras pessoas (Vinnikov *et al.*, 2010).

Em 1960, Moorhead *et al.* publicaram um método que estimulava a divisão celular dos linfócitos periféricos em cultura celular e, por meio desse método, tornou-se possível a visualização dos cromossomos humanos a partir desse tipo celular. Aliado ao fato de que esse tipo celular é de fácil cultivo *in vitro* e de distribuição simples em lâminas, logo essas células se tornaram o principal método para avaliar as anormalidades no número e na estrutura dos cromossomos humanos. Com isso, as alterações cromossômicas observadas em culturas de linfócitos passaram a ser indicadoras de dano genético após exposição à radiação, tanto *in vitro* como *in vivo* (Lloyd *et al.*, 1977; Garcia-Sagredo, 2008).

2.4.1 Linfócitos humanos

Os linfócitos humanos são células que fazem parte de um complexo de defesa imunológica altamente eficiente que conferem imunidade, se destinando a reconhecer e eliminar os agentes infecciosos que entram em contato constantemente com o organismo humano. A fim de destruir o invasor, o

hospedeiro produz substâncias imunes, proporciona agentes tóxicos e citotóxicos especificamente para os antígenos de superfície do invasor (Zipfel, 2009).

A defesa imunológica adequada deve garantir que tais produtos imunes sejam precisamente orientados para a superfície do invasor e que haja a perfeita diferenciação entre os antígenos de superfícies do agente infeccioso e os antígenos próprios do hospedeiro, reconhecendo o invasor como estranhos e, ao mesmo tempo, garantindo que as próprias células do organismo (autocélulas) não sejam atacadas. A resposta imune do hospedeiro é formada, de maneira geral, pelo sistema imune inato (composto do sistema complemento e do sistema celular, formado pelos macrófagos e neutrófilos) e o pelo sistema imune adaptativo, composto pelos linfócitos T e B (Zipfel, 2009).

Os linfócitos são reconhecidos como células altamente sensíveis à radiação ionizante. Os linfócitos localizados em outras partes do corpo, como nos gânglios linfáticos, no timo, na medula óssea e no baço, também têm se mostrado radiosensíveis, contudo em diferentes graus. Em outras palavras, o tempo entre a irradiação e a manifestação do efeito é consideravelmente menor no caso dos linfócitos periféricos. É claro que essa diferença pode ser derivada dos diferentes métodos de avaliação dos danos radioinduzidos ou também devido à diferença na reação imediata das células expostas à radiação (Neff & Cassen, 1968).

Adultos saudáveis normalmente têm contagem de linfócitos na faixa de $1,5-4,0 \times 10^9$ / L de sangue total. No caso de irradiação com doses elevadas (alguns Gy), uma das reações determinísticas é a rápida redução do número de linfócitos (linfocitopenia) no sangue periférico. A linfocitopenia ocorre antes das outras formas de citopenias (granulocitopenia e trombocitopenia), dentro das primeiras 6-24 horas após uma exposição.

A principal vantagem de contar o número de linfócitos é a simplicidade do método. O tempo para contagem de linfócitos é inferior à uma hora na maioria dos laboratórios. A Tabela 1 mostra a relação entre a dose absorvida e a contagem de linfócitos esperada para cada estágio da síndrome aguda da radiação (Lee, 2011).

Tabela 1. Relação entre a contagem absoluta de linfócitos e a dose absorvida após a exposição (IAEA & WHO, 1998 apud Lee, 2011). (ARS, *Acute Radiation Syndrome*).

Síndrome da Radiação Aguda (ARS)	Dose absorvida (Gy)	Número de linfócitos (por μL de sangue total)
Sem sintoma	0,1 – 1,0	1.500 – 2.500
Suave	1,0 – 2,0	700 – 1.500
Moderado	2,0 – 4,0	500 – 800
Severo	4,0 – 6,0	300 – 500
Muito severo	6,0 – 8,0	100 – 300
Letal	> 8,0	0 – 50

Os linfócitos são o objeto da dosimetria citogenética por serem as células mais radiossensíveis dentre as células sanguíneas, representando uma população celular na fase de pré-síntese de DNA do ciclo celular (fase G0) e, em indivíduo saudável, raramente essas células estão em mitose no sangue periférico. Esse tipo celular tem uma vida média de três anos, entretanto, o seu tráfico e sua substituição podem ser afetados em ocorrência de apoptose de células linfáticas após uma exposição à radiação ionizante (Léonard *et al.*, 2005).

2.4.2 Dosimetria Citogenética

A exposição à radiação ionizante provoca quebras no DNA de células vivas. Durante a reparação de quebras nas cadeias de DNA, a reparação incorreta (*misrepair*) de dois cromossomos e replicação do cromossomo anormal podem levar à formação de um cromossomo dicêntrico (Figura 4A), considerado

uma alteração instável ou não balanceada, onde um único cromossomo contém dois centrômeros. Embora a radiação seja capaz de induzir diversos tipos de alterações cromossômicas além dos dicêntricos, esse biomarcador é considerado o mais sensível e específico para a avaliação da radiação em dose absorvida, mesmo em doses baixas (~100 mGy) (Lee *et al.*, 2012; Wong *et al.*, 2013).

As mais típicas alterações cromossômicas instáveis radioinduzidas, além dos dicêntricos, são: o cromossomo em anel (Figura 4B), formado por duas quebras em cada um dos braços de um mesmo cromossomo, com a posterior ligação entre as duas extremidades formadas e acompanhadas por um fragmento associado; e os fragmentos acêntricos isolados (Figura 4C), que podem ser deleções cromossômicas terminais ou intersticiais de tamanhos variados (Lloyd & Dolphin, 1977; IAEA, 2011; Roy *et al.*, 2012).

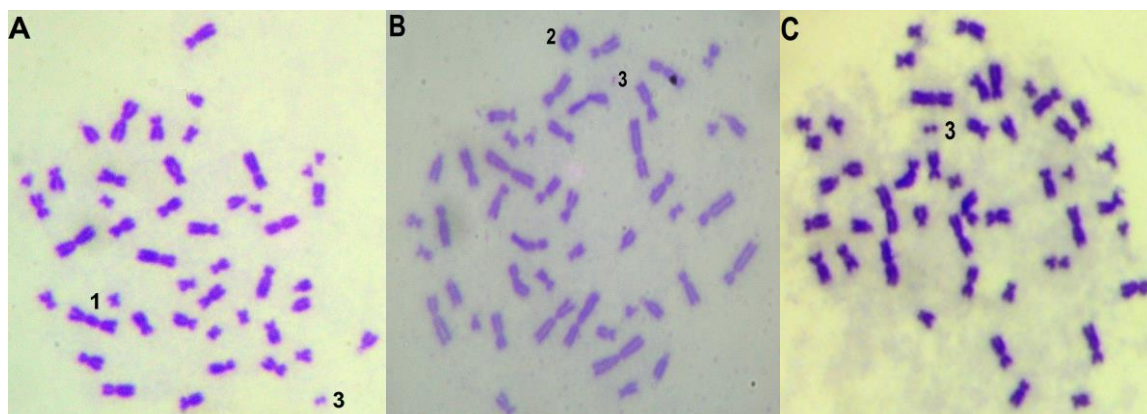


Figura 4. Fotografias de células metafásicas com alterações cromossômicas. **A.** Presença de dicêntrico (1) e seu fragmento associado (3); **B.** Presença de cromossomo em anel (2) e seu fragmento associado (3); **C.** Presença de um fragmento acêntrico isolado (3) (Fonte: Própria)

Alguns laboratórios de dosimetria biológica que utilizam a técnica citogenética somam a avaliação de dicêntricos com os cromossomos em anel, mesmo assim, o dicêntrico é o principal biomarcador para os danos cromossômicos, por ser quase exclusivamente específico à radiação com pouca

diferença no *background* radioativo e pouca variação interindividual (Wong *et al.*, 2013).

A análise das alterações é feito em linfócitos circulantes e convertido em dose absorvida usando curvas de calibração dose-resposta previamente estabelecidas. Cada ponto da curva de calibração representa uma média da dose absorvida pelos linfócitos irradiados. Isso é aproximado para uma média de dose de corpo inteiro considerando que os linfócitos são amplamente móveis e distribuídos pelo corpo. Uma vez a curva gerada e estabelecida, é possível estimar a dose absorvida pelo organismo do indivíduo exposto à radiação ionizante (IAEA, 2001; Roy *et al.*, 2012).

2.4.3 Curva de calibração dose-resposta

As curvas de calibração foram desenvolvidas com o intuito de representar matematicamente a quantidade de dose absorvida pelo organismo humano em relação ao número (ou resposta) de alterações cromossômicas presentes nos linfócitos provenientes do sangue periférico humano. As primeiras curvas construídas *in vitro* com a finalidade de proteção radiológica foram estabelecidas no laboratório NRPB (Lloyd *et al.*, 1975, 1976) para raios X (250 kV), radiação γ de fonte de cobalto-60 e nêutrons (Figura 5). Os dados sobre a produção das alterações (Y) obtidas nesse laboratório foram mostrada representando uma função matemática da forma: $Y = C + \alpha D + \beta D^2$ para radiação de baixa LET (raios X e radiação γ), onde α e β 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. Entretanto, para a

radiação de alta LET (nêutrons), o coeficiente α torna-se maior e, eventualmente, o coeficiente β torna-se biologicamente menos relevante, onde a curva é aproximada pela função linear $Y = C + \alpha D$ (Figura 5) (Lloyd & Dolphin, 1977; IAEA, 2011).

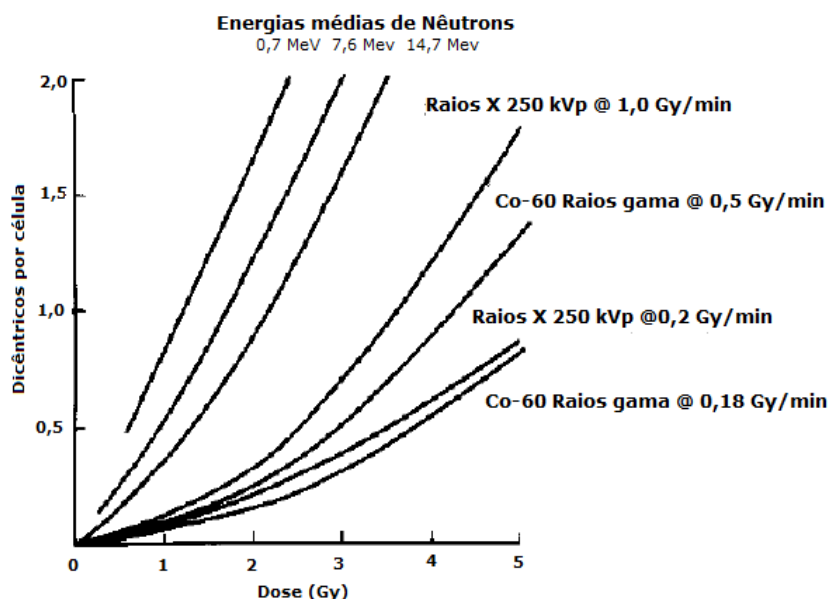


Figura 5. Curvas de calibração construídas *in vitro* com diferentes qualidades de radiação. @ - Taxa de dose absorvida. (Fonte: Lloyd & Purrott, 1981).

Essas funções determinam fisicamente que a produção de algumas alterações cromossômicas é proporcional à dose, no caso do coeficiente linear (αD), sendo predominantemente devido às interações únicas da radiação ionizante, o coeficiente α está relacionado com as exposições à radiação em doses absorvidas baixas. Outras alterações podem ser formadas por duas interações separadas com rendimentos proporcionais ao quadrado da dose, representando o coeficiente quadrático (βD^2), já esse coeficiente está relacionado com as exposições à radiação com doses absorvidas mais elevadas.

A formação do cromossomo dicêntrico requer a ocorrência de duas lesões, podendo ser produzido por uma ou por duas interações, enquanto que os

fragmentos isolados podem ser formados por uma ou duas lesões. A razão entre os coeficientes α/β representa a dose absorvida na qual a produção das alterações cromossômicas produzidas por eventos únicos ou por duas interações têm o mesmo peso (Lloyd & Dolphin, 1977; Coskun *et al.*, 2000; IAEA, 2011).

O coeficiente α é independente do tempo de irradiação, enquanto o coeficiente β é dependente, isso implica que o componente β é potencialmente susceptível a taxa de dose absorvida ou ao efeito de fracionamento de dose (Countryman & Heddle, 1976 apud Acharya *et al.*, 2009). No entanto, a dose absorvida, a fluência da partícula, a energia da radiação utilizada e a forma como a energia foi depositada podem afetar tanto o coeficiente α como o coeficiente β das curvas dose-resposta (Acharya *et al.*, 2009).

Para o estabelecimento da curva de calibração quando se trata de radiação de baixa LET, se faz necessário o estudo de, no mínimo, 10 doses absorvidas diferentes, onde quatro delas devem ser distribuídas entre as doses 0,25-1 Gy, é desejável, ao menos, uma dose abaixo de 0,25 Gy e as outras cinco doses deve ser distribuída entre 1-5 Gy. No caso de curvas de calibração para radiações de alta LET, a dose máxima necessária é 2 Gy (Lee, 2011; IAEA, 2011).

Todos os pontos² da curva, ou seja, todos os dados obtidos devem ser testados para avaliar sua conformidade com o modelo de distribuição de Poisson, esse modelo foi proposto para radiação de baixa LET, isso é normalmente feito pelo teste u de *Papworth* (1970). Esse teste utiliza a unidade normalizada do índice de dispersão σ^2/y (σ^2 , variância e y , média), os valores de u que devem ser calculados conforme as equações 1, 2 e 3 (IAEA, 2011).

² Cada ponto da curva é o representativo de uma dose absorvida.

$$y = X/N \quad (1)$$

$$\sigma^2 = \frac{(0-y)^2 N_0 + (1-y)^2 N_1 + (2-y)^2 N_2 + \dots + (i-y)^2 N_i}{(N_0 + N_1 + N_2 + \dots + N_i) - 1} \quad (2)$$

$$u = (\sigma^2 / y - 1) \sqrt{\frac{N-1}{2(1 - 1/X)}} \quad (3)$$

onde, N₀, N₁, N₂, ... N_i referem-se ao número de células com 0, 1, 2, ..., i alterações (dicêntricos), N significa número total de células analisadas e X o número total de alterações (dicêntricos) (Acharya *et al.*, 2009; IAEA, 2011).

O índice de dispersão igual a um é obtido quando a variância é igual à média, conseqüentemente o valor calculado de *u* será igual à zero, com isso, a distribuição de Poisson será dita como perfeita. Os valores calculados de *u* acima de zero indicam um sobredispersão e valores calculados abaixo de zero indicam uma subdispersão, já os valores calculados de *u* fora do intervalo de $\pm 1,96$ indicam dispersão significativa com nível de confiança de 95% (Acharya *et al.*, 2009; IAEA, 2011).

O teste de homogeneidade de chi-quadrado (X^2 , *Chi Squared Homogeneity Test*) deve ser usado para analisar se os dados observados são estatisticamente diferentes dos esperados. O ideal é que não haja diferença estatística entre os dados, pois um valor de X^2 diferente significativamente do valor de X^2 esperado para um determinado grau de liberdade indica que não houve um bom ajuste das curvas; sendo necessário, então, que o valor de *p* esteja acima de 0,05, indicando que não há diferença entre os dados observados e os dados esperados.

Além disso, os coeficientes α e β também devem ser testados individualmente por meio do teste T , teste Z ou pelo teste F que avalia a relação de cada coeficiente com seus respectivos desvios padrões (DP) (IAEA, 2011).

Em geral, existem três abordagens em relação ao controle ou ponto zero Gy da curva de calibração: (1) esse ponto de dose absorvida é incluído no procedimento de ajuste da curva, (2) o ponto de dose zero Gy é ignorado ou (3) o ponto de dose zero Gy é representado no procedimento de ajuste de curva como um valor de *background* normal já estabelecido (~0,5-1,0 dicêntricos por 1000 células) (IAEA, 2011).

3. Objetivos

3.1 Geral

Verificar as frequências das alterações cromossômicas instáveis em linfócitos do sangue humano irradiado com diferentes doses absorvidas em feixe gama.

3.2 Específicos

1. Analisar as alterações cromossômicas em linfócitos humanos após exposição à radiação gama;
2. Estudar a distribuição intercelular das alterações cromossômicas instáveis para cada dose absorvida;
3. Estabelecer curvas dose-resposta para os diferentes tipos de alterações cromossômicas instáveis (os dicêntricos, os dicêntricos somados aos anéis e os fragmentos acêntricos isolados).

4. Material e Métodos

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Dosimetria Biológica do Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste – CRCN-NE, aprovado pelo Comitê de Ética do CCS (Centro de Ciências da Saúde) da Universidade Federal de Pernambuco (Anexo 1).

4.1 Seleção de doador e coleta de amostras

Foi selecionado um doador saudável e não fumante, tendo sido realizada uma anamnese por meio de um questionário com intuito de verificar se nos últimos seis meses antes da coleta o voluntário não foi exposto à radiação terapêutica, raios X diagnóstico, vacinação viral ou consumiu drogas ilícitas (Gajendiran *et al.*, 2001).

Após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2), foram coletadas amostras de sangue periférico (10 ml) por punção venosa, em seringas estéreis descartáveis contendo heparina sódica na concentração de 5000 U/ml. Foram utilizadas amostras de um único voluntário, visto que o número total de células avaliadas foi elevado, considerando que os dicêntricos são específicos para radiação e que o valor de background já foi estabelecido (0,5 – 1,0 dicêntrico por 1000 células) (IAEA, 2011).

4.2 Irradiação das amostras

Cada amostra de sangue foi separada em duas alíquotas de 5 ml, sendo uma considerada controle (não irradiada) e mantida à temperatura ambiente do laboratório (20 - 22 °C), e a outra alíquota, considerada amostra irradiada. As

amostras irradiadas foram exposta a uma fonte de ^{60}Co (irradiador Gammacel 220) localizada no Departamento de Energia Nuclear (DEN-UFPE) (temperatura da sala de $\sim 22^\circ\text{C}$) com taxas de KERMA no ar de 3,277 a 2,906 Gy/h com incerteza de 2% no ponto de irradiação (22.08.12 a 03.07.13). Uma barreira de polietileno de 4 mm foi utilizada para assegurar o equilíbrio eletrônico das amostras irradiadas.

O fator de conversão da unidade KERMA no ar para dose absorvida em tecido mole é a razão entre os coeficientes de massa de absorção de energia. Numericamente, isso foi obtido pela multiplicação do valor de KERMA no ar por 1,10 para raios γ de fontes de ^{60}Co . Há também uma diferença entre os fatores de conversão de tecidos moles para o sangue, entretanto, para radiações de baixa LET essa diferença é desprezível (IAEA, 2011). Na Tabela 2 estão relacionadas as doses absorvidas, as taxas de dose absorvida, os tempos de exposição e as datas de exposição de cada amostra.

Tabela 2. Amostras de sangue irradiadas com suas respectivas doses absorvidas, taxa de dose absorvida, tempo e data de exposição.

Amostra	Dose (Gy)	Taxa de dose absorvida (Gy.h^{-1})	Tempo de Exposição	Data de Exposição
1	0,15	2,906	2 min 49 s	03/07/13
2	0,253	3,136	4 min 24 s	12/12/12
3	0,51	3,277	8 min 30 s	22/08/12
4	0,77	3,277	12 min 50 s	22/08/12
5	1,0	3,102	17 min 35 s	21/01/13
6	1,5	3,036	27min 4 s	25/03/13
7	2,0	2,970	36 min 46 s	08/05/13
8	3,0	2,937	55 min 46 s	10/06/13
9	4,0	2,906	1h 15 min	01/07/13
10	5,0	2,906	1h 33 min 56 s	03/07/13

4.3 Cultivo de células e preparação das lâminas

Antes do início do cultivo celular, as amostras irradiadas e controle permaneceram na estufa a 37°C , por 2 horas, tempo necessário para que os

mecanismos de reparação celular pudessem atuar, sendo esse um procedimento indicado para construções de curvas de calibração *in vitro* (IAEA, 2011).

As preparações citológicas para as análises cromossômicas foram obtidas a partir de cultura de linfócitos, onde foram adicionados 4 ml de meio RPMI 1640 (Sigma - Aldrich) suplementado com 1 ml de soro bovino fetal (Biological Industries), 0,2 ml de fitohemaglutinina (Sigma - Aldrich) e 0,5 ml de sangue total nos frascos de cultura. Em seguida, os frascos foram mantidos na estufa a 37 °C, por 48 horas. Após 46 horas, foi adicionado aos frascos 0,1 ml de colchicina na concentração de 0,0016% (Sigma - Aldrich).

Ao completar 48 horas de cultivo, o material foi centrifugado por 6 minutos a 1800 rpm, o sobrenadante foi desprezado e foi realizado o choque hipotônico adicionando 8 ml de KCl previamente aquecido a 37 °C e em seguida os tubos foram colocados em banho-maria a 37 °C por 20 minutos. Ao término, 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 das lâminas, foram realizadas centrifugações e trocas de fixador para que o conteúdo da cultura estivesse transparente.

Após o processo de fixação foram confeccionadas lâminas a partir do precipitado de células ressuspenso em 0,5 – 0,75 ml de solução fixadora. O precipitado de células ressuspenso foi gotejado em dois pontos em cada lâmina e essas foram colocadas para secar a temperatura ambiente durante 24 h. Em seguida, as lâminas foram coradas com Giemsa a 5 % durante 7 min para posterior análise cromossômica.

4.4 Análise Microscópica

A contagem de alterações cromossômicas foi realizada diretamente no microscópio óptico (Leica DM 500). As lâminas foram examinadas na sua totalidade e ao menos 1000 células viáveis foram contadas por cada amostra irradiada e 500 para cada amostra controle. Entende-se por viáveis aquelas células que não mostraram nenhuma sobreposição de cromossomos e com 46 centrômeros. Foram contabilizadas as alterações cromossômicas instáveis mais comuns: os cromossomos dicêntricos, os fragmentos isolados e os cromossomos em anel (Figura 6). Vale ressaltar que a partir da dose absorvida de 2 Gy as amostras irradiadas foram analisadas até atingir à contagem de 100 dicêntricos (AIEA, 2011). E para cada dose absorvida estudada, dois investigadores analisaram independentemente metade do total de células.

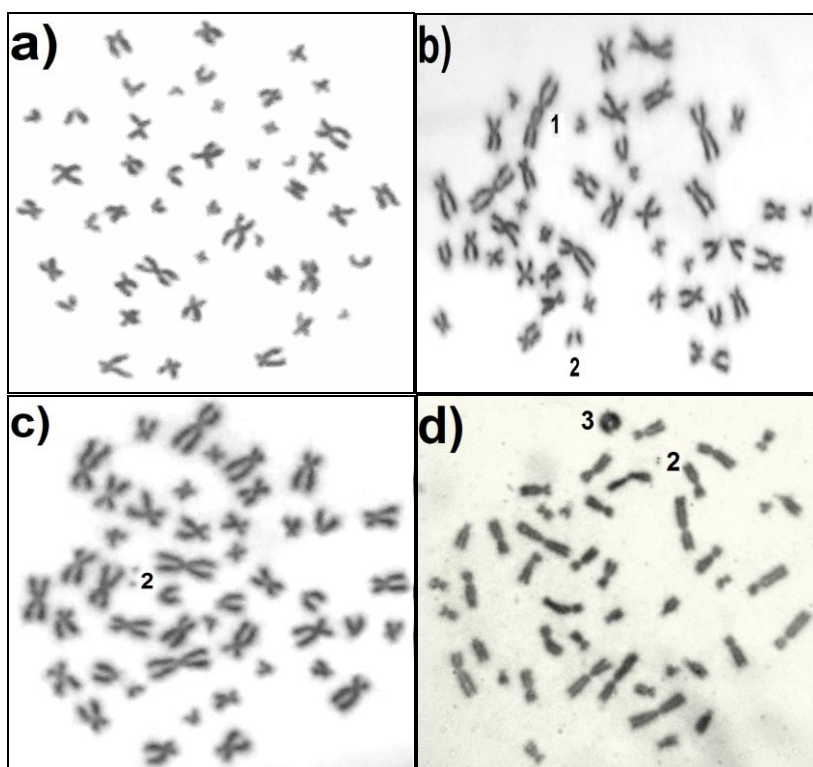


Figura 6. Metáfases mitóticas viáveis e com diferentes alterações cromossômicas instáveis. a) Metáfase normal com 46 centrômeros; b) Metáfase com a presença de um dicêntrico (1) mais um fragmento associado (2); c) Metáfase com um fragmento acêntrico isolado (2); d) Metáfase com um cromossomo em anel (3) mais seu fragmento associado (2). (Fonte própria).

4.5 Análise dos dados

Ao término da contagem das células e das alterações cromossômicas, tanto das amostras irradiadas quanto dos controles, foram realizados cálculos para a verificação do comportamento das alterações cromossômicas frente ao modelo proposto na literatura para radiações de baixa LET, onde as curvas de calibração dose-resposta devem ser ajustadas baseando-se na distribuição de Poisson.

Ao estabelecer a média e a variância de cada amostra foi possível calcular os seus respectivos índices de dispersão e todos os pontos foram testados para avaliar sua conformidade ao modelo de Poisson, sendo empregado o teste u de *Papworth* (Acharya *et al.*, 2009; IAEA, 2011).

Com o auxílio dos programas de ajuste de curvas, o CABAS (Deperas *et al.*, 2007), o Dose Estimate (Ainsbury & Lloyd, 2010) e o Programa R (R development core team, 2012), foram obtidas as curvas de calibração dose-resposta para radiação de baixa LET, sendo determinados os coeficientes (C , α e β) das funções quadráticas e, por conseguinte, foram estabelecidas as razões entre os coeficientes α/β . Vale ressaltar que o objetivo de estudar os três programas foi avaliar as vantagens e as desvantagens de cada um.

Para avaliar se os dados encontrados não diferem estatisticamente dos dados esperados foi preciso utilizar o teste de homogeneidade de chi-quadrado (X^2 , *Chi Squared Homogeneity Test*). Para isso os valores de X^2 devem ser próximos significativamente aos valores de X^2 esperados para os respectivos graus de liberdade, indicando, assim, um bom ajuste da curva de calibração ($p > 0,05$). Além disso, os coeficientes α e β também foram testados individualmente através do teste Z e T nos programas Dose Estimate e Programa

R, respectivamente. Nesse caso, o valor de p deve estar abaixo de 0,05 ao nível de confiança de 95%. Com o programa R foi possível trabalhar os dados com duas formas de ajustes de curva: (1) o índice de dispersão (σ^2/y) de cada dose absorvida foi considerado e (2) o índice dispersão foi considerado igual a 1 para todas as doses absorvidas.

Foram utilizadas também duas abordagens em relação ao controle (*background*) ou ponto zero Gy na obtenção dos coeficientes das curvas: (1) a dose zero Gy foi incluída como o somatório das frequências encontradas nas amostras controle e (2) a dose zero Gy foi ignorada nos procedimentos de ajuste de curva.

5. Resultados

Nesse trabalho o número total de células metafásicas viáveis analisadas foi de 12.860 (Tabela 3), sendo 4.900 para o grupo controle³ e 7.960 para o grupo irradiado com 10 diferentes doses absorvidas (Gy).

Ao analisar as amostras controles, observou-se que a frequência de dicêntricos foi menor (0-0,008 dicêntrico/célula) em relação às respectivas amostras irradiadas (Tabela 4 e 5). A amostra controle da dose 2 Gy apresentou a maior frequência de dicêntricos (0,008 dicêntricos/célula), no entanto, essa frequência de dicêntricos apresentou-se cerca de 20 vezes menor quando comparada com a respectiva amostra irradiada. As frequências de fragmentos isolados foram mais elevadas do que as frequências de dicêntricos nas amostras controles e os cromossomos em anel não foram visualizados nestas amostras (Tabela 3 e 4). Com a ausência dos anéis, a frequência de dicêntricos somados aos anéis (dicêntricos + anéis) foi igual à frequência de dicêntricos (Tabela 4).

Os números totais de células e de alterações cromossômicas analisados nas amostras controles foram somados⁴ para determinar o *background*, com isso, o somatório passou a representar a dose zero Gy (Tabela 5). As frequências de dicêntricos e de fragmentos isolados da dose zero Gy apresentaram-se menores do que as respectivas frequências da menor dose absorvida (0,15 Gy).

³ A amostra controle referente à dose 0,15 Gy foi a mesma da dose 5 Gy, pois as amostras sanguíneas foram coletadas no mesmo dia para a realização das duas irradiações, logo, foi utilizado o mesmo controle para ambas as doses absorvidas.

⁴ O número de células e o número de alterações cromossômicas da amostra controle referente à dose 0,15 Gy não entraram no somatório das amostras controle, tendo em vista que foi a mesma amostra controle para a dose 5 Gy.

Tabela 3. Número de alterações cromossômicas instáveis nas amostras irradiada com diferentes doses absorvidas (Gy) e suas respectivas amostras controle. (^a. Amostra controle; ^b. Amostra Irradiada; ¹. Baixo crescimento celular; *. Mesmo controle da dose 5 Gy).

Alterações Cromossômicas	Doses Absorvidas (Gy)																			
	0,15		0,25		0,51		0,77		1,0		1,5		2,0		3,0		4,0		5,0	
	C ^{a*}	I ^b	C ^a	I ^b	C ^a	I ^b	C ^a	I ^b	C ^a	I ^b	C ^a	I ^b	C ^a	I ^b	C ^a	I ^b	C ^a	I ^b	C ^a	I ^b
Dicêntricos	2	10	0	7	2	18	1	37	0	59	0	80	4	95	1	100	2	104	2	112
Anéis	0	0	0	0	0	1	0	3	0	11	0	8	0	8	0	3	0	4	0	12
Dicêntricos + Anéis	2	10	0	7	2	19	1	40	0	70	0	88	4	103	1	103	2	108	2	124
Fragmentos	12	99	11	37	17	54	15	63	12	86	10	144	22	90	19	68	16	60	12	114
Total de Células	502	2029	500	1004	1000	1006	501	1000	385 ¹	1000	510	1000	483	483	500	222	519	136	502	80

Tabela 4. Frequências (médias) obtidas das diferentes alterações cromossômicas nas amostras controle referentes a cada dose absorvida. (¹. Baixo crescimento celular;*. Mesmo controle da dose 5 Gy).

Controles	Total de Células	Dicêntricos	Anéis	Dicêntricos + Anéis	Fragmentos
0,15 ²	502	0,004	0,0	0,004	0,024
0,25	500	0,0	0,0	0,0	0,022
0,51	1000	0,002	0,0	0,002	0,017
0,77	501	0,002	0,0	0,002	0,030
1,0	385 ¹	0,0	0,0	0,0	0,031
1,5	510	0,0	0,0	0,0	0,020
2,0	483	0,008	0,0	0,008	0,046
3,0	500	0,002	0,0	0,002	0,038
4,0	519	0,004	0,0	0,004	0,031
5,0	502	0,004	0,0	0,004	0,024

Tabela 5. Frequências (médias) obtidas das diferentes alterações cromossômicas em relação à dose absorvida. (*. Somatório das amostras controles).

Dose (Gy)	Total de Células	Dicêntricos	Anéis	Dicêntricos + Anéis	Fragmentos
0,0*	4900	0,002	0,0	0,002	0,027
0,15	2029	0,005	0,0	0,005	0,049
0,25	1004	0,007	0,0	0,007	0,037
0,51	1006	0,018	0,001	0,019	0,054
0,77	1000	0,037	0,003	0,040	0,063
1,0	1000	0,059	0,011	0,070	0,086
1,5	1000	0,080	0,008	0,088	0,144
2,0	483	0,197	0,017	0,213	0,186
3,0	222	0,450	0,014	0,464	0,306
4,0	136	0,765	0,025	0,794	0,441
5,0	80	1,4	0,15	1,55	1,425

As amostras irradiadas apresentaram, de maneira geral, frequências de dicêntricos e de fragmentos isolados elevadas com o aumento dos valores de dose absorvida (Tabela 5). Os cromossomos em anel só foram observados a partir da dose absorvida 0,51 Gy e também foi observado o aumento das frequências de anéis em relação à dose absorvida, exceto nas doses 1,5 e 3,0 Gy (Tabela 5). Contudo, ao somar o número de dicêntricos + anéis, as frequências das doses 1,5 e 3,0 Gy seguiram a normalidade esperada: maior dose absorvida – maior frequência de alterações cromossômicas.

Em seguida, foram estudadas as distribuições intercelulares de dicêntricos, de dicêntricos + anéis e de fragmentos isolados para cada valor de dose absorvida. Com o aumento das doses absorvida foi observado a presença de células com mais de uma alteração cromossômica. Ao determinar o número dessas células, tornou possível o cálculo do índice de dispersão (σ^2/y) e do valor de u de cada amostra (Tabela 6).

Tabela 6. Distribuições intercelulares de dicêntricos, dicêntricos + anéis e de fragmentos isolados com suas respectivas frequências (médias), índices de dispersão e valores de u . (*. Somatório das amostras controles; ¹. Células com zero ou mais alterações cromossômicas; σ^2 - variância; y – média; σ^2/y – índice de dispersão).

Dose (Gy)	Total de Células	Alteração Cromossômica	y	0	1	2	3	4	5	6	7	σ^2/y	u
Dicêntricos													
0,0*	4900	12	0,002	4888	12							0,998	-0,116
0,15	2029	10	0,005	2019	10							0,996	-0,149
0,25	1004	7	0,007	997	7							0,994	-0,145
0,51	1006	18	0,018	988	18							0,983	-0,390
0,77	1000	37	0,037	963	37							0,964	-0,816
1,0	1000	59	0,059	941	59							0,942	-1,309
1,5	1000	80	0,080	923	74	3						0,996	-0,090
2,0	483	95	0,197	397	77	9						0,995	-0,080
3,0	222	100	0,450	134	76	12						0,793	-2,186
4,0	136	104	0,765	61	54	15	4	2				0,993	-0,061
5,0	80	112	1,4	19	30	19	6	4	2			1,060	0,377
Dicêntricos + Anéis													
0,0*	4900	12	0,002	4888	12							0,998	-0,116
0,15	2029	10	0,005	2019	10							0,996	-0,149
0,25	1004	7	0,007	997	7							0,994	-0,145
0,51	1006	19	0,019	987	19							0,982	-0,412
0,77	1000	40	0,040	960	40							0,961	-0,884
1,0	1000	70	0,070	931	68	1						0,960	-0,910
1,5	1000	88	0,088	916	80	4						1,004	0,088
2,0	483	103	0,213	390	83	10						0,989	-0,179
3,0	222	103	0,464	132	77	13						0,792	-2,197
4,0	136	108	0,794	57	58	15	4	2				0,929	-0,582
5,0	80	124	1,55	14	31	20	9	4	2			0,929	-0,446
Fragmentos													
0,0*	4900	134	0,027	4766	134							0,973	-1,339
0,15	2029	99	0,049	1930	99							0,952	-1,539
0,25	1004	37	0,037	967	37							0,964	-0,815
0,51	1006	54	0,054	954	50	2						1,021	0,484
0,77	1000	63	0,063	942	53	5						1,097	2,181
1,0	1000	86	0,086	921	72	7						1,078	1,751
1,5	1000	144	0,144	875	106	19						1,121	2,714
2,0	483	90	0,187	401	74	8						0,993	-0,101
3,0	222	68	0,306	164	48	10						0,992	-0,082
4,0	136	60	0,441	88	39	7	1	1				1,100	0,831
5,0	80	114	1,425	30	16	15	14	1	3	0	1	1,595	3,756

No estudo da distribuição intercelular de dicêntricos foi observada uma tendência a subdispersão desse tipo de alteração cromossômica, as variâncias não excederam as respectivas médias, a exceção ficou por conta da dose 5 Gy

que apresentou o valor do índice de dispersão maior que um (valor da variância maior que a média), então, nessa amostra, os dicêntricos tiveram um comportamento de sobredispersão. Para todas as doses absorvidas, os valores de u estavam dentro do intervalo esperado de $\pm 1,96$ no nível de confiança de 95%, logo, os valores obtidos de u não foram significativos, pois esses valores tenderam a valores próximos de zero. Entretanto, a dose 3 Gy apresentou subdispersão significativa ($u < -1,96$).

Na distribuição de dicêntricos + anéis também foi observado o comportamento de subdispersão dessas alterações cromossômicas (Tabela 6), no entanto, nesse caso, a dose de 5 Gy apresentou subdispersão e a dose 1,5 Gy passou para sobredispersão. Novamente, os valores de u apresentaram-se dentro do intervalo de $\pm 1,96$ e a amostra de 3 Gy permaneceu com subdispersão significativa.

Analisando a distribuição dos fragmentos isolados, observam-se doses absorvidas com subdispersão (doses 0; 0,15; 0,25; 2 e 3 Gy) e com sobredispersão (doses 0,51; 0,77; 1; 1,5; 4 e 5 Gy) (Tabela 6). Os valores de u obtidos em cada dose absorvida apresentaram-se distantes de zero. As distribuições desse tipo de alteração cromossômica apresentaram o comportamento de sobredispersão significativo ($u > 1,96$) nas doses 0,77, 1,5 e 5,0 Gy.

Os coeficientes C , α e β das curvas de dicêntricos na presença do controle (zero Gy) obtidos pelo programa R com as duas abordagens (R1' e R2') tiveram valores próximos (Tabela 7) e esses valores também foram próximos os valores do programa Dose Estimate e o CABAS. Essas proximidades de valores obtidos

pelo o programa R (R1' e R2') e entre os três programas também foi visualizado comparando os valores dos coeficientes das curvas de dicêntricos + anéis.

Nas curvas quadráticas de fragmentos isolados observou-se que os valores dos coeficientes determinados pelo programa R1' e o Dose Estimate foram próximos (Tabela 7), entretanto, diferem dos valores obtidos pelo programa R2' e o CABAS. Essa melhor aproximação dos valores dos coeficientes entre o programa R1' e o Dose Estimate pode ser visualizado também nas curvas lineares de fragmentos isolados.

Tabela 7. Coeficientes das curvas de calibração com seus respectivos valores de desvio padrão, de χ^2 e de valor de p obtidos pelo programa R, Dose Estimate e CABAS na presença do controle (zero Gy). (1'. levado em consideração a dispersão real de cada ponto; 2'. todos os ponto a dispersão foi considerada igual a 1; *. Curvas ajustadas para a função linear; GL. Grau de liberdade).

Curvas de calibração	C $\pm$ DP	α (Gy ⁻¹) $\pm$ DP	β (Gy ⁻²) $\pm$ DP	χ^2	GL	Valor do p
Dicêntricos						
Programa R1'	0,0027 $\pm$ 0,0007	0,0030 $\pm$ 0,0051	0,0470 $\pm$ 0,0032	15,29	8 ⁵	-
Programa R2'	0,0027 $\pm$ 0,0007	0,0028 $\pm$ 0,0052	0,0470 $\pm$ 0,0032	15,3	8	-
Dose Estimate	0,0027 $\pm$ 0,0009	0,0030 $\pm$ 0,0069	0,0470 $\pm$ 0,0043	14,4	8	p=0,768
CABAS	0,0027 $\pm$ 0,0007	0,0028 $\pm$ 0,0052	0,0470 $\pm$ 0,0032	14,44	8	-
Dicêntricos + Anéis						
Programa R1'	0,0026 $\pm$ 0,0007	0,0047 $\pm$ 0,0052	0,0503 $\pm$ 0,0032	18,81	8	-
Programa R2'	0,0026 $\pm$ 0,0007	0,0047 $\pm$ 0,0053	0,0502 $\pm$ 0,0034	18,39	8	-
Dose Estimate	0,0026 $\pm$ 0,0010	0,0047 $\pm$ 0,0079	0,0503 $\pm$ 0,0049	18,26	8	p=0,7548
CABAS	0,0026 $\pm$ 0,0007	0,0047 $\pm$ 0,0053	0,0502 $\pm$ 0,0034	17,82	8	-
Fragmentos						
Programa R1'	0,0311 $\pm$ 0,0022	0,0283 $\pm$ 0,0085	0,0275 $\pm$ 0,0040	35,13	8	-
Programa R2'	0,0315 $\pm$ 0,0022	0,0230 $\pm$ 0,0081	0,0312 $\pm$ 0,0038	43,2	8	-
Dose Estimate	0,0311 $\pm$ 0,0048	0,0282 $\pm$ 0,0187	0,0275 $\pm$ 0,0088	38,64	8	p<0,0001
CABAS	0,0316 $\pm$ 0,0022	0,0230 $\pm$ 0,0082	0,0312 $\pm$ 0,0038	46,76	8	-
Fragmentos*						
Programa R1'	0,0256 $\pm$ 0,0075	0,0862 $\pm$ 0,0173	-	96,4	9 ⁶	-
Programa R2'	0,0248 $\pm$ 0,0088	0,0911 $\pm$ 0,0201	-	135,4	9	-
Dose Estimate	0,0256 $\pm$ 0,0072	0,0863 $\pm$ 0,0174	-	132,5	9	p<0,0001

⁵ Valor de χ^2 para o nível de significância de 5% e com 8 graus de liberdade é 15,51.

⁶ Valor de χ^2 para o nível de significância de 5% e com 9 graus de liberdade é 16,92.

Os coeficientes obtidos das curvas de dicêntricos + anéis na presença do controle diferem dos mesmos coeficientes das curvas de dicêntricos também na presença do controle (Tabela 7), onde foi observado o aumento de aproximadamente 50% do valor do coeficiente α e 6% do coeficiente β . Já o coeficiente C diminuiu, cerca de 20%, ao contabilizar a presença de anéis nas células analisadas. Foram observados que nas curvas quadráticas de fragmentos isolados os valores dos coeficientes C e α diferem também dos coeficientes das curvas lineares.

Observa-se na Tabela 7 que as curvas dose-resposta de dicêntricos e de dicêntricos + anéis na presença do controle (zero Gy) se comportaram de acordo com a função quadrática, pois os valores de X^2 calculados foram próximo aos valores de X^2 tabelados para o referido grau de liberdade ($p > 0,05$). As curvas dose-resposta dos fragmentos isolados não foram bem ajustas, pois os valores de X^2 foram elevados para os dois tipos de função.

Os valores de p de cada coeficiente na presença do controle (zero Gy) estão dispostos na tabela 8, ressaltando que apenas o programa R e o Dose Estimate fazem os testes estatísticos para os coeficientes.

Os valores de p para todos os coeficientes C e β foram significativos ($p < 0,05$) nas curvas de dicêntricos, de dicêntricos + anéis e na curva quadrática de fragmentos isolados (Tabela 8) e o coeficiente C também foi significativo na curva linear de fragmentos isolados, exceto para o coeficiente determinado pelo programa R2'. Os coeficientes α só apresentaram significância ($p < 0,05$) nas curvas quadráticas e lineares de fragmentos isolados, com exceção da curva quadrática obtida pelo programa Dose Estimate (Tabela 8).

Tabela 8. Valores de p determinados pelo programa R e pelo Dose Estimate para cada coeficiente C, α e β nas curvas de calibração das diferentes alterações cromossômicas na presença do controle (zero Gy). (1°. levado em consideração a dispersão real de cada ponto; 2°. todos os ponto a dispersão foi considerada igual a 1; *. Curvas ajustadas para a função linear).

Valor de P	C	α	β
Dicêntricos			
Programa R1'	p<0,0001	p=0,5601	p<0,0001
Programa R2'	p<0,0001	p=0,5901	p<0,0001
Dose Estimate	p=0,0199	p=0,6750	p<0,0001
Dicêntricos + Anéis			
Programa R1'	p<0,0001	p=0,3741	p<0,0001
Programa R2'	p<0,0001	p=0,3814	p<0,0001
Dose Estimate	p=0,0362	p=0,5733	p<0,0001
Fragmentos			
Programa R1'	p<0,0001	p=0,0009	p<0,0001
Programa R2'	p<0,0001	p=0,0047	p<0,0001
Dose Estimate	p=0,0002	p=0,1703	p=0,0140
Fragmentos*			
Programa R1'	p=0,0075	p<0,0008	-
Programa R2'	p=0,204	p<0,0015	-
Dose Estimate	p=0,0063	p=0,0008	-

Na Tabela 9 estão dispostos os coeficientes determinados para as curvas de calibração na ausência do controle (zero Gy). Observa-se que as curvas de dicêntricos apresentaram coeficientes α com valores negativos e os valores de X^2 calculados estão próximos aos valores de X^2 tabelado para os referidos graus de liberdade, entretanto, o valor de p calculado apresentou-se um pouco acima de 0,05. Os valores de X^2 das curvas de dicêntricos + anéis não tiveram um bom ajuste (X^2 um pouco acima do esperado e p<0,05) apesar dos coeficientes α serem positivos.

As curvas quadráticas e lineares de fragmentos isolados na ausência do controle (zero Gy) também não tiveram bons ajustes (X^2 elevado e p<0,05) e os valores dos coeficientes α apresentaram-se negativos nas curvas lineares determinadas pelo programa R2' e pelo CABAS, isso demonstra novamente a

similaridade entre os programas R2' e o CABAS e entre os programas R1' e o Dose Estimate.

Tabela 9. Coeficientes das curvas de calibração com seus respectivos valores de desvio padrão, de χ^2 e de valor de p obtidos pelo programa R, Dose Estimate e CABAS na ausência do controle (zero Gy). (1'. levado em consideração a dispersão real de cada ponto; 2'. todos os ponto a dispersão foi considerada igual a 1; *. Curvas ajustadas para a função linear; GL. Grau de liberdade; DP. Desvio padrão).

Curvas de calibração	C $\pm$ DP	α (Gy ⁻¹) $\pm$ DP	β (Gy ⁻²) $\pm$ DP	χ^2	GL	Valor do p
Dicêntricos						
Programa R1'	0,0049 $\pm$ 0,0022	-0,0035 $\pm$ 0,0081	0,0493 $\pm$ 0,0040	14,15	7 ⁷	-
Programa R2'	0,0050 $\pm$ 0,0022	-0,0040 $\pm$ 0,0081	0,0495 $\pm$ 0,0040	14,09	7	-
Dose Estimate	0,0049 $\pm$ 0,0031	-0,0035 $\pm$ 0,0112	0,0493 $\pm$ 0,0055	13,46	7	p=0,0617
CABAS	0,0050 $\pm$ 0,0022	-0,0038 $\pm$ 0,0082	0,0494 $\pm$ 0,0040	13,52	7	-
Dicêntricos + Anéis						
Programa R1'	0,0041 $\pm$ 0,0022	0,0003 $\pm$ 0,0083	0,0519 $\pm$ 0,0040	18,3	7	-
Programa R2'	0,0041 $\pm$ 0,0022	0,0014 $\pm$ 0,0084	0,0518 $\pm$ 0,0042	17,88	7	-
Dose Estimate	0,0041 $\pm$ 0,0035	0,0002 $\pm$ 0,0132	0,0519 $\pm$ 0,0064	17,89	7	p=0,0125
CABAS	0,0042 $\pm$ 0,0023	0,0004 $\pm$ 0,0085	0,0517 $\pm$ 0,0042	17,49	7	-
Fragmentos						
Programa R1'	0,0433 $\pm$ 0,0050	0,0046 $\pm$ 0,0120	0,0344 $\pm$ 0,0048	25,77	7	-
Programa R2'	0,0344 $\pm$ 0,0048	-0,0011 $\pm$ 0,0115	0,0380 $\pm$ 0,0045	32,53	7	-
Dose Estimate	0,0433 $\pm$ 0,0098	0,0045 $\pm$ 0,0235	0,0345 $\pm$ 0,0094	26,86	7	p=0,0004
CABAS	0,0450 $\pm$ 0,0051	-0,0017 $\pm$ 0,0115	0,0381 $\pm$ 0,0045	33,06	7	-
Fragmentos*						
Programa R1'	0,0216 $\pm$ 0,0149	0,0898 $\pm$ 0,0219	-	94,42	8 ⁸	-
Programa R2'	0,0189 $\pm$ 0,0174	0,0961 $\pm$ 0,0252	-	131,1	8	-
Dose Estimate	0,0216 $\pm$ 0,0146	0,0898 $\pm$ 0,0220	-	128,7	8	p<0,0001

De forma geral, nos ajustes de curvas feitos para as diferentes alterações cromossômicas na ausência do controle (zero Gy) apenas os coeficientes β foram significativos (p<0,05) (Tabela 10). Já os coeficientes C só foram significativos nas curvas de dicêntricos obtidos pelo programa R nas duas abordagens (R1' e R2') e nas curvas quadráticas de fragmentos isolados. Os coeficientes α continuaram

⁷ Valor de χ^2 para o nível de significância de 5% e com 7 graus de liberdade é 14,07.

⁸ Valor de χ^2 para o nível de significância de 5% e com 8 graus de liberdade é 15,51.

não significativos, exceto nas curvas lineares de fragmentos isolados, onde os coeficientes α determinados foram significativos.

Tabela 10. Valores de p determinados pelo programa R e pelo Dose Estimate para cada coeficiente C, α e β nas curvas de calibração das diferentes alterações cromossômicas na ausência do controle (zero Gy) (1°. levado em consideração a dispersão real de cada ponto; 2°. todos os ponto a dispersão foi considerada igual a 1; *. Curvas ajustadas para a função linear).

Valor de P	C	α	β
Dicêntricos			
Programa R1'	p=0,0283	p=0,6661	p<0,0001
Programa R2'	p=0,0260	p=0,6270	p<0,0001
Dose Estimate	p=0,1570	p=1,2350	p<0,0001
Dicêntricos + Anéis			
Programa R1'	p=0,07	p=0,9	p<0,0001
Programa R2'	p=0,06	p=0,9	p<0,0001
Dose Estimate	p=0,2877	p=0,9861	p<0,0001
Fragmentos			
Programa R1'	p<0,0001	p=0,7046	p<0,0001
Programa R2'	p<0,0001	p=0,9213	p<0,0001
Dose Estimate	p=0,0030	p=0,8533	p=0,0078
Fragmentos*			
Programa R1'	p=0,1851	p=0,0035	-
Programa R2'	p=0,3086	p=0,0052	-
Dose Estimate	p=0,1784	p=0,0035	-

Comparando os coeficientes das curvas de dicêntricos na presença do controle com as curvas na ausência do controle, observa-se que houve diferença significativa entre os valores dos coeficientes C e α (Tabela 7 e 9), onde o coeficiente C aumentou o seu valor e o α reduziu de tal forma que se tornou negativo. O coeficiente β não mudou significativamente. Seguindo essa comparação das curvas de dicêntricos + anéis (Tabela 7 e 9), observa-se o mesmo comportamento das curvas de dicêntricos (os valores dos coeficientes C aumentaram, os α reduziram e os β estão praticamente próximos), entretanto, o coeficiente α não se tornou negativo. Nas curvas quadráticas de fragmentos

isolados, os valores dos coeficientes C e β aumentaram e os coeficientes α reduziram. O inverso foi visto nas curvas lineares de fragmentos isolados, onde os valores dos coeficientes C reduziram e os coeficientes α aumentaram.

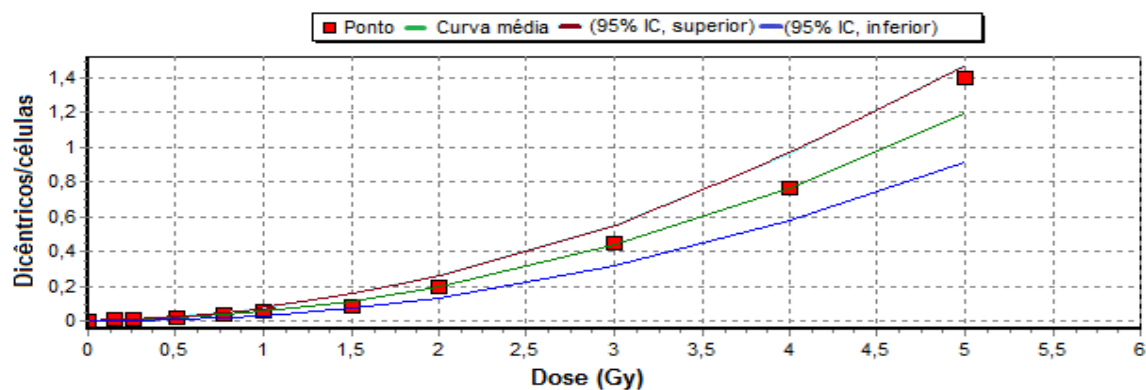
Também foram estudadas as razões entre os coeficientes α/β , entretanto, apenas as curvas de calibração obtidas com a presença da amostra controle foram estudadas, pois os valores das razões α/β das curvas de calibração na ausência do controle se tornaram negativas. As razões α/β para as curvas de dicêntricos e de dicêntricos + anéis tiveram os valores abaixo de 0,1 e as razões α/β das curvas de fragmentos isolados variaram de 0,7-1,03.

Tabela 11. Coeficientes obtidos pelos três programas de ajuste de curvas com a presença do controle (zero Gy) e as razões α/β para cada alteração cromossômica analisada.

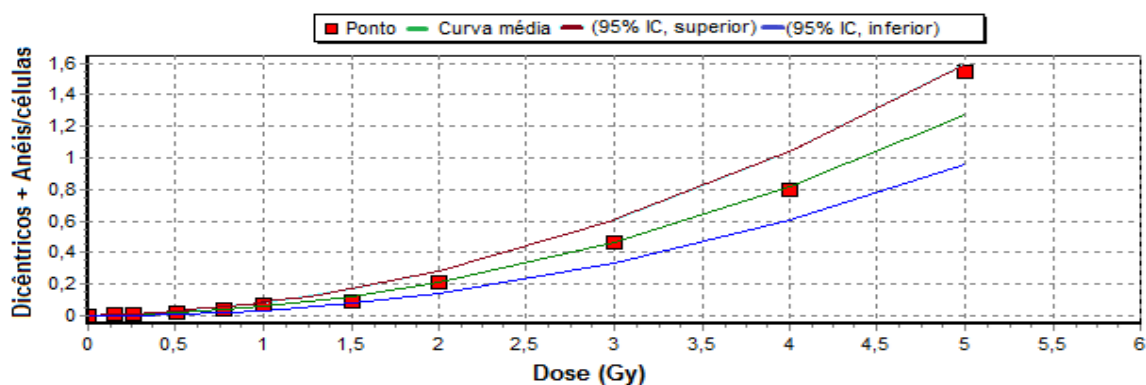
Curvas de calibração	α	β	Razão α/β
Dicêntricos			
Programa R1'	0,0030	0,0470	0,0638
Programa R2'	0,0029	0,0470	0,0592
Dose Estimate	0,0030	0,0470	0,0638
CABAS	0,0028	0,0470	0,0571
Dicêntricos + Anéis			
Programa R1'	0,0047	0,0503	0,0934
Programa R2'	0,0047	0,0502	0,0936
Dose Estimate	0,0047	0,0503	0,0934
CABAS	0,0047	0,0502	0,0936
Fragmentos			
Programa R1'	0,0283	0,0275	1,0290
Programa R2'	0,0230	0,0312	0,7372
Dose Estimate	0,0282	0,0275	1,0255
CABAS	0,0230	0,0312	0,7372

As curvas de calibração de dicêntricos e de dicêntricos + anéis tiveram bons ajustes na presença do controle, podendo ser visualizado pelas curvas médias que passam por quase todos os pontos observados. Embora a curva média quadrática de calibração para fragmentos isolados passe por quase todos os pontos, os três últimos estavam fora e no caso da curva média linear, o último ponto apresentou-se distante (Figura 7).

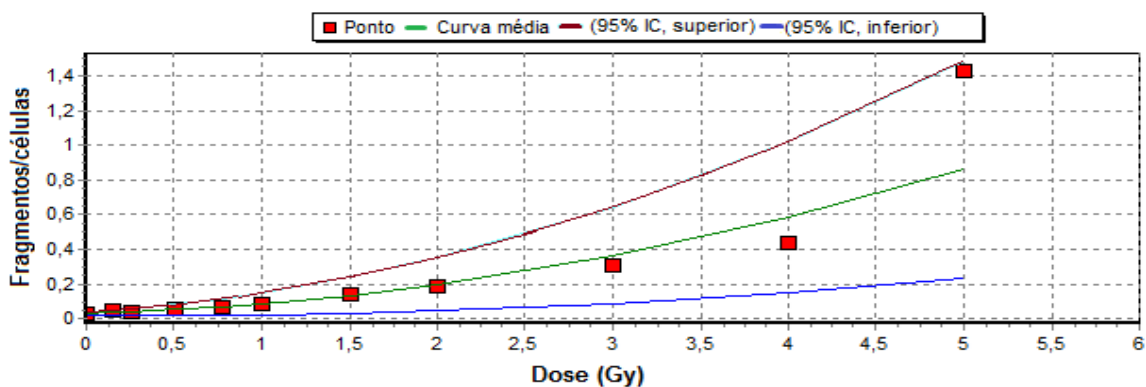
A



B



C



D

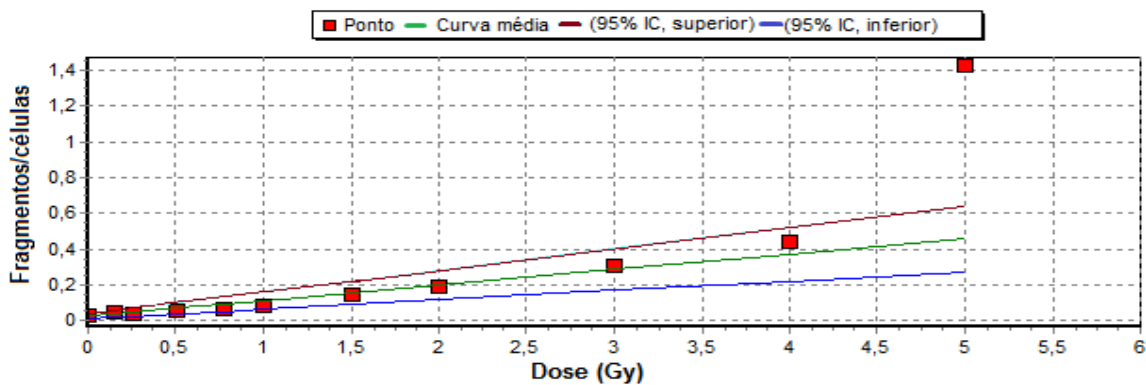


Figura 7. Curvas de calibração obtidas pelo Programa Dose Estimate. Curvas ajustadas para a função quadrática em: a) para dicêntricos por célula, b) para dicêntricos + anéis por célula e c) para fragmentos isolados por célula, em d) curva linear para fragmentos isolados por célula. IC – Intervalo de confiança.

6. Discussão

A Agência Internacional de Energia Atômica determina em seu manual *EPR-Biodosimetry* (2011) que o valor de *background*, ou seja, o valor nas amostras controles sem a exposição à radiação pode variar de 0,5-1 dicêntrico por 1000 células. Entretanto, os níveis espontâneos (*background*) de dicêntricos foram alvos de vários estudos que avaliaram as frequências (médias) dessa alteração cromossômica, foi observado que as frequências variaram amplamente entre as diversas regiões estudadas (entre 0,09-2,99 dicêntricos em 1000 células analisadas) (Romm, *et al.*, 2009; IAEA, 2011). Com base nisso, a frequência de dicêntricos verificada no somatório das amostras controles desse estudo foi considerada espontânea (2 dicêntricos em 1000 células) (Tabela 5).

As frequências observadas dos fragmentos isolados referentes às amostras controles deste trabalho foram mais elevadas em comparação às frequências de dicêntricos. Os fragmentos isolados têm origem, muitas vezes, indeterminada, podendo ser produzidos de formas independentes da presença de dicêntrico ou de anel pela ação de outros agentes mutagênicos que podem também ocasionar a sua formação. Dessa forma, os fragmentos são mais utilizados associados às outras alterações cromossômicas (IAEA, 2011).

Observou-se que houve a elevação das frequências de dicêntricos com o aumento das doses absorvidas e esse comportamento também foi visualizado com os fragmentos isolados. Os cromossomos em anel são mais raros do que os dicêntricos em linfócitos humanos irradiados, por isso que eles foram observados em menor número, entretanto, alguns pesquisadores utilizam os anéis somados aos dicêntricos, enquanto que outros optam por ignorá-los na estimativa da dose,

ficando a critério de cada grupo de pesquisa (IAEA, 2001). Em alguns estudos, entretanto, o termo dicêntrico foi utilizado de forma genérica, sendo atribuída a soma de dicêntricos + anéis (Roy *et al.*, 2012).

Nas curvas produzidas *in vitro* após irradiação com raios γ é comum que alguma dose absorvida apresente-se com valor de u fora do intervalo de $\pm 1,96$ (Lloyd *et al.*, 1986; Barquinero *et al.*, 1995; Koksai *et al.*, 1995; Coskun *et al.*, 2000; Prasanna *et al.*, 2002; Senthamizhchelvan *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2013). Entretanto, se a curva de calibração for ajustada com uma boa faixa de doses absorvidas (segundo a IAEA (2011), são 10 ou mais), o erro dessa dose com dispersão significativa será minimizado (Lee, 2011). Portanto, os resultados das distribuições intercelulares de dicêntricos e de dicêntricos + anéis obtidos neste trabalho estão de acordo com o modelo de distribuição de Poisson, modelo esperado para as amostras sanguíneas expostas à radiação de baixa LET. As radiações consideradas de baixa LET produzem distribuições aleatórias de ionizações em um alvo biológico, neste caso, o alvo foram os linfócitos. Como não foi apresentado um grande número de células com mais de uma alteração cromossômica, os resultados indicam que não houve desvios significativos dos índices de dispersão das amostras irradiadas (IAEA, 2011).

As distribuições de fragmentos isolados observadas neste trabalho tenderam a dispersão e em algumas doses absorvidas houve sobredispersões significativas. Os fragmentos isolados também foram estudados por outros grupos (Bauchinger *et al.*, 1983; Schmid *et al.*, 1984; Lloyd *et al.*, 1986) e também foram relatados em suas amostras irradiadas uma tendência à sobredispersão desse tipo de alteração cromossômica. No trabalho de Bauchinger *et al.* (1983), por exemplo, foi utilizada uma fonte de ^{60}Co com uma taxa de dose absorvida de

0,017 Gy.min⁻¹ e os resultados obtidos tenderam à sobredispersão, porém, a distribuição dos fragmentos isolados de outras amostras irradiadas com uma taxa de dose absorvida mais elevada (0,5 Gy.min⁻¹) resultou em uma distribuição normal de Poisson. O inverso foi observado no trabalho de Schmid *et al.*(1984), onde o estudo feito com a maior taxa de dose absorvida (0,5 Gy.min⁻¹) tendeu a sobredispersão, enquanto no estudo com a menor taxa de dose absorvida (0,16 Gy.min⁻¹) o comportamento seguiu o modelo de Poisson.

O valor dos coeficientes (α e β) obtidos na curva de calibração de dicêntricos + anéis na presença do controle diferiram dos coeficientes produzidos pelas curvas de dicêntricos, o que foi observado também nos trabalhos de Maznyk *et al.* (2004) e Martins *et al.* (2013). Nesses trabalhos as curvas de dicêntricos + anéis tiveram o valor do coeficiente α reduzido e o β aumentado quando comparados com os valores dos respectivos coeficientes das curvas de dicêntricos, entretanto, as diferenças entre os valores dos coeficientes (da curva de dicêntricos e de dicêntricos + anéis) não foram significativas ($p>0,05$).

O teste de homogeneidade de X^2 feito nesse trabalho demonstrou um bom ajuste para as curvas de dicêntricos na presença do controle ($p>0,05$), ou seja, os dados obtidos foram próximos aos esperados, pois os valores de X^2 obtidos não foram diferentes significativamente do valor de X^2 esperado para o nível de significância de 5% e com 8 graus de liberdade. Apesar dos valores de X^2 obtidos para as curvas de dicêntricos + anéis apresentaram-se um pouco acima de valor de X^2 esperado, o valor de p dessa curva confirmou um bom ajuste ($p>0,05$). Enquanto que os valores de X^2 para as curvas quadráticas e lineares de fragmentos isolados foram elevados, determinando, dessa forma, que essas curvas não obtiveram bons ajustes.

As curvas de calibração quadrática de fragmentos juntamente com as de dicêntricos + anéis são importante para o cálculo da estimativa de dose absorvida, nos casos de exposição parcial do corpo. O método Qdr desenvolvido por Sasaki e Miyata (1968) utiliza as frequências dos dicêntricos + anéis e dos fragmentos isolados derivadas a partir dessas curvas dose-resposta uma vez que essas frequências estão relacionadas com a dose absorvida, através desse método é possível estimar de forma mais fiel à dose absorvida entregue localmente no organismo (Coskun *et al.*, 2000; IAEA, 2011).

O manual da IAEA (2011) comenta que ao incluir o ponto zero Gy no procedimento de ajuste de curvas, os coeficientes C e α podem apresentar valores negativos. No caso deste trabalho ao retirar o ponto zero Gy, as curvas de calibração de dicêntricos apresentaram os coeficientes α negativos, e esses valores negativos não tem base biológica, então, alguns pesquisadores resolveram esse problema ignorando o ponto zero Gy e forçando-o a passar pela origem (IAEA, 2011).

As curvas de calibração de dicêntricos + anéis e de fragmentos isolados (quadráticas e lineares) produzidas na ausência do controle (zero Gy) não apresentaram bons ajustes, pois os valores de X^2 obtidos foram elevados e com valor de $p < 0,05$, exceto a curva de dicêntricos que teve um valor de X^2 aceitável, mas que apresentou coeficientes α com valores negativos.

Os valores de p referentes aos coeficientes α de ambas as curvas de dicêntricos e dicêntricos + anéis na presença e na ausência do controle (zero Gy) ficaram acima de 0,05, demonstrando que uma única interação capaz de ocasionar um único dicêntrico não foi expressiva e que as alterações cromossômicas produzidas estão relacionadas com interações duplas, ou seja,

com os coeficientes β . E isso é novamente confirmado quando se analisam os valores da razão α/β determinados para as curvas de dicêntricos e dicêntricos + anéis (Tabela 11), onde todas as razões tiveram os valores abaixo de 0,1. Isso significa que com valores de doses absorvidas inferiores 0,1 Gy, as alterações cromossômicas seriam predominantemente formadas por interações únicas (induzindo duas quebras cromossômicas) e nas doses absorvida superiores a 0,1 Gy, as alterações foram produzidas predominantemente por duas interações independentes, ou seja, em todas as 10 doses absorvidas utilizadas nesse trabalho houve o predomínio do coeficiente β na produção das alterações cromossômicas mesmo nas doses absorvidas mais baixas.

No trabalho de Hellin et al. (1990) também foi encontrado uma razão α/β pequena de 0,0126, menor do que os descritos na literatura. Esse comportamento foi justificado devido ao baixo número de dicêntricos encontrados nas amostras de sangue irradiadas de um dos voluntários com doses baixas de radiação γ , mesmo sendo analisadas 1000 células por dose.

A taxa de dose absorvida é um fator a ser considerado na análise das alterações cromossômicas instáveis, uma vez que o tempo de irradiação prolongado reduz o número de alterações produzidas pela radiação de baixa LET. Esse tempo prolongado permite que os mecanismos de reparo celular possam atuar. Como exemplo, na produção de dicêntricos são necessárias duas lesões para induzir a sua formação, se as lesões são produzidas por duas interações independentes, e a taxa de dose absorvida é reduzida, existe a probabilidade de que a lesão produzida pela primeira interação seja reparada antes que o cromossomo seja atingido por uma segunda interação, formando a segunda lesão (Vinnikov et al., 2010; IAEA, 2011).

Em 1971, Brewen e Luippold realizaram experimento de intensidade versus tempo, onde amostras de sangue foram expostas com a mesma dose absorvida de 2,0 Gy, mas com diferentes tempos de exposição e utilizando duas fontes. Com os raios X as amostras foram expostas de forma aguda com tempos de 3-, 30-, 60- e 90-min e uma exposição crônica de 2,5 h; outras amostras foram irradiadas com raios γ (^{137}Cs) de forma crônica com tempos de 2,5 a 24 h. Foi visto com os resultados obtidos uma diminuição na produção das alterações cromossômicas em função da redução da taxa de dose absorvida.

Nos trabalhos de Lloyd *et al.* (1975) e de Bauchinger *et al.* (1983) foram verificado que o coeficiente α é independente da taxa de dose absorvida e o coeficiente β diminui com a redução da taxa de dose absorvida. Entretanto, Schmid *et al.* (1984) observaram que houve também uma diminuição do coeficiente α com a diminuição da taxa de dose absorvida.

A taxa de dose absorvida utilizada nesse trabalho é cerca de 10 vezes menor em comparação as taxas de doses de outros trabalhos (Tabela 12). Esse pode ser um fator que tenha colaborado para a diminuição das alterações cromossômicas através da interação única, ou seja, o coeficiente α não teve uma participação expressiva na produção das alterações cromossômicas quanto o coeficiente β .

Neste trabalho, foram utilizados três programas de ajuste de curvas: CABAS, R e Dose Estimate para avaliar as vantagens e desvantagens de cada um. O programa CABAS tem uma interface mais simplificada e pode ser obtido gratuitamente pela internet, esse programa utiliza o modelo de Máxima Verossimilhança para o ajuste de curvas de calibração. Entretanto, esse

programa considera o índice de dispersão de cada ponto igual a um, além de não ser possível ajustar a curva de calibração para uma função linear.

O programa R, tal como o CABAS, também utiliza o modelo de Máxima Verossimilhança para o ajuste de curvas de calibração. A desvantagem desse programa é a necessidade de se inserir uma rotina escrita, tornando-se, de certo modo, mais trabalhoso. Contudo, a recente versão do manual da IAEA (2011) já dispõe dessa rotina para os usuários. A vantagem dessa rotina escrita é a possibilidade de se considerar o índice de dispersão de cada ponto da curva ou considerá-los todos iguais a um. Por essa razão, os valores dos coeficientes produzidos por esse programa ($R2'$) (todos os índices foram iguais a um) foram próximos aos do programa CABAS. Essa rotina também oferece o desvio padrão de cada coeficiente, o valor de X^2 , o teste T para o estudo dos coeficientes e, se for o caso é possível ajustar a curva para uma função linear.

O programa Dose Estimate utiliza o modelo de Mínimos Quadrados para o ajuste de curva e faz a correção da dispersão, por isso que os valores dos coeficientes determinados por esse programa foram mais próximos aos obtidos pelo programa $R1'$ (considera os reais valores dos índices de dispersão de cada dose absorvida). Além disso, esse programa fornece todas as informações necessárias para a estatística das curvas de calibração (y , σ^2 , u , coeficientes, entre outros) e bem como é possível ajustar as curvas tanto para a função quadrática quanto para a função linear.

Tendo em vista que as amostras sanguíneas deste trabalho foram expostas aos raios γ , os coeficientes determinados com as duas abordagens pelo programa R apresentaram valores próximos, pois os valores dos índices de dispersão obtidos foram próximos a um. Com isso não houve influencia na

determinação dos coeficientes considerando o valor real de cada índice ou o valor igual a um para todas as doses absorvidas. Entretanto, houve diferença nos valores dos coeficientes das curvas de fragmento nas duas abordagens pelo programa R, pois os índices de dispersão obtidos tiveram valores distantes de um e em algumas doses absorvidas a dispersão foi considerada significativa.

O não uso dos índices de dispersão de cada amostra irradiada na construção das curvas de calibração pode ser observado na determinação dos coeficientes produzidos a partir de radiações de alta LET, pois as amostras sanguíneas expostas aos nêutrons, por exemplo, tendem a dispersão significativa, logo se o programa de ajuste de curva de calibração utilizado não levar em consideração o índice de dispersão na construção das curvas, os coeficientes gerados não reproduzirão fielmente a relação dose-resposta esperada (IAEA, 2011).

Na Tabela 12 estão dispostos os coeficientes de curvas de calibração dose-resposta resultantes de diferentes estudos, foi observado diferenças entre os valores dos coeficientes obtidos pelos diversos grupos de pesquisa. Entretanto, Lee (2011) comenta que na construção das curvas dose-resposta existem diferenças inter-laboratoriais inerentes aos protocolos.

Além dessas diferenças, há diferenças relacionadas à influência da qualidade da radiação nos sistemas biológicos, essas diferenças podem ser quantificadas utilizando a Efetividade Biológica Relativa (RBE). O efeito provocado nas células, assim, não dependente somente da LET, pois a RBE também é influenciada pelo valor total da dose absorvida, da taxa de dose absorvida, da linhagem celular irradiada, de diversos parâmetros biológicos, além da energia da fonte (Okumura, 2013).

Tabela 12. Coeficientes das curvas de calibração dose-resposta para dicêntricos relatadas na literatura para ^{60}Co . (Dic. Dicêntricos; NI. Não informado; DP. Desvio padrão; **. Resultados obtidos através do trabalho de Silva (1997)).

Trabalhos	Faixa de Dose (Gy)	Taxa de Dose (Gy/min)	Dic + Anel	C $\pm$ DP (10^{-4})	$\alpha \pm$ DP ($10^{-4} \cdot \text{Gy}^{-1}$)	$\beta \pm$ DP ($10^{-4} \cdot \text{Gy}^{-2}$)
Esse trabalho	0 – 5	0,055 a 0,048	sim	26,0 $\pm$ 10,0	47,0 $\pm$ 79,0	503,0 $\pm$ 49,0
Brewen & Luippold (1971)	0 – 4	Agudo	sim	0	9,1 $\pm$ 2,0	0,06 $\pm$ 0,007
Brewen & Luippold (1971)	0 – 4	Crônico	sim	0	6,8 $\pm$ 1,0	0,0068 $\pm$ 0,0023
Hellin et al. (1990)	0,1 – 4	0,276	sim	NI	8,6 $\pm$ 8,0	680,0 $\pm$ 47,0
Maznyk et al. (2004)	0 – 1	0,5	sim	930,0 $\pm$ 290,0	29840,0 $\pm$ 4920,0	80490,0 $\pm$ 7170,0
Senthamizhchelvan et al. (2007)	0 – 4	0,5	sim	6,0 $\pm$ 7,0	309,0 $\pm$ 86,0	532,0 $\pm$ 41,0
Martins et al. (2013)	0 – 3	0,18-0,13	sim	NI	95,0 $\pm$ 36,0	536,0 $\pm$ 20,0
Esse trabalho	0 – 5	0,055 a 0,048	não	27,0 $\pm$ 9,0	30,0 $\pm$ 69,0	470,0 $\pm$ 43,0
Lloyd et al (1975)	0,25 - 8	0,5	não	NI	1,57 $\pm$ 0,29	0,05 $\pm$ 0,002
Lloyd et al (1975)	0,25 - 8	0,18	não	NI	1,76 $\pm$ 0,76	0,029 $\pm$ 0,0047
Lloyd & Purott (1981)	NI	0,5	não	NI	16,0 $\pm$ 5,0	50,0 $\pm$ 2,0
Lloyd & Purott (1981)	NI	0,003	não	NI	18,0 $\pm$ 8,0	29,0 $\pm$ 5,0
Bauchiger et al. (1983)	0,5 - 4	0,5	não	3 $\pm$ 1,9	48,0 $\pm$ 74,0	555,0 $\pm$ 34,0
Bauchiger et al. (1983)	0,5 – 4	0,017	não	3 $\pm$ 1,4	234,0 $\pm$ 66,0	308,0 $\pm$ 27,0
Lloyd et al. (1986)	0,05 – 6	0,5	não	NI	142,0 $\pm$ 44,0	759,0 $\pm$ 27,0
Ramalho et al. (1988)	0,2 – 4	0,12	não	NI	2,7 $\pm$ 1,03	0,022 $\pm$ 0,0049
Zhicheng (1989)**	0 – 5	0,78	não	NI	2,746 $\pm$ 0,289	0,06604 $\pm$ 0,00170
Bilbao (1992)**	0 – 4	0,35	não	NI	0,938 $\pm$ 0,0225	0,0591 $\pm$ 0,00169
Barquinero et at. (1995)	NI	1,175 a 1,07	não	13,0 $\pm$ 5,0	210,0 $\pm$ 52,0	631,0 $\pm$ 40,0
Koksal et al. (1995)	NI	0,4573	não	4,8 $\pm$ 2,4	209,0 $\pm$ 57,0	711,0 $\pm$ 25,0
Silva (1997)	0 – 4	0,05	não	NI	3,46 $\pm$ 2,14	0,0345 $\pm$ 0,0064
Lindholm et al. (1998)	0 – 5	0,24	não	5,5 $\pm$ 2,4	135,0 $\pm$ 43,0	544,0 $\pm$ 34,0
Prasanna et al (2002)	0,25 – 5	1,0	não	NI	980,0 $\pm$ 209,0	440,0 $\pm$ 93,0
Schmid et al. (2002)	0 – 4	0,033	não	3,26 $\pm$ 1,9	138,0 $\pm$ 44,0	300,0 $\pm$ 20,0
Maznyk et al. (2004)	0 – 1	0,5	não	870,0 $\pm$ 460,0	30520,0 $\pm$ 7870,0	62360,0 $\pm$ 11330,0
Senthamizhchelvan et al. (2007)	0 – 4	0,5	não	6,0 $\pm$ 7,0	297,0 $\pm$ 83,0	505,0 $\pm$ 40,0
Crespo et al. (2011)	0,1 – 4	0,2385	não	NI	101,34	719,54
Martins et al. (2013)	0 – 3	0,18-0,13	não	NI	105,0 $\pm$ 35,0	480,0 $\pm$ 19,0

Apesar das diferenças observadas entre as curvas de calibração produzidas nos diferentes laboratórios, a técnica de dicêntricos consegue sim estimar a dose absorvida pelo organismo humano com uma boa precisão. No trabalho realizado por Grégoire *et al.* (2013), um dos objetivos foi comparar as

estimativas de doses absorvidas de cinco indivíduos envolvidos em um acidente na Bulgária (2011). A análise foi realizada por dois laboratórios de dosimetria biológica [*National Centre of Radiobiology and Radiation Protection (NCRRP, em Sofia)* e o laboratório do *Intitut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN, em Paris)*]. Em geral, a frequência das alterações relatada pelo laboratório IRSN foram mais elevadas do que as frequências do laboratório NCRRP. No entanto, cada laboratório utilizou como referência sua própria curva de calibração e, com isso, grande parte dessa diferença inter-laboratorial foi removida quando os dados foram convertidos em estimativas de doses, pois os valores estimados foram próximos uns dos outros. Isso reforça a recomendação de que cada laboratório que realize a dosimetria citogenética deva construir com seus próprios dados suas as curvas de calibração (Grégoire *et al.*, 2013).

A técnica de dicêntricos é laboriosa e demorada, então em acidentes nucleares envolvendo inúmeras pessoas, a capacidade de um laboratório de dosimetria biológica poderá ser excedida, sendo necessário o acionamento de outros laboratórios biodosimétricos para a estimativa de dose absorvida de várias vítimas de forma mais rápida. Surgiram, por isso, diversas redes de trabalhos, como a RENEb (*Realising the European Network in Biological Dosimetry*) e a LBDNet (*Latin American Biological Dosimetry Network*), com intuito de colaboração entre os laboratórios biodosimétricos nesses tipos de acidentes que envolvam vários indivíduos. Com isso, foram definidos controles de qualidades em todas as etapas laboratoriais, bem como, foram propostos diversos exercícios de comparação interlaboratoriais com a finalidade de harmonização das técnicas e das interpretações dos dados em lâminas e de imagens digitalizadas (IAEA, 2011; García *et al.*, 2013; Gruel *et al.*, 2013).

As curvas de calibração de dicêntricos e de dicêntricos + anéis construídas neste trabalho poderão ser utilizadas pelo laboratório de dosimetria biológica do CRCN-NE na estimativa de dose absorvida nos casos de acidentes radiológicos ou nucleares envolvendo humanos, entretanto, se faz necessário à validação dessas curvas de calibração. Na validação, amostras sanguíneas de diferentes indivíduos serão expostas à radiação γ com doses absorvidas pré-determinadas. Com a obtenção das frequências dessas alterações cromossômicas instáveis, as curvas de calibração serão utilizadas na estimativa das doses absorvidas, espera-se que os valores de dose absorvida obtidas sejam próximos às doses absorvidas previamente determinadas. Com a validação se tornará possível à participação desse laboratório nos exercícios de comparação interlaboratoriais propostos pelas redes biodosimétricas.

7. Conclusões

1. A frequência de dicêntricos para o sangue não irradiado se apresentou dentro do intervalo esperado.
2. As alterações cromossômicas instáveis (dicêntricos, anéis e fragmentos) esperadas foram observadas e as frequências de tais alterações aumentaram com a dose absorvida. Entretanto, o cromossomo dicêntrico apresentou a melhor relação dose-resposta dentre as outras alterações cromossômicas analisadas.
3. As distribuições intercelulares tanto dos dicêntricos quanto dos dicêntricos + anéis se comportaram de acordo com o modelo de distribuição de Poisson, enquanto a distribuição dos fragmentos acêntricos parece tender a uma sobredispersão significativa.
4. As curvas de calibração de dicêntricos e de dicêntricos + anéis poderão ser utilizadas na avaliação de dose absorvida nos casos de exposição à radiação de corpo inteiro.
5. O programa que ofereceu o melhor ajuste de curva e o melhor benefício foi o programa Dose Estimate por reunir todas as ferramentas necessárias no auxílio da dosimetria biológica.

8. Referências Bibliográficas

- Acharya S, Sanjeev G, Bhat NN, Siddappa K and Narayana Y (2009). The effect of electron and gamma irradiation on the induction of micronuclei in cytokinesis-blocked human blood lymphocytes. *Radiation Environmental Biophys*, 48:197-203.
- Ainsbury EA and Lloyd DC. (2010). Dose Estimation Software For Radiation Biodosimetry Health Physics Society, 98(2):290-295.
- Barquinero J.F, Barrios L, Caballín MR, Miró R, Ribas M, Subias SA and Egozcue J (1995). Establishment and validation of a dose-effect curve for γ -rays by cytogenetic analysis. *Mutation Research*, (326):65-69.
- Barquinero JF, Cigarrán S, Caballín MR, Braselmann H, Ribas M, Egozcue J and Barrios L (1999). Comparison of X-ray dose-response curves obtained by chromosome painting using conventional and PAINT nomenclatures. *International Journal of Radiation Biology*, 75(12):1557-1566.
- Bauchinger M, Schmid E, Streng S and Dresch J (1983) Quantitative analysis of the chromosome damage at first division of human lymphocytes after ^{60}Co γ -irradiation. *Radiation Environ Biophys*, 22:225-229.
- Bergink S, Salomons FA, Hoogstraten D, Groothuis TAM, Waard H, Wu J, Yuan L, Citterio E, Houtsmuller AB, Neefjes J, Hoijmakers JHJ, Vermeulen W and Dantuma NP (2006) DNA damage triggers nucleotide excision repair-dependent monoubiquitylation of histone H2A. *Genes Dev*, 20:1343-1352.
- Bergonié J and Tribondeau L (1906). Interprétation de quelques résultats de la radiothérapie et essai de fixation d'une technique rationnelle. *CR Acad Sci*, 143:983-984.
- Bordier G (1906). Une nouvelle unité de quantité de rayons X: l'unité I. Discussions. Proceedings of the 35th Congress of the French Association for the Advancement of Science, Lyon, France. Paris, France: Masson.
- Brewen JG and Luippold HE (1971). Radiation-induce Human Chromosome Aberrations: in vitro Dose Rate Studies. *Mutation Research*, 12:105-314.
- Christensen DM, Iddins CJ and Sugarman SL (2014). Ionizing Radiation Injuries and Illnesses. *Emerg Med Clin N Am*, 32:245-265.
- Coskun M, Top A and Orta T (2000). Biological dosimetry following X-ray irradiation. *Turk J Med Sci*, 30:563-569.
- Countryman PI and Heddle JA (1976). The production of micronuclei from chromosome aberration in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res*, 41:321-332.
- Crespo RH, Domene MM and Rodríguez (2011). Biodosimetry and assessment of radiation dose. *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy*, 16:131-137.
- Cucinotta FA, Nikjoo H and Goodhead DT (2000). Model for Radial Dependence of Frequency Distributions for Energy imparted in Nanometer Volumes from HZE Particles. *Radiation Research*, 153(4):459-468.
- De Laat WL, Jaspers NGJ and Hoijmakers JHJ (1999) Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev*, 13:768-785.
- Dennis AJ (1987). The relative biological effectiveness of neutron radiation and its implications for quality factor and dose limitation. *Progress in Nuclear Energy*, 20(2):133-149.
- Deperas J, Szluin M, Deperas-Kaminska M, Edwards A, Lloyd D, Lindholm C, Romm H, Roy L, Moss R, Morand J and Wojcik A (2007). CABAS: a freely

- available pc program for fitting calibration curves in chromosome aberration dosimetry. *Radiation Protection Dosimetry*, 124(2):115–123.
- Di Giorgio M, Barquinero JF, Vallergera MB, Radl A, Taja MR, Seoane A, De luca J, Oliveira MS, Valdivia P, García Lima O, Lamadrid A, González Mesa J, Romero Aguilera I, Mandina Cardoso T, Guerrero Carvajal YC, Arceo Maldonado C, Espinoza ME, Martínez-López W, Méndez-Acuña L, Di tomaso MV, Roy L, Lindholm C, Romm H, Güclü I and Lloyd DC (2011). Biological dosimetry intercomparison exercise: an evaluation of triage and routine mode results by robust methods. *Radiation Reserach*, 175:638-649.
- Foray N, Colin C and Bourguignon M (2012). 100 Years of Individual Radiosensitivity: How We Have Forgotten the Evidence. *Radiology*, 264(3):627-631.
- Gajendiran N, Tanaka K, Kumaravel TS and Kamada N (2001). Neutron-Induced Adaptative Response in Go Human Lynphocytes Using the Comet Assay. *Journal of Radiation Research*, (42) 91-101.
- Garcia-Sagredo JM (2008). Fifty years of cytogenetics: A parallel viem of the evolution of cytogenetics and genotoxicology. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1779:363-375.
- García O, Di Giorio M, Vallergera MB, Radl A, Taja MR, Seoane A, De Luca J, Oliveira MS, Valdivia P, Lima OG, Lamadrid A, González JE, Romero I, Mandina T, Pantelias G, TERzoudi G, Guerrero-Carbajal C, Maldonado CA, Espinoza ME, Oliveros N, Martínez-López W, Di Tomaso MV, Méndez-Acuña L, Puig R, Roy L and Barquinero JF (2013). Interlaboratory comparison of dicentric chromosome assy using electronically transmitted images. *Radiation Protection Dosimetry*, 154(1):18-25.
- Grégoire E, Hadjidekova V, Hristova R Hadjidekova V, Hritova R, Gruel G, Roch-Lefevre S, Voisin P, Staynova A, Deleva S, Ainsbury EA, Lloyd DC and Barquinero JF (2013). Biological dosimetry assessments of a serious radiation accident in bulgaria in 2011. *Radiation Protection Dosimetry*, 1-5.
- Gruel G, Grégoire E, Lecas S, Martin C, Roch-Lefevre S, Vaurijoux A, Voisin P, Voisin P and Barquinero JF (2013). Biological Dosimetry by Automated Dicentric Scoring in a Simulated Emergency. *Radiation Research*, 179(5):557-569.
- Hellin H, Paulsen A, Liskien H, Decat G, Wambersie A, Léonard A and Baugnet-Mahieu L (1990). Chromosome Aberrations induced in vitro human lymphocytes by monoenergetic 2.5 Mev neutrons and 60Co gamma rays. *Strahlenthe. Onkol*, 166(8):549-553.
- Hitomi K, Iwai S and Tainer JA (2007) The intricate structural chemistry of base excision repair machinery: Implications for DNA damage recognition, removal, and repair. *Dna Repair*, 6:410–428.
- International Atomic Energy Agency, IAEA (2001). Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment. Technical Report Series nº 405, Vienna, Austria.
- International Atomic Energy Agency, IAEA (2004) Radiation, People and the Environment, http://www.iaea.org/Publications/Booklets/RadPeopleEnv/radiation_booklet.html (November 15, 2013)
- International Atomic Energy Agency, IAEA (2011). Cytogenetic dosimetry: applications in preparedness for and response to radiation emergencies. *EPR-Biodosimetry*.

- Jeggo P and Lavin MF (2009). Cellular radiosensitivity: How much better do we understand it? *International Journal of Radiation Biology*, 85(12):1061-1081.
- Kamileri I, Karakasilioti I and Garinis GA (2012). Nucleotide excision repair: new tricks with old bricks. *Trends in Genetics*, review, 1-8.
- Kavanagh JN, Redmond KM, Schettino G and Prise KM (2013). DNA Double Strand Break Repair: A Radiation Perspective. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(18).
- Knehr S, Zitzelsberger H, Braselmann H, Nahrstedt U and Bauchinger M (1996). Chromosome analysis by fluorescence in situ hybridization: further indications for a non-DNA-proportional involvement of single chromosomes in radiation-induced structural aberrations. *Int J Radiat Biol*, 70:385-392.
- Knoll GF. (1999) *Radiation Detection and Measurement*. Third Edition.
- Koksai G, Pala FS and Dalci DO (1995). In vitro dose-response curve for chromosome aberrations induced in human lymphocytes by ^{60}Co γ -radiation. *Mutation Research*, 329; 57-61.
- Lagerwerf S, Vrouwe MG, Overmeer RM, Fousteri MI and Mullenders LHF (2011). *DNA Repair*, 10:743-750.
- Lara PC, López-Peñalver JJ, Farias VA, Ruiz-Ruiz MC, Oliver Fj and Almodóvar JMR (2013). Direct and bystander radiation effects: A biophysical model and clinical perspectives *Cancer Letters*. Mini-review.
- Lee J K (2011). Practical applications of cytogenetic biodosimetry in radiological emergencies. *The Korean Journal of Hematology*, (46)2.
- Lee JK, Han EA, Lee SS, Ha WH, Barquinero JF, Lee HR and CHO MS (2012). Cytogenetic biodosimetry for Fukushima travelers after the nuclear power plant accident: no evidence of enhanced yield of dicentrics. *Journal of Radiation Research*, 53:876-881.
- Léonard A, Rueff J, Gerber GB and Léonard ED (2005). Usefulness and Limits of biological dosimetry based on cytogenetic methods. *Radiation Protection Dosimetry*, 115(1-4):448-454.
- Lindhold C, Luomahaara S, Koivistoinen A, Ilus T, Edwards AA and Salomaa (1998). Comparison of dose± response curves for chromosomal aberrations established by chromosome painting and conventional analysis. *International Journal Radiation Biology*, 74(1):27-34.
- Lloyd DC and Dolphin GW (1977). Radiation-induced chromosome damage in human lymphocytes. *British Journal of Industrial Medicine*, 34: 261-273.
- Lloyd DC and Purrott RJ (1981). Chromosome Aberrations Analysis in *Radiological Protection Dosimetry*, 1(1):19-28.
- Lloyd DC, Edwards AA and Prosser JS (1986). Chromosome Aberrations Induced in Human Lymphocytes by in vitro Acute X and Gamma Radiation. *Radiation Protection Dosimetry*, 15(2):83-88.
- Lloyd DC, Purrott RJ, Dolphin GW, Bolton D and Edwards AA (1975). The relationship between chromosome aberrations and low LET radiation dose to human lymphocytes. *International Journal of Radiation Biology*, 28(1):75-90.
- Lloyd DC, Purrott RJ, Dolphin GW, Edwards AA (1976). Chromosome aberrations induced in human lymphocytes by neutron radiation. *Int. Journ. Rad. Biol*, 29(2):169-182.
- Loucas BD, Durante M, Bailey SM and Cornforth MN (2013). Chromosome Damage in Human Cells by γ Rays, α Particles and Heavy Ions: Track Interactions in Basic Dose-Response Relationships. *Radiation Research*, 179(1):9-20.

- Luomahaara S, Lindholm C, Mustonen R and Salomaa S (1999). Distribution of radiation induced exchange aberrations in human chromosomes 1, 2 and 4. *Int J Radiat Biol*, 75:1551-1556.
- Martins V, Antunes AC and Monteiro Gil O (2013). 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*, 750:50-54.
- Maznyk NA, Vinnikov VA, Maehnk HO and Bihhikob BA (2004). Calibration dose-resposnse relationships for cytogenetic biodosimetry of recent and past exposure to low dose gamma-radiation. *БА Вінніков*, 12:415-425.
- Morgan WF (2012). Non-targeted and Delayed Effects of Exposure to Ionizing Radiation: I. Radiation-Induced Genomic Instability and Bystander Effects In *vitro Radiation Research*, 178(2):223-236.
- Neff RD and Cassen B (1968). Relative radiation sensitivity of circulating small and large lymphocytes. *Journal of Nuclear Medicine*, 9(7):402-5.
- Okumura K, Kinashi Y, Kubota Y, Kitajima E, Okayasu R, Ono K and Takahashi S (2013). Relative biological effects of neutron mixed-beam irradiation for boron neutron capture therapy on cell survival and DNA double-strand breaks in cultured mammalian cells. *Journal of Radiation Research*, 54: 70-75.
- Pandita TK, Gregoire V, Dhingra K, Hittelman WN (1994). Effect of chromosome size on aberration levels caused by gamma radiation as detected by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, 67:94-101.
- Papworth DG (1970). Appendix to paper by savage JRK sites of radiation induced chromosome exchanges. *Curr Top Radiat Res*, 6:129–194.
- Pathak R, Ramakumar A, Subramanian U and Prasanna PGS (2009). Differential radio-sensitivities of human chromosomes 1 and 2 in one donor in interphase- and metaphase-spreads after ^{60}Co γ -irradiation. *BMC Medical Physics*, 9:6.
- Prasanna PGS, Loats H, Torres BN, Shehata CW, Duffy KL, Floura RS, Khuse AW, Jackson WE and Blakely WF (2002). AFRRI's Gamma-Ray, X-Ray, and Fission-Neutron Calibration Curves for the Lymphocytes Dicentric Assay: Application of a Metaphase Finder System. AFRRI Special Publication 02-1.
- R development core team (2012). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL:<http://www.R-project.org/>.
- Ramalho AT, Nascimento ACH and Natarajan AT (1988). Dose assessments by cytogenetic analysis in the Goiania (Brazil) radiation accident. *Radiation Protection Dosimetry*, 25(2):97-100.
- Regaud C and Lacassagne A (1927). Effets histophysiologiques des rayons de Roentgen et de Becquerel- Curie sur les tissus adultes normaux des animaux supérieurs. In: Regaud C, ed. *Radiophysiologie et radiothérapie*. Paris, France: Presses Universitaires de France.
- Romm H, Oestreicher U and Kulka U (2009). Cytogenetic damage analysed by the dicentric assay. *Ann Ins Super Sanità*, (45)3:251-259.
- Roy L., Gregoire E., Gruel G, Roch-Lefevre S, Voisin P, Busset A, Martin C and Voisin P (2012). Effect of lymphocytes culture variations on the mitotic index and on the dicentric yield following gamma radiation exposure. *Radiation Protection Dosimetry*, 1-9.

- Ryan LA, Wilkins RC, McFarlane NM, Sung MM, McNamee JP and Boreham DR (2006) Relative biological effectiveness of 280 keV neutrons for apoptosis in human lymphocytes. *Health Phys*, 91:68–75.
- Santivasi WL and Xia F (2013). Ionizing Radiation-Induced DNA Damage, Response, & Repair. *Antioxidants & Redox Signaling*, Nov 1.
- Schmid E, Bauchinger M, Streng S and Nahrstedt U (1984). The Effect of 220 kVp X-Rays with Different Spectra on the Dose Response of Chromosome Aberrations in Human Lymphocytes. *Radiation and Environmental Biophysics*, 23:305-309.
- Schmid E, Regulla D, Guldbakke S, Schlegel D and Roos M (2002). Relative Biological Effectiveness of 144 keV Neutrons in Producing Dicentric Chromosomes in Human Lymphocytes Compared with ^{60}Co Gamma Rays under Head-to-Head Conditions. *Radiation Research*, 157(4):453-460.
- Senthamizhchelvan S, Pant GS, Rath GK, Julka PK, Nair O, Joshi RC, Malhotra A and Pandey RM (2007). Biodosimetry using chromosome aberrations in human lymphocytes. *Radiation Protection Dosimetry*, 123(2):241–245.
- Shields Warren MD (1980). Effects of Radiation on Normal Tissues. *A Cancer Journal for Clinicians*, 30:350-355.
- Silva MA (1997). Dosimetria biológica em proteção radiológica: elaboração de curvas dose-resposta para ^{60}Co e ^{137}Cs . (Dissertação de Mestrado).
- Sommer S, Buraczewska I, Wojewodzka M, Bouzyk E, Szumiel I and Wojcik A (2005). The radiation sensitivity of human chromosomes 2, 8 and 14 in peripheral blood lymphocytes of seven donors. *Int J Radiat Biol*, 81:741-749.
- Sugasawa K, Okamoto T, Shimizu Y, Masutani C, Iwai S and Hanaoka F (2001). A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair. *Genes Dev* 15:507-521.
- Taleei R and Nikjoo H. (2013). The Non-homologous End-Joining (NHEJ) Pathway for the Repair of DNA Double-Strand Breaks: I. A Mathematical Model *Radiation Research*, 179.
- Trowell OA (1952). The sensitivity of lymphocytes to ionizing radiation. I. *Pathol. Bacteriol*, 64:687.
- UNSCEAR (1958). Report of the United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation General Assembly Official Records: Thirteenth session Supplement N^o. 17 (A/3838).
- Vinnikov VA, Ainsbury EA, Maznyk NA, Lloyd DC and Rothkamm K (2010). Limitations Associated with Analysis of Cytogenetic Data for Biological Dosimetry. *Radiation Research Society*, 174(4):403-414.
- Vral A, Cornelissen M, Thierens H, Louagie H, Philippé J, Strijckmans K and De Ridder L (1998). Apoptosis induced by fast neutrons versus ^{60}Co gamma-rays in human peripheral blood lymphocytes. *Int J Radiat Biol*, 73:289–95.
- Wong KF, Siu LLP, Ainsbury E and Moquet J (2013). Cytogenetic biodosimetry: what it is and how we do it. *Hong Kong Medical Journal*, 19:168-73.
- Xu G, Herzig M, Rotrekl V and Walter CA (2008) Base excision repair, aging and health span Mechanisms of Ageing and Development, 129:366–382
- Zipfel PF (2009). Complement and Immune defense: From innate immunity to human diseases *Immunology Letters*, 126,1-7.

9. Anexos

Anexo 1

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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: 09186813.7.0000.5208

Instituição Proponente: COMISSAO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR

Patrocinador Principal: COMISSAO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 289.483

Data da Relatoria: 08/05/2013

Apresentação do Projeto:

O documento intitulado "Implementação do Serviço de Dosimetria Biológica no Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste - CRCN-NE/CNEN" trata-se de projeto de pesquisa da Dra. Fabiana Farias de Lima Guimarães - CRCN-NE/CNEN.

O uso das radiações ionizantes vem crescendo no país, haja vista a implantação de centros de produção de radiofármaco, 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:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

Anexo 2



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 sadios cujas amostras sanguíneas voluntariamente cedidas serão irradiadas ou não por fontes radioativas. 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



Ministério da
Ciência, Tecnologia
e Inovação



Declaro estar ciente do inteiro teor deste TERMO DE CONSENTIMENTO e estou de acordo em participar do estudo proposto, sabendo que dele poderei desistir a qualquer momento, sem sofrer qualquer punição ou constrangimento.

Nome: _____

RG: _____

Data: _____

Assinatura : _____

Testemunha 1: _____ Data ____/____/____

Testemunha 2: _____ Data ____/____/____

A rogo de _____,
assino o presente
termo.

10. Curriculum vitae (Lattes)

Mariana Esposito Mendes

Curriculum Vitae

JANEIRO/2014

Dados pessoais

Nome Mariana Esposito Mendes
Filiação Alexandre Mendes de Oliveira e Rosane Esposito Mendes
Nascimento 18/07/1990 - Recife/PE - Brasil
Carteira de Identidade 7546593 SDS - PE - 28/04/2004
CPF 087.954.614-00

Endereço residencial Rua José de Holanda
Torre - Recife
50710140, PE - Brasil
Telefone: 81 30330240

Endereço profissional Universidade Federal de Pernambuco, Centro de
Ciências Biológicas
AV. PROF. MORAES REGO
CIDADE UNIVERSITÁRIA - Recife
50670901, PE - Brasil
Telefone: 81 21268569

Endereço eletrônico

E-mail para contato : mendes_sb@hotmail.com
e-mail alternativo : mariespositomendes@gmail.com

Formação acadêmica/titulação

- 2012** Mestrado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Verificação da taxa de alterações cromossômicas em sangue humano irradiado em feixe gama
Orientador: Neide Santos
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Palavras-chave: Dosimetria biológica, Citogenética, Radiação gama
- 2008 - 2011** Graduação em Biomedicina.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Verificação da taxa de alterações cromossômicas em sangue humano irradiado com diferentes doses absorvidas em feixe gama
Orientador: Fabiana Farias de Lima Guimarães

Formação complementar

2011 - 2011	English High Advanced 1 e 2. Cultura Norte Americana, CNA, Brasil
2010 - 2010	Extensão universitária em Genética e Evolução como Iniciação Científica. Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
2010 - 2010	Curso de curta duração em V Curso de Biologia Molecular. Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco, HEMOPE, Recife, Brasil
2010 - 2010	English Advanced 1 e 2. Cultura Norte Americana, CNA, Brasil
2009 - 2009	Pre-advanced 1 e 2. Cultura Norte Americana, CNA, Brasil
2008 - 2008	English Intermediate 1 e 2. Cultura Norte Americana, CNA, Brasil
2005 - 2006	English Basic 1 e 2. Cultural Norte Americano, CNA, Brasil

Atuação profissional**1. Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste - CRCN/NE**

Vínculo institucional

2010 - 2012	Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Aluno de Iniciação Científica , Carga horária: 20
--------------------	---

Projetos

Projetos de pesquisaProjetos de pesquisa

2011 - 2012	Verificação da taxa de alterações cromossômicas em sangue humano irradiado com diferentes doses absorvidas em feixe gama Descrição: Este trabalho tem como objetivo observar as frequências de alterações cromossômicas instáveis (dicentricos, fragmentos acêntricos e anéis) irradiados por uma fonte ¹³⁷ Cs (feixe gama) com mais duas diferentes doses. Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa Integrantes: Mariana Esposito Mendes (Responsável); ; José Odinson de Caldas
--------------------	--

Brandão; Merilane da Silva Calixto; Fabiana Farias Lima; Priscilla Luna Góis de Souza; Eudice Coreia Vilela; Joelan Ângelo de Lucena Santos; Neide Santos
Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPQ

2010 - 2011 Verificação da taxa de alterações cromossômicas em sangue humano irradiado em campo misto nêutron-gama com diferentes doses absorvidas

Descrição: Este trabalho tem como objetivo dar continuidade ao estudo da relação entre as frequências de alterações cromossômicas instáveis e a irradiação por campo misto nêutron-gama, submetendo-se amostras a mais duas diferentes doses (0,50 Gy e 0,81 Gy).

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Mariana Esposito Mendes; José Odnilson de Caldas Brandão; Merilane da Silva Calixto; Fabiana Farias Lima; Priscilla Luna Góis de Souza (Responsável); Eudice Coreia Vilela; Joelan Ângelo de Lucena Santos; Neide Santos

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPQ

2010 - 2011 Verificação da taxa de alterações cromossômicas em sangue humano irradiado com diferentes doses absorvidas em feixe gama

Descrição: Este trabalho tem como objetivo observar as frequências de alterações cromossômicas instáveis (dicentricos, fragmentos acêntricos e anéis) irradiados por uma fonte ^{137}Cs (feixe gama) com diferentes doses.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Mariana Esposito Mendes (Responsável); ; José Odnilson de Caldas Brandão; Merilane da Silva Calixto; Fabiana Farias Lima; Priscilla Luna Góis de Souza; Eudice Coreia Vilela; Joelan Ângelo de Lucena Santos; Neide Santos

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPQ

Idiomas

Inglês Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

Prêmios e títulos

2013 Menção Honrosa pelo trabalho intitulado: ESTUDO CITOGENÉTICO EM LINFÓCITOS HUMANOS IRRADIADOS NA AVALIAÇÃO DE DOSE ABSORVIDA", III Jornada de Pós-Graduação em Genética da UFPE

2013 Primeiro lugar em apresentação oral com o trabalho: "Avaliação da taxa de alterações cromossômicas instáveis radioinduzidas em linfócitos humanos por radiação de baixa LET em uma fonte de

60Co.", XX Semana de Biomedicina: " Das bases moleculares as grandes inovações"

- 2013** Terceiro lugar com o trabalho intitulado: "Análise da frequência de alterações cromossômicas instáveis em linfócitos humanos irradiados com 60Co.", 2013 International Nuclear Atlantic Conference - ABEN

Produção

Produção bibliográfica

Apresentação de trabalho e palestra

1. Mendonça, J. C. G., **MENDES, M. E.**, Santos, N., Lima, F. F.
Análise da frequência de alterações cromossômicas instáveis em linfócitos humanos irradiados com 60Co, 2013. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português; Local: Brasil; Cidade: Recife; Evento: 2013 International Nuclear Atlantic Conference; Inst.promotora/financiadora: ABEN
2. Mendonça, J. C. G., **MENDES, M. E.**, Santos, N., Lima, F. F.
Avaliação da taxa de alterações cromossômicas instáveis radioinduzidas em linfócitos humanos por radiação de baixa LET em uma fonte de 60 Co, 2013. (Outra, Apresentação de Trabalho)
Palavras-chave: Dosimetria biológica
Referências adicionais : Brasil/Português; Local: Brasil; Cidade: Recife; Evento: XX Semana de Biomedicina - UFPE: "Das bases moleculares as grandes inovações"; Inst.promotora/financiadora: Diretório Acadêmico de Biomedicina - UFPE
3. **MENDES, M. E.**, Mendonça, J. C. G., Souza, P. L. G., Santos, N., Lima, F. F.
Comparative study of chromosome aberrations yield induced by cesium and cobalt source in human lymphocytes, 2013. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
Palavras-chave: Dosimetria biológica
Referências adicionais : Brasil/Inglês; Local: Brasil; Cidade: Recife; Evento: 2013 International Nuclear Atlantic Conference; Inst.promotora/financiadora: ABEN
4. Souza, P. L. G., **MENDES, M. E.**, Monteiro, P. B., Santos, J. A. L., Vilela, E. C., Santos, N., Lima, F. F.
Curva dose-resposta para dicêntricos induzidos por feixe misto nêutron-gama, 2013. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português; Local: Brasil; Cidade: Rio de Janeiro; Evento: IX Congresso Latino americano IRPA; Inst.promotora/financiadora: SBPR
5. **MENDES, M. E.**, Mendonça, J. C. G., Lima, F. F., Santos, N.
ESTUDO CITOGENÉTICO EM LINFÓCITOS HUMANOS IRRADIADOS NA

AVALIAÇÃO DE DOSE ABSORVIDA, 2013. (Outra,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português; Local: Brasil; Cidade: Recife; Evento: III Jornada de Pós-Graduação em Genética; Inst.promotora/financiadora: PPGG - UFPE

6. **MENDES, M. E.**, Souza, P. L. G., Monteiro, P. B., Mendonça, J. C. G., Santos, N., Lima, F. F.

Alterações cromossômicas instáveis induzidas por radiação gama e campo misto nêutron-gama: um estudo comparativo, 2012. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português; Cidade: recife; Evento: VII Congresso Internacional da SBBN; Inst.promotora/financiadora: SBBN

7. **MENDES, M. E.**, Souza, P. L. G., Mendonça, J. C. G., Santos, N., Lima, F. F.

Chromosomal aberrations analysis after gamma Irradiation at a low dose rate, 2012. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Inglês; Cidade: recife; Evento: VII Congresso Internacional da SBBN; Inst.promotora/financiadora: SBBN

8. **MENDES, M. E.**, Souza, P. L. G., Brandao, J. O. C., Lima, F. F., Santos, N.

Estudo das Alterações Cromossômicas Instáveis Induzidas por Radiação Gama, 2012. (Outra,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português; Cidade: recife; Evento: II Jornada de Pós-Graduação em Genética da UFPE

9. Souza, P. L. G., **MENDES, M. E.**, Monteiro, P. B., Santos, J. A. L., Vilela, E. C., Santos, N., Lima, F. F.

Intercellular distributioon of dicentrics in lymphocytes for different doses by a mixed neutron-gamma field, 2012. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Inglês; Cidade: recife; Evento: VII Congresso Internacional da SBBN; Inst.promotora/financiadora: SBBN

10. Souza, P. L. G., **MENDES, M. E.**, Monteiro, P. B., Lima, F. F., Santos, N.

“Verificação da taxa de alterações cromossômicas instáveis em linfócitos devido à irradiação por campo misto nêutron-gama, 2012. (Outra,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português; Cidade: recife; Evento: II Jornada de Pós-Graduação em Genética da UFPE

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **2013 International Nuclear Atlantic Conference**, 2013. (Congresso)

Análise da frequência de alterações cromossômicas instáveis em linfócitos humanos irradiados com ^{60}Co .

2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **2013 International Nuclear Atlantic Conference**, 2013. (Congresso)

Comparative study of chromosome aberrations yield induced by cesium and cobalt source in human lymphocytes.

3. **III Jornada de Pós-Graduação em Genética**, 2013. (Outra)

ESTUDO CITOGENÉTICO EM LINFÓCITOS HUMANOS IRRADIADOS NA AVALIAÇÃO DE DOSE ABSORVIDA.

4. Apresentação de Poster / Painel no(a) **VIII Congresso Internacional da SBBN**, 2012. (Congresso)

Alterações cromossômicas instáveis em linfócitos induzidas por radiação gama e campo misto nêutron-gama.

5. Apresentação de Poster / Painel no(a) **VIII Congresso Internacional da SBBN**, 2012. (Congresso)

Chromosomal aberrations analysis after gamma irradiation at low dose rate.

6. Apresentação de Poster / Painel no(a) **II Jornada de Pós-Graduação em Genética**, 2012. (Outra)

Estudo das alterações cromossômicas instáveis induzidas por radiação gama.

Totais de produção

Produção bibliográfica

Apresentações de trabalhos (Congresso).....	8
Apresentações de trabalhos (Seminário).....	1
Apresentações de trabalhos (Outra).....	4

Eventos

Participações em eventos (congresso).....	10
Participações em eventos (seminário).....	1
Participações em eventos (simpósio).....	2
Participações em eventos (outra).....	2