



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

AKÍRIA OHANA TORREÃO

**DESENVOLVIMENTO DO PROTOCOLO COMBINADO NO CRCN-NE
PARA TRIAGEM E ESTIMATIVA DE DOSE ABSORVIDA**

Recife
2022

AKÍRIA OHANA TORREÃO

**DESENVOLVIMENTO DO PROTOCOLO COMBINADO NO CRCN-NE
PARA TRIAGEM E ESTIMATIVA DE DOSE ABSORVIDA**

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

Orientadora: Dra. Fabiana Farias de Lima
Guimarães

Recife
2022

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

Torreão, Akíria Ohana.

Desenvolvimento do protocolo combinado no CRCN-NE para triagem e
estimativa de dose absorvida / Akíria Ohana Torreão. - Recife, 2022.
64 : il., tab.

Orientador(a): Fabiana Farias de Lima Guimarães
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2022.
Inclui referências, anexos.

1. Dosimetria Biológica. 2. Radiação gama. 3. Citogenética. 4. Dicêntrico. 5.
Micronúcleo. I. Guimarães, Fabiana Farias de Lima . (Orientação). II. Título.

500 CDD (22.ed.)

AKÍRIA OHANA TORREÃO

**DESENVOLVIMENTO DO PROTOCOLO COMBINADO NO CRCN-NE
PARA TRIAGEM E ESTIMATIVA DE DOSE ABSORVIDA**

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

Aprovada em: _29_ / _06_ / _2022_

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dra. Fabiana Farias de Lima Guimarães
CRCN-NE/CNEN

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

Prof. Dra. Neide Santos
UFPE/Departamento de Genética

Dedico este trabalho a Deus por ser meu refúgio e fortaleza, socorro bem-presente na angústia. Dedico também aos meus pais e ao meu irmão por todo o amor, apoio e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, Dra. Fabiana Farias, por ter me acolhido para fazer parte do Laboratório de Dosimetria Biológica do CRCN-NE, por todo o incentivo, assistência e dedicação ao longo da minha Iniciação Científica e do desenvolvimento deste trabalho.

A toda equipe do Laboratório de Dosimetria Biológica do CRCN-NE, pelo auxílio na execução do meu projeto e pela amizade construída ao longo desses anos.

À minha mãe e melhor amiga, Simone Valéria, pela compreensão e companheirismo nos bons e maus momentos, pelo suporte emocional, por zelar e se preocupar com o meu bem-estar, por sonhar junto comigo e por ser o meu porto seguro.

Ao meu pai, Gilmar Torreão, por estar sempre ao meu lado, acreditar em mim e investir no meu futuro.

Ao meu irmão, Gabriel Torreão, pela torcida para que tudo desse certo e por me proporcionar momentos de alegria e leveza.

À professora, Dra. Isvânia Lopes, por ter despertado em mim o interesse por essa área de pesquisa e me acolhido para fazer parte do Laboratório de Biofísica Celular e Molecular onde iniciei a minha trajetória.

A todas as pessoas e amigos que de alguma forma contribuíram para o meu desenvolvimento pessoal.

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

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada, apenas dê o primeiro passo.

(Martin Luther King)

TORREÃO, Akíria Ohana. **Desenvolvimento do Protocolo Combinado no CRCN-NE para Triagem e Estimativa de Dose Absorvida**. 2022. 64. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

RESUMO

A biodosimetria baseia-se na investigação dos efeitos biológicos relacionados com a dose absorvida em casos de exposição accidental ou ocupacional à radiação ionizante. Essa investigação é realizada por meio de análises citogenéticas e estudos de alterações cromossômicas, principalmente o ensaio de dicêntrico, que se tornou rotina na estimativa de dose absorvida em exposições accidentais. Por sua vez, o ensaio de micronúcleo por bloqueio da citocinese, por ser uma técnica mais rápida e de fácil análise, resulta em uma alternativa adequada para procedimentos de triagem em situações de urgência. No entanto, os micronúcleos não são específicos para radiação ionizante, variando de acordo com idade, sexo, estilo de vida, entre outros parâmetros. Por esse motivo após a triagem, o ensaio de dicêntrico deverá ser aplicado para estimativas de dose absorvida mais exata, devido a sua alta especificidade para radiação ionizante, o que torna a técnica padrão ouro para dosimetria biológica. Diante disso, este trabalho visa implementar e avaliar um protocolo combinado que englobe as técnicas de micronúcleo e dicêntrico e que permita diferenciar entre as fases do ciclo celular para assim avaliar a dose absorvida em casos de emergências de larga escala. Além disso, visa comparar os resultados obtidos pelas técnicas aplicadas individualmente. Para isto, amostras sanguíneas de um doador foram irradiadas com as doses de 0,5 Gy e 0,75 Gy. As amostras foram expostas à fonte de ^{60}Co (Gammacel 220) localizada no Departamento de Energia Nuclear (DEN/UFPE). As preparações citológicas para as análises das alterações cromossômicas foram obtidas a partir da cultura de linfócitos, tanto para a técnica de dicêntrico e micronúcleo, quanto para o protocolo combinado. Em seguida, as lâminas foram confeccionadas a partir do precipitado de células ressuspenso em solução fixadora e posteriormente foram coradas com Giemsa 5%. As frequências de cromossomos dicêntricos foram estabelecidas a partir da leitura de 533 metáfases para o ensaio de dicêntrico, 588 para o intervalo de 48h e 321 para o intervalo de 72h do protocolo combinado. Para a técnica de micronúcleo foram analisadas 4957 células binucleadas, 185 no intervalo de 48h e 295 no intervalo de 72h do protocolo em estudo. As doses foram estimadas utilizando o coeficiente das curvas de dose-resposta. Os resultados obtidos mostraram que tanto os ensaios de dicêntrico e micronúcleo separadamente, quanto o protocolo combinado, as doses estimadas englobaram a dose absorvida conhecida no intervalo de confiança de 95%. Sendo assim, o protocolo combinado mostra-se um ensaio promissor para a avaliação de dose accidental.

Palavras-chave: Dosimetria Biológica. Radiação gama. Citogenética. Dicêntrico. Micronúcleo.

TORREÃO, Akíria Ohana. **Development of the Combined Protocol at the CRCN-NE for Screening and Estimation of Absorbed Dose**. 2022. 64. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

ABSTRACT

Biodosimetry is based on the investigation of biological effects related to absorbed dose in cases of accidental or occupational exposure to ionizing radiation. This investigation is carried out by means of cytogenetic analyses and studies of chromosomal changes, especially the dicentric assay, which has become routine in estimating absorbed dose in accidental exposures. In turn, the micronucleus assay by blocking cytokinesis, for being a faster and easily analyzed technique, results in a suitable alternative for screening procedures in emergency situations. However, micronuclei are not specific for ionizing radiation, varying according to age, sex, lifestyle, among other parameters. For this reason after screening, the dicentric assay should be applied for more accurate absorbed dose estimates due to its high specificity for ionizing radiation, making it the gold standard technique for biological dosimetry. In view of this, this work aims to implement and evaluate a combined protocol that covers the micronucleus and dicentric techniques and that allows differentiating between cell cycle phases in order to assess the absorbed dose in large-scale emergencies. In addition, it aims to compare the results obtained by the techniques applied individually. For this, blood samples from a donor were irradiated with doses of 0.5 Gy and 0.75 Gy. The samples were exposed to a ^{60}Co source (Gammacel 220) located in the Departamento de Energia Nuclear (DEN/UFPE). Cytological preparations for the analysis of chromosomal alterations were obtained from the culture of lymphocytes, both for the dicentric and micronucleus technique, and for the combined protocol. Then, slides were made from the cell pellet resuspended in fixative solution and subsequently stained with Giemsa 5%. The frequencies of dicentric chromosomes were established from the reading of 533 metaphases for the dicentric assay, 588 for the 48h interval and 321 for the 72h interval of the combined protocol. For the micronucleus technique 4957 cells were analyzed, 185 in the 48h interval and 295 in the 72h interval. Doses were estimated using the coefficient of dose response curves. The results showed that both the dicentric and micronucleus assays separately, as well as the combined protocol, the estimated doses comprised the known absorbed dose in the 95% confidence interval. Therefore, the combined protocol proves to be a promising trial for accidental dose assessment.

Key words: Biological Dosimetry. Gamma radiation. Cytogenetics. Dicentric. Micronucleus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ilustração do efeito fotoelétrico.....	16
Figura 2 – Ilustração do efeito Compton.....	16
Figura 3 – Ilustração da produção de pares.....	17
Figura 4 – Ilustração das interações de acordo com os níveis de energia.....	18
Figura 5 – Distribuição espacial média de eventos ionizantes para diferentes valores de LET em relação à estrutura de dupla hélice do DNA.....	20
Figura 6 – Curva de sobrevivência de células para radiações ionizantes de alta e baixa LET.....	21
Figura 7 – Relação entre RBE e LET.....	22
Figura 8 – Tempo de latência para aparecimento de câncer após irradiação.....	25
Figura 9 – Relações típicas entre dose e severidade do dano para efeitos determinísticos numa população de indivíduos.....	26
Figura 10 – Esquema das principais fontes de danos ao DNA e as diferentes respostas celulares.....	28
Figura 11 – Ilustração resumida da principal via de BER.....	30
Figura 12 – Representação esquemática do ciclo celular.....	32
Figura 13 – Curvas de calibração construídas <i>in vitro</i> com diferentes qualidades de radiação.....	36
Figura 14 – Formação de um cromossomo dicêntrico.....	37
Figura 15 – Metáfase contendo dicêntrico (DC) associado ao fragmento acêntrico (Fg).....	37
Figura 16 – Células binucleadas contendo micronúcleos (MN).....	38
Figura 17 – Formação de micronúcleos (MN) a partir de cromossomos inteiros ou fragmentos e formação de pontes nucleoplasmáticas (PNP).....	39
Figura 18 – Fotografia de células metafásicas em M1 (A) com um dicêntrico (DC) associado ao fragmento acêntrico (Fg) e em M2 (B, foto ilustrativa, pois tem apenas 88 cromossomos), além de célula binucleada na presença de três micronúcleos (C).....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Curvas de calibração para dicêntricos e para micronúcleos estabelecidas para radiação gama.....	45
Tabela 2 – Análise das frequências e distribuição celular de dicêntricos em relação à dose absorvida.....	46
Tabela 3 – Análise das frequências e distribuição celular de micronúcleos em relação à dose absorvida.....	47
Tabela 4 – Frequências das alterações cromossômicas em relação aos diferentes tempos de cultura.....	48
Tabela 5 – Análise das distribuições celulares do protocolo combinado em relação à dose absorvida.....	49
Tabela 6 – Valores de doses estimadas utilizando os protocolos de DC e MN separadamente.....	49
Tabela 7 – Valores de doses estimadas utilizando o protocolo combinado DC+MN.....	50
Tabela 8 – Frequências e valores de u de dicêntricos obtidos com curvas de calibração para radiação gama.....	51
Tabela 9 – Frequências e valores de u de micronúcleos obtidos através de curvas de calibração para radiação gama.....	51
Tabela 10 – Frequência de dicêntricos e micronúcleos em amostras irradiadas com protocolos combinados.....	52

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	RADIAÇÕES IONIZANTES	14
2.2	INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO ELETROMAGNÉTICA COM A MATÉRIA	15
2.3	INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO COM O TECIDO BIOLÓGICO	18
2.3.1	Dose e Taxa de Dose Absorvida	18
2.3.2	Transferência Linear de Energia-LET	19
2.3.3	Efetividade Biológica Relativa-RBE	21
2.3.4	Danos ao Genoma	22
2.3.5	Morte Celular	23
2.4	CLASSIFICAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS	23
2.4.1	Efeitos Estocásticos e Determinísticos	24
2.4.2	Efeitos Somáticos e Hereditários	26
2.4.3	Efeitos Imediatos e Tardios	26
2.5	LESÕES RADIOINDUZIDAS E EFEITOS GENÔMICOS	27
2.5.1	Mutação e Reparo	28
2.5.1.1	Reparo por excisão de base (BER – <i>base excision repair</i>)	30
2.5.1.2	Reparo por excisão de nucleotídeos (NER – <i>nucleotide excision repair</i>)	31
2.5.1.3	Reparação de DSBs (<i>double-strand breaks</i>)	31
2.6	CICLO CELULAR	32
2.7	LINFÓCITOS HUMANOS	34
2.8	DOSIMETRIA BIOLÓGICA	35
3	OBJETIVOS	40
3.1	OBJETIVO GERAL	40
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	40
4	METODOLOGIA	41
4.1	SELEÇÃO DE DOADORES E COLETA DE AMOSTRAS	41
4.2	IRRADIAÇÃO DAS AMOSTRAS	41

4.3	CULTIVO DE CÉLULAS	42
4.4	PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS	43
4.5	ANÁLISE MICROSCÓPICA	43
4.6	ANÁLISE DOS DADOS	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
6	CONCLUSÕES	54
	REFERÊNCIAS	55
	ANEXOS	60
	ANEXO A – Cópia do parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE	61
	ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	62

1 INTRODUÇÃO

O amplo uso de radiações ionizantes, para fins médicos, industriais, agrícolas, de pesquisa e militares aumenta o risco de superexposição de trabalhadores e indivíduos da população em geral à radiação. A Dosimetria Biológica, baseada no estudo de alterações cromossômicas, principalmente o ensaio de dicêntrico, tornou-se rotina na estimativa de dose absorvida em exposições acidentais. Com a aplicação em centenas de casos de suspeita ou superexposições verificadas, provou-se o valor deste método e também se definiu suas limitações.

As análises cromossômicas em linfócitos periféricos humanos fornecem um meio de estimativa de doses absorvidas de corpo inteiro após superexposição real ou suspeita às radiações ionizantes por meio do uso de curvas de calibração dose resposta pré-estabelecidas a partir de experimentos padronizados *in vitro*.

Em casos de acidentes radiológicos de grande escala, os indivíduos suspeitos de exposição precisam de uma rápida avaliação capaz de estimar a dose a que foram expostos para que seja feita a intervenção médica de imediato. Neste contexto, é necessário o uso de métodos de triagem para que os indivíduos expostos a doses mais elevadas tenham prioridade na intervenção médica devido ao alto risco de efeitos biológicos severos e de morte.

Assim, o ensaio de micronúcleo por bloqueio da citocinese surgiu como alternativa, por ser uma técnica mais rápida e de fácil análise, o que a torna adequada para procedimentos de triagem em situações emergenciais. Apesar disso, os micronúcleos não são específicos para a radiação ionizante, variando de acordo com idade, sexo, estilo de vida e aparecendo também devido a exposições a outros agentes genotóxicos e mutagênicos. Desta forma, após a triagem, o ensaio de dicêntrico deve ser aplicado para uma estimativa de dose absorvida mais exata, tendo em vista a sua alta especificidade, tornando-o padrão-ouro para a dosimetria biológica.

Diante disso, um ensaio combinado que englobe as técnicas de micronúcleo e dicêntrico e que ainda permita a distinção de diferentes fases do ciclo celular, se mostra altamente promissor para a avaliação de doses acidentais em emergências

de larga escala.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 RADIAÇÕES IONIZANTES

A radiação é definida como energia em movimento, enquanto a ionização é o processo a partir do qual a radiação colide e arranca um dos elétrons de um átomo, tornando-os eletricamente carregados. Em 1896, uma rocha de urânio esquecida sobre um filme fotográfico virgem levou à descoberta de um fenômeno denominado de radioatividade. Essa descoberta se deu após ser constatado que o filme em questão havia sido velado por raios ou radiações que saía da rocha.

Posteriormente, foi constatado que o urânio não era o único material capaz de emitir raios, outros elementos com massas próximas à dele como o rádio e o polônio também tinham a mesma propriedade e foram chamados de elementos radioativos (PINTO *et al.*, 2005). A emissão de radiação ionizante proveniente desses materiais decorre da tentativa de atingirem a estabilidade nuclear por meio de decaimento radioativo que ocorre pela emissão de partículas ou fótons (IAEA, 2011).

As radiações ionizantes mais conhecidas são as partículas alfa(α), beta(β), pósitrons e nêutrons, e as que são formadas por ondas eletromagnéticas como os raios gama (γ) e raios X. Essas radiações são emitidas a partir da instabilidade nuclear de elementos radioativos, com exceção dos raios X, que tem origem na eletrosfera ou no freamento de partículas carregadas no campo eletromagnético do núcleo atômico ou dos elétrons (TAUHATA *et al.*, 2013).

Os raios X podem ser produzidos mecanicamente quando elétrons são acelerados em direção a um alvo metálico. O choque do feixe de elétrons (que saem do cátodo com energia de dezenas de KeV) com o ânodo (alvo) produz dois tipos de raios X. Estes podem ser classificados como característicos (resultantes de desexcitações atômicas) e raios X de frenagem ou *Bremsstrahlung* (originados da desaceleração ou desvio do elétron) (OKUNO, 2013).

É de fundamental importância a classificação das radiações visto que cada tipo interage de forma distinta com a matéria (YOSHIMURA, 2015). A emissão de energia e partículas de núcleos instáveis é capaz de causar ionização em qualquer

tipo de molécula inclusive, nas moléculas biológicas, como uma fita de DNA, que podem perder suas funções a depender do nível de ionização a que foram expostas (CHRISTENSEN; IDDINS; SUGARMAN, 2014). É incontestável a utilidade das radiações ionizantes, sua aplicabilidade desde o campo da medicina às armas bélicas e seus benefícios, bem como, seus riscos (RESQUETTI, 2013).

2.2 INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO ELETROMAGNÉTICA COM A MATÉRIA

As características comuns aos raios X e gama são: caráter ondulatório, ausência de carga e massa de repouso; conferindo a essas radiações a propriedade de penetrar e percorrer grandes espessuras de um material antes de sofrer a primeira interação. O poder de penetração das radiações X e gama é maior que a das partículas carregadas, e a probabilidade de interação com a matéria depende do valor de sua energia. Os principais modos de interação dessas radiações, excluindo as reações nucleares são o efeito fotoelétrico, o efeito Compton e a produção de pares (TAUHATA *et al.*, 2013).

O efeito fotoelétrico se caracteriza pela incidência de uma frequência específica de onda eletromagnética sobre um material, possuindo essa frequência, uma energia suficientemente alta para arrancar os elétrons do mesmo. O mais provável é que o fotoelétron ejetado seja proveniente da camada mais interna do átomo, ou seja, a camada eletrônica K; enquanto a lacuna formada é preenchida por algum elétron das camadas mais externas.

O efeito fotoelétrico predomina em baixas energias e para elementos químicos de elevado número atômico (TAUHATA *et al.*, 2013). Os raios X e gama são capazes de transferir a energia para um único elétron orbital, expelindo-o com uma energia cinética bem definida (Figura 1).

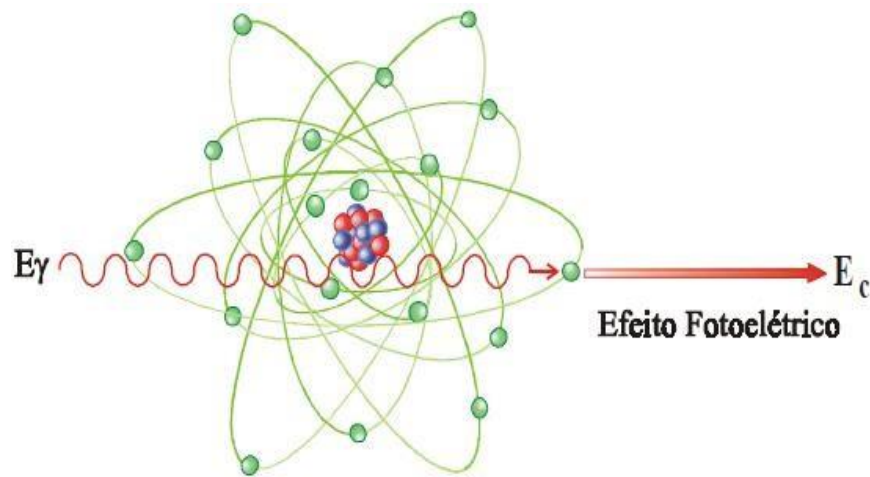


Figura 1. Ilustração do efeito fotoelétrico (TAUHATA *et al.*, 2013).

O efeito Compton consiste na diminuição de energia de um elétron ocasionando o espalhamento de um fóton de raios X ou gama quando estes interagem com a matéria. No efeito Compton, o fóton é desviado de sua trajetória inicial por um ângulo relacionado com a quantidade de energia transferida ao elétron (KNOLL, 1999). Isso faz com que de um fóton de energia fixa possa resultar elétrons com energia variável desde zero até um valor máximo (Figura 2) (TAUHATA *et al.*, 2013).

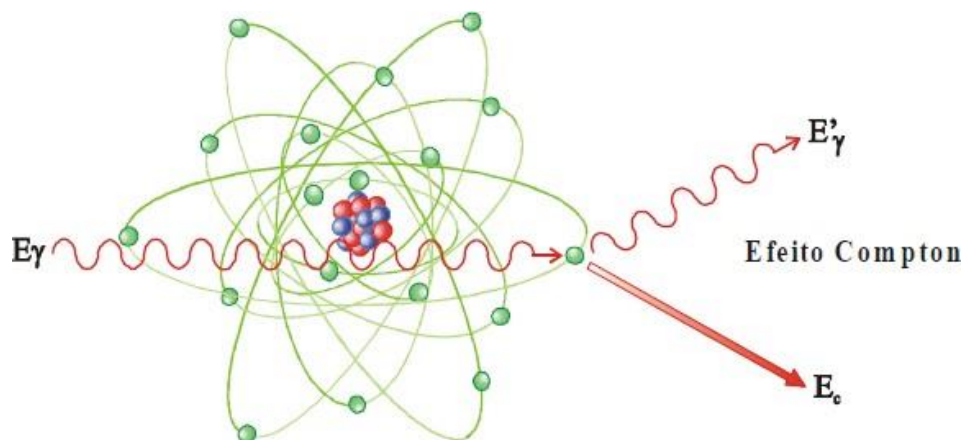


Figura 2. Ilustração do efeito Compton (TAUHATA *et al.*, 2013).

Quando a energia da radiação gama incidente aumenta ou quando a energia de ligação do elétron que sofre a incidência diminui, a um nível desprezível em relação à da radiação incidente, a ocorrência do efeito Compton se torna mais provável (TAUHATA *et al.*, 2013).

Uma das principais formas de absorção da radiação eletromagnética de alta energia é o processo de produção de par. Esse processo ocorre quando um fóton interage com o núcleo de um elemento de elevado número atômico, desaparece e surge um par elétron-pósitron e todo o excesso de energia transportada pelo fóton (que deve ser maior ou igual a 1,022 MeV) é transformado em energia cinética no pósitron e no elétron (Figura 3). Em seguida, o pósitron volta a se combinar com um elétron do meio dando origem a dois fótons de aniquilação com energia de 511 keV cada (KNOLL, 1999; TAUHATA *et al.*, 2013).

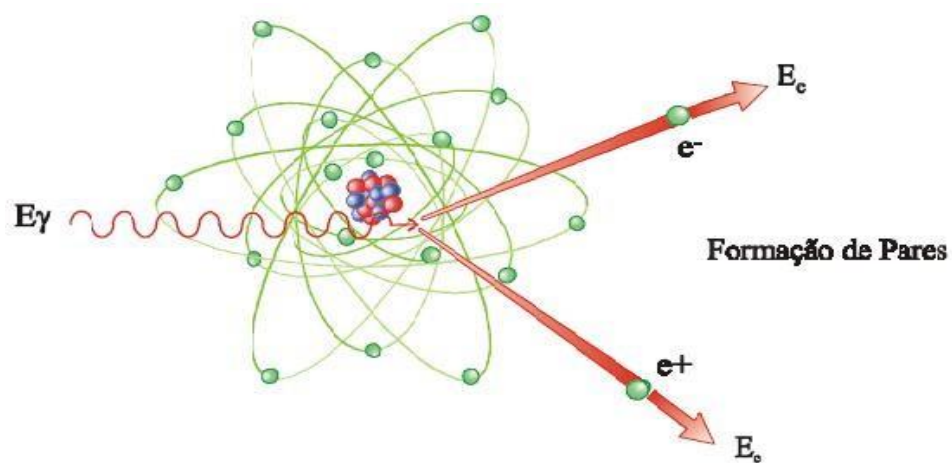


Figura 3. Ilustração da produção de pares (TAUHATA *et al.*, 2013).

Em energias de fótons suficientemente baixas predominam as interações fotoelétricas para todos os materiais, no entanto, à medida que a energia aumenta, o efeito fotoelétrico diminui mais rapidamente que o efeito Compton que acaba se tornando o efeito predominante. Caso a energia do fóton continue a aumentar, ainda que o efeito Compton decresça em termos absolutos, continua aumentando em relação ao efeito fotoelétrico (TAUHATA *et al.*, 2013). Acima da energia de alguns MeV para o fóton, a produção de pares passa a ser a principal contribuição para as

interações de fótons (Figura 4) (PINTO *et al.*, 2005).

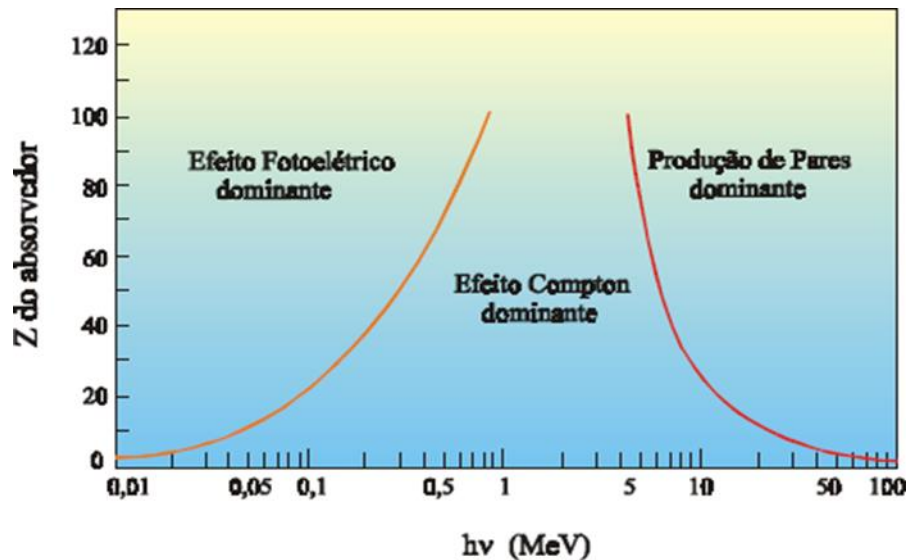


Figura 4. Ilustração das interações de acordo com os níveis de energia (TAUHATA *et al.*, 2013).

2.3 INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO COM O TECIDO BIOLÓGICO

A interação da radiação ionizante com o tecido biológico ocorre pela deposição de energia de forma descontínua no tempo e no espaço, sendo seu efeito sobre um determinado tecido proporcional à quantidade de energia absorvida (IAEA, 2011). Essa interação é capaz de alterar a estrutura das moléculas que compõem uma célula e produzir danos ao DNA direta ou indiretamente, com a produção de radicais livres, íons e elétrons, mas nem sempre essas alterações são prejudiciais ao organismo humano (TAUHATA *et al.*, 2013).

A gravidade de tais danos depende da dose absorvida, taxa de dose absorvida, Transferência Linear de Energia (LET - Linear Energy Transfer) e Efetividade Biológica Relativa (RBE, Relative Biological Effectiveness) (IAEA, 2011).

2.3.1 Dose e Taxa de Dose Absorvida

Dose absorvida (D) é definida como a quantidade de energia depositada na matéria pela radiação ionizante, por unidade de massa, podendo ser expressa pela equação 1 (IAEA, 2011).

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

Onde, $d\varepsilon$ é a energia média cedida pelas radiações ionizantes à matéria em Joule (J), e dm é a massa da matéria em Quilograma (Kg) (IAEA, 2011).

Já a taxa de dose absorvida se refere à energia das partículas ionizantes transferida para a matéria em um dado intervalo de tempo, ou seja, é a dose absorvida por unidade de tempo (IAEA, 2011).

A taxa de dose produz um efeito biológico interessante, pois seu aumento ou diminuição conduz a mecanismos de respostas distintos. Por exemplo, se for depositada uma dose absorvida alta em um tecido com uma taxa de dose baixa, o tecido tem maior probabilidade de se regenerar, compensando qualquer efeito biológico às células somáticas e nenhum efeito será notado. Entretanto, se a mesma dose absorvida for depositada com uma taxa de dose absorvida maior, os danos celulares podem ser irreparáveis (BARCELLOS-HOFF; NGUYEN, 2009; IAEA, 2011).

2.3.2 Transferência Linear de Energia-LET

A quantidade média de energia depositada por unidade de comprimento de trajetória é conhecida por LET (Transferência Linear de Energia) que determina o modo como as ionizações serão distribuídas na matéria, se de forma aleatória ou espaçada (IAEA, 2011).

Radiações de baixa LET resultam em uma distribuição aleatória de ionizações, visto que, necessitam de mais colisões com o alvo para depositar sua energia; enquanto as radiações de alta LET produzem ionizações espaçadas que são distribuídas densamente, pois necessitam de menos colisões para depositar a mesma quantidade de energia, provocando mais danos do que as radiações de baixa LET (Figura 5) (IAEA, 2011).

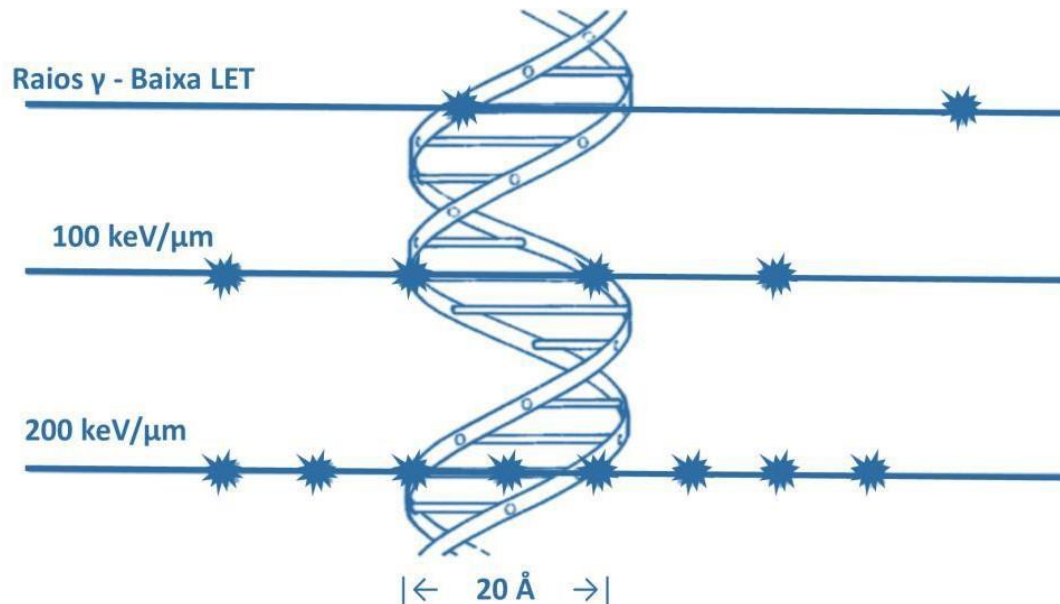


Figura 5. Distribuição espacial média de eventos ionizantes para diferentes valores de LET em relação à estrutura de dupla hélice do DNA (HALL *et al.*, 2017).

Utilizando radiações de alta LET (alfa, nêutrons, íons pesados) e baixa LET (beta, elétrons, fótons), com altas e baixas taxas de dose, pode-se obter o percentual de sobrevivência de células de um tecido ou órgão. Observa-se que para o mesmo valor de dose, as radiações de alta LET resultam em menor percentual de sobrevivência de células que as de baixa LET.

Os pontos experimentais podem ser ajustados matematicamente e, as diversas expressões obtidas são denominadas de curvas de sobrevivência, como mostrado na Figura 6 (TAUHATA *et al.*, 2003).

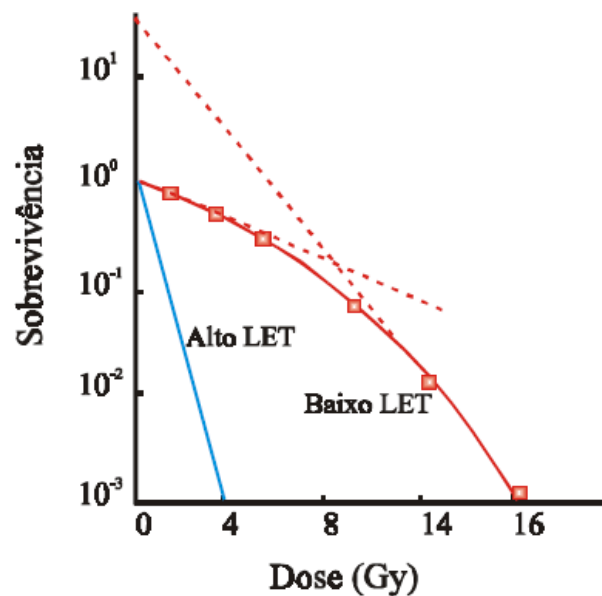


Figura 6. Curva de sobrevivência de células para radiações ionizantes de alta e baixa LET (TAUHATA *et al.*, 2003).

2.3.3 Efetividade Biológica Relativa-RBE

A Efetividade Biológica Relativa (RBE) pode ser descrita como a quantidade de doses de diferentes tipos de radiações requeridas para ter um determinado efeito biológico (IAEA, 2011). A RBE é expressa em função da LET, aumentando com a LET até cerca de 100 keVm^{-1} e decaindo posteriormente, conforme mostrado na Figura 7. Logo, quanto maior for o valor da LET, os efeitos biológicos no tecido irradiado serão mais concentrados (TAUHATA *et al.*, 2003).

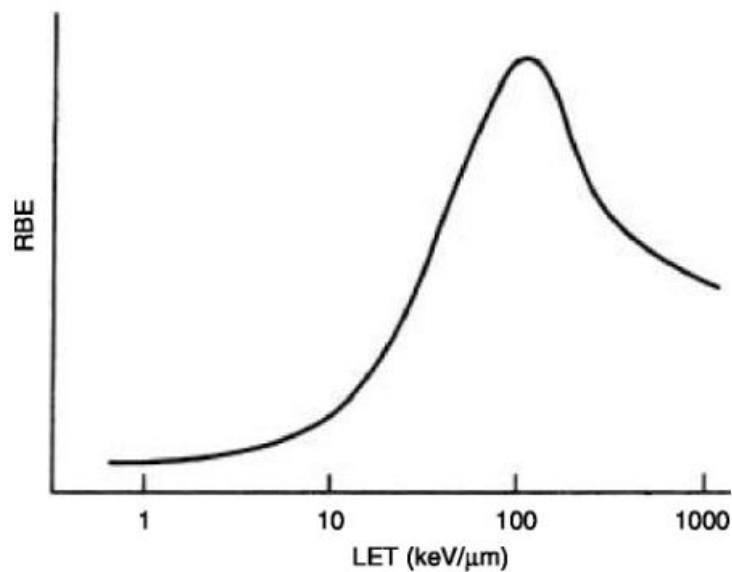


Figura 7. Relação entre RBE e LET (IAEA, 2011).

Entretanto, a RBE não depende apenas da LET, mas também da dose, da taxa de dose, do fracionamento da dose e até mesmo da idade da pessoa exposta e suas condições fisiológicas no momento da exposição, sendo assim, a RBE pode ser expressa pela equação 2 (TAUHATA *et al.*, 2003).

$$RBE = \frac{\text{Dose referência } (Dr)}{\text{Dose radiação A } (Dra)} \quad (2)$$

Sendo, Dr a dose referência de uma radiação conhecida necessária para produzir uma resposta específica e Dra , a radiação da qual se quer descobrir a dose necessária para produzir igual resposta (TAUHATA *et al.*, 2003).

2.3.4 Danos ao Genoma

A absorção da radiação ionizante pelas células pode levar a uma interação direta com as moléculas biológicas, como o DNA, podendo causar desde mutação genética até morte celular; ou a uma interação indireta através da quebra da molécula de água, formando radicais livres que podem atacar outras moléculas

importantes. Esse mecanismo é relevante, pois nosso corpo é composto por mais de 70% de água (OKUNO, 2013).

Para radiações de alta energia cerca de dois terços dos danos causados são de forma indireta, enquanto apenas um terço é de forma direta (ALIZADEH; ORLANDO; SANCHE, 2015).

Os danos causados ao genoma desencadeiam uma sucessão de mecanismos de sinalização bioquímica e molecular que podem reparar os danos, desenvolver alterações fisiológicas permanentes ou, em último caso, resultar na morte celular (AZZAM; JAY-GERIN; PAIN, 2012).

As alterações no genoma podem resultar no desenvolvimento de um processo neoplásico, caso a célula modificada mantenha sua capacidade reprodutiva. Embora o sistema imunológico consiga eliminar ou bloquear as células alteradas, as células sobreviventes acabam por se adaptar e persistirem na reprodução superando o mecanismo de defesa do organismo (BUDWORTH *et al.*, 2012).

2.3.5 Morte Celular

Quando o limiar de dose que as células do tecido suportam é ultrapassado tem-se o denominado efeito determinístico, caracterizado pela severidade do dano. As células mais radiossensíveis são as integrantes do ovário, dos testículos, da medula óssea e do cristalino (IAEA, 2011).

As células atingidas por uma dose de radiação elevada (vários Gy) podem não suportar as transformações e morrerem, após tentativas de se dividir. Ocasionalmente, pode haver uma compensação do aumento da taxa de perda com o aumento da taxa de reposição. Neste caso, haverá um período de transição, entre o comprometimento parcial da função do tecido ou órgão e posterior reposta. A perda de uma quantidade significativa de células pode causar prejuízos detectáveis no funcionamento do tecido ou órgão (TAUHATA *et al.*, 2003).

2.4 CLASSIFICAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS

Os efeitos biológicos da radiação dependem de fatores físicos, entre eles o fracionamento de dose absorvida, a dose total e a LET, além da taxa de dose absorvida; e fatores biológicos: nível de oxigenação tecidual e volume de tecido irradiado, incluindo o tipo celular irradiado com suas características genéticas e taxa de proliferação celular (TAUHATA *et al.*, 2003).

Dessa forma, os efeitos radioinduzidos são classificados em função da dose e forma de resposta, em estocásticos e determinísticos; em termos do tempo de manifestação, em imediatos e tardios; em função do nível de dano, em somáticos e hereditários (TAUHATA *et al.*, 2003).

2.4.1 Efeitos Estocásticos e Determinísticos

Os efeitos estocásticos são aqueles em que a probabilidade de ocorrência é proporcional à dose de radiação recebida, sem a existência de limiar de dose. Isto significa que valores baixos de doses absorvidas podem induzir tais efeitos. Entre estes efeitos, destaca-se o tumor maligno (TAUHATA *et al.*, 2003).

A probabilidade de ocorrência de um câncer radioinduzido depende da quantidade de clones de células modificadas no tecido ou órgão. O período de detecção do câncer após a exposição à radiação pode chegar até 40 anos, já no caso da leucemia pode levar entre 5 e 7 anos, com período de latência de 2 anos, como representado na Figura 8 (TAUHATA *et al.*, 2003).

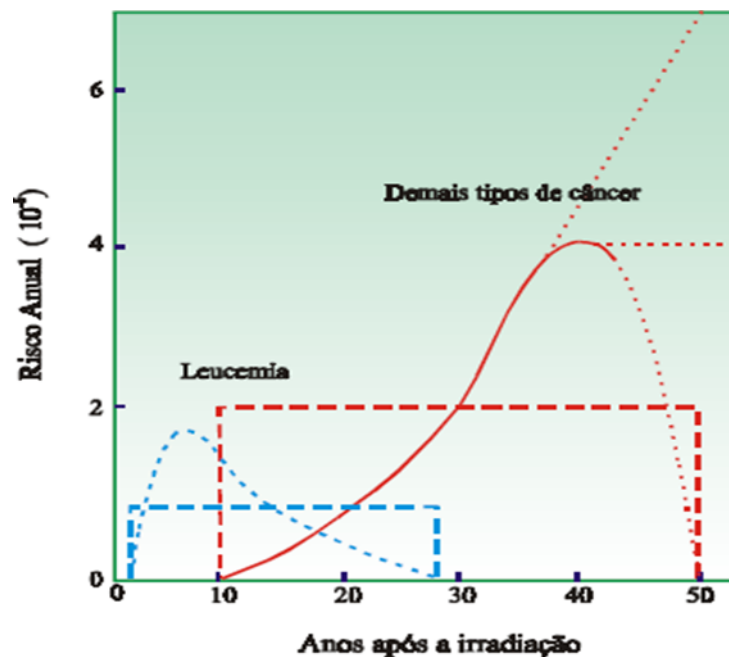


Figura 8. Tempo de latência para aparecimento de câncer após irradiação (TAUHATA *et al.*, 2003).

Em contrapartida, os efeitos determinísticos estão diretamente relacionados à dose absorvida e à severidade do dano, que aumenta com a dose aplicada. Esses efeitos causam um grau de morte celular não compensado pela reposição ou reparo, com prejuízos detectáveis no funcionamento do tecido ou órgão (TAUHATA *et al.*, 2003).

No entanto, existe um limiar de dose abaixo do qual a perda de células não é suficiente para causar efeitos clínicos detectáveis, isso significa que, os efeitos determinísticos são produzidos por doses elevadas, acima do limiar. Além da severidade, os efeitos determinísticos variam com a frequência de um dado efeito, aumentando em função da dose em uma população de indivíduos com diferentes susceptibilidades (curvas a, b e c), conforme ilustra a Figura 9 (TAUHATA *et al.*, 2003).

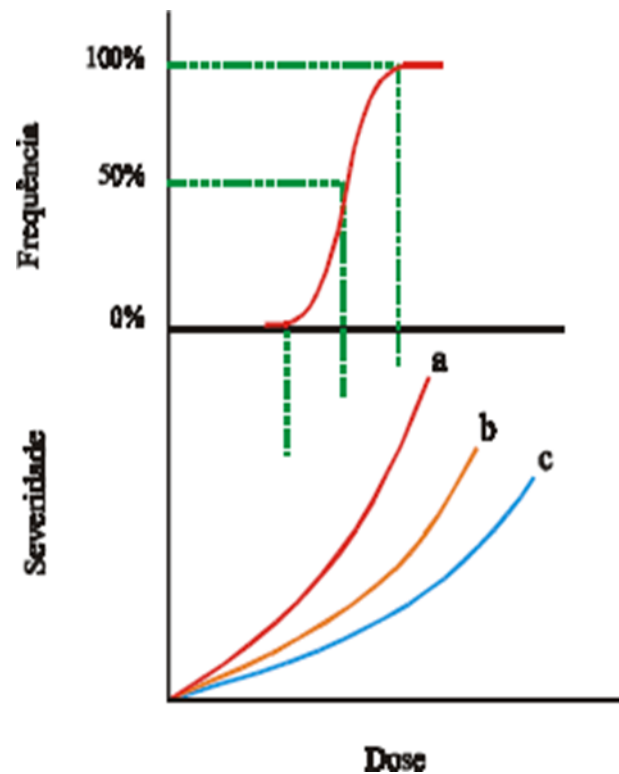


Figura 9. Relações típicas entre dose e severidade do dano para efeitos determinísticos numa população de indivíduos (TAUHATA *et al.*, 2003).

2.4.2 Efeitos Somáticos e Hereditários

Os efeitos somáticos são aqueles ocasionados a partir do dano nas células do corpo e o efeito aparece na própria pessoa que foi exposta à radiação. A gravidade desses efeitos depende da dose absorvida, da taxa de absorção da energia da radiação, da região e da área do corpo irradiada (TAUHATA *et al.*, 2003).

Contudo, quando os efeitos surgem nos descendentes da pessoa irradiada (como resultado do dano produzido pela radiação em células dos órgãos reprodutores) são denominados efeitos hereditários. Nesse caso, os efeitos independem da taxa de absorção de dose e têm caráter cumulativo (TAUHATA *et al.*, 2003).

2.4.3 Efeitos Imediatos e Tardios

Os efeitos biológicos que surgem em um período de poucas horas até algumas semanas após a exposição, são denominados de efeitos imediatos, como por exemplo, a radiodermite. Quando os efeitos aparecem depois de anos ou mesmo décadas, são chamados de efeitos retardados ou tardios, como por exemplo, o câncer (TAUHATA *et al.*, 2003).

Para as doses elevadas, predominam os efeitos imediatos, e as lesões serão severas ou até letais. Se as doses forem intermediárias, predominam os efeitos imediatos com grau de severidade menor, e não necessariamente permanentes. Entretanto, haverá uma grande chance de lesões severas em longo prazo. Para doses baixas, não haverá efeitos imediatos, mas há possibilidade de lesões em longo prazo (TAUHATA *et al.*, 2003).

2.5 LESÕES RADIOINDUZIDAS E EFEITOS GENÔMICOS

A constante exposição da molécula de DNA a danos provocados por uma vasta variedade de agentes químicos e físicos sejam eles endógenos ou exógenos, pode causar diferentes tipos de lesões, sendo a quebra da fita dupla a mais citotóxica quando comparada às demais e podendo resultar em deleções no DNA e instabilidade genética (SANTOS, 2015).

Os danos provocados pela radiação ionizante ao DNA incluem: quebra de fita única (SSB, single-strand break), quebra de fita dupla (DSB), vários tipos de ligações cruzadas entre DNA-DNA e DNA-proteínas, seja pela ionização direta, seja pela ionização indireta, modificação de bases via oxidação, alquilação, desaminação ou perda de resíduos de base na produção de sítios apurínico ou apirimidínico. Todas essas modificações podem levar indiretamente à produção de SSBs e/ou DSBs (KAVANAGH *et al.*, 2013; HALL *et al.*, 2017).

Embora todas as células possam ser alvo dos danos causados pela radiação ionizante, as lesões mais deletérias para a sobrevivência celular são aquelas envolvendo a estrutura do DNA, devido à função desempenhada por ele necessária para construir e manter o funcionamento das células, tecidos, e organismos (HALL *et al.*, 2017). Fortuitamente, as lesões ocorridas na estrutura do DNA são prontamente

reparadas pelas células por meio da ação de várias enzimas de reparo, preservando assim, a estabilidade genômica. (JACKSON, 2002).

Caso não seja possível reparar os danos ao DNA, especialmente se tratando de quebras tanto de fitas simples quanto de fitas duplas no DNA, mecanismos de sinalização crônica são induzidos e provocam a senescência celular ou morte celular por apoptose. A Figura 10 esquematiza os principais agentes causadores de danos ao DNA e as possíveis respostas celulares desencadeadas (SANTOS, 2015).

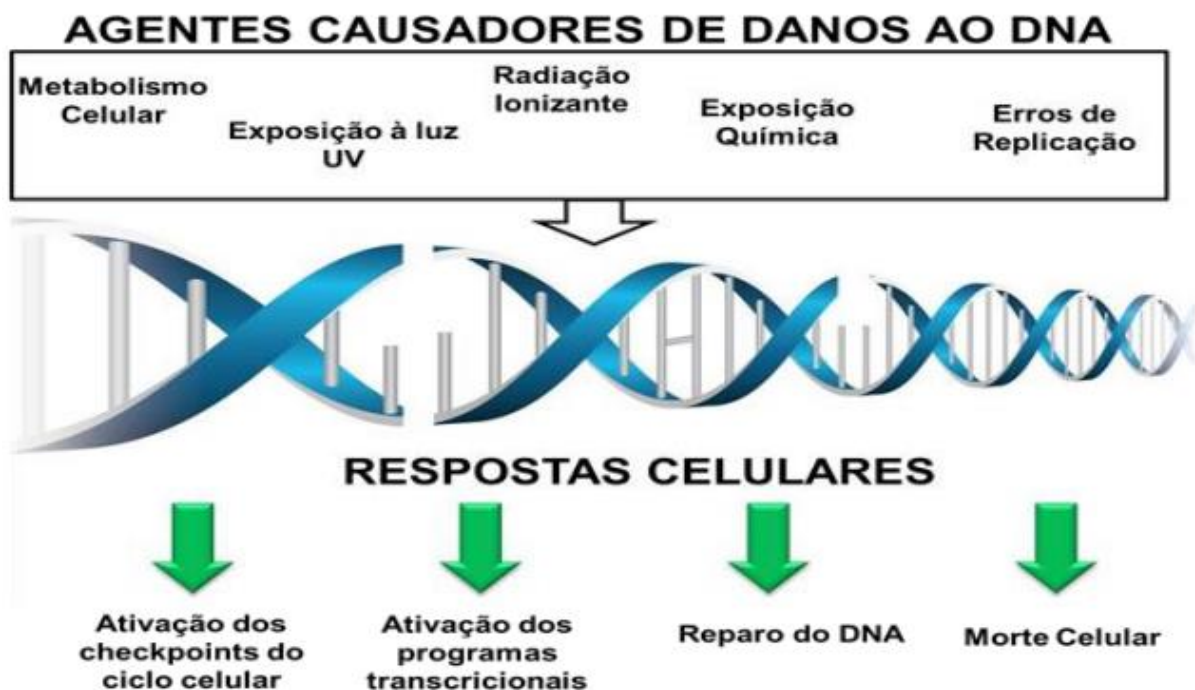


Figura 10. Esquema das principais fontes de danos ao DNA e as diferentes respostas celulares (SANTOS, 2015).

2.5.1 Mutação e Reparo

Quando as alterações no DNA são reparadas erroneamente ou não são reparadas, podem comprometer o metabolismo da molécula, acarretando mutações, as quais estão relacionadas aos processos de câncer e envelhecimento; ou em eventos citotóxicos que ativam vias de morte celular (MENCK; MUNFORD, 2014).

Sendo assim, a reparação tem papel fundamental na garantia da viabilidade celular (JACKSON, 2002).

As alterações são classificadas em gênicas e cromossômicas. As alterações gênicas são induzidas na sequência do DNA e resultam na perda ou na transformação de informações codificadas na forma de genes. As alterações cromossômicas ocorrem na forma de uma reorganização na estrutura do cromossomo (translocação, inversão ou mesmo ganho ou perda de parte maior destes cromossomos) (KIMURA, 2012).

A ocorrência das mutações pode resultar de mudanças espontâneas ou induzidas. As espontâneas tendem a ocorrer na ausência de qualquer agente conhecido, surgindo durante a replicação, aparentemente são consequências de erros no pareamento de bases dos nucleotídeos nas fitas antiga e nova do DNA. A maioria dos agentes que podem reagir química ou fisicamente com o DNA causam mutações, sendo assim, são consideradas mudanças induzidas. Muitas formas de radiação eletromagnética são agentes mutagênicos indutores (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Na presença de danos ao DNA são ativadas vias bioquímicas, conhecidas como *checkpoints*, responsáveis por provocar um atraso ou até mesmo bloqueio do ciclo celular, funcionando como uma resposta às mutações que estão ocorrendo. Essa sinalização é detectada por proteínas específicas, geralmente representadas por quinases, que executam diversas funções celulares, dentre elas o bloqueio ou, o reparo do DNA e a apoptose (KIMURA, 2012).

Os *checkpoints* são os pontos de parada durante o ciclo celular onde a célula tem tempo para ser reparada, impedindo assim, a transmissão dos defeitos para as células filhas e contribuindo com a manutenção da estabilidade genômica (SILVA, 2017). Porém, se ocorrem defeitos nesses *checkpoints* ou se o dano ao DNA ou ao cromossomo for extenso, a reparação não é possível e a célula, provavelmente, dará início a apoptose.

A instabilidade genômica pode levar a uma transformação das células normais em células tumorais. E embora essa instabilidade seja um fator preponderante para a indução de um câncer por ação das radiações, não

necessariamente haverá a evolução para alguma patologia (SILVA, 2017).

2.5.1.1 Reparo por excisão de base (BER – *base excision repair*)

Esta via de reparação altamente conservada é responsável pela restauração da grande maioria dos danos endógenos do DNA, incluindo alquilações, oxidações, desaminações e depurinadizações, como também quebra de fita simples do DNA (SSB). Sendo assim, a principal função do BER é remover as lesões frequentemente produzidas ao DNA ocasionadas por espécies reativas de oxigênio, radiação, produtos químicos genotóxicos, entre outros, e manter a integridade do genoma (WALLACE, 2014).

No BER ocorre o reconhecimento específico do dano e a sua excisão é realizada por glicosilase direcionadas para lesões de bases distintas; posteriormente, há um reconhecimento do dano geral durante a produção dos produtos intermediários, os sítios AP 3' terminal são processados por nucleases de estrutura específica e, por último, tem-se a síntese de reparo do DNA e de ligação; como esquematizado na Figura 11 (WILSON *et al.*, 2011).

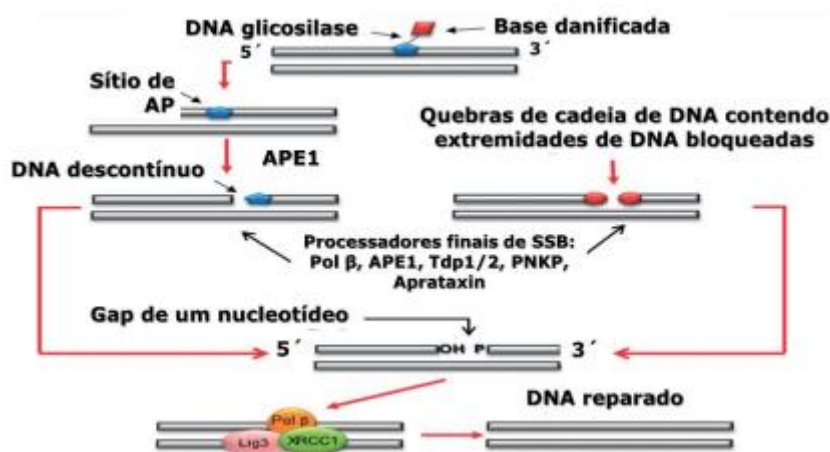


Figura 11. Ilustração resumida da principal via de BER (DIANOV; HÜBSCHER, 2013).

2.5.1.2 Reparo por excisão de nucleotídeos (NER – *nucleotide excision repair*)

Esta é a principal via envolvida no reparo de lesões amplas e volumosas que distorcem a hélice do DNA e conta com mais de 30 genes envolvidos nesse sistema reparo. A ocorrência do NER nos eucariotos reconhece e remove as distorções helicoidais de duas formas: reparação genômica global (GGR, *global genome repair*) e reparação acoplada de transcrição (TCR, *transcription-coupled repair*), que se distinguem apenas na forma como são reconhecidas as lesões de DNA que distorcem a hélice (BUDWORTH *et al.*, 2012).

Enquanto no reparo por excisão de base (BER), apenas a base avariada é removida, no NER um nucleotídeo é removido junto com muitos outros nucleotídeos adjacentes; outra diferença entre essas vias de reparo são as enzimas utilizadas (KIMBALL, 2015).

2.5.1.3 Reparação de DSBs (*double-strand breaks*)

O reparo de DSBs ocorre por três vias principais: recombinação homóloga (HR- *homologous recombination*), junção de extremidades não homólogas (NHEJ- *Non-homologous end-Joining*) e anelamento de fita simples (SSA, *single-strand annealing*) (TALEEI & NIKJOO, 2013).

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

Da mesma forma que o processo de HR, a reparação via SSA envolve proteínas em comum, depende do ciclo celular e exige a presença de sequências homólogas. A via SSA pode levar a grandes deleções, pois promove a remoção de sequências de bases distorcidas (*overhanging*) (TALEEI & NIKJOO, 2013).

Enquanto na via NHEJ, as primeiras etapas do reparo do DNA se assemelham à via HR. Nessa via a DSB é reconhecida pelas proteínas Ku70/80 e a

sinalização é mediada pela DNA-PK (proteína quinase dependente de DNA), assim, o processo de reparação é iniciado (TUIMALA *et al.*, 2004). A via NHEJ é mais propensa a erros por ligar diretamente as extremidades das DSBs nas fases G₀ e G₁, além de ser potencialmente mutagênica, à medida que, é capaz de evitar a morte celular provocando alterações na molécula de DNA (MLADENOV; ILIAKIS, 2011; ISBIR *et al.*, 2015).

2.6 CICLO CELULAR

O ciclo celular consiste no processo de produção de novas células, onde ao final, são originadas células-filhas com a mesma informação da célula-mãe. Esse processo é dinâmico e ocorre de forma ordenada. O ciclo se divide em quatro fases com períodos de tempo bem regulados, sendo cada fase dependente de uma ativação e completude das fases anteriores. O ciclo celular compreende a fase G₁ (pré-síntese de DNA), S (síntese de DNA), G₂ (pré- mitótica) e M (mitótica) (Figura 12) (MALUMBRES; BARBACID, 2009).

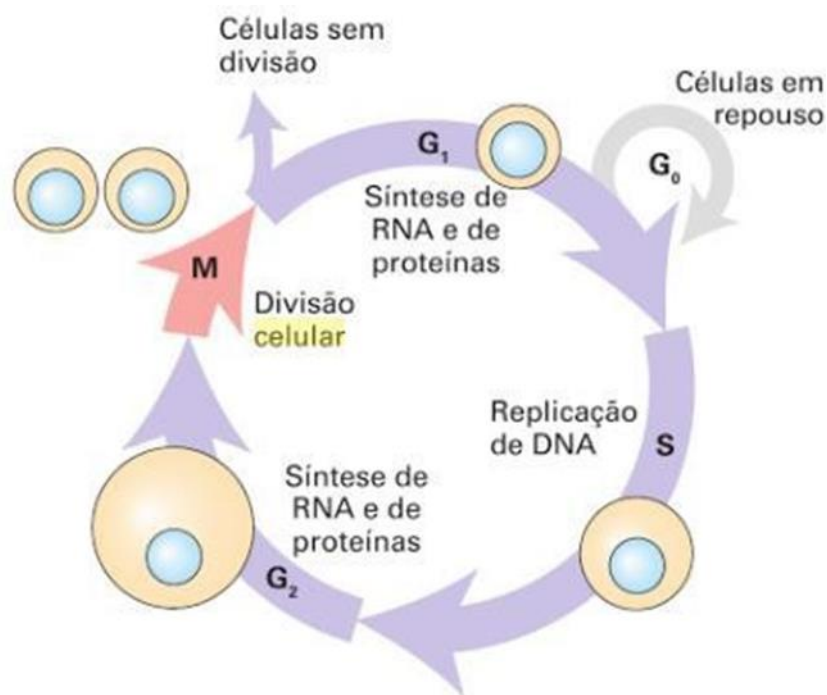


Figura 12. Representação esquemática do ciclo celular (LODISH *et al.*, 2014).

A primeira fase do ciclo (fase G) necessita de estímulos extracelulares que sinalizem a saída da célula da fase G1 e promovam sua entrada na fase S. Portanto, durante G1 a célula se encontra em um estado quiescente. Ao final de G1, o ciclo deixa ser dependente de fatores extracelulares e passa a ser controlado por mecanismos intracelulares que envolvem a ativação de proteínas CDKs (quinases dependente de ciclinas) (EKHOLM *et al.*, 2001).

O ciclo celular possui um ponto de restrição (R) entre G0 e G1 controlado por CDKs e *checkpoints* que regulam a entrada na fase S, a entrada e a saída na mitose; impedindo assim, que haja a progressão de células com DNA danificado. Se tudo for favorável, o ciclo avança para a fase S, que tem como principal função garantir a síntese do DNA e duplicação do material genético (MALUMBRES; BARBACID, 2009).

A célula é verificada ao entrar na fase G2 através de um sistema enzimático e caso haja algum defeito, as células normais detêm o seu avanço no ciclo celular até que a condição seja corrigida. Contudo, se o dano ao DNA ou ao cromossomo for extenso, a reparação fica impossível e a célula inicia a apoptose. Na fase G2 ocorre a síntese de proteínas que serão fundamentais para a mitose. Após a verificação da integridade do DNA, a célula progride para fase M (GUERRA *et al.*, 2011).

A mitose é dividida em quatro etapas básicas: prófase, a cromatina começa a se condensar; metáfase, os cromossomos atingem o grau máximo de condensação e se alinham na placa equatorial; anáfase, as cromátides-irmãs atingem os polos opostos da célula; e a telófase, onde ocorre a descondensação dos cromossomos e ocorre a citocinese. Por fim, a divisão citoplasmática origina duas células-filhas idênticas à célula-mãe, que retornarão a G0 até a necessidade de uma nova divisão ou se diferenciam (COOPER; HAUSMAN, 2007).

Células expostas à radiação ionizante podem sofrer parada do ciclo celular antes da reparação do DNA, levando à produção de mutações, de transformações e de morte celular (JEGGO & LAVIN, 2009). Segundo a Lei proposta por Bérignon e Tribondeau (1906), a radiosensibilidade tem relação direta à atividade mitótica e

inversa ao grau de diferenciação celular, ou seja, células germinativas e de tecidos em constante renovação como intestino, pele e medula óssea são mais afetadas que células senescentes como as neurais, hepáticas e ósseas.

2.7 LINFÓCITOS HUMANOS

Os linfócitos são células integrantes do sistema imunológico, responsáveis por reconhecer e eliminar os agentes infecciosos que frequentemente entram em contato com o organismo humano (ZIPFEL, 2009).

Existem dois tipos de respostas imunes. A resposta imune inata (natural), caracterizada pela rápida e inespecífica resposta à agressão, sendo a primeira linha de defesa do organismo; e a resposta imune adquirida (adaptativa), caracterizada pela especificidade e diversidade de reconhecimento, memória e resposta, induzida pela exposição repetida a um determinado antígeno (CRUVINEL *et al.*, 2010).

É conhecido que todas as linhagens de células hematopoiéticas sofrem redução em seus níveis a depender do valor de dose absorvida (DAINIYAK, 2002). Sabe-se também que a radioterapia induz a linfopenia e alterações na distribuição dos linfócitos T e B, acabando por comprometer a imunidade dos pacientes, visto que, os linfócitos são reconhecidos como células altamente sensíveis à radiação ionizante e mesmo aqueles localizados na periferia do corpo humano têm se mostrado radiosensíveis, embora em diferentes graus. (SHAHID *et al.*, 2015).

Dessa forma, é de grande interesse a utilização de biomarcadores para avaliação de lesões teciduais em populações humanas nos casos de exposição, acidental ou pós radioterapia, às radiações ionizantes (BUDWORTH *et al.*, 2012). Diante disso, os linfócitos são considerados os alvos da dosimetria citogenética por serem as células mais radiosensíveis dentre as células sanguíneas, representando uma exceção à Regra de Bergonié-Tribondeau (IAEA, 2011).

Esse tipo celular é de fácil obtenção do indivíduo irradiado, tem uma vida média de 3 anos e raramente está em mitose no sangue periférico, embora a sua circulação e substituição possam ser afetadas em decorrência da apoptose de células linfáticas após exposição à radiação ionizante (LÉONARD *et al.*, 2005).

2.8 DOSIMETRIA BIOLÓGICA

A dosimetria biológica baseia-se na avaliação dos efeitos biológicos radioinduzidos, através da utilização de biomarcadores e a correlação destes com a dose absorvida de radiação. A biodosimetria foi desenvolvida tendo em vista a necessidade de se estimar a dose absorvida pelo organismo de um determinado indivíduo exposto, ocupacional ou acidentalmente, à radiação ionizante; se consolidando como um método alternativo ou complementar à dosimetria física, fornecendo valores de dose mais próximos as reais condições do irradiado (AMARAL, 2002).

As alterações cromossômicas (cromossomos dicêntricos, anéis cromossômicos e fragmentos) surgem a partir de rupturas de filamentos duplos (DSB) ou reparação incorreta do DNA, que podem ser provocados pela exposição à radiação ionizante. A análise dessas alterações tem sido empregada na avaliação de indivíduos expostos à radiação, sendo amplamente estudada em linfócitos provenientes do sangue periférico humano (IAEA, 2011).

Os resultados das análises das frequências de alterações cromossômicas são convertidos em dose absorvida usando curvas de calibração dose-resposta previamente estabelecidas (Figura 13). Cada ponto da curva de calibração representa uma média aproximada da dose absorvida pelos linfócitos irradiados, considerando que os linfócitos são amplamente móveis e distribuídos pelo corpo. Com a curva de calibração gerada e estabelecida, é possível estimar a dose absorvida pelo organismo do indivíduo exposto à radiação ionizante (IAEA, 2001; IAEA, 2011; GRUEL *et al.*, 2012).

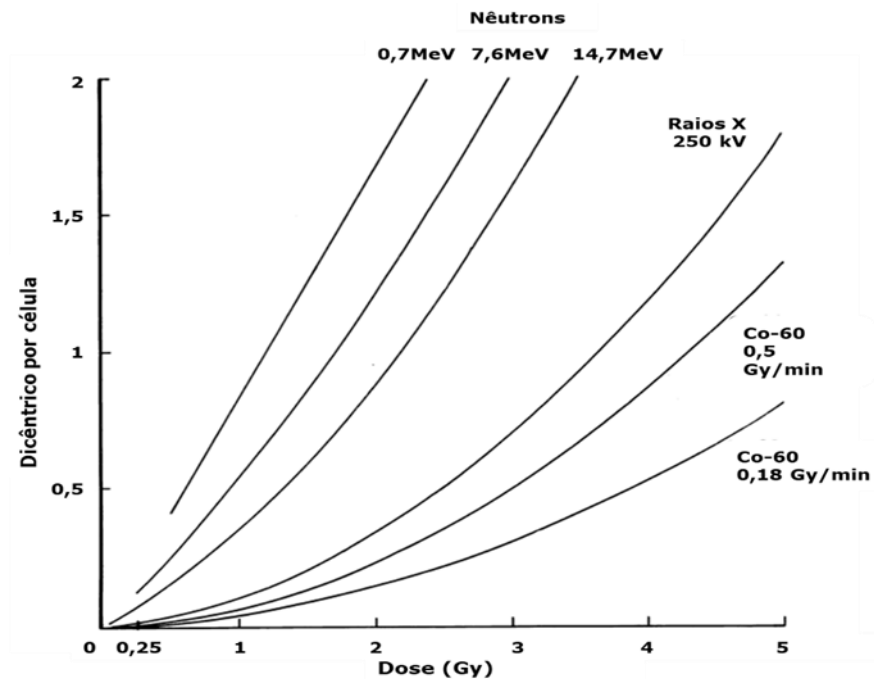


Figura 13. Curvas de calibração construídas *in vitro* com diferentes qualidades de radiação (LLOYD & DOLPHIN, 1977).

Dentre as técnicas que podem ser aplicadas para a análise citogenética, destacam-se o ensaio de cromossomos dicêntricos, considerado padrão ouro da biodosimetria, e a técnica de micronúcleos (MN) com bloqueio da citocinese celular (CBMN - Cytokinesis-Block Micronucleus) (THIERENS; VRAL, 2009; IAEA, 2011).

Os cromossomos dicêntricos são altamente específicos para radiação, com um nível basal populacional de 1 a cada 1000 células, o que permite sua análise para doses a partir de 0,1 Gy, inclusive para radiações de baixa LET (IAEA, 2001). A quebra de dois cromossomos diferentes por parte da radiação produz uniões invertidas entre as extremidades cromossômicas e consequente troca de material genético (Figura 14). Ao final, obtém-se um cromossomo com dois centrômeros (dicêntricos), acompanhado de um fragmento acêntrico formado pelas porções acêntricas desses cromossomos (Figura 14 e 15) (IAEA, 2011; CUNHA, 2015).

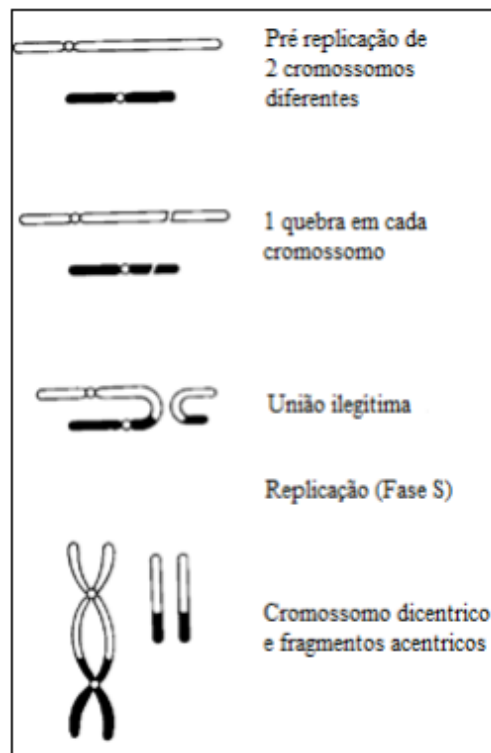


Figura 14. Formação de um cromossomo dicêntrico (CUNHA, 2015).



Figura 15. Metáfase contendo dicêntrico (DC) associado ao fragmento acêntrico (Fg) (IAEA, 2011).

Em casos de acidentes radiológicos de larga escala os indivíduos expostos a doses mais elevadas necessitam de uma intervenção médica prioritária e imediata. Neste contexto, o uso de métodos de triagem é essencial para rápida avaliação dos riscos e dos efeitos biológicos produzidos (IAEA, 2001). E a técnica de dicêntricos embora seja específica, apresenta-se laboriosa e com respostas demoradas. Desse modo, o ensaio de micronúcleo por bloqueio da citocinese surgiu como uma alternativa complementar, por ser uma técnica mais rápida e de fácil análise, o que a torna adequada para procedimentos de triagem em situações de emergência (IAEA, 2001).

Os MN resultam de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que não são incorporados aos núcleos das células filhas durante a divisão celular, sendo assim, aparecem no interior do citoplasma dessas células como pequenos objetos esféricos que apresentam as mesmas características dos núcleos (Figura 16). Como nesta técnica se realiza o bloqueio da citocinese, o processo resulta em células binucleadas (Figura 17) (IAEA, 2001; THIERENS; VRAL, 2009).

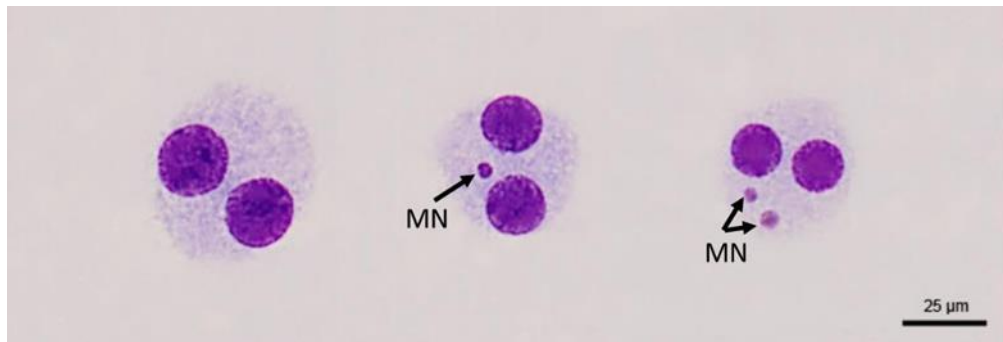


Figura 16. Células binucleadas contendo micronúcleos (MN) (IAEA, 2011).

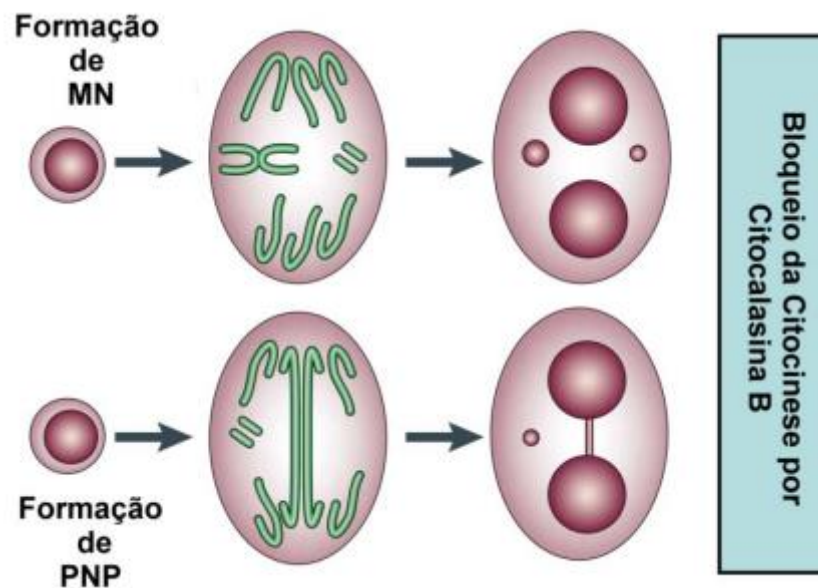


Figura 17. Formação de micronúcleos (MN) a partir de cromossomos inteiros ou fragmentos e formação de pontes nucleoplasmáticas (PNP) (OCAMPO, 2016).

Embora seja o ensaio de escolha para monitoramento em acidentes radiológicos ou nucleares, os micronúcleos não são específicos para a radiação ionizante, podendo surgir pós-exposição a vários agentes clastogênicos e variar de acordo com idade, sexo e estilo de vida (FENECH, 2000; THIERENS; VRAL, 2009). Logo, após a triagem, o ensaio de dicêntrico deve ser aplicado para uma estimativa correta de dose absorvida mais exata.

Diante desta necessidade, TESTA *et al.* (2019), desenvolveram um protocolo combinado de dosimetria biológica que resulta de uma junção da técnica padrão utilizada para estimativa de dose absorvida, por estudo de alterações cromossômicas causadas pela radiação, com a técnica de micronúcleos por bloqueio da citocinese (CBMN) que é utilizada para a estimativa de dose em casos de triagem. Assim, este método projetado especificamente para triagem e avaliação de doses acidentais em emergências radiológicas envolvendo um grande número de indivíduos se mostra altamente promissor.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar no Laboratório de Dosimetria Biológica do CRCN-NE/CNEN um protocolo combinado das técnicas de dicêntrico e micronúcleo, com diferenciação da fase do ciclo celular, para utilização em triagem e estimativa de dose absorvida nos casos de suspeita de superexposição à radiação ionizante.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o ensaio combinado de dicêntrico (DCA) com o ensaio de micronúcleo por bloqueio da citocinese (CBMN);
- Avaliar o comportamento do ensaio combinado com diferentes doses absorvidas (0,5 Gy e 0,75 Gy);
- Identificar as metáfases no primeiro ciclo celular (M1) sem a necessidade da Fluorescência Plus Giemsa (FPG);
- Comparar as técnicas separadas de dicêntricos e micronúcleos com o protocolo combinado.

4 METODOLOGIA

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Dosimetria Biológica do Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste – CRCN-NE e faz parte de um projeto aprovado para coleta de dados pelo Comitê de Ética envolvendo pesquisas com seres humanos da Universidade Federal de Pernambuco sob o número de CAAE 09186813.7.0000.5208 e do parecer consubstanciado 269.483 (ANEXO A).

4.1 SELEÇÃO DE DOADORES E COLETA DE AMOSTRAS

Um voluntário saudável e não fumante foi selecionado por meio de critérios (GAJENDIRAN *et al.*, 2001), sendo realizada uma anamnese por meio de um questionário para verificar se nos últimos seis meses antes da coleta o voluntário havia sido exposto à radiação terapêutica, raios-X diagnóstico ou consumiu drogas ilícitas. Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO B), foram coletadas 5 amostras de sangue periférico (4 ml cada) por punção venosa à vácuo utilizando seringas estéreis descartáveis contendo heparina sódica na concentração de 5000U/ml.

4.2 IRRADIAÇÃO DAS AMOSTRAS

Uma das amostras foi considerada controle (não irradiada) e mantida à temperatura de $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$. As outras amostras foram transferidas para 2 tubos maiores (2 amostras em cada tubo) para serem irradiadas.

Os tubos contendo o sangue periférico foram irradiados com doses absorvidas de 0,5 Gy e 0,75 Gy em 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 uma taxa de dose absorvida de 0,021 Gy/min. Uma barreira de polietileno de 4 mm foi utilizada para assegurar o equilíbrio eletrônico das amostras irradiadas (IAEA, 2011).

4.3 CULTIVO DE CÉLULAS

As preparações citológicas para as análises cromossômicas foram obtidas a partir de cultura de linfócitos. Para a análise de dicêntricos, na cultura de linfócitos foi adicionado 0,5 ml de sangue total nos frascos de cultura contendo 4 ml de meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 1 ml de soro bovino fetal (Biological Industries), 0,2 ml de fitohemaglutinina (Biological Industries) e 0,06 ml de antibiótico. Em seguida, os frascos foram mantidos na estufa a 37°C e foi adicionado 0,1 ml de Colchicina 0,0016% (Biological Industries) após 46 horas. Ao completar às 48 horas, o material foi centrifugado por 6 minutos a 180g, o sobrenadante foi desprezado e adicionado 8 ml de KCl previamente aquecido a 37°C, para realizar o choque hipotônico. Durante a hipotonia, os tubos foram colocados em banho-maria a 37°C por 15 minutos. Em seguida, os tubos foram novamente centrifugados, o sobrenadante foi retirado e adicionado o fixador metanol:ácido acético (3:1) até completar 8 ml. Para a preparação de lâminas, foram realizadas tantas centrifugações e trocas de fixador quanto necessárias para que o conteúdo da cultura estivesse transparente.

Para as preparações de micronúcleo foram utilizados os mesmos parâmetros de cultivo. No entanto, os frascos foram mantidos na estufa a 37°C, por 72 horas, e após 24 horas, foi adicionado 0,02 ml de citocalasina B (Sigma), sem adição de colchicina. Ao completar às 72 horas de cultivo, o material foi centrifugado por 10 minutos a 180 g, o sobrenadante desprezado e adicionado 7 ml de KCl, para ocorrer o choque hipotônico. Em seguida, os tubos foram novamente centrifugados, o sobrenadante retirado e adicionado o fixador metanol: ácido acético (10:1), diluídos em solução de Ringer (1:1) até completar 7 ml. Em seguida, foram realizadas tantas centrifugações e trocas de fixador na proporção metanol: ácido acético (10:1) quanto o necessário para que o conteúdo da cultura estivesse transparente.

No ensaio combinado, foram feitas culturas em tempos de 48 e 72 horas. Dessa forma, na cultura de 48 horas, foi adicionado 0,02 ml de citocalasina B (Sigma) após 24 horas e 0,1 ml de Colchicina 0,0016% (Biological Industries) após 45 horas. Ao completar 48 horas, a cultura continuou seguindo os parâmetros para

dicêntrico. No tempo de 72 horas, foi adicionado 0,02 ml de citocalasina B (Sigma) após 24 horas e 0,1 ml de Colchicina 0,0016% (Biological Industries) após 69 horas, seguindo os mesmos parâmetros para dicêntrico ao completar às 72 horas. Este protocolo foi aplicado baseado nos estudos de Testa *et al.* (2019).

4.4 PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

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. Para as lâminas de micronúcleo, as gotas foram despejadas sem altura, ou seja, com a pipeta rente à lâmina. No caso de dicêntrico, foi respeitada a altura de aproximadamente um metro da lâmina para auxiliar na dispersão dos cromossomos. Em seguida, as lâminas foram coradas com Giemsa a 5 % durante 7 min para dicêntrico, 15 minutos para dicêntrico mais micronúcleo e 20 minutos para micronúcleo, seguindo para posterior análise cromossômica.

4.5 ANÁLISE MICROSCÓPICA

As análises das alterações cromossômicas foram realizadas no microscópio óptico (Leica DM500). As lâminas foram examinadas em busca de metáfases viáveis, englobando amostras irradiadas e controle para o ensaio de dicêntrico e o protocolo combinado. Entende-se por viáveis aquelas metáfases que não mostram nenhuma sobreposição de cromossomos, com 46 centrômeros. Vale ressaltar que os dicêntricos contabilizados foram apenas aqueles associados à presença de seus fragmentos acêntricos, segundo preconizado pela Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA, 2011).

Para o ensaio de micronúcleo foram analisadas células binucleadas viáveis (núcleos de mesmo tamanho e cor, contorno citoplasmático íntegro e limites nucleares respeitados) quanto à presença de micronúcleos (IAEA, 2011). Além

disso, foi feita a leitura combinada onde foram analisadas metáfases exclusivamente em M1 (46 cromossomos), M2 (92 cromossomos) e células binucleadas simultaneamente (Figura 18).

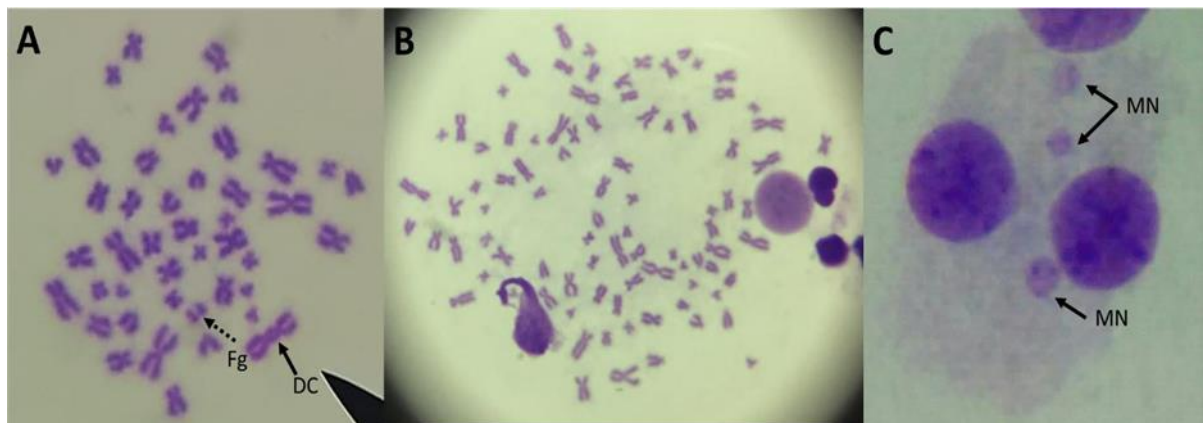


Figura 18. Fotografia de células metafásicas em M1 (A) com um dicêntrico (DC) associado ao fragmento acêntrico (Fg) e em M2 (B, foto ilustrativa, pois tem apenas 88 cromossomos), além de célula binucleada na presença de três micronúcleos (C) (LIMA, 2019).

4.6 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados obtidos a partir da leitura das lâminas de dicêntrico, micronúcleo e dicêntrico mais micronúcleo foram submetidos a testes estatísticos para a avaliação quanto à conformidade ao modelo de Poisson, sendo utilizados o índice de dispersão e o teste u de Papworth (IAEA, 2011).

As estimativas de dose absorvida foram feitas utilizando o coeficiente das curvas de dose-resposta de dicêntrico e micronúcleo para feixe gama do Laboratório de Dosimetria Biológica do CRCN-NE (Tabela1) e com o auxílio do programa Dose Estimate (AINSBURY; LLOYD, 2010).

Tabela 1. Curvas de calibração para dicêntricos e para micronúcleos estabelecidas para radiação gama.

Curvas de calibração	C	±SE	A	±SE	β	±SE
Dicêntricos	0,0014	0,0008	0,0074	0,0069	0,0449	0,0044
Micronúcleos*	0,0032	0,0012	0,0668	0,0077	0,0274	0,0043

(MENDES *et al.*, 2020) *Dados não publicados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse trabalho foram realizadas no modo de triagem três diferentes técnicas: o ensaio de dicêntricos (DC), o ensaio de micronúcleo por bloqueio da citocinese (MN) e o protocolo combinado de DC + MN com dois tempos de cultura celular 48h e 72h.

No ensaio de dicêntrico, foram contabilizadas 533 células metafásicas, sendo 301 para o controle (0 Gy), 113 para a dose de 0,5 Gy e 119 para a dose de 0,75 Gy (Tabela 2). Na análise de dicêntrico, no grupo controle não foi observado qualquer tipo de alteração. No entanto para as amostras irradiadas, as frequências foram diferentes, aumentando com a elevação da dose (Tabela 2). No estudo da distribuição celular dos dicêntricos, observa-se que a variância não excedeu a média de forma significativa, com isso os valores de u estão dentro do intervalo de $\pm 1,96$ no limite de confiança de 95%.

Tabela 2. Análise das frequências e distribuição celular de dicêntricos em relação à dose absorvida.

Dose (Gy)	Total de metafases	DC	Y^{DC}	Distribuição celular de dicêntricos		var	var/Y	u
				0	1			
0*	301	0	0,000	301	0	0,000	-	-
0,5	113	3	0,027	110	3	0,026	0,982	-0,164
0,75	119	5	0,042	114	5	0,041	0,966	-0,291

*sangue controle; Y^{DC} , frequência de dicêntricos; var. variância; var/Y. índice de dispersão.

Para o ensaio de micronúcleo, foram analisadas 4957 células binucleadas, sendo 2000 para o controle (0 Gy), 1599 para a dose de 0,5 Gy e 1358 para a dose de 0,75 Gy. A frequência de micronúcleo na amostra controle foi menor (0,005 micronúcleo/célula) em relação às amostras irradiadas que apresentaram frequências de 0,023 micronúcleo/célula para a dose de 0,5 Gy e 0,045 para a dose de 0,75 Gy (Tabela 3).

Tabela 3. Análise das frequências e distribuição celular de micronúcleos em relação à dose absorvida.

Dose (Gy)	Total de binucleadas	MN	Y^{MN}	Distribuição celular de micronúcleos			var	var/Y	u
				0	1	2			
0*	2000	9	0,005	1991	9	0	0,004	0,996	-0,134
0,5	1599	37	0,023	1562	37	0	0,023	0,977	-0,646
0,75	1358	61	0,045	1300	55	3	0,047	1,054	1,424

*sangue controle; Y^{MN} , frequência de micronúcleo; var. variância; var/Y. índice de dispersão.

Nota-se uma mudança na distribuição dos micronúcleos, sendo observado mais de um micronúcleo na dose de 0,75 Gy, mas todas as amostras testadas estatisticamente seguiram a distribuição de Poisson, pois os valores de u apresentam-se dentro do intervalo de $\pm 1,96$ no limite de confiança de 95%.

No protocolo combinado de DC + MN, foram analisados dois tempos diferentes de cultura: 48 e 72 horas. Para a cultura de 48h foram analisadas um total de 588 metáfases, todas em M1 (46 cromossomos), sendo 95 para o controle, 338 para a dose de 0,5 Gy e 155 para a dose de 0,75 Gy (Tabela 4). Ao longo da contagem destas 588 metáfases, foram contabilizadas 185 células binucleadas, sendo 34 para o controle, 70 para a dose de 0,5 Gy e 81 para a dose de 0,75 Gy.

As frequências de micronúcleo e dicêntrico se mostraram maiores nas amostras irradiadas em relação ao controle, sendo maiores para a dose de 0,75 Gy.

Tabela 4. Frequências das alterações cromossômicas em relação aos diferentes tempos de cultura.

Dose (Gy)	Tempo de cultura	M1	M2	BN	BN/M1	DC	Y ^{DC}	MN	Y ^{MN}
0*	48h	95	0	34	0,358	0	0,000	0	0,000
0*	72h	98	1	54	0,551	0	0,000	1	0,019
0,5	48h	338	1	70	0,207	9	0,027	3	0,043
0,5	72h	140	2	146	1,043	3	0,021	11	0,075
0,75	48h	155	0	81	0,522	5	0,032	5	0,062
0,75	72h	83	2	95	1,144	5	0,060	7	0,074

*sangue controle; M1. Célula em primeira metáfase; M2. Célula em segunda metáfase; BN. Célula binucleada; DC. Número de dicêntricos; Y^{DC}. Frequência de dicêntricos; MN. Número de micronúcleos; Y^{MN}. Frequência de micronúcleos.

Na cultura de 72h foi observado o mesmo comportamento de elevação da frequência com o aumento da dose (Tabela 4). Neste caso, foram analisadas 321 metáfases em M1 (98 para o controle, 140 para a dose de 0,5 Gy e 83 para a dose de 0,75 Gy). Também foi possível encontrar um total de 6 células em M2, no entanto, para a análise de dicêntricos são usadas apenas as células em M1.

Ao longo da contagem das metáfases, foram contabilizadas 295 células binucleadas (54 para o controle, 146 para a dose de 0,5 Gy e 95 para a de 0,75 Gy), por isso a relação entre o número de células binucleadas e células metafásicas (BN/M1) foi maior no tempo de cultura mais prolongado (Tabela 4).

As mesmas amostras do protocolo combinado foram testadas de acordo com a distribuição de Poisson, utilizando o índice de dispersão e o teste u (Tabela 5). Tanto a distribuição de dicêntricos como de micronúcleos tenderam a subdispersão, quando as variâncias não excedem as médias, mesmo assim os valores de u não foram significativos, pois apresentaram valores na faixa de $\pm 1,96$ com um intervalo de confiança de 95%. Isto demonstra que os experimentos *in vitro* seguiram a distribuição de Poisson (Tabela 5) como se espera para radiações de baixa LET.

Tabela 5. Análise das distribuições celulares do protocolo combinado em relação à dose absorvida.

Dose (Gy)	Tempo de cultura	Y^{DC}	Distribuição celular de dicêntricos		var/ Y^{DC}	u	Y^{MN}	Distribuição celular de micronúcleos			var/ Y^{MN}	u
			0	1				0	1	2		
0*	48h	0	95	0	-	-	0,000	34	0	0	-	-
0*	72h	0	98	0	-	-	0,019	53	1	0	1,000	-
0,5	48h	0,027	329	9	0,976	-0,327	0,043	67	3	0	0,971	-0,209
0,5	72h	0,021	137	3	0,986	-0,147	0,075	136	9	1	1,114	1,019
0,75	48h	0,032	150	5	0,974	-0,255	0,062	76	5	0	0,950	-0,354
0,75	72h	0,060	78	5	0,951	-0,349	0,074	88	7	0	0,936	-0,473

*sangue controle; var. variância; var/Y. índice de dispersão; Y^{DC} . Frequência de dicêntricos; Y^{MN} . Frequência de micronúcleos.

As estimativas de dose absorvida foram feitas utilizando o coeficiente das curvas de dose-resposta de dicêntrico e micronúcleo para feixe gama do Laboratório de Dosimetria Biológica do CRCN-NE através do programa Dose Estimate. Na tabela 6 pode-se observar as estimativas referentes as técnicas empregadas separadamente.

Tabela 6. Valores de doses estimadas utilizando os protocolos de DC e MN separadamente.

Dose (Gy)	Dose estimada (Gy) ± SE	Valor mínimo e máximo de dose (Gy)**	
Dicêntricos			
0*	0	0	0
0,5	0,671 ± 0,231	0,219	1,123
0,75	0,872 ± 0,225	0,432	1,312
Micronúcleos			
0*	0,019 ± 0,200	0	0,411
0,5	0,269 ± 0,203	0	0,667
0,75	0,516 ± 0,211	0,103	0,929

*sangue controle; SE. Erro padrão. **Valores estimados utilizando o limite de confiança de 95% combinando os erros de Poisson e das curvas de calibrações pelo método A (IAEA, 2001).

Na análise de dicêntrico, os valores de dose para as amostras irradiadas com diferentes valores de dose absorvida foram estimados em 0,671 Gy para a dose absorvida de 0,5 Gy e 0,872 Gy para a dose absorvida de 0,75 Gy, utilizando-se o programa Dose Estimate. Ambas permaneceram dentro do intervalo de confiança de 95%. Na análise de micronúcleo, foram encontrados valores semelhantes de dose estimada. Para o controle foi obtido o valor de 0,019 Gy, para a dose absorvida de

0,5 Gy foi obtido 0,269 Gy e para a dose absorvida de 0,75 Gy, foi obtido 0,516 Gy. Também foi observada a permanência dentro do intervalo de confiança de 95%.

A estimativa de dose foi baseada nas metáfases do primeiro ciclo celular (M1), foram estimadas doses com valores muito semelhantes aos encontrados com o uso das duas técnicas isoladas (Tabela 7). Os valores tanto das frequências das alterações quanto das estimativas de dose se mostraram condizentes ao dos respectivos protocolos padrão de cada técnica. A respeito da cultura de 48h foi possível chegar a doses estimadas de 0,672 Gy e 0,751 Gy para as doses absorvidas de 0,5 e 0,75 Gy, respectivamente. Com a cultura de 72h, foram obtidas doses estimadas de 0,591 Gy e 1,065 Gy para as referidas doses absorvidas.

Tabela 7. Valores de doses estimadas utilizando o protocolo combinado DC+MN.

Dose (Gy)	Tempo de cultura	DC			MN		
		Dose estimada (Gy) $\pm$ SE	Valor mínimo e máximo de dose (Gy)*		Dose estimada (Gy) $\pm$ SE	Valor mínimo e máximo de dose (Gy)*	
0*	48h	0	0	0	0	0	0,344
0*	72h	0	0	0	0,211 $\pm$ 0,308	0	0,814
0,5	48h	0,672 $\pm$ 0,138	0,402	0,942	0,494 $\pm$ 0,332	0	1,144
0,5	72h	0,591 $\pm$ 0,209	0,182	1	0,811 $\pm$ 0,294	0,235	1,386
0,75	48h	0,751 $\pm$ 0,198	0,363	1,139	0,684 $\pm$ 0,336	0,026	1,342
0,75	72h	1,065 $\pm$ 0,267	0,542	1,589	0,796 $\pm$ 0,329	0,152	1,44

DC. Número de dicêntricos; MN. Número de micronúcleos; *sangue controle; SE. Erro padrão.

*Valores estimados utilizando o limite de confiança de 95% combinando os erros de Poisson e das curvas de calibrações pelo método A (IAEA, 2001).

Observa-se uma aproximação entre os valores de dose absorvida obtidos com a técnica de dicêntrico com os da curva de dose-resposta de dicêntrico para feixe gama, demonstrando a aplicabilidade desse ensaio para estimativas de dose. Os resultados seguem de acordo com a literatura (TOP *et al.*, 2000; PRASANNA *et al.*, 2002; MARTINS *et al.*, 2013; PHAM *et al.*, 2019; MENDES *et al.*, 2020) com valores de u entre o intervalo de $\pm 1,96$ com o limite de confiança de 95% (Tabela 8), no entanto podemos observar que o valor da taxa de dose está relacionado com a formação de dicêntricos, quanto maior a taxa, maior a frequência de dicêntricos observada (IAEA, 2011).

Tabela 8. Frequências e valores de u de dicêntricos obtidos com curvas de calibração para radiação gama.

	Top et al. 2000	Prasanna et al. 2002	Martins et al. 2013	Pham et al. 2019	Mendes et al. 2020	Este trabalho	
Taxa de dose (Gy/min)	0,425	1	0,180 a 0,126	0,275	0,048 a 0,055	0,021	
Dose (Gy)	Freq u	Freq u	Freq u	Freq u	Freq u	Freq u	Freq u
0,5	0,018 -0,5	0,037 -0,45	0,017 0,79	0,037 -1,52	0,018 -0,39	0,027 -0,16	
0,7	0,029 1,1	0,098 -0,45	0,036 -0,01	0,056 -0,83	0,037 -0,82	0,042 -0,29	

Freq. Frequência de dicêntricos.

Os valores de dose absorvida estimados através da técnica de micronúcleo também foram próximos ao encontrado na curva de dose-resposta de micronúcleo para feixe gama (Tabela 9). A distribuição dos micronúcleos seguiu o comportamento de Poisson, no entanto era esperado que os micronúcleos apresentassem sobredispersão (valor de u acima de 1,96) devido sua formação (MENDES *et al.*, 2019) como pode ser visto na tabela 9. Os achados deste trabalho não apresentaram sobredispersão provavelmente pela quantidade de células analisadas não ter sido suficiente, acredita-se que com o aumento das células analisadas o comportamento de sobredispersão poderá ser observado.

Tabela 9. Frequências e valores de u de micronúcleos obtidos através de curvas de calibração para radiação gama.

	Köksal et al. 1996	Paul et al. 1997	Antunes et al. 2014	Rastkhah et al. 2016*	Nairy et al. 2017	Este trabalho	
Taxa de dose (Gy/min)	0,45	0,6	0,126	0,83	1,5	0,021	
Dose (Gy)	Freq u	Freq u	Freq u	Freq u	Freq u	Freq u	Freq u
0,5	0,007 4,41	0,059 4,05	0,027 11,16	0,064 10,2	0,067 2,47	0,023 -0,64	
0,7	0,084 3,28	- -	0,041 10,25	- -		0,045 1,42	

Freq. Frequência de micronúcleos; *dados apenas com população feminina de 20 a 34 anos de idade.

Em relação ao protocolo combinado, os valores obtidos se mostram satisfatórios e condizentes com os encontrados utilizando-se as técnicas separadamente. Quando comparado aos resultados encontrados por TESTA *et al.*

(2019), se observa que o número de células analisadas é bem menor neste trabalho, logo, se torna necessário prosseguir com as análises para o aumento do número de células contabilizadas com a finalidade de confirmar o comportamento das alterações cromossômicas (Tabela 10).

Tabela 10. Frequência de dicêntricos e micronúcleos em amostras irradiadas com protocolos combinados.

	Tempo de cultura	M1	Y_{DC+CR}*	BN	Y_{MN}
<i>TESTA et al. 2019</i>					
0*	58h	500	0	2000	0,003
0,5	58h	500	0,12	2000	0,02
0,75	58h	500	0,15	2000	0,042
<i>Este trabalho</i>					
0*	48h	95	0	34	0
0*	72h	98	0	54	0,019
0,5	48h	338	0,027	70	0,043
0,5	72h	140	0,021	146	0,075
0,75	48h	155	0,032	81	0,062
0,75	72h	83	0,060	95	0,074

M1. Célula em primeira metáfase; BN. Célula binucleada; DC. Número de dicêntricos mais anéis; YDC+CR. Frequência de dicêntricos mais anéis; YMN. Frequência de micronúcleos; *Sangue controle.

Vale ressaltar, entretanto, que a quantidade de metáfases em M1 foi suficiente para a estimativa de dose e, como o valor estimado corresponde à dose absorvida pela amostra durante a irradiação dentro do intervalo de confiança de 95%, o protocolo se mostra viável, inclusive na mudança do tempo de cultura 72h.

O tempo total de cultura utilizando este protocolo para as culturas de 48 horas é mais curto em relação ao ensaio CBMN padrão (72h), sendo um motivo para o baixo número de células binucleadas, ainda assim é possível estimar a dose, no entanto mais análises precisam ser realizadas.

Este protocolo apresenta vantagens como a economia de tempo, a utilização de uma única cultura para os ensaios de DC e CBMN permitindo uma economia de reagentes, a identificação de metáfases em M1 e M2 por meio de uma coloração simples com Giemsa, excluindo a necessidade de

Fluorescência Plus Giemsa (FPG) (TESTA *et al.*, 2019).

As desvantagens relacionadas ao uso desse protocolo são devido a uma validação adicional através de curvas de calibração robustas com um painel abrangendo desde doses muito baixas a extremamente altas. Além de exercícios de intercomparação envolvendo diferentes laboratórios de dosimetria biológica para avaliar a reprodutibilidade deste ensaio.

6 CONCLUSÕES

- O uso do protocolo combinado para triagem e estimativa de dose absorvida em casos de suspeita de superexposição à radiação ionizante mostra-se uma alternativa promissora que deverá ser considerada em análises futuras.
- O protocolo combinado tanto para a cultura de 48h quanto para de 72h mostra-se até o momento boa aplicabilidade para a dosimetria biológica.
- O protocolo combinado possibilitou fazer a análise de dicêntrico e micronúcleo em uma única lâmina, além de permitir a análise de metáfases exclusivamente em seu primeiro ciclo celular (M1), a partir da distinção, pela quantidade de cromossomos, entre M1 e M2 na mesma lâmina.
- As doses absorvidas estimadas com o protocolo combinado demonstram-se condizentes com as encontradas por meio do uso das técnicas de dicêntricos e micronúcleos separadamente.

REFERÊNCIAS

- AINSBURY, E. A.; LLOYD, D. C. Dose estimation software for radiation biodosimetry. **Health Physics**, v. 98, n. 2, p. 290–295, 2010.
- ALIZADEH, E.; ORLANDO, T. M.; SANCHE, L. Biomolecular Damage Induced by Ionizing Radiation: The Direct and Indirect Effects of Low-Energy Electrons on DNA. **Annual Review of Physical Chemistry**, 2015.
- ANTUNES, A. C. et al. The cytokinesis-blocked micronucleus assay: Dose estimation and inter-individual differences in the response to γ -radiation. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 760, p. 17–22, 2014
- AZZAM, E. I.; JAY-GERIN, J. P.; PAIN, D. **Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury** **Cancer Letters**, 2012.
- BARCELLOS-HOFF, M. H.; NGUYEN, D. H. **Radiation carcinogenesis in context: How do irradiated tissues become tumors?** **Health Physics. Anais...**2009
- BUDWORTH, H. et al. DNA Repair and Cell Cycle Biomarkers of Radiation Exposure and Inflammation Stress in Human Blood. **PLoS ONE**, 2012.
- CHRISTENSEN, D. M.; IDDINS, C. J.; SUGARMAN, S. L. Ionizing radiation injuries and illnesses. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 32, n. 1, p. 245–265, 2014.
- COOPER, G. M.; HAUSMAN R. E.. The Cell A Molecular Approach-Cooper-Hausman.pdf. In: **The cell: A molecular approach**, 2007.
- CRUVINEL, W. M.; MESQUITA JR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Sistema Imunitário – Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev Bras Reumatol**. 50(4): 434-461, 2010.
- CUNHA, Kelly de Paula. **Aplicação de Mapas Auto-Organizáveis na Classificação de Aberrações Cromossômicas Utilizando Imagens de Cromossomos Humanos Submetidos à Radiação Ionizante**. 2015. Dissertação (Mestrado) - Tecnologia Nuclear, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.
- DAINIAK, N. **Hematologic consequences of exposure to ionizing radiation** **Experimental Hematology**, 2002.
- DIANOV, G. L.; HÜBSCHER U. Mammalian Base Excision Repair: the Forgotten Archangel. **Nucleic Acids Research**, Volume 41, Issue 6, 1, Pages 3483–3490, 2013.

EKHOLM, S.V.; ZICKERT, P.; REED, S.I.; ZETTERBERG, A. Accumulation of cyclin E is not a prerequisite for passage through the restriction point. **Mol Cell Biol**. 2001.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000.

GAJENDIRAN, N. et al. Neutron-induced Adaptive Response Studied in Go Human Lymphocytes Using the Comet Assay. **Journal of Radiation Research**, 2001.

GRUEL, G. et al. Note Effect of Lymphocytes Culture Variations on the Mitotic Index and on the Dicentric Yield. v. 151, n. 1, p. 135–143, 2012.

GUERRA, R. A. T. et al. Ciências Biológicas. **Cadernos CB Virtual 1**. João Pessoa: Ed. Universitária, 516 p. ISBN: 978-85-7745-678-9, 2011.

HALL, J. et al. Ionizing radiation biomarkers in epidemiological studies – An update. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 771, p. 59–84, 2017a.

IAEA. Annual report. Viena, 2001.

IAEA. Introduction to Body Composition Assessment Using the Deuterium Dilution Technique with Analysis of Urine Samples by Isotope Ratio Mass Spectrometry. **IAEA Human Health Series; no. 13**, 2011.

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

JACKSON, S. P. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. v. 23, n. 5, p. 687–696, 2002.

JEGGO, P. and LAVIN, M.F. Cellular radiosensitivity: How much better do we understand it? **International Journal of Radiation Biology**, 85(12):1061-1081, 2009.

KAVANAGH, J.N.; REDMOND K.M.; SCHETTINO G. and PRISE K.M. DNA Double Strand Break Repair: A Radiation Perspective. **Antioxidants & Redox Signaling**, 18(18), 2013.

KIMBALL, J. W. DNA repair. In: **Kimball's biology pages**. October 31, 2015.

KIMURA, A. [Radiation associated leukemia and myelodysplastic syndrome]. **Nihon rinsho. Japanese journal of clinical medicine**, 2012.

KNOLL, GF. **Radiation Detection and Measurement**. Third Edition. 1999.

KÖKSAL, G.; DALCÍ, D. Ö.; PALA, F. S. Micronuclei in human lymphocytes: The Co-60 gamma-ray dose-response. **Mutation Research - Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 359, n. 2, p. 151–157, 1996.

LÉONARD, A. et al. Usefulness and limits of biological dosimetry based on cytogenetic methods. **Radiation Protection Dosimetry**, 2005.

LIMA, Julianne Caroline Freires de. **Implantação do Protocolo Combinado no CRCN/NE para Triagem e Estimativa de Dose Absorvida em Casos de Acidentes Radiológicos**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso - Curso de Biomedicina Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.

LLOYD, D. C.; DOLPHIN, G. W. Radiation-induced chromosome damage in human lymphocytes. **British Journal of Industrial Medicine**, 1977.

LODISH H.; BERK A.; KAISER C.A.; KRIEGER M.; BRETSCHER A.; PLOEGH H. et al. **Biologia celular e molecular**. 7ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2014.

MALUMBRES, M.; BARBACID M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Natural Revist of Cancer**. v. 9 (3) p. 153-166. 2009.

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

MENCK, C. F.M.; MUNFORD, V. DNA repair diseases: what do they tell us about cancer and aging? **Genetics and Molecular Biology** [online], v. 37, n. 1, 2014.

MENDES, M. E. et al. As curvas de calibração por ^{60}Co com baixa taxa de dose são diferentes em termos de estimativa de dose – um estudo comparativo. **Genet. Mol. Biol.**, Ribeirão Preto, v. 43, n. 1, e20180370, 2020.

MENDES, M. E. et al. Comparative study of micronucleus assays and dicentric plus ring chromosomes for dose assessment in particular cases of partial-body exposure. **International Journal of Radiation Biology**, v. 95, n. 8, p. 1058–1071, 2019.

MLADENOV, E.; ILIAKIS, G. Induction and repair of DNA double strand breaks: The increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 2011.

NAIRY, R. K. et al. Dose-response study using micronucleus cytome assay: A tool for biodosimetry application. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 174, n. 1, p. 79–87, 2017.

OCAMPO, Ivette Zegarra. **Comparação e Validação de Técnicas Clássicas e Modificadas para Estudos de Potencial Genotóxico de Peptídeos Utilizados na Produção de Radiofármacos**. 2016. Dissertação (Mestrado) - Tecnologia Nuclear, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

OKUNO, Emico. **Efeitos biológicos das radiações ionizantes: acidente radiológico de Goiânia. Estudos Avançados** [online]. 2013, v. 27, n. 77 [Acessado 6 Maio 2022], pp. 185-200. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0103-40142013000100014>>. Epub 11 Abr 2013. ISSN 1806-9592. <https://doi.org/10.1590/S0103-40142013000100014>.

PAUL, S. F. D.; VENKATACHALAM, P.; JEEVANRAM, R. K. Analysis of radiation dose-response curve obtained with cytokinesis block micronucleus assay. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 24, n. 5, p. 413–416, 1997.

PHAM, N. D. et al. Determination of spontaneous dicentric frequencies and establishment of dose-response curves after expose of human peripheral blood lymphocytes to low- and high-dose rate 60 Co gamma rays—the basis for cytogenetic biodosimetry in Vietnam. **International Journal of Radiation Biology**, v. 95, n. 3, p. 307–313, 2019.

PINTO, I. et al. **Radioatividade Apostila educativa Por ELIEZER DE MOURA CARDOSO Colaboradores**, 2005.

PRASANNA, P. G. S. et al. AFRRI's Gamma-Ray, X-Ray, and Fission-Neutron Calibration Curves for the Lymphocyte Dicentric Assay: Application of a Metaphase Finder System. **AFRRI Special Publication**, n. 02–1, p. 18, 2002.

RASTKHAH, E. et al. The cytokinesis-blocked micronucleus assay: dose–response calibration curve, background frequency in the population and dose estimation. **Radiation and Environmental Biophysics**, v. 55, n. 1, p. 41–51, 2016.

RESQUETTI, Silvia Oliveira. **Uma sequência didática para o ensino da radioatividade no nível médio, com enfoque na história e filosofia da ciência e no movimento CTS**. 2013. 281 f. Tese. (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2013.

SANTOS, Valquiria Tiago dos. **Estudo dos mecanismos moleculares do reparo de quebra de duplas fitas no DNA mitocondrial**. 2015. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

SHAHID, S.; CHAUDHRY, M. N.; MAHMOOD, N. Mutations of the human interferon alpha-2b (hIFN α -2b) gene in cancer patients receiving radiotherapy. **American journal of cancer research**, v. 5, n. 8, p. 2455, 2015.

SILVA, Thiago David dos Santos. **Determinação da Atividade Antitumoral e Citotóxica de Derivados Híbridos da Piridina, Tiossemicarbazona e Tiazóis**. 2017 Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.

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

TAUHATA, L., SALATI, I. P. A., DI PRINZIO, R., DI PRINZIO, M. A. R. R. **Radioproteção e Dosimetria: Fundamentos** - 9ª revisão novembro/2013 - Rio de Janeiro - IRD/CNEN. 345p.

TESTA, A.; PALMA, V.; PATRONO, C. a Novel Biological Dosimetry Assay As a Potential Tool for Triage Dose Assessment in Case of Large-Scale Radiological Emergency. **Radiation Protection Dosimetry**, p. 1–3, 2019.

THIERENS, H.; VRAL, A. The micronucleus assay in radiation accidents. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanita**, 2009.

TOP, A.; COSKUN, M.; ORTA, T. Biological dosimetry of Co-60 gamma irradiation. **Turkish Journal of Haematology**, v. 17, n. 4, p. 189–196, 2000.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 6ª ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, 827p, 2000.

TUIMALA, J. et al. Genetic polymorphisms of DNA repair and xenobiotic-metabolizing enzymes: Effects on levels of sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 2004.

WALLACE, S. S. Base excision repair: a critical player in many games. **DNA repair**, v. 19, p. 14-26, 2014.

WILSON, D. M. et al. Variation in base excision repair capacity. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 2011.

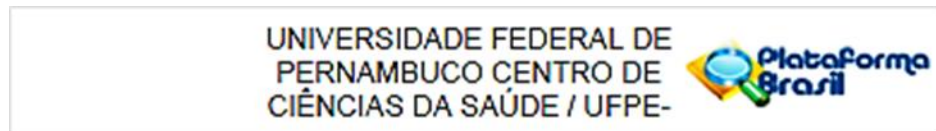
YOSHIMURA, E. M. Física das Radiações: interação da radiação com a matéria. **Revista Brasileira De Física Médica**, 3(1), 57–67, 2015.

ZIPFEL, P.F. Complement and Immune defense: From innate immunity to human diseases. **Immunology Letters**, 126,1-7, 2009.

ANEXOS

ANEXO A

Cópia do parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da 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: 05186813.7.0000.5208

Instituição Proponente: COMISSAO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR

Patrocinador Principal: COMISSAO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 269.483

Data da Relatoria: 08/05/2013

Apresentação do Projeto:

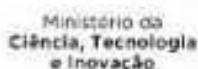
O documento intitulado *Implementação do Serviço de Dosimetria Biológica no Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste - CRCN-NE/CNEN* trata-se de projeto de pesquisa da Dra. Fabiana Farias de Lima Guimarães - CRCN-NE/CNEN

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

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 Fax: (81)2126-8588 E-mail: cepcsc@ufpe.br

ANEXO B

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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

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

Este estudo tem por objetivo principal avaliar as alterações cromossômicas (nos cromossomos estão contidos a informação genética) nas células de adultos saudáveis cujas amostras sanguíneas voluntariamente cedidas serão irradiadas ou não por 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: flima@cnen.gov.br