

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS
ENERGÉTICAS E NUCLEARES (PROTEN)**

**ADEQUAÇÃO DA DOSIMETRIA CITOGENÉTICA PARA
AVALIAÇÃO DE IRRADIAÇÃO PARCIAL E DE CORPO INTEIRO**

THIAGO DE SALAZAR E FERNANDES

**RECIFE - PERNAMBUCO - BRASIL
MARÇO – 2009**

**ADEQUAÇÃO DA DOSIMETRIA CITOGENÉTICA PARA
AVALIAÇÃO DE IRRADIAÇÃO PARCIAL E DE CORPO INTEIRO**

THIAGO DE SALAZAR E FERNANDES

**ADEQUAÇÃO DA DOSIMETRIA CITOGENÉTICA PARA
AVALIAÇÃO DE IRRADIAÇÃO PARCIAL E DE CORPO INTEIRO**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação
em Tecnologias Energéticas e Nucleares, do
Departamento de Energia Nuclear, da
Universidade Federal de Pernambuco, para
obtenção do título de Doutor em Ciências. Área
de Concentração: Dosimetria e Instrumentação
Nuclear.

ORIENTADOR: PROF. DR. ADEMIR DE JESUS AMARAL (DEN-UFPE)

CO-ORIENTADOR: DR. DAVID LLOYD (HPA-INGLATERRA)

RECIFE - PERNAMBUCO - BRASIL

MARÇO – 2009

F363a

Fernandes, Thiago de Salazar e.

Adequação da dosimetria citogenética para avaliação de irradiação parcial e de corpo inteiro / Thiago de Salazar e Fernandes. - Recife: O Autor, 2009.

ix, 111 folhas, il : tabs.,grafs.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, 2009.

Inclui Referências Bibliográficas e Anexos.

1. Energia Nuclear. 2. Biodosimetria. 3. Aberrações Cromossômicas. 4. FISH. 5. Bandeamento C. 6. Cultivo Celular. 7. Irradiações Parciais. I. Título.

UFPE

612.01448

BCTG/ 2009-098

**ADEQUAÇÃO DA DOSIMETRIA CITOGENÉTICA PARA
AVALIAÇÃO DE IRRADIAÇÃO PARCIAL E DE CORPO INTEIRO**

Thiago de Salazar e Fernandes

APROVADO EM: 18.03.2009

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. David Charles Lloyd

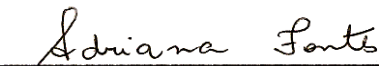
COMISSÃO EXAMINADORA:



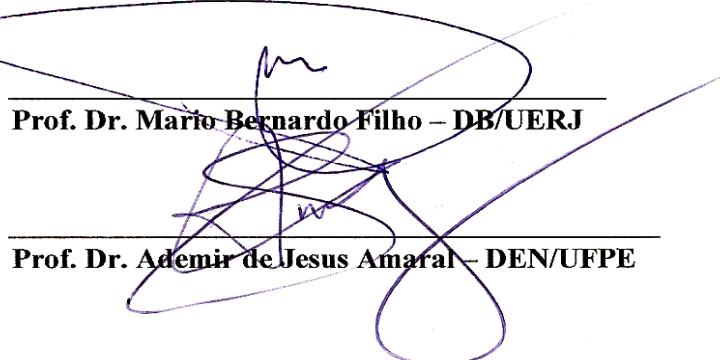
Profa. Dra. Neide Santos – DG/UFPE



Profa. Dra. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo – DB/UFPE



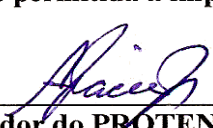
Profa. Dra. Adriana Fontes – DB/UFPE



Prof. Dr. Mario Bernardo Filho – DB/UERJ

Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral – DEN/UFPE

Visto e permitida a impressão



Coordenador do PROTEN/DEN/UFPE

Dedico à minha família.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, agradeço a Deus por finalizar este período de doutoramento com saúde e a convicção de que, apesar das dificuldades, todo esforço vale a pena.

Aos meus pais, Pedro Neto e Vera Lúcia, pela compreensão e por participarem direta ou indiretamente com apoio e conselhos valiosos nos momentos de decisão, até mesmo quando eu me encontrava na Inglaterra. Aos meus irmãos, Henrique, pelo entusiasmo e bom humor, e Rodrigo, pelo exemplo de determinação. À Talita, pelo imenso carinho, apoio e compreensão, tão importantes para que eu finalizasse esse trabalho.

Ao prof. Dr. Ademir Amaral, pela amizade e orientação durante a minha formação acadêmica, atento a elaboração de artigos científicos e nas sugestões quanto à maneira de escrever e de explicar e com quem aprendi muito durante todos estes anos.

Aos membros da banca de acompanhamento, Neide Santos, Edvane Borges e Ana Mendonça, por todas as observações referentes aos Seminários e Exame de Qualificação, que visaram tão somente o meu aperfeiçoamento científico. Neste sentido, agradeço ao professor Mario Bernardo-Filho e às professoras Adriana Fontes e Laélia Campos.

A todos que fizeram ou fazem parte do Laboratório de Modelagem e Biodosimetria Aplicada (LAMBDA) do Grupo de Estudos em Radioproteção e Radioecologia (GERAR), Rodrigo Bezerra, Thiago Tenório, Thiago Augusto, Guilherme Soares, Mariana Brayner, Neyliane Santos, Fátida Coeli, Rebeca Cantinha, Marcela Pinto, Rafael Freitas, Suelen Lima, Thaísa Feliciano, Maria Helena, pela amizade durante todos esses meses ou anos de convivência. À Mariana e Neyliane, pela longa amizade e releituras deste trabalho. Ao Dr. Jonathan Melo, pela amizade e por nossas conversas sobre radiobiologia.

Aos pesquisadores da Agência de Proteção à Saúde do Reino Unido (HPA, UK), em especial ao Dr. David Lloyd, pelo exemplo dignificante de pesquisador atento às necessidades da sociedade. A Pat Hone e Jayne Moquet, que a princípio me acompanharam

nas etapas de laboratório e depois me deram autonomia no laboratório, a Paul Finnon, com quem aprendi muito sobre aquisição de imagens citogenéticas utilizando sistemas de capturas e programas de computador, a Liz Ainsbury e Alan Edwards, por contribuírem com o tratamento estatístico dos dados obtidos neste trabalho. A Lucia Singer e Hugh Rice, pela amizade e hospitalidade cordial.

A todos os professores do Departamento de Energia Nuclear (DEN). À colaboração integral do Prof. Dr. Carlos Brayner para que eu atingisse as minhas metas; ao Prof. Dr. Ivon Fittipaldi (Ministério da Ciência e Tecnologia - MCT), pelas palavras de incentivo durante minha empreitada acadêmica, ao Prof. Dr. Suêlto Vita (Laboratório de Proteção Radiológica – LPR), pelo apoio às nossas pesquisas, ao Prof. Dr. André Neto, pelo compromisso com a qualidade do curso de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares (PROTEN). Agradeço a todos os colegas e amigos pós-graduandos do DEN, pelas conversas descontraídas e informais na Copa. Agradeço a José Araújo e Jairo Dias, pelo auxílio com as equações. A Ricardo Aguiar, pela amizade.

Às secretárias Alene, Magali e Nilvânia, aos Srs. Edvaldo e Antônio, à dona Maria (Lia), Sr. Juarez e Sra. Eliete, por serem todos sempre muito receptivos e prestativos, bem como a todos os funcionários do DEN.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por financiar essa pesquisa no Brasil, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por financiar o meu Estágio de Doutorando na HPA da Inglaterra (Chilton, Oxfordshire).

"Eu gosto de catar o mínimo e o escondido. Onde ninguém mete o nariz, aí entra o meu, com a curiosidade estreita e aguda que descobre o encoberto".

Machado de Assis (1839 – 1908).

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
RESUMO.....	viii
SUMMARY	ix
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 Dano Cromossômico Radioinduzido: Descobertas e Aplicações.....	4
2.1.1 Estrutura dos Cromossomos e Formação das Aberrações Instáveis.....	6
2.2 Biofísica do Dano Cromossômico	10
2.2.1 Transferência Linear de Energia (LET).....	10
2.2.2 Taxa de Dose	13
2.2.3 Irradiação Parcial do Corpo Humano	15
2.3 Recirculação dos Linfócitos	18
2.4 Cinética da Transmissão das Aberrações Cromossômicas Instáveis.....	20
2.5 Métodos de Coloração Citogenética em Dosimetria.....	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Coleta Amostras de Sangue Periférico	30
3.2 Irradiação das Amostras.....	30
3.3 Cultura de Linfócitos Humanos	32
3.3.1 Retirada da Cultura.....	33
3.4 Preparo das Lâminas	34
3.4.1 Coloração das Lâminas.....	35
3.5 FISH (Hibridização Fluorescente in situ).....	35

3.5.1 Hibridização.....	35
3.5.2 Tratamento com RNAase – Proteinase.....	35
3.5.3 Desnaturação das Preparações Cromossômicas	36
3.5.4 Preparação das Sondas de Hibridização- 1ª Hibridização	36
3.5.5 Preparação da Sonda Centromérica - 2ª Hibridização.....	37
3.5.6 Detecção Imunológica	37
3.6 Técnica de bandeamento C.....	39
3.7 Análise e Armazenamento das Lâminas.....	40
3.8 Estimativas da Dose Absorvida	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 Adequação do Tempo de Cultura e de Adição do Colcemid para Avaliação de Irradiação Parcial.....	43
4.2 Influência do Tempo de Adição do Colcemid na Qualidade da Preparação Cromossômica	55
4.3 Adequação do Método de Coloração em Dosimetria Citogenética.....	61
5 CONCLUSÕES.....	71
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
ANEXOS	82
ANEXO 1: DISTRIBUIÇÃO DE ABERRAÇÕES INSTÁVEIS POR CÉLULAS .	82
ANEXO 2 PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Tipos de lesões no DNA induzidas pelas radiações ionizantes	7
Figura 2 Níveis de compactação do DNA no núcleo da célula.....	8
Figura 3 Formação de dicêntricos, anéis e fragmentos, promovida por quebras induzidas pelas radiações ionizantes.....	9
Figura 4 Curva linear e linear-quadrática.....	11
Figura 5 Linfócito Humano	18
Figura 6 Esquema da transmissibilidade dos dicêntricos ao longo de duas divisões celulares	21
Figura 7 Esquema do efeito arlequim pela técnica de FPG.....	22
Figura 8 Hipóteses para a cinética da frequência de dicêntricos	23
Figura 9 Metáfase de uma célula exposta à radiação ionizante.....	26
Figura 10 Bandeamento C de metáfase apresentando um dicêntrico.....	27
Figura 11 Presença de um dicêntrico (seta branca) e um anel (seta amarela) visualizados por FISH	28
Figura 12 Irradiação das amostras com raios-X provenientes de acelerador linear Siemens	31
Figura 13 Esquema da simulação de irradiação parcial	32
Figura 14 Esquema da preparação de lâmina através do gradiente de temperatura em banho-Maria.....	34
Figura 15 Esquema das etapas da detecção imunológica.....	38
Figura 16 Esquema do bandeamento C de um cromossomo humano, com o destaque da região centromérica	39
Figura 17 Frequências de dicêntricos encontrados em linfócitos em função do tempo de cultura	43
Figura 18 Cinética dos dicêntricos encontrados em linfócitos em M1 (48 horas), M2 e M3 (72 horas).....	44

Figura 19 Metáfase contendo dicêntrico em M2 (A) fragmento replicado em M2 (B), três dicêntricos em M2 (C).....	45
Figura 20 Cinética de dicêntricos	47
Figura 21 Planejamento da dosimetria citogenética em caso de irradiação parcial	54
Figura 22 Condensação cromossômica elevada induzida pelo tempo de tratamento com Colcemid.....	56
Figura 23 Distribuição dos comprimentos dos pares de cromossomos 2 e 3 em culturas de 72 h com adição de Colcemid após 69 e 24 h de incubação	57
Figura 24 Cromossomos em metáfase endoreduplicados	60
Figura 25 Confirmação de dicêntricos por técnicas que evidenciam os centrômeros.....	61
Figura 26 Confirmação de cromossomos monocêntricos	62
Figura 27 Presença de dicêntricos falso-positivos pelos métodos que evidenciam os centrômeros	63
Figura 28 Frequências de dicêntricos encontrados em linfócitos para cada dose pelos quatro métodos de coloração selecionados.....	67
Figura 29 Planejamento de escolha do método de coloração citogenética a ser empregado em dosimetria, envolvendo exposições a elevadas e baixas doses de radiação	70
Figura 30 Frequências dos polígonos de distribuições de Poisson para vários valores de média	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Distribuição de aberrações cromossômicas instáveis em exposições parciais	50
Tabela 2 Estimativa da dose absorvida conhecendo-se a fração irradiada (70 %) e usando os métodos Qdr e CP	51
Tabela 3 Valores da média dos pares de cromossomos 2 e 3 em 50 metáfases culturas de 72 h e adição de Colcemid após 69 e 24 h de incubação.....	58
Tabela 4 Frequência de aberrações cromossômicas em células irradiadas com 1,5 Gy analisadas por diferentes métodos de coloração.....	65
Tabela 5 Frequência de aberrações cromossômicas em células irradiadas com 3 Gy analisadas por diferentes métodos de coloração.....	66
Tabela 6 Causas de ambigüidade e suas resoluções por quatro diferentes métodos (Giemsa, bandeamento C, DAPI e FISH)	68
Tabela 7 Resumo do tempo, custos e acurácia relativa a cada método de coloração citogenética avaliado	69

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Anéis cêntricos
ANOVA	Análise da variância
Ba(OH)₂.8H₂O	Hidróxido de bário
BrdU	5-Bromo-2-dioxiuridina
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
CP	Poisson contaminada
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
Dic	Dicêntricos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
DSB	Quebra da dupla fita
EP	Erro padrão
F	Fração irradiada
FC	Fragmentos cêntricos
FISH	Hibridização fluorescente <i>in situ</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FPG	Fluorescência mais Giemsa
F1	anti-FITC
F2	anti coelho Ig
Gy	gray
HCl	Ácido clorídrico
HPA	Agência de Proteção à Saúde
IAEA	Agência Internacional de Energia Atômica
ICRU	Comissão Internacional de Unidades de Radiação
Ig	Imunoglobulina
KCl	Cloreto de potássio
LET	Transferência Linear de Energia
MEM	Meio essencial mínimo
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MRC	Conselho de Pesquisa Clínica
M1	Primeira mitose

M2	Segunda mitose
M3	Terceira mitose
M4	Quarta mitose
NPL	Laboratório Físico Nacional
PBS	Salina tamponada com fosfato
PHA	Fitohemaglutinina
RPD	Divisão de Proteção Radiológica
SP	Sangue periférico
SSB	Quebra de fita simples
SSC	Solução salina citrato
UV	Ultravioleta
WCP	Sonda para cromossomo inteiro

ADEQUAÇÃO DA DOSIMETRIA CITOGENÉTICA PARA AVALIAÇÃO DE IRRADIAÇÃO PARCIAL E DE CORPO INTEIRO

Autor: Thiago de Salazar e Fernandes

Orientador: Prof. Dr. Ademir Amaral – DEN/UFPE

Co-orientador: Dr. David Lloyd – HPA/Reino Unido

RESUMO

A maioria das exposições humanas às radiações ionizantes envolve irradiação parcial do corpo humano. Com isso, o emprego da dosimetria citogenética, sem consideração desse aspecto, pode resultar na subestimação da dose absorvida pelo indivíduo. Neste contexto, essa pesquisa estudou parâmetros metodológicos da biodosimetria, tais como tempo de cultivo celular, tempo de adição de Colcemid e métodos de coloração citogenética, objetivando fornecer um planejamento de escolha metodológica que seja mais adequado ao tipo de irradiação (parcial ou de corpo inteiro). Para tanto, amostras de sangue de um doador saudável foram irradiadas com doses de 1,5; 3,0 e 4,0 Gy de raios-X. Os métodos de coloração, Giemsa, DAPI, bandeamento C e FISH, foram comparados em relação à eficácia na identificação de aberrações cromossômicas, a partir das amostras irradiadas com 1,5 e 3,0 Gy. A irradiação parcial do corpo foi simulada por meio da mistura de 70% da amostra de sangue irradiada com 4,0 Gy com 30% de sangue não irradiado. Os resultados obtidos nesta pesquisa indicaram que a comparação das frequências de aberrações cromossômicas obtidas com tempo de cultura de 48 horas, com aquelas obtidas em culturas prolongadas de 72 horas, permite a distinção entre uma exposição parcial e de corpo inteiro, em função do atraso mitótico da população de linfócitos irradiados. Por outro lado, culturas com adição prévia de Colcemid e com duração de 72 horas, apesar de garantir que as células permaneçam em primeira divisão mitótica (M1), apresentaram cromossomos com elevada condensação. Em relação às técnicas de coloração, embora não tenham sido observadas diferenças significativas entre os resultados das estimativas de dose obtidas, constatou-se que o método de FISH e de bandeamento C são indicados para elucidação de imagens duvidosas.

Palavras-chave: Biodosimetria; aberrações cromossômicas; cultivo celular; FISH; raios-X.

ADEQUACY OF CYTOGENETIC DOSIMETRY TO EVALUATE PARTIAL AND TOTAL BODY IRRADIATION

Author: Thiago de Salazar e Fernandes

Adviser: Dr. Ademir Amaral – DEN/UFPE

Co-adviser: Dr. David Lloyd – HPA/United Kingdom

SUMMARY

The majority of human exposures to ionizing radiation involves partial human body irradiation. Thus, the use of cytogenetic dosimetry, when this aspect is not taken into account, can result in dose underestimation to the irradiated subject. In this context, this research studied methodological parameters of biodosimetry, such as cell culture time, time of Colcemid addition and cytogenetic stain methods, with the purpose of providing a planning of choice of the most adequate method considering the type of irradiation (partial or total body). For this, blood samples from a healthy donor were irradiated with doses of 1.5, 3.0, 4.0 Gy of X-rays. The staining methods, Giemsa, DAPI, C banding and FISH were compared in relation to the efficacy in identifying chromosome aberrations, from samples irradiated with 1.5 and 3.0 Gy. Partial body irradiation was simulated by the mixture of 70% blood sample irradiated with 4.0 Gy with 30% non-irradiated sample. The results obtained in this research indicate that the comparison between the frequencies of chromosome aberrations obtained with the time of cell culture of 48 hours, with the ones quantified after prolonged cell culture of 72 hours, allows distinguishing between partial and total body exposure, due to mitotic delay of the population of irradiated lymphocytes. On the other hand, cell cultures with the previous addition of Colcemid and duration of 72 hours, despite of guaranteeing cells in first mitotic division (M1), presented highly condensed chromosomes. In relation to the stain techniques, despite the fact that there are no significant differences between the results of dose estimates among the evaluated techniques, it was observed that FISH and C banding methods are indicated to elucidate doubtful images.

Key-words: Biodosimetry; chromosome aberrations; cell culture; FISH; X-rays.

1 INTRODUÇÃO

Em casos reais ou de suspeita de exposições humanas às radiações ionizantes (RIs), a dosimetria citogenética é um método complementar à dosimetria física para estimar a dose absorvida e, às vezes, o único meio disponível (LLOYD, 1998). A técnica mais comumente empregada para este fim se baseia na quantificação de aberrações cromossômicas instáveis (dicêntricos, anéis e fragmentos) em linfócitos do sangue periférico humano, principalmente nos casos de exposições mais recentes e envolvendo o corpo inteiro (EDWARDS et al., 1979; LLOYD et al., 1984; 2000).

No entanto, a grande maioria dos incidentes radiológicos envolve exposições de regiões localizadas do corpo, resultando na presença significativa de linfócitos não irradiados na amostra de sangue periférico. Essa heterogeneidade da amostra pode levar a subestimação da dose absorvida (AMARAL, 2002; MAGNATA et al., 2002; HEIMERS et al., 2006).

No intuito de corrigir os valores de dose neste tipo de cenário, foram desenvolvidos métodos matemáticos de correção como o CP (Poisson contaminada), por Dolphin (1969) e o método Qdr, por Sasaki e Miyata (1968). O método CP leva em consideração que as células que contêm aberrações são naturalmente pertencentes à fração irradiada do corpo, e as células normais sem aberrações compreendem duas populações: a de células irradiadas não contendo aberrações e a de células não irradiadas. O método Qdr considera apenas as células que contêm aberrações cromossômicas, incluindo a presença de anéis cêntricos. Por esses métodos, fatores como atraso mitótico e morte celular (apoptose) são levados em consideração para a estimação da dose absorvida (SASAKI e MIYATA, 1968; DOLPHIN, 1969; IAEA, 2001).

Atualmente, há evidências de que o prolongamento do tempo de cultivo celular para além do tempo convencional de 48 horas poderia favorecer seletivamente as células pertencentes à fração irradiada, por considerar “naturalmente” fatores como o atraso mitótico induzido pela radiação e permitir tempo suficiente para que as mesmas atinjam o estágio de metáfase. Porém, os dados a esse respeito ainda são controversos e carentes de maiores elucidações a respeito da cinética das aberrações instáveis (HONE et al., 2005; HEIMERS et al., 2006).

Outro fator importante para a obtenção fidedigna de estimativas de dose, tanto em situação de exposição parcial quanto de corpo inteiro, é a escolha do método de coloração citogenética. Até o presente momento não há um consenso sobre qual é o melhor método para a visualização das aberrações cromossômicas instáveis. O método mais comumente empregado para obter as curvas de calibração é a coloração com Giemsa, que pode ser combinada a uma técnica de coloração diferencial das cromátides, a FPG (Fluorescência mais Giemsa), útil na identificação do número de ciclos celulares pelos quais a célula passou (GRIFFITHS et al., 2002). Outra coloração que pode ser usada é o DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), que combinado à luz UV (ultravioleta) permite a observação de cromossomos em um microscópio de fluorescência (EDWARDS et al., 2005).

Em contrapartida, muitas vezes faz-se necessária a distinção da região centromérica para a identificação correta de aberrações cromossômicas. A mesma pode ser obtida por meio de técnicas de citogenética molecular, a exemplo da técnica de Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) (KANDA e HAYATA, 1996; ROY et al., 1996). De forma alternativa e menos dispendiosa, é possível a realização de técnicas clássicas de análise cromossômica, como o bandeamento C, que permite a coloração com Giemsa da região de heterocromatina constitutiva, que em humanos corresponde à região centromérica (PROSSER et al., 1975; FERNANDES et al., 2006).

Diante disso, essa pesquisa objetivou adequar parâmetros metodológicos como o prolongamento do tempo de cultura de 48 para 72 horas, o tempo de adição do Colcemid e os métodos de coloração e identificação cromossômica, buscando gerar um protocolo de

planejamento de escolha de métodos a depender da natureza da irradiação (parcial ou de corpo inteiro). Neste sentido, os objetivos específicos foram:

- 1) Comparar as frequências de dicêntricos e os valores de dose estimados em tempos diferentes de cultivo celular (48 e 72 horas) e em momentos distintos de adição do Colcemid (0, 24, 45 e 69 horas), após simulação *in vitro* de irradiação de 70% do corpo com a dose de 4 Gy.
- 2) Comparar a correção natural do valor de dose obtida com o prolongamento da cultura para 72 horas, com a correção matemática das doses por meio dos métodos CP e Qdr, que consideram os fatores de atraso mitótico e morte celular (apoptose).
- 3) Investigar o efeito do Colcemid sobre o fenômeno de condensação cromossômica, normal ou excessiva, induzido pela ação prolongada desta droga em cultura, utilizando ferramentas computacionais e a técnica de FISH.
- 4) Comparar a acurácia da identificação de aberrações cromossômicas instáveis e suas aplicações em dosimetria citogenética, por quatro métodos de coloração citogenética: Giemsa, Bandeamento C, DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) e FISH (hibridização fluorescente *in situ*) com sonda centromérica; em amostras irradiadas com as doses de 1,5 e 3,0 Gy de raios-X.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Dano Cromossômico Radioinduzido: Descobertas e Aplicações

A primeira evidência de que os raios-X causam dano aos cromossomos data de 1927, com as experiências genéticas realizadas por Joseph H. Muller envolvendo a irradiação de moscas *Drosophila melanogaster*, popularmente conhecidas como “moscas das frutas”. Muller percebeu que as novas gerações de moscas adquiriam características físicas distintas das parentais, como variações da cor dos olhos, tamanho das asas, dentre outros fenótipos¹ induzidos pela radiação (apud PRESTON, 2005).

Estudos similares também foram conduzidos em espécie vegetal por Barbara McClintock (1931), com base no estudo da estrutura dos cromossomos de milho sob condições normais e após exposição aos raios-X. McClintock associou as alterações cromossômicas específicas induzidas por raios-X com a geração de novos fenótipos de milhos (apud PRESTON, 2005).

O estudo do dano cromossômico radioinduzido só foi finalmente realizado de forma quantitativa com o trabalho pioneiro de Sax (1938), que avaliou como o número de aberrações cromossômicas em plantas do gênero *Tradescantia* variava proporcionalmente em função da dose absorvida² de radiação (apud LLOYD e DOLPHIN, 1977).

¹ Fenótipo – são as características físicas observáveis de um organismo (SNUSTAD e SIMMONS, 2001).

² Dose Absorvida – é a energia média depositada pela radiação em um volume elementar de matéria de massa dm. A unidade no Sistema Operacional de Unidades (SI) é o joule por quilograma (J/kg), denominada gray (Gy) (CNEN 3.01, 2005).

Em humanos, o estudo dos cromossomos passou por um grande progresso com a descoberta de Tjio e Levans (1956) de que o número normal de cromossomos da espécie humana é 46, e não 48 como se pensava anteriormente. Porém, esta descoberta não ocorreu de forma independente, pois teve por base pesquisas prévias que melhoraram sensivelmente a qualidade das preparações cromossômicas, a exemplo do tratamento das células com solução hipotônica introduzido por Hsu (1952) (apud HARPER, 2006).

Com o progresso da citogenética humana, tornou-se possível também quantificar o dano cromossômico produzido em linfócitos do sangue periférico e relacioná-lo com a dose absorvida de radiação, como ocorreu de forma pioneira após um incidente radiológico em 1962 com vítimas do “Recuplex” em Hanford (BENDER; GOOCH, 1966 apud LLOYD, 1997). O método citogenético empregado com esta finalidade passou a ser denominado de dosimetria citogenética, e este é considerado até hoje o método mais eficaz de dosimetria biológica (UNSCEAR, 2000; IAEA, 2001; RIBEIRO et al., 2003).

A importância da dosimetria citogenética tem sido demonstrada em situações práticas envolvendo emergências radiológicas, sendo uma etapa crucial para a radioproteção do homem. Para altas doses de radiação (> 1 Gy), a dosimetria citogenética auxiliaria a equipe médica no tratamento dos indivíduos expostos, permitindo identificar os possíveis candidatos ao transplante de medula óssea. Isso é possível devido ao conhecimento de que certas faixas de dose acarretam em determinados sinais clínicos e sintomas, que podem surgir dentro de horas a semanas após a exposição. Para baixas doses, é possível identificar os casos de histeria ou que possuam outras causas quaisquer que não estejam necessariamente associadas à radiação, a exemplo de intoxicação alimentar (LLOYD, 1998; IAEA, 2001).

No Brasil, a primeira aplicação prática da dosimetria citogenética ocorreu no acidente de Goiânia (1987), envolvendo a contaminação de uma parcela da população com a fonte radioativa de Césio-137 proveniente de um equipamento de radioterapia que se encontrava obsoleto em um ferro velho. Após a violação desse aparelho, famílias inteiras foram contaminadas com partículas radioativas do Césio. Nesse caso, a frequência de

aberrações cromossômicas instáveis (cromossomos dicêntricos, em anel e fragmentos acêntricos) permitiu a identificação das vítimas e o cálculo da dose absorvida de radiação que cada indivíduo recebeu (RAMALHO e NASCIMENTO, 1991).

Para melhor compreender como as aberrações cromossômicas são produzidas quando as radiações ionizantes interagem com os linfócitos humanos, serão abordadas, no item a seguir, as questões fundamentais relacionadas à composição e estrutura dos cromossomos humanos e da formação de aberrações instáveis.

2.1.1 Estrutura dos Cromossomos e Formação das Aberrações Instáveis

As aberrações cromossômicas instáveis (dicêntricos, anéis e fragmentos) induzidas pelas radiações ionizantes são o resultado de quebras das moléculas de ácido desoxirribonucléico (DNA). Esse fenômeno pode ocorrer em apenas uma fita da dupla hélice de DNA (SSB – quebra de fita simples), ou da dupla fita de DNA (DSB – quebra da dupla fita) (HALL e GIACCIA, 2006; NATARAJAN et al., 2008).

A Figura 1 ilustra a interação da radiação com a molécula de DNA (representada pela região em amarelo), resultando em SSB e DSB da molécula de DNA. Esse efeito é chamado direto porque a radiação age diretamente sobre a biomolécula causando a ionização dos átomos presentes na mesma e levando ao surgimento das quebras do DNA (HALL e GACCIA, 2006),

Porém, vale lembrar que estes mesmos efeitos mostrados na Figura 1 também podem ser produzidos de forma indireta. Isso ocorre porque os sistemas biológicos são constituídos em sua maior parte de moléculas de água, e a radiação causaria a formação de radicais livres, moléculas ionizadas e excitadas. Espécies reativas do oxigênio podem ser produzidas pela interação da radiação com a molécula de água, como o $\text{OH}^\bullet$ (radical superóxido), O_2^- (íon oxigênio) e H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), que vão provocar a lesão da estrutura do DNA (HALL e GIACCIA, 2006).

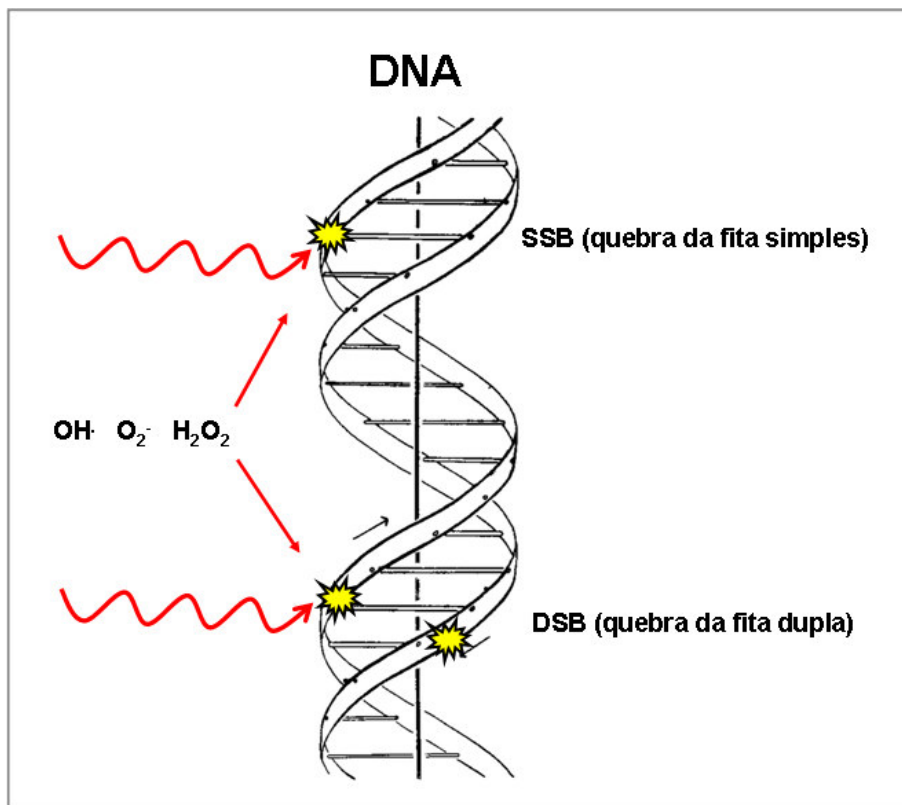


Figura 1 Tipos de lesões no DNA induzidas pelas radiações ionizantes. Modificado de: (WATSON e CRICK, 1953).

Caso o dano a dupla hélice de DNA não seja reparado, ou se o mesmo for reparado de forma incorreta, pode haver a formação de aberrações cromossômicas visíveis ao microscópio óptico. Isso ocorre porque cada cromossomo humano consiste numa única e longa molécula de DNA acondicionada com proteínas, formando a fibra de cromatina (SNUSTAD e SIMMONS, 2001).

Existem diferentes graus de compactação do DNA com estas proteínas. Em um primeiro estágio, o DNA encontra-se ligado a duas cópias de cada uma das proteínas histonas H2a, H2b, H3 e H4. O DNA associado a esse octâmero protéico forma o nucleossomo, que é a unidade básica da fibra de cromatina e possui um diâmetro de 10 nm. Quando os nucleossomos se dobram ou se helicoidizam ainda mais, há a formação de estruturas conhecidas por solenóides. Cerca de seis nucleossomos, organizados com a

proteína H1 ao centro formam a estrutura dos solenóides, que passam a ter o diâmetro de 30 nm (GRIFFITHS et al., 2002; EITOKU et al., 2008).

Diferentes graus de compactação do DNA com proteínas até formar os cromossomos metafásicos são mostrados na Figura 2. No esquema, o DNA é apresentado como uma dupla hélice de diâmetro de apenas 2 nm, seguido da condensação com proteínas histonas formando os nucleossomos de 10 nm, que se condensam ainda mais até formar as alças com 300 nm e, finalmente, os cromossomos metafásicos com 1.400 nm (HALL e GIACCIA, 2006).

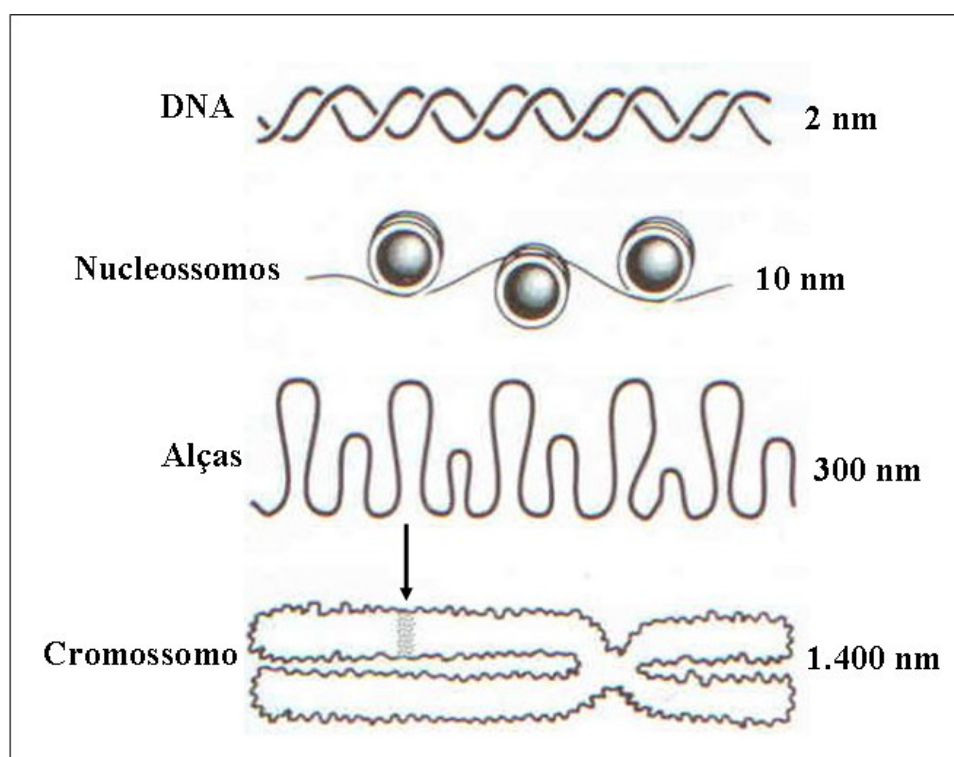


Figura 2 Níveis de compactação do DNA no núcleo da célula. Modificado de:
(HALL e GIACCIA, 2006).

Uma das regiões cromossômicas mais envolvidas com as quebras induzidas pela radiação são as porções terminais, denominadas de telômeros (do grego *telos* e *meros*, que significa “ponta” e “parte”, respectivamente) por Herman J. Muller em 1938. Barbara

McClintock também observou que as pontas dos cromossomos que perderam a região telomérica tornam-se adesivas e tendem a se unir, dando origem às aberrações cromossômicas (apud SNUSTAD e SIMMONS, 2001).

A Figura 3 apresenta de forma esquemática a formação de aberrações cromossômicas instáveis, mais comumente empregadas em dosimetria citogenética. No caso dos dicêntricos, as quebras envolvem dois cromossomos distintos, que perdem os telômeros e se unem pelas extremidades de forma incorreta. Na formação do cromossomo em anel, as quebras são produzidas em um único cromossomo, havendo a união das extremidades opostas de um mesmo cromossomo. Nos fragmentos, ocorre a perda da porção terminal ou intersticial de um cromossomo (LLOYD e DOLPHIN, 1977).

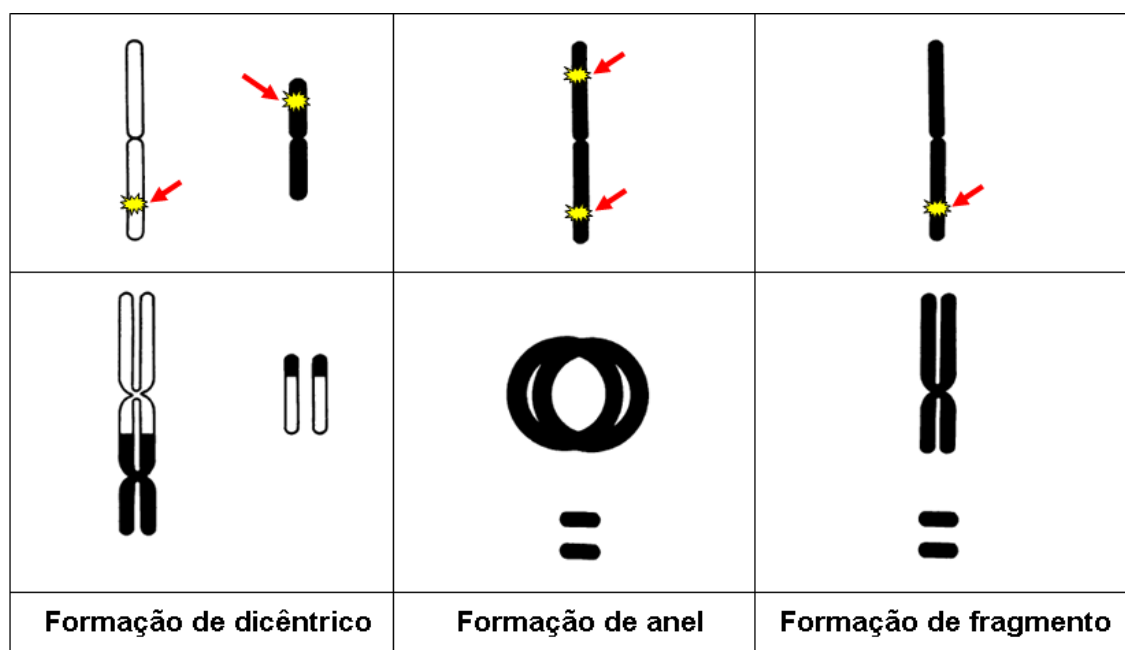


Figura 3 Formação de dicêntricos, anéis e fragmentos, promovida por quebras induzidas pelas radiações ionizantes. Modificado de: (LLOYD e DOLPHIN, 1977).

Atualmente, sabe-se que essa adesividade das regiões terminais dos cromossomos (i.e. telômeros) que foram quebradas pela radiação ocorre por meio de mecanismos de reparo fisiológico e de manutenção do DNA, que evita, na maioria das vezes, que mutações

genéticas sejam perpetuadas para as células-filhas. No entanto, os mesmos mecanismos quando atuam de forma incorreta podem causar uma reunião não-homóloga do DNA danificado, dando origem às aberrações cromossômicas (RIBEIRO et al., 2003; PRESTON, 2005; HALL e GACCIA, 2006).

Há que se considerar, ainda, outros fatores físicos necessários para que as DSBs dêem origem às aberrações cromossômicas, como a distância entre as quebras, denominada de “zona de interação” ou “alvo”. Caso essa distância ultrapasse 1 μm , as quebras têm maior probabilidade de reconstituir sua configuração original e nenhuma aberração cromossômica será formada (LLOYD e DOLPHIN, 1977; IAEA, 2001).

No próximo tópico, serão abordados outros parâmetros biofísicos relacionados ao dano cromossômico radioinduzido e que podem vir a interferir na produção das aberrações cromossômicas instáveis em linfócitos do sangue periférico humano.

2.2 Biofísica do Dano Cromossômico

2.2.1 Transferência Linear de Energia (LET)

Dentre os fenômenos físico-químicos resultantes da interação das radiações ionizantes com a matéria viva, ocorre a ejeção de elétrons das biomoléculas, com a conseqüente produção de íons ao longo do caminho percorrido pela radiação. A distribuição de ionizações e excitações ao longo da trajetória de uma radiação varia de acordo com o tipo de radiação (HALL e GIACCIA, 2006).

Deste modo, a resposta das células de um tecido ou órgão irradiado depende da energia média da radiação (dE) que é depositada na matéria por unidade de comprimento (dl), definida como “Transferência Linear de Energia” (LET), descrita matematicamente na Equação 1. A unidade prática do LET é o quilo elétron-volt por micrometro ($\text{keV}/\mu\text{m}$) (ICRU, 1970; HALL e GIACCIA, 2006).

$$LET = \frac{dE}{dl} \quad (1)$$

A Figura 4 apresenta curvas típicas da formação de dicêntricos em função da dose em linfócitos humanos expostos *in vitro* a doses de radiações de baixo e alto LET, que podem ser utilizadas para estimar a dose absorvida *in vivo*. Os dados estão ajustados para uma relação linear e linear-quadrática, como é esperado para a formação de cromossomos dicêntricos (UNSCEAR, 2000; IAEA, 2001).

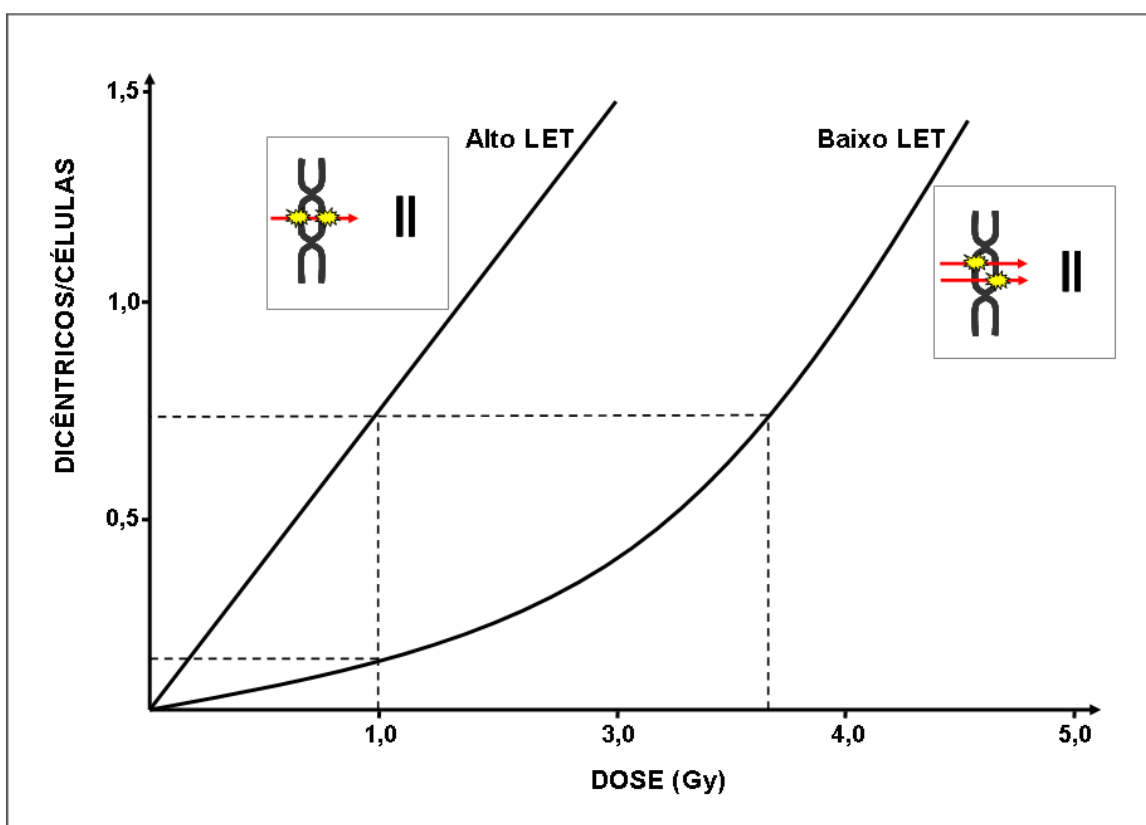


Figura 4 Curva linear e linear-quadrática típica de dose *versus* frequência de dicêntricos. Modificado de: (IAEA, 2001).

A curva para baixo LET é geralmente descrita por uma equação polinomial do segundo grau, também conhecida por “linear-quadrática”, expressa na Equação 2 (IAEA, 2001).

$$Y = A + \alpha D + \beta D^2 \quad (2)$$

Onde **Y** é a frequência de aberrações cromossômicas radioinduzidas, **A** é a frequência de dicêntricos normalmente encontrada em indivíduos não expostos, geralmente 1 dicêntrico a cada 1.000 células, **D** é a dose absorvida, **α** é o coeficiente linear e **β** o coeficiente quadrático da curva. Com isso, conhecendo-se a frequência de dicêntricos (**Y**), é possível encontrar a dose absorvida (**D**) (IAEA, 2001).

A resposta linear é consequência das quebras da dupla fita de DNA (DSBs) induzidas por um único feixe ou partícula de radiação. Se as duas quebras resultam de dois feixes distintos, a probabilidade da formação de dicêntricos será uma função quadrática da dose (HALL e GIACCIA, 2006).

Radiações com LET de 100 keV/ μ m, como nêutrons rápidos, prótons de baixa energia e partículas α , promovem uma média de separação entre dois eventos de ionização que coincide justamente com o diâmetro da dupla hélice de DNA (2 nm), necessitando de apenas de um feixe de partícula para causar DSBs. Por esse motivo, essas radiações estão muito associadas a danos biológicos, como morte celular e formação de aberrações cromossômicas. Por outro lado, radiações com LET acima de 100 keV/ μ m depositarão mais energia no alvo do que a necessária para produzir as DSBs, havendo um desperdício energético (UNSCEAR, 2000; IAEA, 2001; HALL e GIACCIA, 2006).

Uma das consequências da distribuição de ionizações ao longo do feixe ou partícula de radiação também é a distribuição de aberrações cromossômicas entre as células. Para radiações de baixo LET (e.g. raios-X e γ), as ionizações são randomicamente ou aleatoriamente distribuídas entre as células, caracterizando uma distribuição de Poisson (ver **ANEXO 1**) (SAVAGE, 1970 apud EDWARDS et al., 1979; EDWARDS et al., 2007).

Para radiações de alto LET, os eventos de ionização estão distribuídos de forma não randômica entre as células, sendo a variância maior que a média. Neste caso, a energia da

radiação é depositada em forma de “pacotes discretos” de energia. Isto significa que haverá células contendo múltiplas aberrações cromossômicas e células não contendo aberrações (TESSARD et al., 1997).

Diante disso, a curva de ‘dose absorvida’ *versus* ‘frequência de dicêntricos’ depende de parâmetros físicos básicos, como a distância entre as DSBs (região alvo) e o LET da radiação (TESSARD et al., 1997). No tópico seguinte, será abordado outro fator físico que pode influenciar na forma da curva para radiações de baixo LET (e.g. raios-X e γ), que é a taxa de dose.

2.2.2 Taxa de Dose

O tempo de irradiação é outro fator importante que influencia na formação de aberrações cromossômicas. Isso se deve à propriedade que a molécula de DNA tem de ser reparada dentro de alguns minutos até várias horas, a depender da lesão em particular (IAEA, 2001).

A taxa de dose é a medida da dose absorvida tendo transcorrido um determinado tempo (CNEN 3.01, 2005). Se as duas lesões necessárias para induzir a formação de um dicêntrico são produzidas por feixes de radiação de baixo LET e a taxa de dose é baixa, o tempo disponível para reparo do DNA será maior, permitindo que o dano causado pelo primeiro feixe de radiação seja reparado de maneira efetiva antes mesmo que o segundo feixe atravesse o núcleo da célula produzindo o segundo dano. Embora, neste caso, duas lesões tenham sido produzidas na região ‘alvo’, elas não podem interagir para produzir um dicêntrico (LLOYD et al., 1984; IAEA, 2001).

Esse fenômeno foi primeiro expresso de forma matemática com a introdução de uma função $G(x)$, proposta por Lea e Catcheside (1942). Esse fator permite a correção do coeficiente quadrático da dose (β) e, portanto, a obtenção do valor correto de dose

absorvida em situações envolvendo exposições prolongadas às radiações (apud IAEA, 2001). A equação linear quadrática pode ser então obtida pelas equações 3 e 4:

$$Y = \alpha D + \beta G(x) D^2 \quad (3)$$

$$G(x) = \frac{2}{x^2} [x - 1 + \exp(-x)] \quad (4)$$

Na Equação 4, $x = t/t_0$, sendo t a duração da exposição ou o intervalo de tempo entre as frações de dose e t_0 o tempo de vida média das quebras do DNA, o qual é cerca de 2 horas em linfócitos humanos (BAUCHINGER et al., 1979, LLOYD et al., 1984). A partir dessa equação, pode-se concluir que a taxa de dose influencia na frequência de aberrações cromossômicas, pois quanto maior for o tempo de exposição, maior será o intervalo de tempo disponível para o reparo, em se tratando do mesmo valor de dose. Essa função $G(x)$ foi confirmada mais recentemente por Hone e colaboradores (2005).

Esse mesmo fenômeno também ocorre para doses fracionadas. Se duas ou mais doses são recebidas, lesões da primeira podem interagir com lesões produzidas pela segunda, caso o intervalo de tempo entre a primeira dose e a subsequente não seja longo o suficiente para que ocorra o reparo da primeira lesão. Deste modo, se doses são separadas por tempos maiores que o tempo de reparo do DNA (t maior que 6 horas), a frequência de dicêntricos produzida pela dose total (i. e. a soma das frações) será menor do que se a dose fosse liberada de uma só vez. Para intervalos de tempo menores entre as frações, a função $G(x)$ na Equação 3 pode ser substituído por $\exp(-t_1/t_0)$, onde t_1 é o intervalo entre as frações (IAEA, 2001).

Outro componente importante é o valor de dose absorvida. A região do gráfico (Figura 4) correspondente a baixas doses de radiação ($< 0,3$ Gy) apresenta um comportamento linear com a frequência de dicêntricos ($Y = \alpha D$), mesmo para radiações de baixo LET. Isso significa que as duas lesões necessárias para formação de dicêntricos, neste caso, estão sendo promovidas por apenas um único feixe de radiação. Esse comportamento

linear também ocorre em situações envolvendo exposições crônicas ou ocupacionais de trabalhadores, onde a função $G(x)$ se reduz a valores próximos de zero, e pode-se assumir também a equação linear para a estimação da dose. Porém, vale salientar que neste último caso, outros fatores devem ser levados em consideração, como o tempo em que o indivíduo trabalha com radiação (IAEA, 2001).

No caso particular das radiações de alto LET, ambas as lesões envolvidas na indução de dicêntricos são geralmente produzidas por um único feixe ou partícula de radiação e a resposta é linear com a dose, independentemente da taxa de dose (TESSARD et al., 1997). A diferença maior está na forma de distribuição não uniforme de aberrações cromossômicas entre as células, característica desse tipo de radiação. Porém, essa distribuição variável também é um atributo de exposições parciais do corpo humano (IAEA, 2001).

2.2.3 Irradiação Parcial do Corpo Humano

É importante destacar que grande parte das exposições humanas às radiações ionizantes não envolve a região do corpo inteiro, e sim regiões localizadas do corpo (e.g. braços, pernas, tronco). Como consequência, a avaliação da dose absorvida a partir da análise cromossômica em linfócitos do sangue periférico pode resultar em valores de dose subestimados (LLOYD et al., 1991; PRASANNA et al., 2005).

Isso se deve ao fato dos linfócitos serem células que circulam por todo o corpo. Portanto, aqueles linfócitos que não pertencem à região do corpo irradiada irão circular e estarão presentes em certa quantidade na amostra, sendo contabilizados como células normais. Isso leva a uma diminuição da frequência total de dicêntricos e, conseqüentemente, da dose absorvida (IAEA, 2001).

No sentido de corrigir eventuais erros no valor de dose estimado em situações envolvendo exposições parciais, foram propostos dois métodos matemáticos: o método CP

(Poisson contaminada), que considera tanto a fração do corpo irradiada quanto a fração não exposta (DOLPHIN, 1969); e o método Qdr, que considera apenas as células contendo dicêntricos e anéis e assume que essas foram expostas no momento da irradiação (SASAKI e MIYATA, 1968).

De acordo com o método CP, as células que contêm aberrações cromossômicas são pertencentes à região do corpo irradiada, enquanto as células normais não danificadas pertencem a duas subpopulações: (a) as pertencentes à fração não irradiada do corpo e (b) as que foram irradiadas, representando o primeiro termo (e^{-Y}) da distribuição de Poisson (ver **ANEXO 1**) (IAEA, 2001).

A correção da frequência de dicêntricos (**Y**) pelo método CP, e a obtenção da fração de células irradiadas (**f**), pode ser calculada com base nas equações 5 e 6.

$$\frac{Y}{1 - e^{-Y}} = \frac{X}{N - n_0} \quad (5)$$

$$Yf = \frac{X}{N} \quad (6)$$

Onde **N** é o número total de células contadas, **X** é o número de dicêntricos e **n₀** é o número de células sem dicêntricos.

A dose média pode ser obtida aplicando-se o valor de **Y** obtido pela Equação 5 na equação da curva padrão de dose-efeito (Equação 1, já apresentada). A fração do corpo irradiada pode ser estimada após correção considerando os efeitos de morte celular (apoptose) e atraso mitótico. Esse último faz menção ao atraso que as células irradiadas têm em atingir o estágio de metáfase da divisão celular (mitose) em culturas convencionais de 48 horas. Se a fração de células irradiadas que atingem metáfase for **p**, a fração do corpo irradiada (**F**) pode ser obtida pela Equação 7 (IAEA, 2001):

$$F = \frac{f}{(f + p) - (f \times p)} \quad (7)$$

O valor de **p** é usado para corrigir o valor de **f**, levando em consideração os fatores de atraso mitótico e apoptose, pois nem todas as células sobrevivem ou atingem metáfase. O mesmo é obtido com base na dose que reduz em 37% o número de células viáveis (i.e. D_0). Por exemplo, se o valor de **p** for 0,33, isso significa que apenas 33% das células foram capazes de atingir metáfase em 48 horas. Portanto, usando este valor na Equação 7, o valor de células contadas é ajustado para fornecer a real fração total do corpo que foi irradiada (**F**) (IAEA, 2001).

O método Qdr, por outro lado, evita problemas de diluição das células irradiadas com células pertencentes à fração não exposta do corpo, ou a renovação a partir de células-tronco da medula óssea dos linfócitos após irradiação. Com isso, **Qdr** é a produção esperada de dicêntricos, **X**, dentre as células danificadas pela radiação, N_u , e é dado pela Equação 8.

$$Qdr = \frac{X}{N_u} = \frac{Y}{1 - e^{-(Y_1 + Y_2)}} \quad (8)$$

Onde **Y₁** e **Y₂** são as produções de dicêntricos mais anéis e de excesso de fragmentos acêntricos, respectivamente. Como **Y₁** e **Y₂** são funções conhecidas da dose e são deriváveis de curvas de calibração dose-resposta obtidas através da irradiação *in vitro* de linfócitos do sangue periférico humano, Qdr é uma função da dose apenas e permite a estimativa da dose para a fração do corpo irradiada.

Esses métodos são possíveis porque os linfócitos do sangue periférico humano possuem a propriedade de circular uniformemente por todo o corpo humano, ou seja, os linfócitos pertencentes à região irradiada do corpo podem ser encontrados na corrente sanguínea periférica por meio do processo de recirculação.

2.3 Recirculação dos Linfócitos

Os linfócitos são células sanguíneas de tamanho pequeno, com diâmetro cerca de $6\ \mu\text{m}$ e um volume estimado em torno de $110\ \mu\text{m}^3$ (IAEA, 2001) (Figura 5).

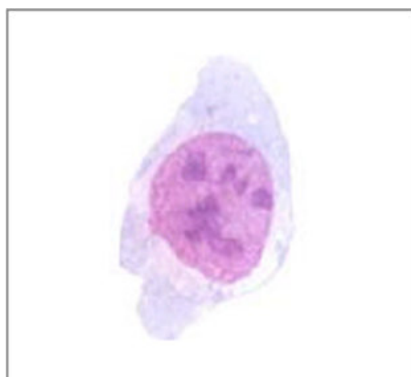


Figura 5 Linfócito Humano (FENECH et al., 2003).

Dois tipos principais de linfócitos podem ser distinguidos, i.e. linfócitos T e B. Ambos os tipos originam-se de células-tronco hematopoiéticas da medula óssea. Essas células indiferenciadas migram para o interior do timo e outros órgãos linfóides secundários, multiplicam-se nestes locais e, provavelmente por mutações somáticas, originam a população de linfócitos (IAEA, 2001).

Após completarem sua maturação em órgãos linfóides primários (timo e medula óssea, respectivamente), os linfócitos T e B migram para a corrente sanguínea, de onde passam para órgãos linfóides secundários (fenômeno da ecotaxia), como linfonodos e baço, estabelecendo-se em sítios específicos onde se dá a estimulação antigênica. Ademais, os linfócitos virgens podem usar o sangue ou canais linfáticos para trafegarem entre diferentes tecidos linfóides secundários, fenômeno conhecido por recirculação (LLOYD e DOLPHIN, 1977).

Após irradiação com doses de 2 a 10 Gy, a concentração de linfócitos no sangue periférico pode diminuir para valores inferiores ao limite normal de $1300\text{-}4800/\text{mm}^3$

(IAEA, 2001). Tal diminuição ocorreria mais devido à migração dos linfócitos circulantes para os tecidos irradiados do que devido à radiosensibilidade dessas células (LLOYD e DOLPHIN, 1977). Em sentido contrário, posteriormente há migração dos linfócitos dos tecidos irradiados para a corrente sangüínea, uma vez que 98 % dos linfócitos encontram-se no timo, linfonodos, amígdalas, tecidos linfáticos dos intestinos, baço e na medula óssea (IAEA, 2001).

A migração dos linfócitos dos tecidos para a corrente sanguínea também ocorre porque os linfócitos ativados pela radiação recirculam para atingir sítios específicos extranodais, também chamados de tecidos linfóides terciários. Dessa forma, os linfócitos T tendem a se acumular em áreas associadas a epitélios, como intestino, trato respiratório e regiões inflamatórias na pele e líquido sinovial (IAEA, 2001; ZAGO et al., 2001).

Dessa forma, com a análise de linfócitos humanos, não apenas as aberrações cromossômicas que foram induzidas pela radiação ionizante em linfócitos do sangue periférico podem ser detectadas, como também as induzidas em linfócitos distribuídos em diferentes órgãos e tecidos do corpo humano, o que permite a avaliação da dose em casos de exposições parciais do corpo (MAGNATA et al., 2002; SILVA-BARBOSA et al., 2005). No caso envolvendo irradiação parcial, o equilíbrio entre linfócitos irradiados e os linfócitos pertencentes aos tecidos não irradiados só ocorre após 24 horas (TAMURA et al., 1974 apud IAEA, 2001).

Além disso, os linfócitos irradiados circulantes se encontram naturalmente no estágio de G0 (quiescência) ou de pré-síntese de DNA do ciclo celular. Por conseguinte, essas células armazenam o dano enquanto não se dividirem e durante o seu tempo de vida média, que é em torno de 3 anos (IAEA, 2001).

Os linfócitos T podem abandonar o estágio G0 do ciclo celular e se dividirem, quando estimulados *in vitro* pela fitohemaglutinina (PHA), uma proteína derivada da planta de feijão *Phaseolus vulgaris* (NOWELL, 1960 apud IAEA, 2001). Uma vez estimulados, os linfócitos contendo aberrações cromossômicas induzidas pela radiação ionizante podem

ser avaliados após 48 horas, adicionando Colcemid convencionalmente com 45 horas. O Colcemid atua sobre as fibras do fuso acromático (mitótico), impedindo sua polimerização e interrompendo a divisão celular no estágio de metáfase (IAEA, 2001).

O próximo tópico aborda as questões relacionadas à cinética e ao declínio de aberrações cromossômicas instáveis em linfócitos T ao longo das divisões celulares. O estudo da transmissibilidade das aberrações instáveis é importante em dosimetria citogenética, especialmente em casos de exposições parciais do corpo humano.

2.4 Cinética da Transmissão das Aberrações Cromossômicas Instáveis

Os linfócitos do sangue periférico humano se dividem após estímulo com a fitohemaglutinina (PHA) e podem transmitir as aberrações cromossômicas para células-filhas viáveis. Porém, as aberrações denominadas instáveis (cromossomos dicêntricos, anéis acêntricos e fragmentos acêntricos) tendem a se diluir ao longo dos sucessivos ciclos de divisão celular (PALA et al., 2001).

Isto ocorre porque a cada divisão celular há 50% de chance de células em M1 contendo dicêntricos se dividirem, e 50% de produzirem uma ponte anafásica letal. Uma vez transmitindo o dicêntrico, há 50% de uma célula-filha herdar o dicêntrico “completo” (i.e. contendo o fragmento) (PALA et al., 2001). Em suma, há 25% de chance de transmissão de dicêntricos completos a cada divisão celular.

No entanto, para altas doses de radiação (> 4 Gy), as frequências de dicêntricos completos reduzem à metade (50%) a cada divisão celular (CARRANO e HEDDLE, 1973; BRASELMANN et al., 1986 apud PALA et al., 2001; FERNANDES et al., 2008b). De acordo com esses autores, os dicêntricos completos co-existem com fragmentos acêntricos em excesso, além do fragmento associado ao dicêntrico. Deste modo, quando uma célula contém um dicêntrico e um fragmento acêntrico em excesso, cada célula-filha tem 50% de probabilidade de herdar um dicêntrico completo ou de formar uma ponte anafásica letal, como esquematizado na Figura 6.

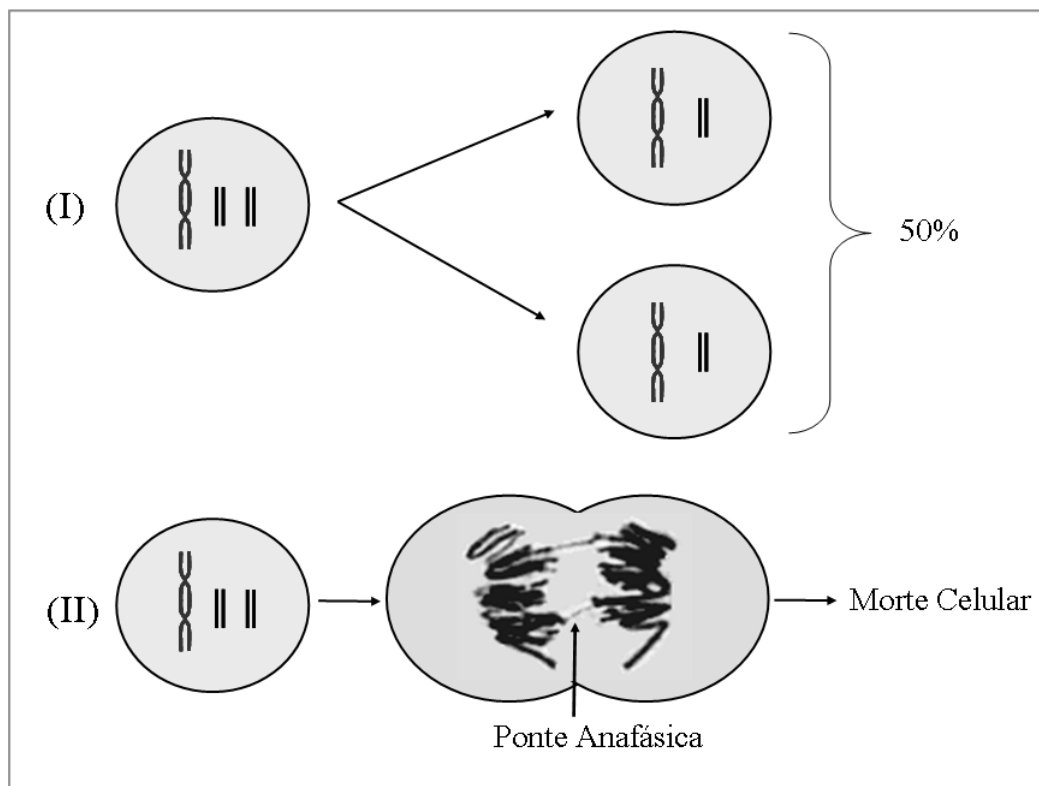


Figura 6 Esquema da transmissibilidade dos dicêntricos ao longo de duas divisões celulares. **(I)** Transmissão do dicêntricos para duas células-filhas; **(II)** Formação de ponte anafásica letal durante transmissão de dicêntrico.

Como as aberrações cromossômicas instáveis diluem ao longo das divisões celulares, percebeu-se ainda na década de 1960 que o tempo de cultura de 72 horas levava a uma diminuição das frequências de dicêntricos e, conseqüentemente, uma subestimação do valor de dose absorvida (HONE et al., 2005).

Com o advento da técnica de FPG (Fluorescência mais Giemsa), a identificação de células em segunda mitose (M2) tornou-se possível. Esse método permite uma coloração diferencial das cromátides com o decorrer dos sucessivos ciclos de divisão celular. Essa distinção se faz fornecendo às células em crescimento um análogo da base nitrogenada desoxitimidina do DNA, a 5-Bromo-2-desoxiuridina (BrdU) (PERRY e WOLFF, 1974; GRIFFITHS et al., 2002; RIBEIRO et al., 2003).

As células que incorporam esse análogo de base do DNA após o primeiro ciclo celular apresentam BrdU nas cadeias recém-sintetizadas, ao invés da desoxitimidina. Quando a célula passa pelo segundo ciclo celular, uma das cromátides conterá BrdU em ambas as cadeias de DNA e a outra conterá apenas uma das cadeias com BrdU (PERRY e WOLFF, 1974; GRIFFITHS et al., 2002; RIBEIRO et al., 2003).

Após exposição à luz ultravioleta (UV), as fitas de DNA que incorporaram BrdU se quebram, e ocorre uma coloração diferencial das cromátides pelo Giemsa. Esse método foi originalmente descrito por Perry e Wolff (1974) (apud IAEA, 2001).

A Figura 7 ilustra como uma nova fita de DNA tem a antiga como molde, seguindo o modelo da replicação semiconservativa.

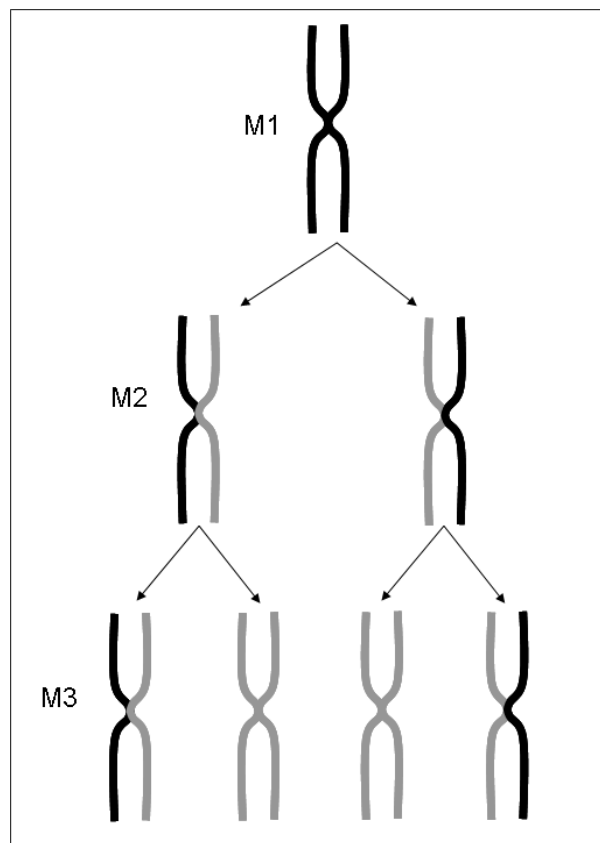


Figura 7 Esquema do efeito arlequim pela técnica de FPG.

Com a possibilidade de distinguir e contar apenas as células em primeira divisão mitótica (M1) por meio da análise diferencial das cromátides com o emprego da técnica de FPG, pesquisas passaram a evidenciar que as frequências de dicêntricos permanecem constantes quando apenas células em M1 são contabilizadas, independentemente do tempo de cultivo celular (GUERRERO-CARBAJAL et al., 1998; SCOTT e LYONS, 1979 apud HONE et al., 2005).

Em contraposição a essas observações, Boei (1996; 1997), Hoffmann (2002), Hone (2005) e Heimers (2006), junto aos seus respectivos colaboradores, evidenciaram que há um aumento das frequências de aberrações cromossômicas em células em M1 com o prolongamento do tempo de cultura de 48 para 72 horas. Esses autores argumentam que este aumento deve ocorrer devido ao atraso mitótico das células irradiadas.

Essa controvérsia a respeito da constância ou do aumento das frequências de aberrações cromossômicas (**Y**) em células em M1 em função do tempo (**t**) de cultivo celular permanece até hoje. Deste modo, há duas hipóteses para a cinética dos dicêntricos em células em M1 ao longo do tempo. A Figura 8 apresenta graficamente essas duas possibilidades de impacto significativo para a dosimetria citogenética.

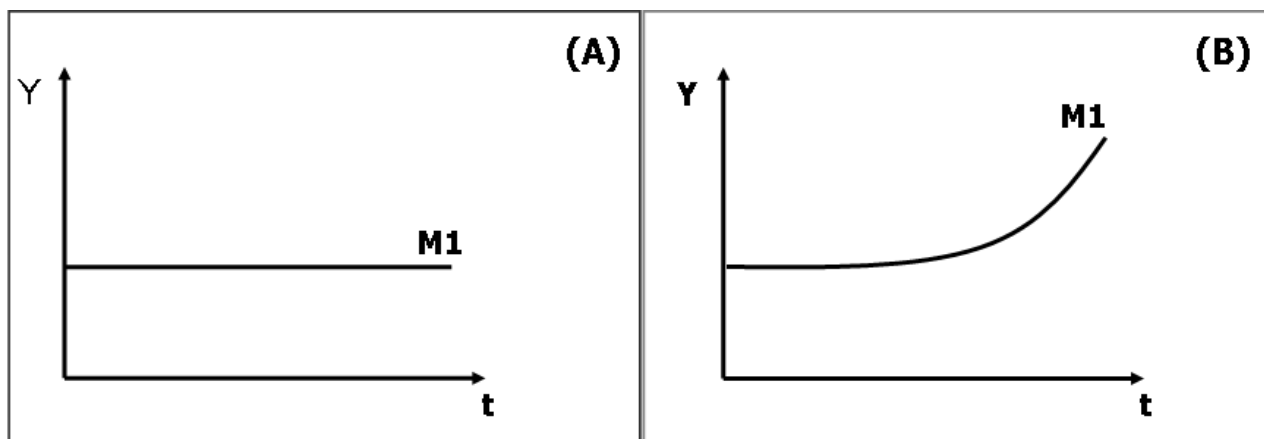


Figura 8 Hipóteses para a cinética da frequência de dicêntricos (**Y**) ao longo do tempo (**t**) de cultura celular. (A) A frequência permanece constante em células em M1; (B) Há um aumento em células em M1.

Em estudo mais recente, Hone e colaboradores (2005) demonstraram que há um aumento significativo na frequência de dicêntricos em células em M1 com o prolongamento do tempo de cultura. Os dados indicam que as frequências de dicêntricos permanecem constantes até 51 horas, aumentando após 60 horas. Comparado com as frequências em 48 horas, o aumento da frequência de aberrações em células em M1, entre 60-70 horas, foi de cerca de 50%.

O retardo das células irradiadas em atingir metáfase no tempo de cultura convencional de 48 horas poderia ser explicado pelo atraso na resposta à estimulação com fitohemaglutinina (HOFFMANN et al., 2002). Outra possível explicação é que esse retardo é uma resposta ao dano induzido no DNA, acarretando na ativação de processos mediados por vários genes responsáveis pelo controle do ciclo celular, que é conhecido atualmente como pontos de checagem (checkpoints) (HOFFMANN et al., 2002; RIBEIRO et al., 2003).

Purrot e colaboradores (1980) relataram um atraso de 1 hora para cada Gy (gray) de raios-X (apud HONE et al., 2005). Outra hipótese alternativa ao atraso mitótico das células irradiadas é que as diferentes populações de linfócitos possuem diferentes radiosensibilidades com relação à formação de aberrações cromossômicas (HOFFMANN et al., 2002; HONE et al., 2005).

Além do atraso mitótico, metáfases presentes em culturas mais longas tendem a incluir proporcionalmente o surgimento de linfócitos B, cuja transformação blastogênica requer a presença dos linfócitos T circulantes que responderam ao estímulo da fitohemaglutinina (PHA) (HAN e DADAY, 1978 apud HONE et al., 2005).

No entanto, também há evidências de que os linfócitos B são mais sensíveis em termos de morte celular para altas doses de radiação e, conseqüentemente, a maioria das células que atingem metáfase nesse caso são os linfócitos T (WUTTKE et al., 1993). Entretanto, não há ainda evidências de que há uma diferença significativa entre as células B

e T com relação às frequências de aberrações cromossômicas radioinduzidas para baixas doses de radiação (SCHWARTZ e GAULDEN, 1980 apud HONE et al., 2005).

Por fim, há ainda a possibilidade de que haja uma subpopulação dentre os linfócitos T (CD4 e CD8), que seja mais radiosensível em termos de expressão de aberrações cromossômicas, e mais lenta em resposta a estimulação ao mitógeno. Porém, não há dados experimentais que confirmem essa hipótese (HONE et al., 2005).

Segundo Hone e colaboradores (2005), essas observações não teriam maiores implicações para a dosimetria citogenética, em se tratando de exposições de corpo inteiro. Porém, Heimers e colaboradores (2006) discutem que tais fatores poderiam levar a obtenção de valores de dose de radiação abaixo da real em casos de irradiações parciais do corpo, devido ao atraso da população de linfócitos pertencentes à fração irradiada.

Por fim, outra etapa crucial para a contagem apropriada de aberrações cromossômicas em linfócitos é a escolha do método de coloração cromossômica. No próximo tópico serão abordados alguns métodos de coloração citogenética que permitem a análise diferencial de cromossomos individuais ou de regiões cromossômicas específicas.

2.5 Métodos de Coloração Citogenética em Dosimetria

O estudo de cromossomos humanos no estágio de metáfase do ciclo celular é geralmente realizado pela técnica de coloração convencional (Giemsa). Esta técnica cora o cromossomo como um todo, sem distinção de regiões cromossômicas (GUERRA e SOUZA, 2002). Este é também o método comumente empregado para a avaliação de aberrações cromossômicas instáveis (dicêntricos, anéis e fragmentos) em dosimetria citogenética (IAEA, 2001).

A Figura 9 mostra um exemplo de uma metáfase corada por Giemsa contendo cromossomos dicêntricos, cromossomo em anel e fragmentos acêntricos observados em um

linfócito irradiado. Particularmente, esta célula com múltiplas aberrações foi exposta a altas doses de radiação (IAEA, 2001).

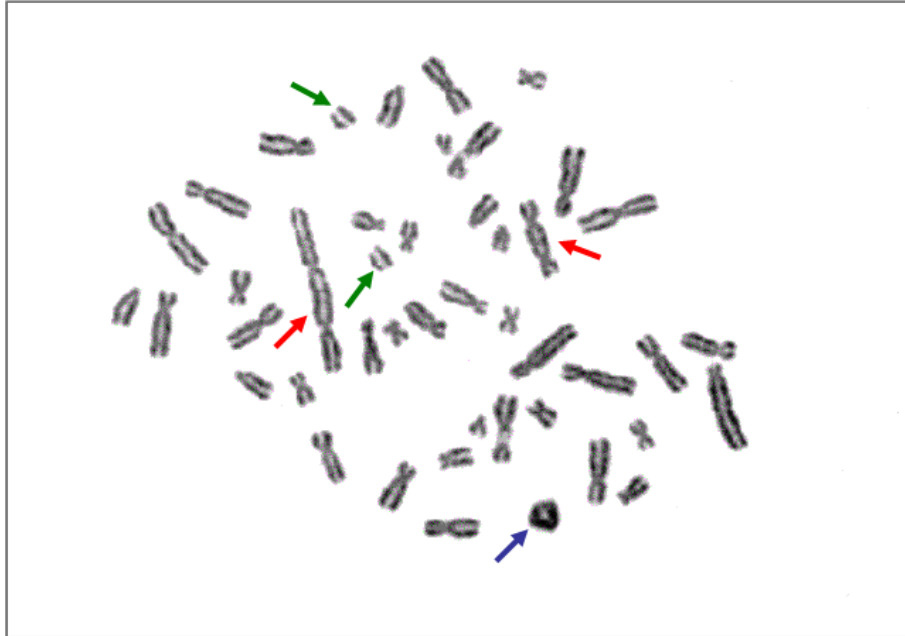


Figura 9 Metáfase de uma célula exposta à radiação ionizante corada por Giemsa, com dois dicêntricos (setas vermelhas), um anel (seta azul) e dois fragmentos acêntricos (setas verdes). Modificado de: (IAEA, 2001).

A partir de 1970, foram desenvolvidas métodos que permitem localizar a região de heterocromatina constitutiva de forma mais rápida e precisa, como a técnica de bandeamento C. Nesta técnica, as lâminas contendo preparações cromossômicas são imersas numa solução básica de hidróxido de bário e, em seguida, expostas à uma solução salina a temperatura elevada. Com esse procedimento, há o destaque da região de heterocromatina constitutiva após coloração com Giemsa, que em humanos está localizada nas região centromérica (SUMNER, 1972; GUERRA, 1988; GUERRA e SOUZA, 2002).

Isso sugere que esse método seja aplicado em dosimetria citogenética, por facilitar a identificação de cromossomos dicêntricos, em anel e fragmentos acêntricos com o destaque

da região centromérica pelas bandas C (PROSSER, 1975; PANTELIAS et al., 1993; FERNANDES et al., 2006; FERNANDES et al., 2008a).

A Figura 10 mostra um esquema do destaque da região centromérica de cromossomos da espécie humana após a realização da técnica de bandeamento C, onde é possível observar a presença de um cromossomo dicêntrico (seta azul) e um fragmento acêntrico (seta vermelha). Neste caso, o corante utilizado também é o Giemsa (FERNANDES et al., 2006).

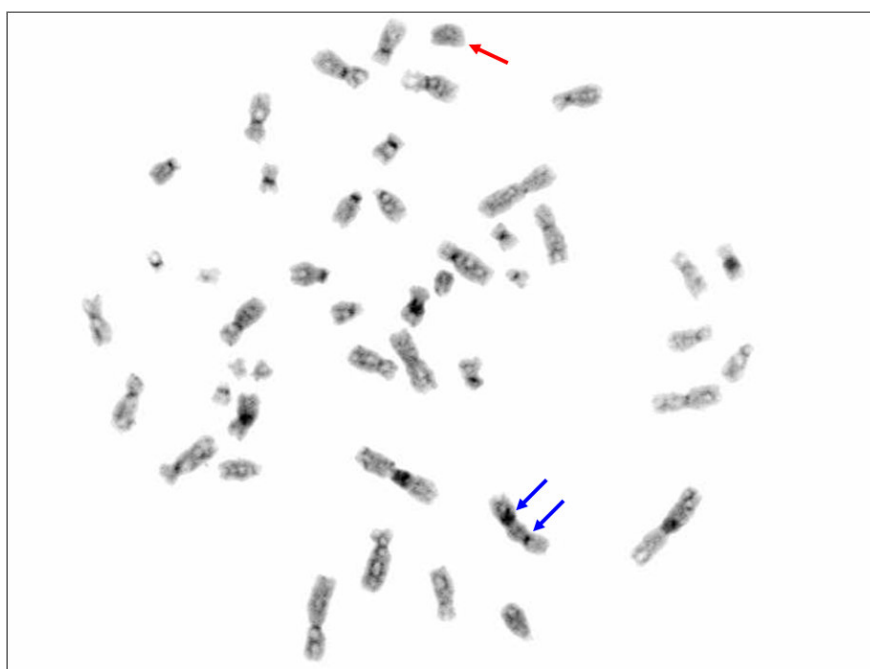


Figura 10 Bandeamento C de metáfase apresentando um dicêntrico (setas azuis indicando os dois centrômeros escuros) e um fragmento acêntrico associado (seta vermelha) (FERNANDES et al., 2006).

A possibilidade de realizar o bandeamento C em lâminas previamente coradas por Giemsa permite a re-análise de aberrações quando há incertezas na identificação, a exemplo de centrômeros muito próximos um do outro ou em posição terminal, ou quando a associação com fragmentos não é clara. Isso pode ser de valor em estudos dosimétricos de dano cromossômico em pessoas expostas ocupacionalmente às radiações ionizantes, onde

cada aberração observada carrega consigo uma larga proporção da dose estimativa, e na investigação do nível basal de aberrações em linfócitos (PROSSER, 1975; FERNANDES et al., 2006).

Com o advento da citogenética molecular, com a técnica de FISH (hibridização fluorescente *in situ*), tornou-se possível marcar os centrômeros de todos os cromossomos humanos, bem como cromossomos inteiros, com sondas de DNA marcadas a anticorpos associados a substâncias fluorescentes (PINKEL et al., 1986). Essa ferramenta facilitaria a identificação de aberrações tanto instáveis, quanto estáveis (e.g. translocações) (ROY et al., 1996). A Figura 11 apresenta um dicêntrico, um anel e dois fragmentos acêntricos (estes indicados pelas setas) evidenciados por FISH.

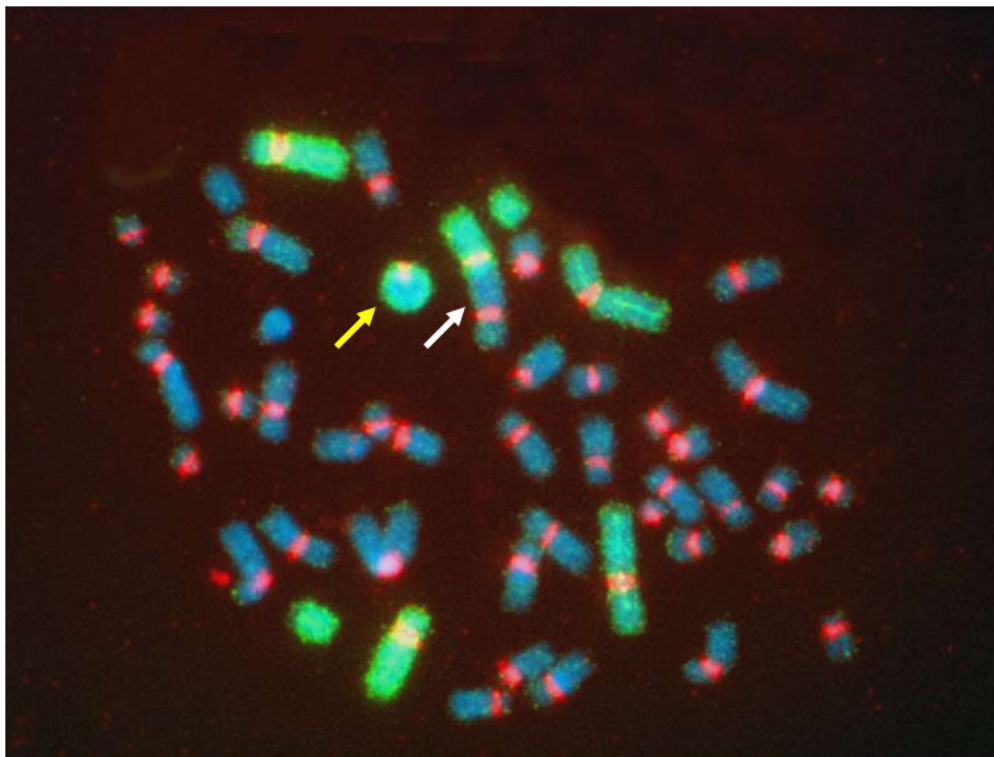


Figura 11 Presença de um dicêntrico (seta branca) e um anel (seta amarela) visualizados pela técnica de FISH, com destaque da região centromérica (em vermelho) e dos pares de cromossomos 2, 3 e 5 (em verde). Os demais cromossomos estão contracorados com DAPI (foto cedida por Dr. David Lloyd da HPA, Inglaterra).

A análise de translocações por meio da técnica de FISH criou novas perspectivas para a dosimetria citogenética, com a possibilidade de sua aplicação na estimação da dose recebida no passado (dosimetria retrospectiva), uma vez que as translocações persistem ao longo dos sucessivos ciclos de divisão celular, ao contrário das aberrações instáveis (RIBEIRO et al., 2003).

No intuito de assegurar que nenhum erro de classificação dos dicêntricos e translocações ocorra, a marcação de cromossomos específicos deve ser associada à marcação de todos os centrômeros. Com isso, um passo para a validação da técnica de FISH para propósitos de dosimetria citogenética tem sido a eficiência dessa técnica na identificação de cromossomos dicêntricos e em anel com o uso de sondas centroméricas (ROY et al., 1996). Deste modo, cromossomos dicêntricos podem ser distinguidos das translocações, uma vez que essa última não envolve a região centromérica, enquanto a primeira contém duas regiões destacadas pela fluorescência correspondentes aos centrômeros (SCHMID et al., 1992; KANDA e HAYATA, 1996; EDWARDS et al., 2005).

Com relação à estimação da dose absorvida por FISH, Finnon e colaboradores (1995) e Roy e colaboradores (1996) analisaram dicêntricos com o uso de sonda centromérica e encontraram uma boa concordância com curvas obtidas pelo método convencional (FINNON et al., 1995; ROY et al., 2006). No entanto, esses dados confrontam os resultados de Schmid e colaboradores (1992) e Tucker e colaboradores (1993), que encontraram mudanças significativas entre os métodos de FISH e o convencional em amostras irradiadas com doses superiores a 2 Gy (SCHMID et al., 1992; TUCKER et al., 1993).

Neste contexto, esta pesquisa objetivou avaliar parâmetros metodológicos da dosimetria citogenética, tal como o método de coloração citogenética (Giemsa, DAPI, bandeamento C e FISH) e o tempo de cultivo celular (48 e 72 horas), que muitas vezes variam entre diferentes laboratórios de biodosimetria. Desta forma, os resultados obtidos neste trabalho serão úteis em gerar novos protocolos de planejamento de escolha metodológica que seja mais adequado ao tipo de irradiação (parcial ou de corpo inteiro).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta das Amostras de Sangue Periférico

As amostras de sangue de apenas um doador saudável foram intencionalmente selecionadas no intuito de confirmar se a influência de tempos de cultura na estimação da dose em caso de exposição parcial, ou a possível interferência de métodos de coloração cromossômica, são fenômenos que existem “*per se*”, e não influenciados por variações entre diferentes indivíduos.

As amostras foram conduzidas com a aprovação do Comitê de Ética para Estudos Voluntários da RPD (Divisão de Proteção Radiológica) da HPA (Agência de Proteção à Saúde) do Reino Unido, e do Comitê de Ética em Pesquisas Clínicas de Oxfordshire (referência CO2.201). A coleta foi realizada com tubo vacutainer estéril contendo o anticoagulante heparina, conforme recomendado no manual da IAEA (2001).

3.2 Irradiação das Amostras

As amostras foram irradiadas nas instalações do MRC (Conselho de Pesquisa Clínica) do Campus de Harwell (Chilton, Oxfordshire, Inglaterra) conforme o protocolo de irradiação estabelecido pela HPA. Para as irradiações, foram utilizados raios-X provenientes de um acelerador linear da Siemens com taxa de dose de 0,715 Gy/min, 250 kVp e corrente de 14 mA, apresentado na Figura 12.

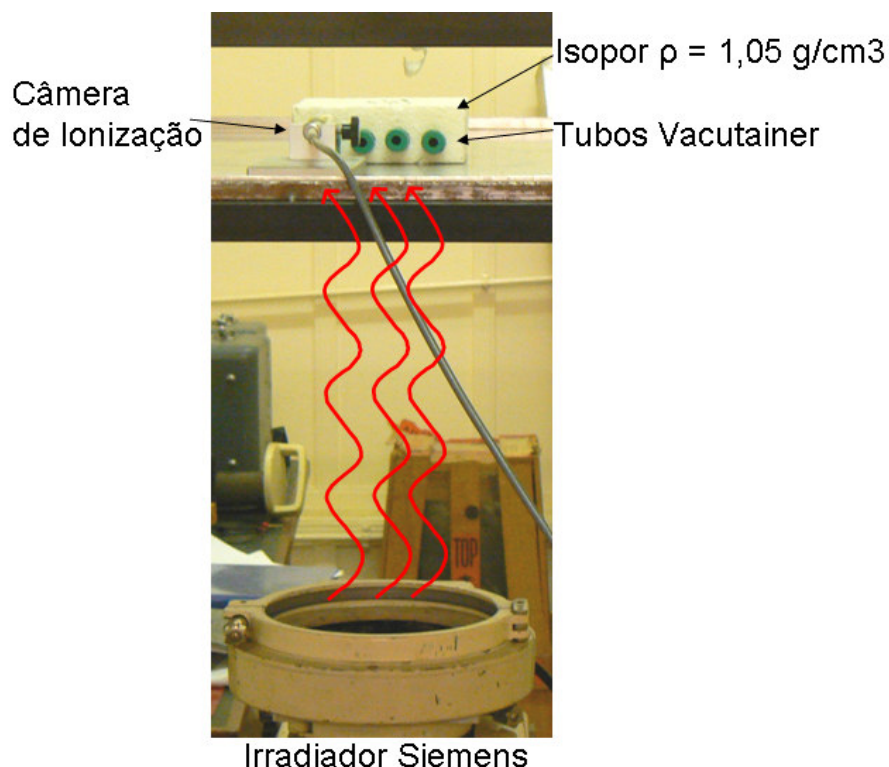


Figura 12 Irradiação das amostras com raios-X provenientes de acelerador linear Siemens.

Os tubos foram acondicionados num isopor de densidade similar ao tecido humano ($1,05 \text{ g/cm}^3$). A distância do irradiador até a linha mediana do interior do tubo vacutainer foi de 1 metro, sendo o campo de irradiação de dimensões $20 \times 20 \text{ cm}$ com os tubos ao centro desse campo para uma distribuição uniforme da dose absorvida.

A dosimetria foi realizada com uma câmera de ionização na mesma geometria das irradiações das amostras de sangue, ou seja, inserida também no material isopor. Essa câmera de ionização é regularmente calibrada na NPL (Laboratório Físico Nacional) do Reino Unido.

As doses de radiação foram: 1,5; 3,0 e 4,0 Gy. Antes e após a irradiação das amostras, as mesmas foram mantidas a 37°C com o auxílio de um bloco aquecedor. Após a irradiação, as amostras permaneceram neste bloco por 2 horas no intuito de permitir o

tempo fisiológico de reparo celular (GUMRICH et al., 1986; VIRSIK-PEUCKERT e HARDER, 1986; KANDA e HAYATA, 1996; ROY et al., 1996; IAEA, 2001).

A simulação da irradiação parcial foi realizada misturando 70 % da amostra irradiada com dose de 4 Gy com 30 % de uma amostra não irradiada, conforme o esquema da Figura 13.

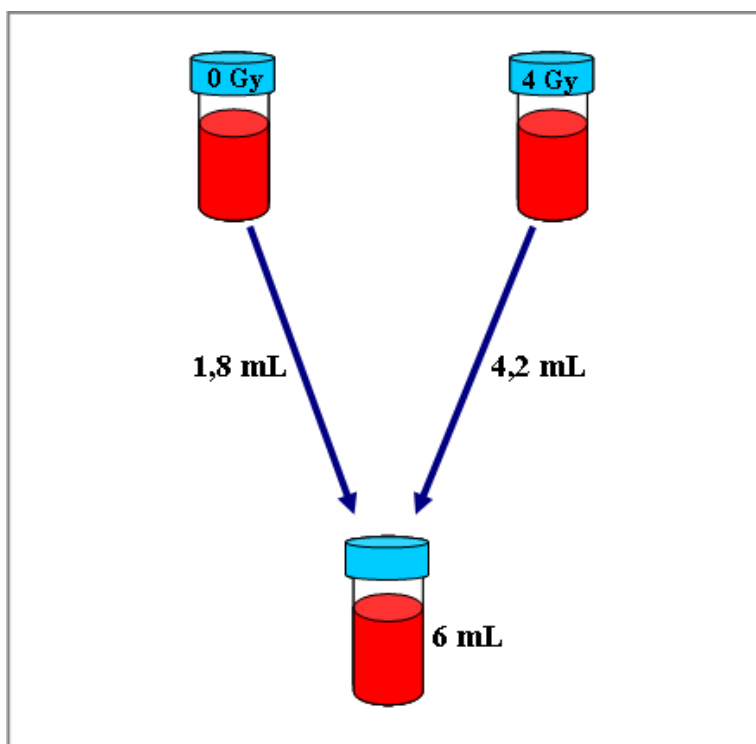


Figura 13 Esquema da simulação de irradiação parcial por meio da mistura das amostras (70% sangue irradiado mais 30% de sangue não irradiado).

3.3 Cultura de Linfócitos Humanos

As amostras de sangue irradiadas e não irradiadas foram conduzidas para o Laboratório de Citogenética da RPD/HPA. Para cada dose de radiação, foram realizados 6 (seis) tubos de cultivo celular. O meio de cultura utilizado foi o “Meio Essencial Mínimo”

(MEM) (Gibco, Reino Unido), contendo 1 mL de solução de antibiótico penicilina e estreptomicina (10.000 µg/mL cada) e 200 mM de L-glutamina.

Cada tubo consistiu em 4 mL de meio de cultura MEM, com 20 % (1 mL) de soro fetal bovino e 2 % (0,1 mL) de fitohemaglutinina para estimular a divisão celular (Gibco, EUA). Para a técnica de FPG, que permite a coloração diferencial das cromátides, foi adicionado 5-Bromo-2-dioxiuridina (BrdU) (Sigma, Reino Unido) numa concentração de 20 µM. Em seguida, foram adicionados 0,3 mL de sangue para todas as metodologias empregadas. Por fim, a solução de Colcemid (25 µg/mL) em 0,85 % de salina foi acrescida ao meio para a obtenção de células em metáfase (IAEA, 2001).

Para o experimento de simulação de irradiação parcial, os tempos de cultivo celular foram de 48 e 72 horas, com tempos de adição de Colcemid com 0, 24, 45 e 69 horas após incubação. Para o experimento de comparação dos métodos de coloração citogenética, as culturas foram de 48 horas e adição do Colcemid com 45 horas após a incubação.

3.3.1 Retirada da Cultura

As células foram suspensas em meio de cultura por agitação leve e depois transferidas para tubos de centrífuga. Em seguida, as mesmas foram centrifugadas a 300 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 6 mL de solução hipotônica de cloreto de potássio (KCl) 0,56%. Em seguida, os tubos foram mantidos por 7 minutos em estufa a 37 °C.

Decorrido esse tempo, centrifugou-se novamente as amostras a 300 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células foram suspensas em 6 mL de fixador (metanol:ácido acético 3:1), que foi adicionado lentamente com constante agitação para prevenir que as células formassem grumos.

Os tubos foram novamente centrifugados a 300 x g por 5 minutos e a etapa anterior com o fixador foi repetida mais duas vezes ou até o sedimento se tornar límpido (esbranquiçado), deixando cerca de 1 mL de fixador ao final.

3.4 Preparo das Lâminas

As lâminas foram preparadas conforme o protocolo descrito por Henegariu e colaboradores (2001), com modificações descritas a seguir.

As lâminas foram mantidas em banho-maria a 75 °C até formar uma camada uniforme de água sobre a superfície. Com uma pipeta automática, 25 à 35 µL da suspensão de células foram distribuídos em vários locais da superfície da lâmina. Após o fixador evaporar, a lâmina foi submetida ao vapor d'água por 1 à 3 segundos, e então posicionada sobre uma superfície metálica situada no topo do banho-maria, que gera um gradiente de temperatura que varia de 25 a 65 °C, conforme ilustrado na Figura 14.

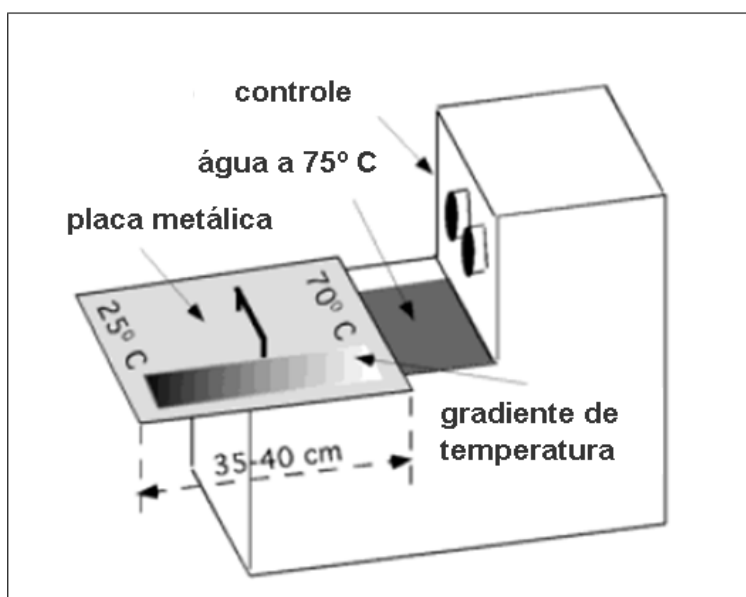


Figura 14 Esquema da preparação de lâmina por meio de gradiente de temperatura em banho-maria. Modificado de: (HENEGARIU et al., 2001).

3.4.1 Coloração das Lâminas

As lâminas foram envelhecidas por 2 horas em estufa a 60 °C e submetidas à técnica de Fluorescência mais Giemsa (FPG) de acordo com modificações da metodologia descrita por Perry e Wolff (1974), com modificações a seguir. As preparações cromossômicas foram incubadas com 2 a 3 gotas de 0,5 µg/mL de solução Hoechst 33258 (Sigma, Reino Unido) e submetidas a luz ultravioleta de comprimento de onda de 360 nm por 20 minutos em uma câmara escura. Para a análise citogenética convencional, foi utilizado o corante Giemsa a 5 % em tampão de pH 6,8 por a 3 minutos.

3.5 FISH (Hibridização Fluorescente *in situ*)

Algumas lâminas contendo preparações cromossômicas também foram submetidas à técnica de FISH, para estudo da região centromérica ou de cromossomos individuais. Para tanto, o protocolo utilizado teve por base duas publicações: Finnon e colaboradores (1995) e Hone e colaboradores (2005), com modificações descritas a seguir.

3.5.1 Hibridização

Lâminas envelhecidas foram imersas em solução fixadora (metanol:ácido acético 3:1) por 1 hora, seguida da desidratação por 2 minutos em cada uma das soluções de álcool (70, 90 e 100%). Em seguida, as mesmas foram imersas em acetona por 10 minutos.

3.5.2 Tratamento com RNAase – Proteinase

As preparações cromossômicas foram tratadas com 100 µL de RNAase (100 ng/µL) em solução salina citrato duas vezes concentrada (2x SSC), seguido da incubação em câmara úmida na estufa a 37 °C por 1 hora.

Em seguida, as lâminas foram lavadas com solução tampão salina fosfato (PBS) com pH 7,4 por 5 minutos e incubadas com pepsina a 37° C por 1 minuto. Iniciou-se em seguida uma série de lavagens com PBS, sendo 5 minutos em PBS, 5 minutos em solução de PBS acrescida de 50 mM MgCl₂ (cloreto de magnésio) e 5 minutos em solução de PBS com 50 mM MgCl₂ e formaldeído a 1 %. Por fim, foi realizada uma última lavagem com PBS pH 7,4 por 5 minutos e a desidratação novamente em soluções de álcool (70, 90 e 100 %).

3.5.3 Desnaturação das Preparações Cromossômicas

As preparações cromossômicas foram desnaturadas em formamida a 70 % a 70 °C por 2,5 minutos. Em seguida, as lâminas foram imediatamente imersas em etanol a 70 % a -20 °C por 2,5 minutos para impedir que houvesse a reassociação da dupla fita de DNA. As lâminas foram novamente desidratadas em soluções de álcool (70, 90 e 100%).

3.5.4 Preparação das Sondas de Hibridização- 1ª Hibridização

Foram utilizadas sondas WCP (sonda para cromossomo inteiro) para os cromossomos 2 e 3. A sonda WCP para cromossomo 2 tem como fluorocromo o isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Cambio, Inglaterra), que promove uma coloração verde, e a sonda para cromossomo 3 foi marcada com avidina Texas Red (Cambio, Inglaterra), que possui coloração vermelha. Estes pares de cromossomos são os mais comumente empregados em biodosimetria e foram selecionados pelo presente estudo no intuito de investigar a elevada condensação cromossômica induzida por ação do Colcemid.

Para cada 4 µL de sonda WCP, foram adicionados 11 µL de solução tampão e 1 µL de DNA Genômico Humano Sonicado (em microtubo – Eppendorff). Essa solução denominada de “mix” (que consiste em sonda de DNA + solução tampão + DNA Genômico) foi desnaturada a 70 °C por 10 minutos e em seguida mantida por 60 minutos em banho-maria a 37 °C para permitir a reassociação da dupla fita de DNA. Decorrido este

tempo (que deve ser sincronizado com a desnaturação da preparação cromossômica), foram aplicados 20 µL do 'mix' sobre as lâminas contendo as preparações cromossômicas, que foram incubadas por 72 horas a 42 °C em câmara úmida e escura para permitir a hibridização.

3.5.5 Preparação da Sonda Centromérica - 2ª Hibridização

Os centrômeros de todos os cromossomos humanos foram marcados para o experimento referente à comparação dos métodos de coloração na identificação de cromossomos dicêntricos. As etapas prévias são as mesmas descritas nos tópicos **3.4.1**, **3.4.2**, **3.4.3**. Para a marcação dos centrômeros humanos, as sondas centroméricas conjugadas ao fluorocromo avidina Texas Red (Cambio, Inglaterra) foram pré-aquecidas por 5 minutos a 42 °C. Foram utilizados 25µL da sonda por lâmina. As sondas foram desnaturadas a 85 °C por 10 minutos e imediatamente colocadas em gelo, para evitar a reassociação do DNA. A sonda centromérica foi aplicada sobre as lâminas contendo as preparações cromossômicas e incubadas em câmara úmida a 42 °C por 12 horas.

3.5.6 Detecção Imunológica

Tendo transcorrido o período de hibridização, as lâminas foram lavadas em solução de 2x SSC por mais 5 minutos e em solução 4x SSC/0,05% Tween 20 (solução de lavagem). Em seguida, foi dado início a uma série de incubações com anticorpos fluorescentes e lavagens, etapa esta conhecida por detecção imunológica. Esta etapa pode ser sumariamente descrita como a seguir.

A primeira incubação foi com 50 µL de avidina texas red (para cromossomo 3 ou os centrômeros de todos os cromossomos, a depender do experimento). Em seguida, as lâminas foram incubadas com 35 µL de anti-avidina biotilada e com 35 µL de anti-FITC (F1). Por fim, incubou-se com 35 µL de avidina texas red e anti coelho Ig (F2). Para a realização de marcação da região centromérica, exclui-se a etapa do FITC, F1 e F2. Entre

cada uma das etapas de incubação com os anticorpos, as lâminas foram imersas em solução de lavagem por 4 minutos. Essas etapas foram repetidas mais uma vez para intensificação dos sinais.

A Figura 15 apresenta cada uma dessas etapas de detecção imunológica de forma diagramática, visando facilitar a visualização das incubações com anticorpos simbolizados com as cores referentes aos sinais fluorescentes (Texas Red – vermelho; FITC – verde).

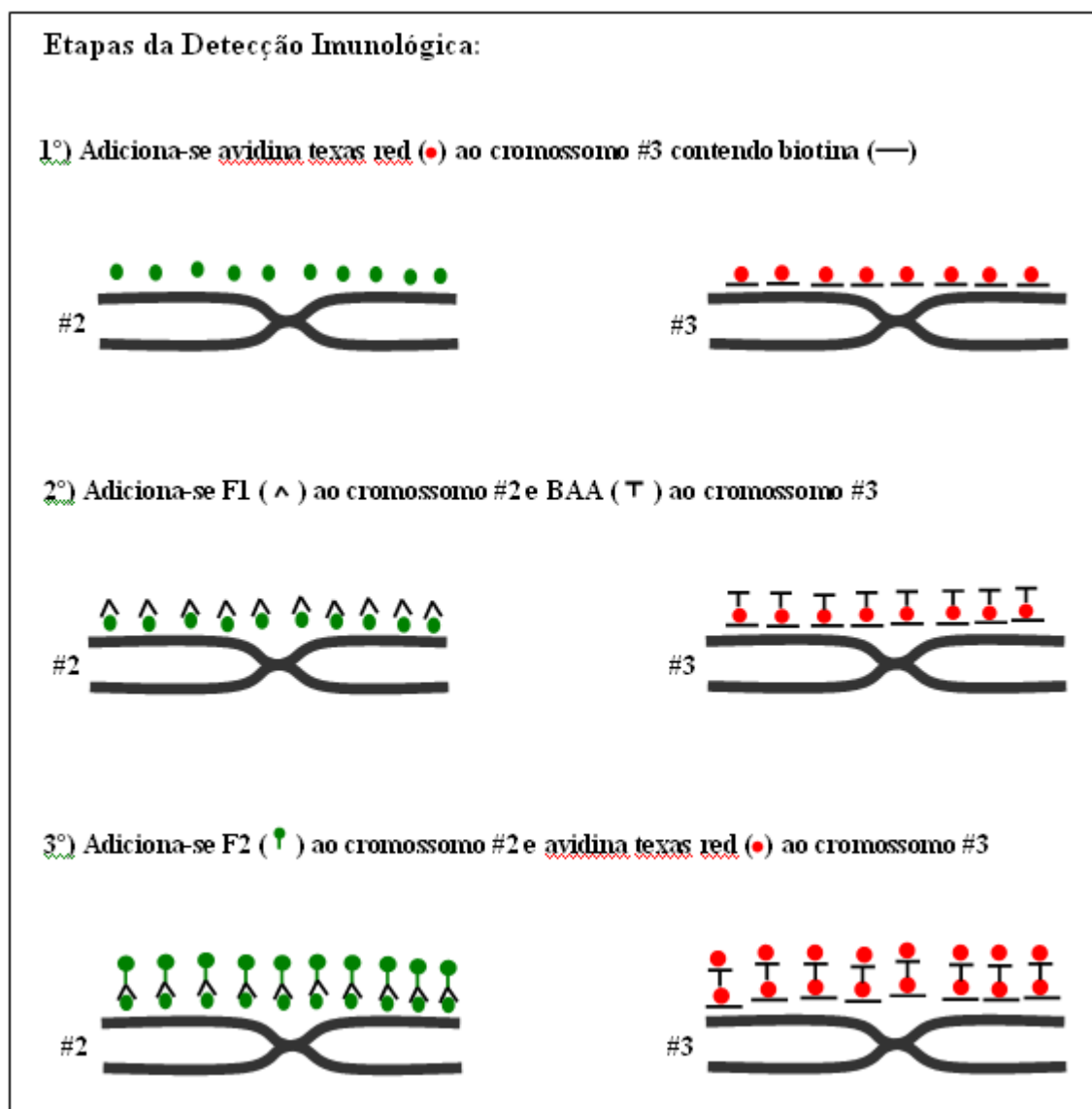


Figura 15 Esquema das etapas da detecção imunológica de sondas de FISH para o cromossomo #2 marcado com FITC e para o cromossomo #3 marcado com biotina.

Após a detecção imunológica, as lâminas foram desidratadas em soluções de álcool (70, 90 e 100%) e montadas com 27 μL de 200 ng/mL de DAPI em 500 μL 'Vectashield antifade mountant'.

A medição dos cromossomos 2 e 3 normais e altamente condensados por ação prolongada do Colcemid, bem como a análise da região centromérica, foi realizada utilizando o programa Isis (Metasystems GmbH, Altussheim, Alemanha).

3.6 Técnica de bandeamento C

A técnica de bandeamento C foi realizada a partir de modificações do protocolo de tratamento com hidróxido de bário, modificado de Sumner (1972) e Guerra e Souza (2002). A Figura 16 apresenta um diagrama do efeito da técnica em destacar a região de heterocromatina.

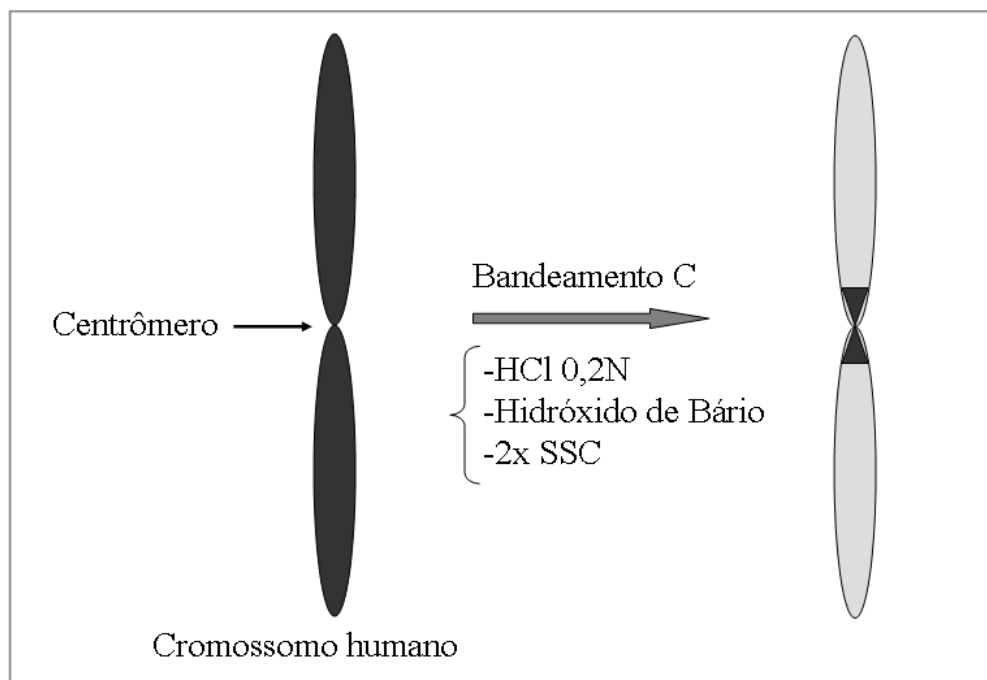


Figura 16 Esquema do bandeamento C de um cromossomo humano, com o destaque da região centromérica.

O procedimento consiste em submeter os cromossomos à hidrólise com ácido clorídrico (HCl) 0,2 N por 30 minutos à temperatura ambiente. A hidrólise foi interrompida imergindo a lâmina três ou quatro vezes em água destilada.

Em seguida, as lâminas foram incubadas em solução aquosa filtrada de $\text{Ba(OH)}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (hidróxido de bário) a 5 %, preparada em água aquecida à temperatura de 60 °C. A depender do tempo de envelhecimento da lâmina, variou-se o tempo de incubação em hidróxido de bário, de 5 segundos – para lâminas recentes – e 1 minuto – para lâminas envelhecidas a 3 dias. A ação do hidróxido de bário foi interrompida após lavar a lâmina em banhos rápidos de HCl (0,2 N) e água destilada, dois minutos em cada.

A etapa seguinte foi a incubação durante 45 minutos em 2x SSC a 60 °C. Após a incubação, as lâminas foram lavadas com água destilada e, depois de secas, foram coradas durante 5 a 10 minutos em solução de Giemsa a 5 % em tampão de pH 6,8.

3.7 Análise e Armazenamento das Lâminas

As análises citogenéticas foram realizadas ao microscópio óptico (Nikon), utilizando a objetiva de aumento de 20X para a localização da metáfase e a de imersão (100X) para a análise e contagem dos cromossomos e aberrações cromossômicas, conforme já descrito na literatura especializada (MAGNATA et al., 2002; SILVA-BARBOSA et al., 2005; FERNANDES et al., 2006). Foram utilizados sistemas eletrônicos para o armazenamento dos dados por meio da captura de imagens das metáfases analisadas, utilizando o programa Isis (Metasystems GmbH, Altlussheim, Alemanha).

As análises das seqüências detectadas por FISH foram efetuadas em microscópio de fluorescência (Nikon) com filtros adequados para DAPI, FITC e Texas Red. Durante a análise, apenas foram incluídas na contagem as metáfases que continham 46 cromossomos (metáfases normais) e os dicêntricos associados a fragmentos acêntricos, somando ao final 46 ‘objetos’ (contando o dicêntrico mais o fragmento).

No caso de cromossomos em anel, deve haver associação também com o fragmento acêntrico em metáfases contendo 47 ‘objetos’ (somando o anel mais o fragmento). Os fragmentos e os anéis acêntricos foram observados em metáfases contendo 47 objetos (fragmento ou anel acêntrico extra). Metáfases contendo mais de 47 ‘objetos’ foram contabilizadas caso fosse devido a um excesso de fragmentos acêntricos. Outros tipos de observações (e.g. trocas de cromátides irmãs, cromossomos trirradiais, endoreduplicação), foram anotados numa coluna a parte.

Na comparação do tempo de cultura e adição do Colcemid, a contagem de dicêntricos seguiu o protocolo descrito por Lloyd e colaboradores (2000) para simulações de exposições acidentais e parciais, de 30 dicêntricos ou 50 metáfases por método. Este tamanho da amostra (n), para efeitos práticos, permite uma boa aproximação para realização dos testes estatísticos (COSTA, 2005).

Para o experimento de comparação dos métodos de coloração citogenética (Giemsa, Bandeamento C, DAPI e FISH), foram contadas 600 metáfases para a dose de 1,5 Gy e 160 metáfases para a dose de 3,0 Gy, totalizando 3.040 metáfases analisadas. Foram contabilizados cerca de 100 dicêntricos por cada método de coloração citogenética, para verificar se há diferenças significativas entre os métodos de coloração citogenética.

3.8 Estimativas da Dose Absorvida

As frequências de cromossomos dicêntricos obtidas foram utilizadas para estimar a dose absorvida com base na curva de dose *versus* resposta biológica obtida no mesmo Laboratório de Citogenética da RPD (HPA, Inglaterra), a partir das irradiações de amostras de sangue *in vitro* com doses conhecidas de raios-X. A equação que descreve essa curva é mostrada abaixo:

$$Y = 0,0005(\pm 0,005) + 0,046(\pm 0,005)D + 0,065(\pm 0,003)D^2 \quad (9)$$

Onde **Y** é a frequência de dicêntricos e **D** é a dose em grays (Gy). No experimento que simulou uma irradiação parcial, o método padrão considerou a estimação da dose de corpo inteiro sem correção para a fração do corpo irradiada (dose esperada de 3,3 Gy). Já o volume do corpo irradiado (70 %) foi considerado para estimar a dose para a fração irradiada (dose esperada de 4 Gy). Esses dois métodos consideraram o conhecimento prévio da fração do corpo irradiada (**F**) para a correção da frequência de dicêntricos (**Y_f**), conforme a Equação 10.

$$Y = Y_f \times F \quad (10)$$

Onde **Y** é a frequência de aberrações no sangue periférico, **Y_f**, frequência de aberrações no volume irradiado e **F** é o percentual ‘conhecido’ do volume do corpo irradiado.

Para a estimação da dose parcial do corpo, os métodos matemáticos de CP e Qdr foram empregados conforme foram descritos no tópico **2.2.3** deste trabalho, e utilizando o software da MLPOL da Agência de Proteção à Saúde (HPA) (www.hpa.org.uk).

O teste-u e a relação da variância/média foram calculados no intuito de verificar se as frequências de dicêntricos obtidas seguem uma distribuição de Poisson (**ANEXO 1**) ou uma distribuição dispersa (EDWARDS et al., 1979; 2007). Para irradiações de corpo inteiro, a distribuição segue uma Poisson, enquanto em irradiações parciais do corpo, há dispersão dos dados (IAEA, 2001).

O teste do Chi quadrado foi usado pra checar a homogeneidade dos dados para cada dose, e o teste t foi aplicado para analisar se as diferenças entre os valores das frequências de aberrações cromossômicas ou dos comprimentos dos cromossomos foram estatisticamente significativas para cada método investigado.

A análise da variância (ANOVA) foi realizada para comparar as diferenças entre os métodos de coloração citogenética para cada dose de radiação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Adequação do Tempo de Cultura e de Adição do Colcemid para Avaliação de Irradiação Parcial

A Figura 17 apresenta a cinética das freqüências de dicêntricos em diferentes tempos de culturas (48 e 72 horas) e em momentos distintos de adição do Colcemid (0, 24, 45 e 69 horas). É possível observar um aumento significativo do número de células em M1 contendo dicêntricos quando a cultura é prolongada de 48 para 72 horas, independentemente do tempo de adição do Colcemid. O uso prévio de Colcemid (0 e 24 horas) garantiu que as células permanecessem em M1. Em contrapartida, quando o Colcemid foi adicionado 3 horas antes do término da cultura (45 e 69 horas), foram encontradas células pós-M1 (M2, M3 e M4).

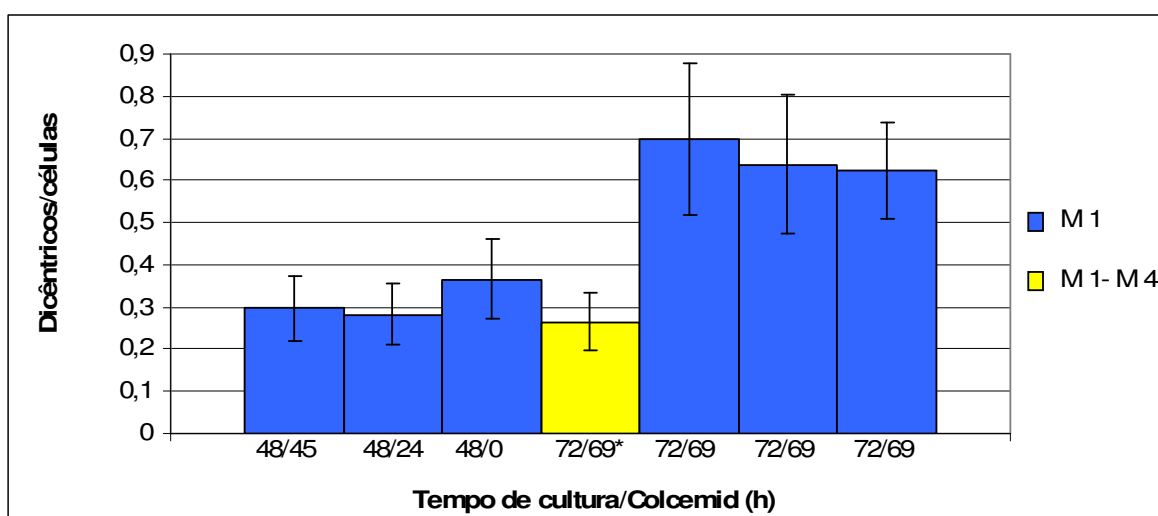


Figura 17 Freqüências $\pm$ EP (erro padrão) de dicêntricos encontrados em linfócitos em função do tempo de cultura.

Quando a transmissibilidade dos dicêntricos foi estudada, percebeu-se uma redução de 50% das frequências de dicêntricos a cada ciclo de divisão celular (de M1 a M3) ($p < 0,05$). A Figura 18 apresenta graficamente, em forma de barras, esse declínio dos dicêntricos ao longo das sucessivas divisões celulares.

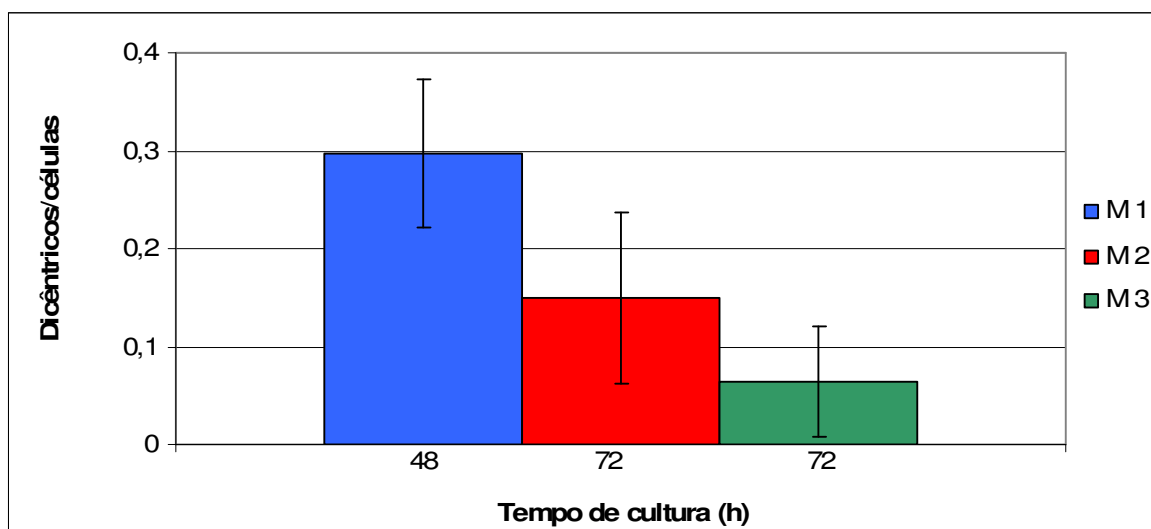


Figura 18 Cinética dos dicêntricos (Frequências $\pm$ erro padrão) encontrados em linfócitos em M1 (48 horas), e em M2 e M3 (72 horas).

Estes resultados estão em concordância com estudos prévios encontrados na literatura que demonstram uma redução em 50% das frequências de dicêntricos a cada ciclo de divisão celular. Nestes trabalhos, sugere-se que, para altas doses de radiação (iguais ou superiores a 4 Gy), as células contêm em média 1 dicêntrico e 1 fragmento acêntrico em excesso (além do fragmento associado ao dicêntrico) (CARRANO e HEDDLE, 1973; BRASELMANN et al., 1986 apud PALA et al., 2001).

A Figura 19 apresenta algumas imagens obtidas nesta pesquisa, que evidenciam a herança dos dicêntricos e fragmentos acêntricos por células que passaram por mais de um ciclo de divisão celular. Isso é possível por meio da técnica de FPG, que permite a identificação de células em M2 e M3, como apresentadas na figura.

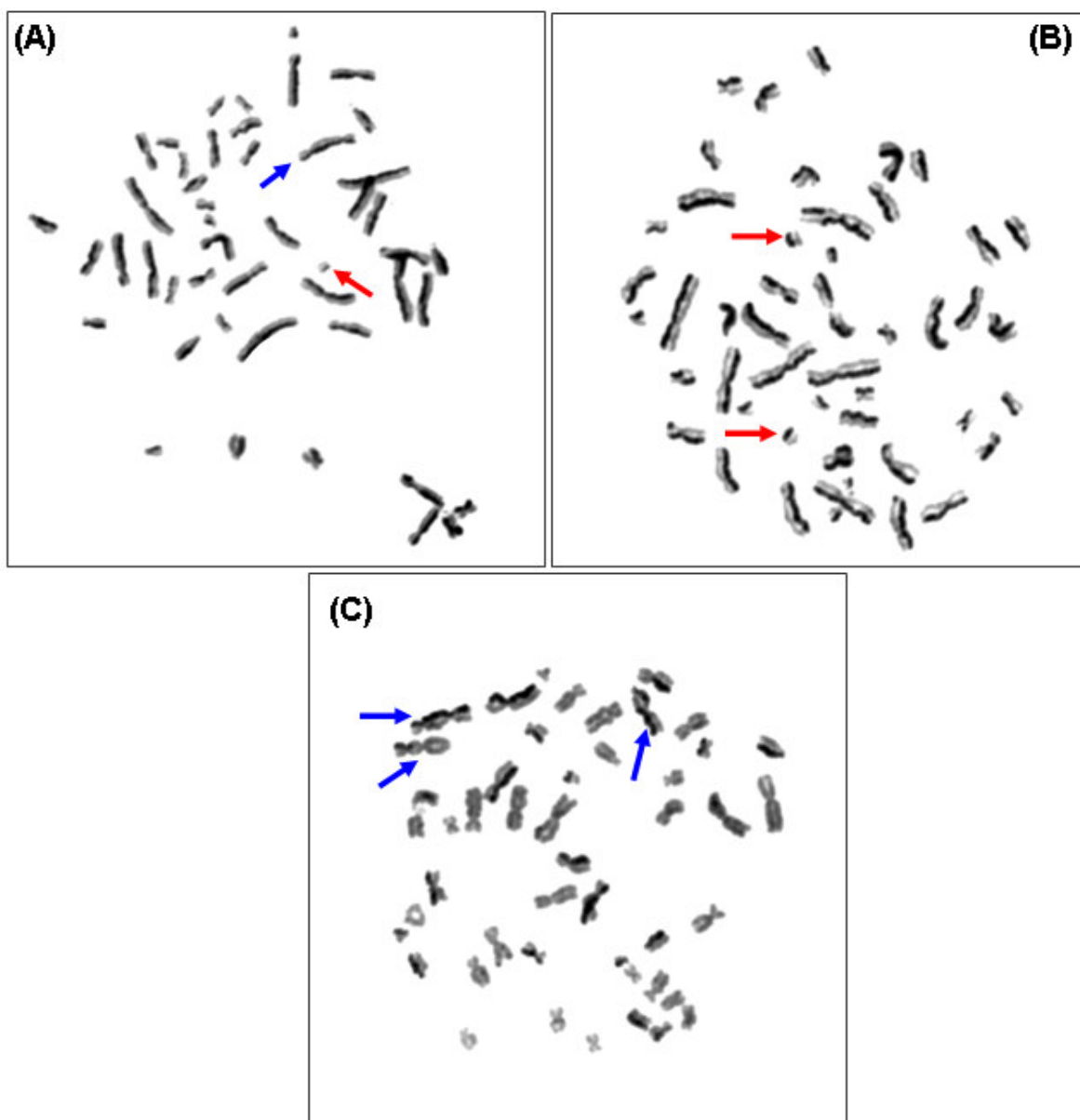


Figura 19 Metáfase contendo dicêntrico (seta azul) e fragmento acêntrico (seta vermelha) em M2 (A), fragmentos replicados (setas vermelhas) em M2 (B), e três dicêntricos (setas azuis) em M3 (C).

Em dosimetria citogenética, as células em M2 como as apresentadas na Figura 19 não devem ser contabilizadas, uma vez que “apenas” células em M1 (i.e. com as duas cromátides escuras) são representativas da dose. Essa contaminação da amostra com células pós-M1 em culturas prolongadas foi a maior limitação desse método. Além do tempo extra

envolvido com a realização da técnica de FPG, a procura de células em M1 tornou a análise mais laboriosa.

No intuito de evitar este surgimento de células pós-M1 em culturas prolongadas, o Colcemid, substância responsável pelo bloqueio em metáfase, foi adicionado no momento da incubação da cultura (0 horas) e com 24 horas após o início da cultura. Esse método garantiu que o grande percentual de células permanece em M1, de forma similar às culturas de 48 horas.

Quando as frequências de aberrações cromossômicas obtidas em culturas de 72 horas foram comparadas àquelas obtidas em culturas de 48 horas, considerando agora apenas células em primeira divisão mitótica (M1), foi observado que as frequências de dicêntricos neste caso aumentaram 50% com o prolongamento do tempo de cultivo celular ($p < 0,05$). Este dado está de acordo com os resultados obtidos por Hone e colaboradores (2005), que demonstraram que as frequências de dicêntricos em células em M1 permanecem constantes até 51 horas e depois aumentam 50% após 60 horas.

Por outro lado, ao desconsiderar o número de ciclos celulares, não foi observada nenhuma alteração significativa das frequências de dicêntricos entre os tempos de cultura de 48 e 72 horas ($p > 0,05$). Isto sugere que a redução de 50% das frequências de dicêntricos de M1 para M2, é contrabalanceada pelo aumento de dicêntricos em M1, ambos em culturas de 72 horas. Esses resultados confirmam os achados de Boei e colaboradores (1996) e Hone e colaboradores (2005), mas contrariam as observações de Buckton e Pike (1964), Guerrero-Carbajal e colaboradores (1998) e Hoffmann e colaboradores (2002), que verificaram uma diminuição das frequências de dicêntricos quando o número de ciclos celulares não é levado em consideração.

Estes resultados estão apresentados em forma de gráficos em barras na Figura 20, onde a diminuição, constância e aumento das frequências de dicêntricos de 48 para 72 horas dependem da consideração do número de ciclos celulares pelos quais os linfócitos passaram.

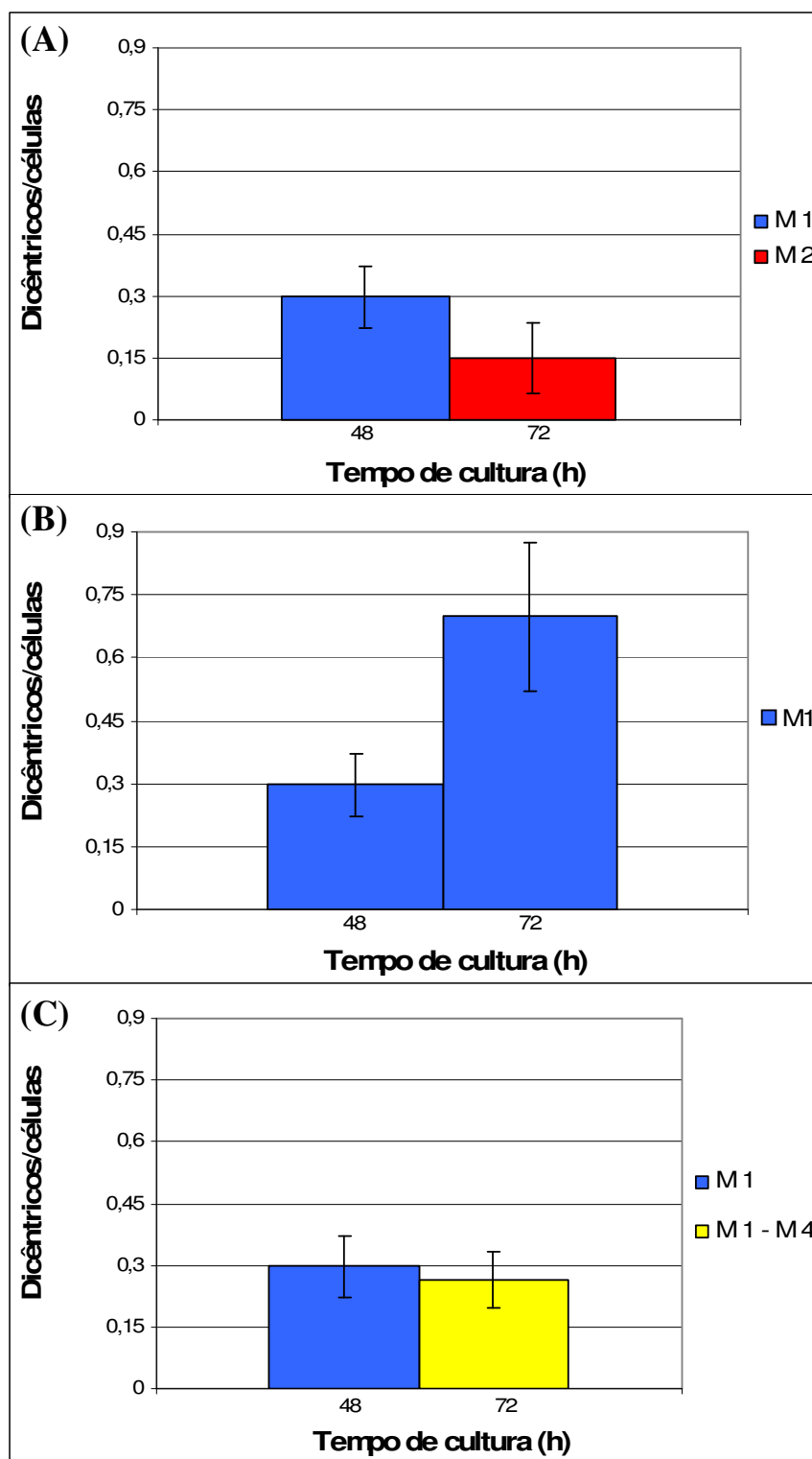


Figura 20 Cinética de dicêntricos. **(A)** Redução por um fator de 2 entre células em M1 e M2; **(B)** Aumento por um fator de 2 em células M1 entre os tempos de 48 e 72 h; **(C)** Constância das frequências quando não se considera o número de ciclos celulares em 72 h.

Neste contexto, os resultados obtidos nesta pesquisa são consistentes em mostrar que a frequência de aberrações cromossômicas radioinduzidas, quando apenas células em M1 são contabilizadas, aumenta com o tempo após estimulação com PHA. Embora esse mecanismo não esteja totalmente esclarecido, os dados indicam que nem todas as células em M1 são equivalentes como bioindicadores de exposição às radiações ionizantes (HONE et al., 2005).

Algumas das hipóteses levantadas pela literatura que buscam explicar o aumento das frequências de aberrações cromossômicas em células em M1 com o prolongamento do tempo de cultura, são:

1. As células irradiadas crescem mais lentamente devido a um atraso mitótico, com a parada do ciclo celular nos ponto de checagem (checkpoints) de dano do DNA (HONE et al., 2005).
2. As células irradiadas respondem mais lentamente ao estímulo com o mitógeno fitohemaglutinina (PHA) (HOFFMANN et al., 2002).
3. Os linfócitos B seriam estimulados pelos linfócitos T responsivos à fitohemaglutinina (PHA), após transcorrido um certo tempo de cultivo celular. Com isso, aberrações cromossômicas induzidas em linfócitos B seriam detectadas em culturas prolongadas (HAN e DADAY, 1978; PIQUET e VASSALLI, 1972 apud HONE et al., 2005).
4. Dentre as subpopulações de linfócitos T, os que expressam o antígeno CD4 (chamado linfócito T “auxiliar”) se dividiriam mais lentamente em cultura, e os mesmos seriam detectados apenas em culturas mais longas, acima de 60 horas (WUTTKE et al., 1993; HONE et al., 2005).

A Tabela 1 apresenta as frequências e distribuições de aberrações cromossômicas em diferentes tempos de cultivo celular e de adição do Colcemid. O cálculo da variância/média (Var/μ) e o valor do teste-u indicam que a maioria dos dados de aberrações cromossômicas por células está dispersa, confirmando que a exposição foi parcial (ver sobre dispersão de dados no **ANEXO 1**).

A Tabela 2 mostra as estimativas de dose obtidas para cada tempo de cultivo celular com base na curva de calibração de raios-X para a produção de dicêntricos, considerando o corpo inteiro, a fração do corpo irradiada e os métodos de correção matemática CP e Qdr, para correção da frequência de dicêntricos (Y) e cálculo da dose em situações envolvendo irradiações parciais.

Tendo em vista que o prolongamento do tempo de cultivo celular de 48 para 72 horas levou a um aumento das frequências de dicêntricos em linfócitos em M1 (conforme apresentadas na Tabela 1), isso refletiu de forma significativa nas estimativas de dose absorvida considerando a dose de corpo inteiro (3,3 Gy) apresentadas na Tabela 2 (coluna 3). Estes dados estão de acordo com a pesquisa de Heirmers e colaboradores (2006), que também simulou *in vitro* uma irradiação parcial e observaram um aumento do surgimento de células em M1 irradiadas contendo dicêntricos e conseqüentemente da dose absorvida em culturas prolongadas.

Ainda na Tabela 2, considerando que há o conhecimento prévio da fração irradiada do corpo (coluna 4), as doses estimadas em culturas de 72 horas se aproximaram do valor real da dose para esta fração (4 Gy). Já as doses estimadas pelo método matemático Qdr não seguiram essa conformidade, sendo as melhores estimativas obtidas tanto em culturas de 48 quanto de 72 horas. No entanto, pelo método CP (coluna 8), mais uma vez as melhores estimativas de dose foram obtidas em culturas em culturas de 72 horas. Outra importância do método CP é a estimativa da fração do corpo irradiada (**F**), que produziu as melhores estimativas em culturas de 48 horas.

Tabela 1 Distribuição de aberrações cromossômicas instáveis em exposições parciais de amostras de sangue com 70 % irradiado com 4 Gy, contabilizando 30 dicêntricos em 'x' número de células em M1.

							Distribuição						
Tempo de cultura (h)	Tempo de Colcemid (h)	Células	AC	FA	Dic	Freq±EP	D0	D1	D2	D3	D4	Var/μ	Teste-u
48	45	101	1	10	30	0,297±0,076	77	19	4	1	0	1,180	1,300
	24	106	3	31	30	0,283±0,073	85	15	4	1	1	1,600	4,410
	0	82	2	34	30	0,366±0,094	60	16	4	2	0	1,320	2,050
72	69*	113	3	18	30	0,265±0,067	94	11	6	1	1	1,750	5,710
	69	43	2	14	30	0,698±0,178	25	9	7	1	1	1,400	1,870
	24	47	1	18	30	0,638±0,164	27	14	2	4	0	1,320	1,580
	0	48	1	10	30	0,625±0,114	28	12	6	2	0	1,200	0,986

* Células em M1, M2, M3 e M4.

AC = Anéis Cêntricos.

FA = Fragmentos acêntricos.

Dic = Dicêntricos.

Freq±EP = Frequência de dicêntricos e Erro Padrão.

Var/μ = Variância pela média.

D0, D1, D2, D3 e D4 = Número de células com 0, 1, 2, 3 e 4 dicêntricos, respectivamente.

Tabela 2 Estimativa da dose absorvida conhecendo-se a fração irradiada (70 %) e usando os métodos Qdr e CP.

		Dose Esperada = 3,3 Gy	Dose Esperada = 4 Gy			
Tempo (h)		Método Padrão	Fração Irradiada (70 %)		Qdr	CP
Cultura	Colcemid	Dose (Gy)	Dose (Gy)	F (%)	Dose (Gy)	Dose (Gy) F (%)
48	45	1,81	2,34	42	3,59	2,31 79,3
	24	1,76	2,28	40	4,22	3,04 62,1
	0	2,04	2,64	52	3,98	2,80 76,3
72	69*	1,69	2,20	38	4,53	3,53 54,1
	69	2,94	3,77	93	4,61	4,02 82,3
	24	2,80	3,58	91	4,18	3,29 89,0
	0	2,76	3,54	89	4,18	3,29 88,2

* Células em M1, M2, M3 e M4.

EP = Erro Padrão.

F (%) = Fração Irradiada.

Sabe-se que a informação da coluna 4 da Tabela 2, referente ao conhecimento prévio da fração do corpo irradiada, não é geralmente evidente em situações práticas (e.g. Goiânia e Chernobyl), quando há ausência da dosimetria física e de informações seguras acerca do volume do corpo irradiado (LLOYD, 1998).

Em uma situação prática, o emprego do método CP (coluna 8 da Tabela 2), permitiria estimar a real fração do corpo irradiada (**F**), em culturas de 48 horas. Essa informação pode ser de vital importância em situações reais envolvendo irradiações parciais, principalmente porque permitiria à equipe médica identificar os indivíduos acometidos com maior extensão do corpo irradiada. Caso essa metodologia tivesse sido aplicada no acidente de Chernobyl, por exemplo, teria evitado que muitas das vítimas viessem a óbito por reação “*enxerto versus hospedeiro*”, devido à recuperação da medula óssea da “suposta” vítima do acidente radiológico (LLOYD, 1998).

Este trabalho demonstra que seria possível utilizar a dosimetria citogenética para fornecer informações mais seguras a respeito de exposições não uniformes do corpo (irradiações parciais), ao invés de se limitar à estimação da dose em caso de exposição de corpo inteiro. Os métodos descritos aqui são capazes de promover maiores informações à equipe médica a respeito dos riscos dos indivíduos irradiados a altas doses virem a manifestar efeitos determinísticos, auxiliando-a no planejamento do tratamento daqueles que podem sofrer da depleção da própria medula óssea (LLOYD et al., 1991).

Vale ressaltar que a identificação de exposições parciais pode ter certas limitações práticas a depender do percentual do corpo irradiado. Não há estudos contundentes que demonstrem ainda sua aplicabilidade em se tratando de regiões irradiadas muito pequenas, a exemplo do relato da exposição excessiva das mãos de um médico traumatologista apresentando radiodermite nas mãos, cujo percentual é indetectável por dosimetria citogenética (FERNANDES et al., 2006). Sendo assim, mais estudos *in vivo* subsequentes são necessários para melhor compreender e confirmar os dados verificados *in vitro*, pois os

primeiros levarão em consideração outros fatores como a recirculação dos linfócitos pelo corpo humano.

Por fim, os dados obtidos pelo trabalho em apreço induzem a idéia de que, em casos de exposições parciais, o valor da dose de corpo inteiro poderia ser corrigido experimentalmente sem a necessidade de correção matemática pelo método CP e Qdr. A base para esse argumento seria que o prolongamento do tempo de cultura permitiria detectar a fração de células que pertencem à região do corpo irradiada e que crescem mais lentamente em cultura, incluindo “naturalmente” fatores como morte celular (apoptose) e atraso mitótico.

Com isso, o prolongamento do tempo de cultura seria, de fato, um passo importante na obtenção de melhores estimativas da dose por dosimetria citogenética em casos de irradiações parciais, independentemente das curvas dose-efeito terem sido calibradas para culturas de 48 horas. Sugere-se que este artifício metodológico seja adotado por laboratórios designados a realizar a dosimetria citogenética, e envolvidos com a proteção radiológica ao nível regional ou nacional.

Atualmente, nos Estados Unidos, há um interesse crescente por novos métodos de identificação de exposições humanas parciais às radiações ionizantes, por parte do Instituto de Pesquisas em Radiobiologia das Forças Armadas. O intuito é gerar protocolos de planejamento visando a radioproteção da população americana, fornecendo assistência médica e laboratórios especializados na identificação e tratamento de possíveis indivíduos expostos às radiações ionizantes (PRASANNA et al., 2005).

Neste contexto, a atual pesquisa propõe com base nos resultados obtidos um protocolo de dosimetria citogenética para caso real ou de suspeita de exposição não uniforme ou parcial do corpo, que é apresentado esquematicamente na Figura 21. A comparação de culturas de 48 e 72 horas, juntamente com os resultados dos métodos Qdr e CP, auxiliariam nas estimativas de dose em situações envolvendo este cenário.

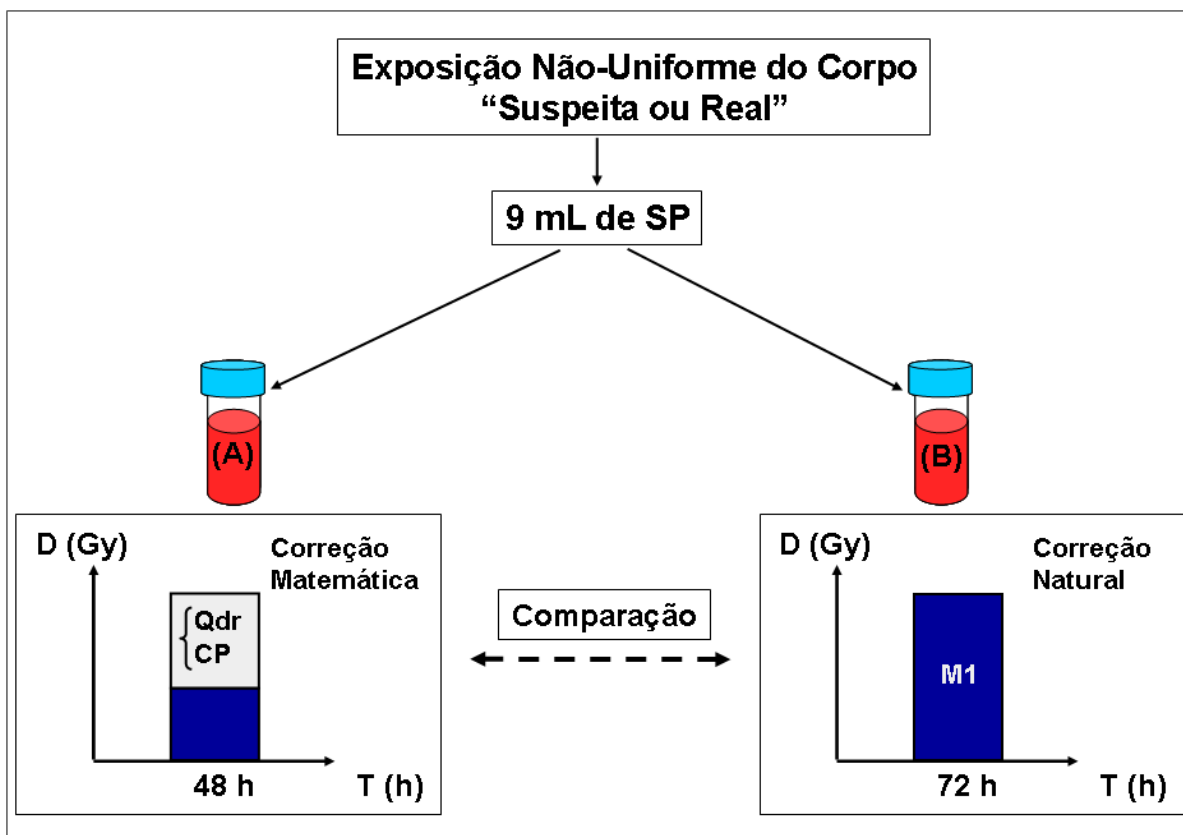


Figura 21 Planejamento da dosimetria citogenética em caso de irradiação parcial. (A) Tubo destinado à cultura de 48 h e cálculo da dose com correção matemática pelos métodos CP e Qdr. (B) Método alternativo de cultura de 72 h, sem a necessidade de correção matemática.

Em contrapartida, um fenômeno indesejado de elevada condensação cromossômica foi observado em culturas com tempo prolongado de ação do Colcemid para garantir uma maior proporção de células em M1. Este efeito pode dificultar as análises citogenéticas em biodosimetria, especialmente nas análises por FISH, que utilizam usualmente a marcação dos cromossomos 2 e 3 na avaliação retrospectiva da dose (EDWARDS et al., 2005).

Foi relatado também um caso raro de endoreduplicação, provavelmente induzido pela exposição à radiação ionizante ou por ação prolongada da substância Colcemid. Esses resultados são apresentados e discutidos no tópico a seguir.

4.2 Influência do Tempo de Adição do Colcemid na Qualidade da Preparação Cromossômica

Os cromossomos humanos estão naturalmente condensados no estágio de metáfase do ciclo celular (GERRA e SOUZA, 2002). No entanto, a adição prévia de Colcemid pode induzir a uma condensação excessiva dos cromossomos, tornando a análise mais difícil particularmente pelo FISH (IAEA, 2001).

Na atual pesquisa, esse fenômeno foi investigado por meio da medição dos cromossomos 2 e 3 submetidos à técnica de FISH, comparando os comprimentos obtidos em culturas convencionais com tempo de adição do Colcemid de 3 horas antes do término da cultura celular, e com a adição dessa substância no momento da cultura e 24 horas após a incubação.

A Figura 22 mostra os pares de cromossomos 2 (verde) e 3 (vermelho), evidenciados pela técnica de FISH, que ora apresentam-se alongados quando Colcemid é adicionado com 3 horas antes do final da cultura celular (**A** e **C**), ou altamente condensados quando Colcemid é adicionado 24 h após incubação (**B** e **D**). Esse fenômeno pode tornar a análise dos cromossomos em metáfase mais duvidosa, especialmente para o profissional com pouca experiência em análises citogenéticas, e nas análises de FISH dos cromossomos 2 e 3 comumente marcados em biodosimetria.

Esse fenômeno de excessiva condensação cromossômica foi observado nestes casos particulares, e a medição dos pares de cromossomos 2 e 3 foi realizado através de ferramentas computacionais, usando o programa Isis (Metasystems GmbH, Altlussheim, Alemanha). Os cromossomos 2 e 3 foram escolhidos uma vez que são estes os mais comumente avaliados em dosimetria citogenética retrospectiva que faz uso da técnica de FISH para análise de translocações cromossômicas, e que as relaciona com as doses recebidas no passado (EDWARDS et al., 2005). A condensação desses cromossomos pode

resultar numa dificuldade na identificação de aberrações cromossômicas tanto instáveis quanto estáveis.

A distribuição dos comprimentos dos pares de cromossomos 2 (2a e 2b) e 3 (3a e 3b) são apresentadas em forma de gráficos na Figura 23, e os valores médios dos comprimentos desses pares em 50 metáfases são apresentados na Tabela 3. A diferença dos comprimentos dos cromossomos 2 e 3 foram estatisticamente diferentes entre os tempos de adição do Colcemid de 69 e 24 horas ($p < 0,05$).

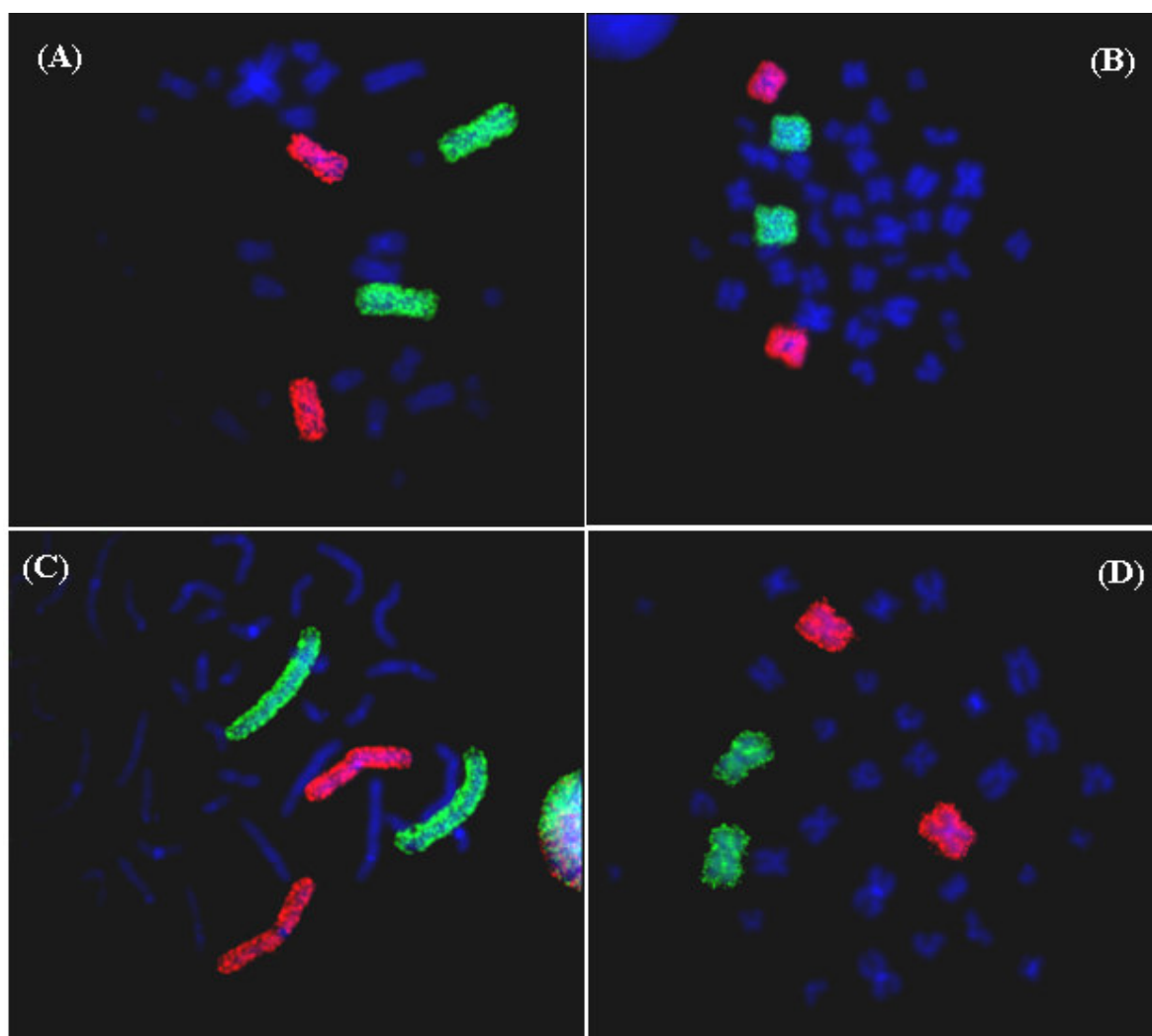


Figura 22 Condensação cromossômica elevada (B e D) induzida pelo tempo de tratamento com Colcemid, para os cromossomos 2 (verde - FITC) e 3 (vermelho – Texas Red).

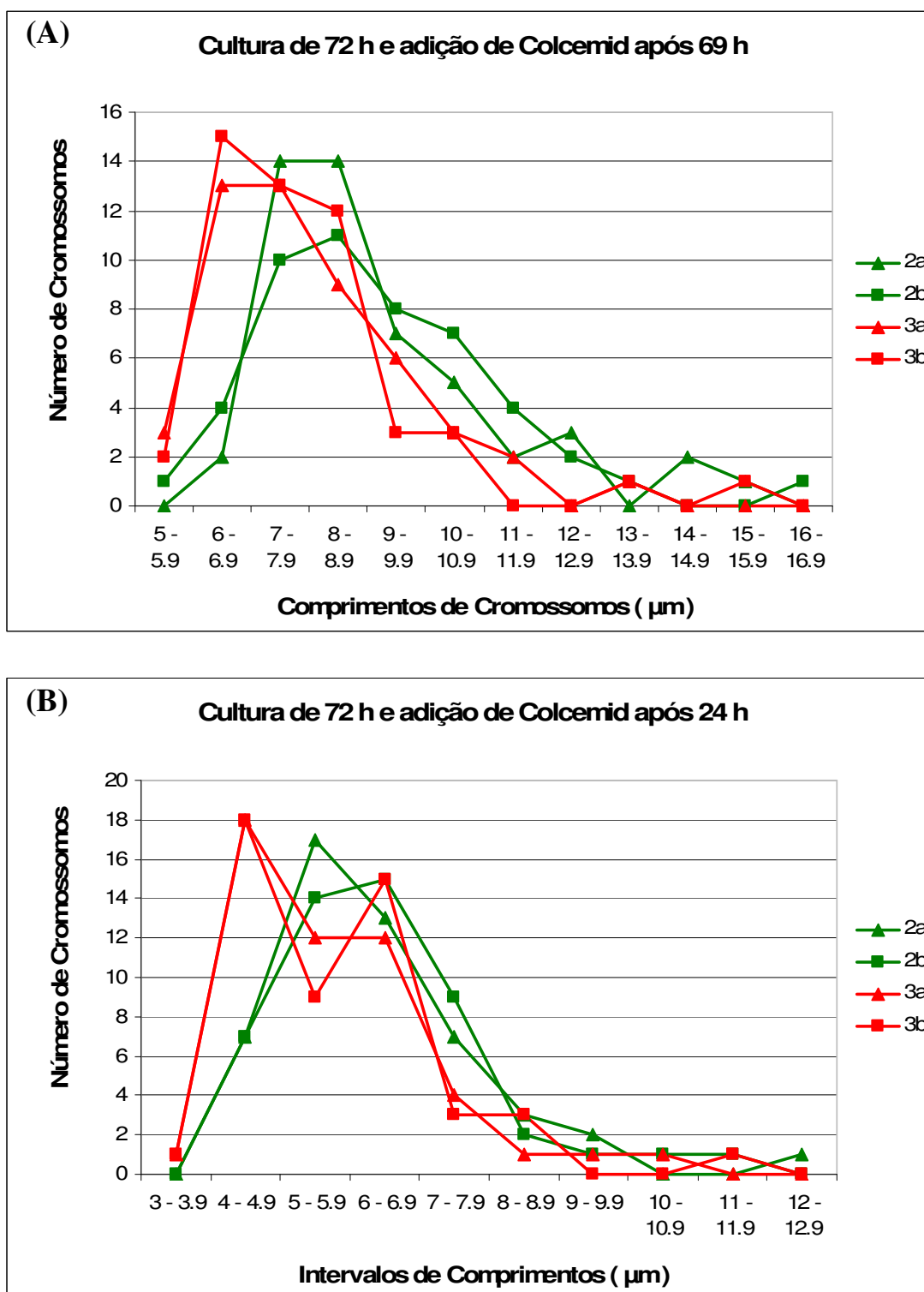


Figura 23 Distribuição dos comprimentos dos pares de cromossomos 2 e 3 em culturas de 72 h com adição de Colcemid após 69 e 24 h de incubação.

Tabela 3 Valores da média dos pares de cromossomos 2 e 3 em 50 metáfases culturas de 72 h e adição de Colcemid após 69 e 24 h de incubação.

Cultura/tempo de Colcemid (h)	Funções	Comprimento dos cromossomos (μm)					
		2a	2b	μ	3a	3b	μ
T 72/69	μ	9,10	9,29	9,20	7,93	7,88	7,90
	σ	2,10	2,23	2,12	1,68	1,82	1,70
	EP	0,30	0,32	0,30	0,24	0,26	0,24
T 72/24	μ	6,33	6,38	6,35	5,78	5,81	5,80
	σ	1,52	1,50	1,47	1,39	1,40	1,37
	EP	0,21	0,21	0,21	0,20	0,20	0,19

μ = Média

σ = Desvio Padrão.

EP = Erro Padrão.

Alguns autores referem-se à possível relação entre a concentração de Colcemid e a contração cromossômica. A concentração utilizada nesta pesquisa foi de 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Sasaki e colaboradores (1989), por sua vez, utilizaram Colcemid em uma concentração de 0,05 $\mu\text{g/mL}$ após 24 horas de incubação, ou seja, dez vezes inferior a que foi utilizada pelo presente trabalho.

No trabalho de Hayata e colaboradores (1992), o Colcemid foi adicionado no momento da incubação numa concentração final de 0,043 $\mu\text{g/mL}$ e os autores não fazem alusão quanto ao fenômeno de excessiva condensação dos cromossomos humanos, nem mesmo tal efeito é observado nas imagens de metáfases que foram publicadas (dado não mostrado).

Segundo Kanda e colaboradores, concentrações de Colcemid superiores a 0,05 $\mu\text{g/mL}$ são inapropriadas para um tratamento contínuo com Colcemid, uma vez que esse fator interfere na condensação dos cromossomos e conseqüentemente pode vir a dificultar as análises de aberrações cromossômicas (KANDA et al., 1994).

Há evidências de que mesmo a adição de Colcemid em concentrações muito baixas, de 0,03 $\mu\text{g/mL}$ por Schmid e colaboradores (1995) e de 0,02 $\mu\text{g/mL}$ por Senthamizhchelvan e colaboradores (2007), adicionadas em cultura de 24 horas de incubação, já é eficiente em interromper as células em metáfase. Isto favorece a idéia de reduzir a concentração dessa droga e alongar o seu tempo de ação. Nesta concentração, não foi relatada uma condensação excessiva dos cromossomos e o espalhamento das metáfases foi adequado para a identificação de dicêntricos.

Portanto, é importante procurar uma janela de concentração que seja baixa o suficiente para evitar o fenômeno de contração, mas alta o suficiente para evitar que as células passem por mais de um ciclo de divisão celular. Essa possibilidade requer maiores investigações e pode vir a ser útil como perspectiva para estudos futuros.

Uma última hipótese para essa condensação cromossômica excessiva induzida pelo Colcemid, além da concentração e do tempo de adição da droga, é que esse efeito estaria relacionado ao estágio do ciclo celular no momento em que o Colcemid é adicionado. No tempo de 3 horas antes do término da incubação, a maioria das células encontra-se em G2, já tendo passado pela fase “S” de replicação do DNA. No entanto, quando o Colcemid é adicionado com 24 horas, as células podem estar ainda em G0 ou G1. Essa falta de sincronização das células durante o ciclo celular explicaria porque, numa mesma lâmina, foram observadas metáfases com cromossomos alongados e metáfases vizinhas com cromossomos excessivamente condensados.

Outro fenômeno observado em uma célula irradiada com a dose de 4 Gy de raios-X e cultivada por 72 horas, adicionando Colcemid com 24 horas, foi um caso raro de endoreduplicação dos cromossomos, incluindo a presença de cromossomo dicêntrico (seta em azul) e fragmentos acêntricos (setas vermelhas), apresentado na Figura 24.

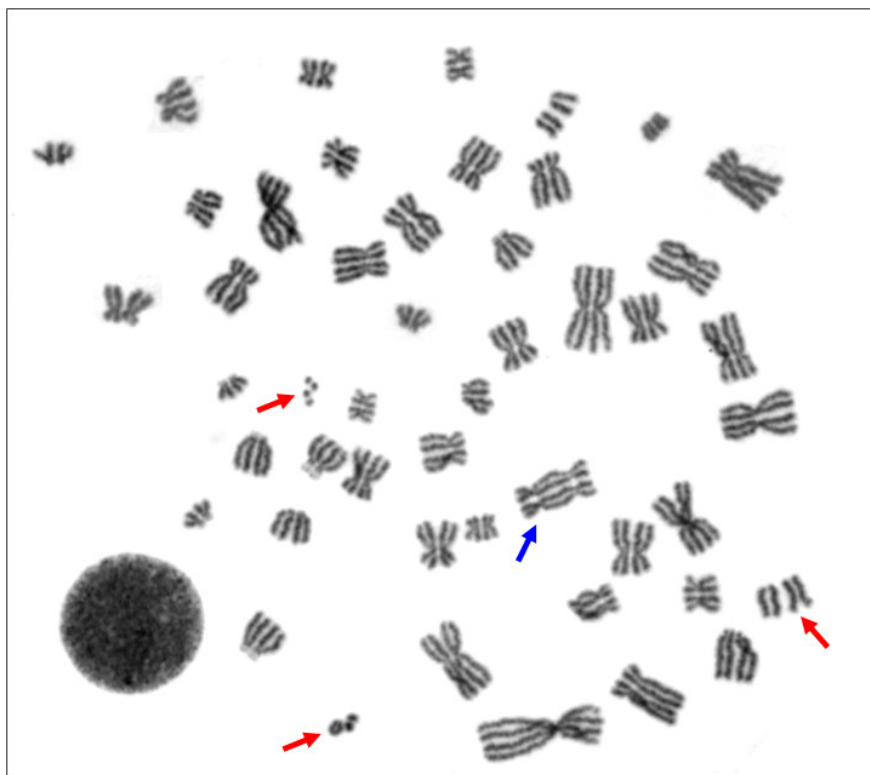


Figura 24 Cromossomos endoreduplicados em metáfase. Presença de cromossomo dicêntrico (seta azul) e fragmentos acêntricos (setas vermelhas).

A endoreduplicação ocorre quando uma célula inicia o ciclo celular, saindo da fase G₀, passando pela fase G₁, “S” (de duplicação do DNA) e G₂, iniciando a prometáfase, e depois descondensando os cromossomos novamente, reiniciando o ciclo sem que a célula se divida. Sendo assim, a célula inicia novamente o ciclo, passando pela fase “S” novamente, quadruplicando o conteúdo de DNA, passando a ter quatro cromátides ao invés de duas (GUERRA, 1988). Nessa pesquisa, sugere-se que esse fenômeno tenha ocorrido como decorrência da dose de radiação, ou do estímulo com fitohemaglutinina e do tempo prolongado de Colcemid.

4.3 Adequação do Método de Coloração em Dosimetria Citogenética

A Figura 25 ilustra como a evidência da região centromérica pelo método de FISH (A e B) e em outra metáfase pelo método de bandeamento C (C e D), pode auxiliar na identificação de dicêntricos. Os centrômeros justapostos são na maioria das vezes indistinguíveis, mas quando a mesma metáfase é analisada com os centrômeros evidenciados por FISH ou bandeamento C, a presença de dicêntrico é inquestionável.

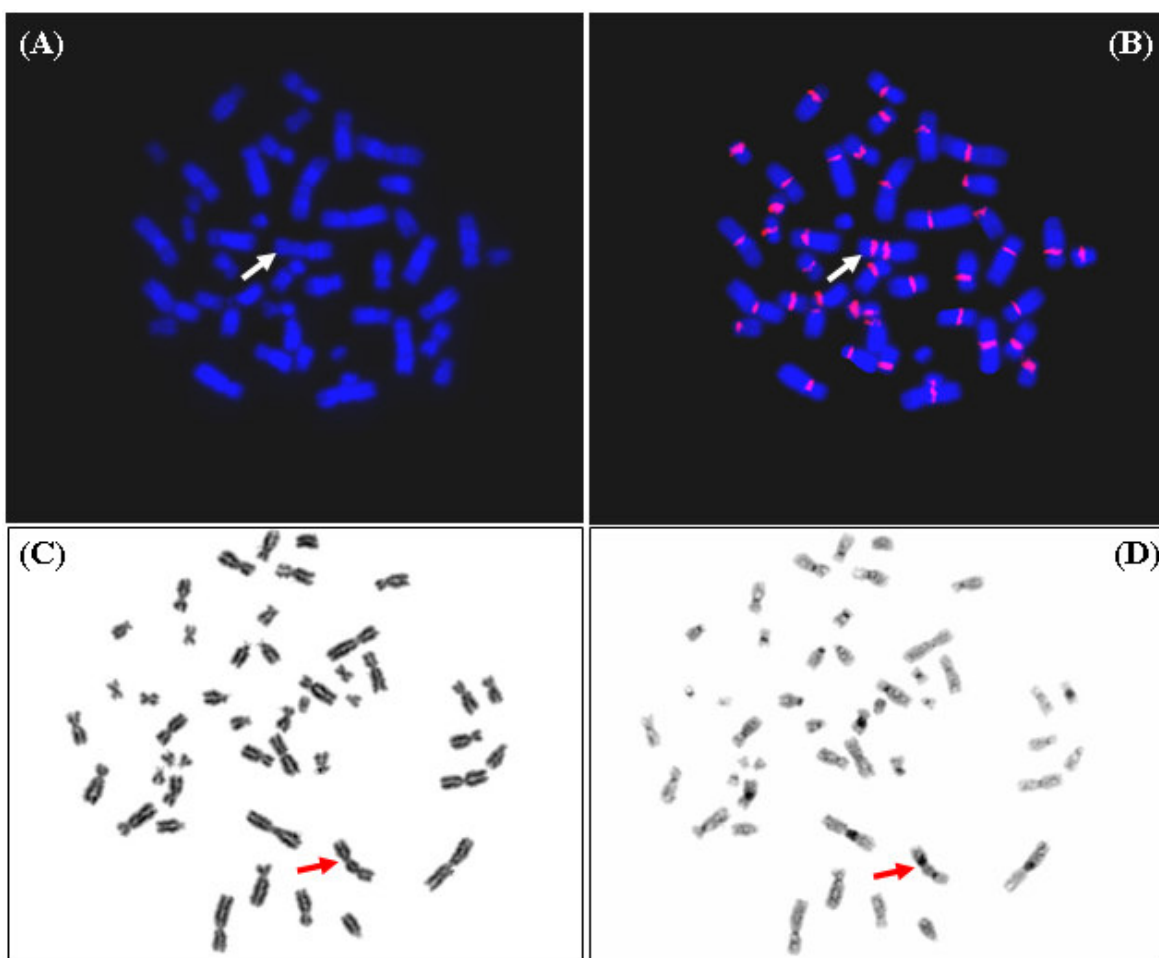


Figura 25 Confirmação de dicêntricos por técnicas que evidenciam os centrômeros. (A) Uma metáfase contendo um possível dicêntrico (seta) observado por coloração DAPI e (B) sua confirmação por FISH. (C) Outra metáfase contendo uma suspeita de dicêntrico (seta) analisado por Giemsa e (D) sua confirmação por bandeamento C.

A Figura 26 mostra outra situação, onde dois cromossomos, um (A) em uma metáfase corada por DAPI, e outra (C) corada com Giemsa, aparentam ter dois centrômeros. Esse tipo de confusão ocorre, principalmente, por iniciantes menos experientes durante o treinamento em citogenética, e envolve na maioria das vezes os cromossomos normais do Grupo B. Quando as metáfases foram re-analisadas por FISH (B) e bandeamento C (D), respectivamente, não houve dúvidas de que os cromossomos eram monocêntricos.

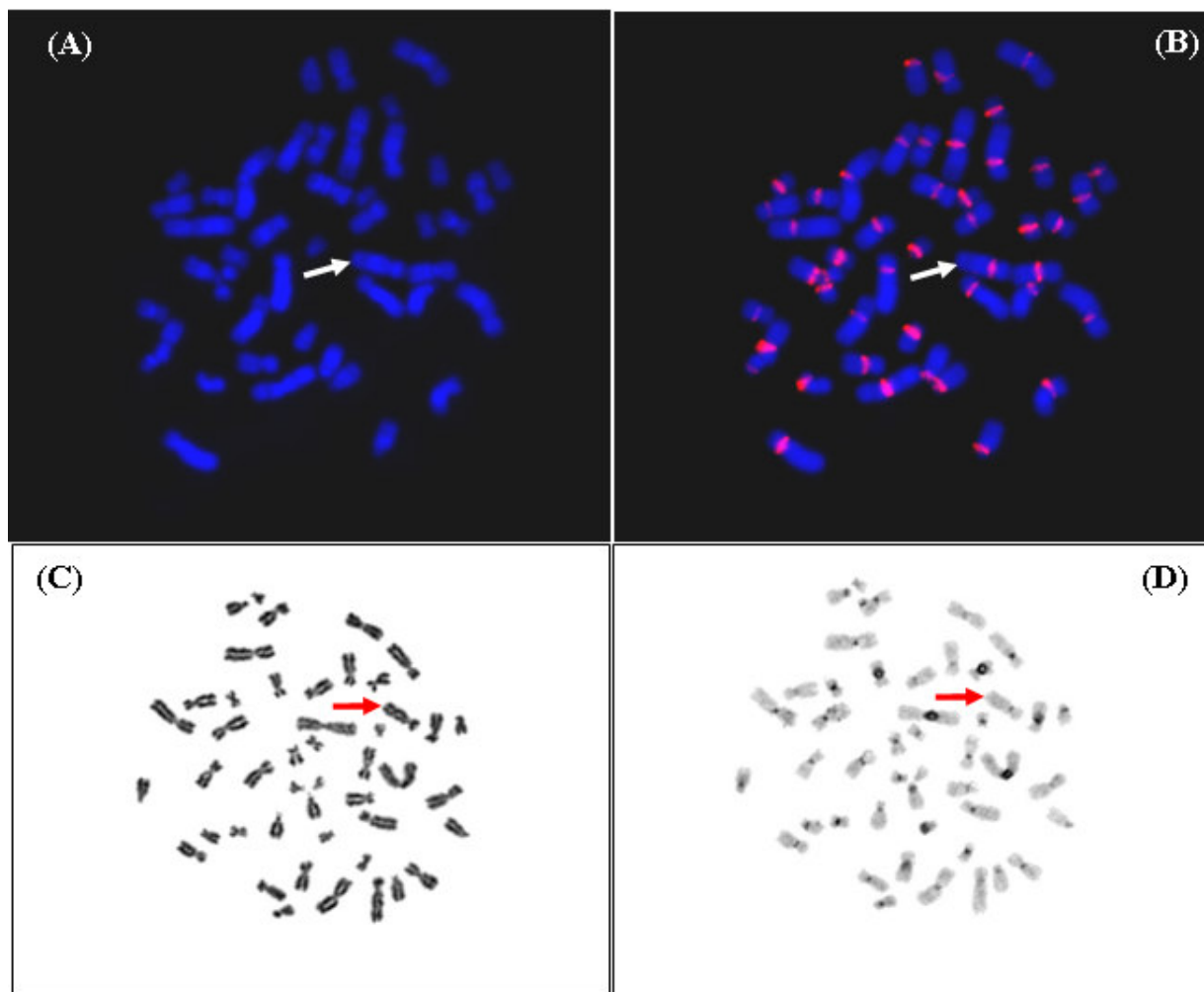


Figura 26 Confirmação de cromossomos monocêntricos. (A) Uma metáfase contendo um possível dicêntrico (seta) observado por DAPI e (B) sua confirmação como monocêntrico com FISH. (C) Outra metáfase contendo um dicêntrico suspeito (seta) analisado por Giemsa e (D) sua confirmação como monocêntrico com bandeamento C.

A Figura 27, por sua vez, ilustra dois cromossomos com as extremidades alinhadas e observados por DAPI (A) que podem ser confundidos com dicêntricos quando analisados diretamente por FISH (B). Em (C), observa-se cromossomos acrocêntricos próximos uns dos outros, e com associação da região satélite (D) dando o falso aspecto de dicêntrico quando analisados por bandeamento C. Esses casos foram denominados de “falso-positivos”.

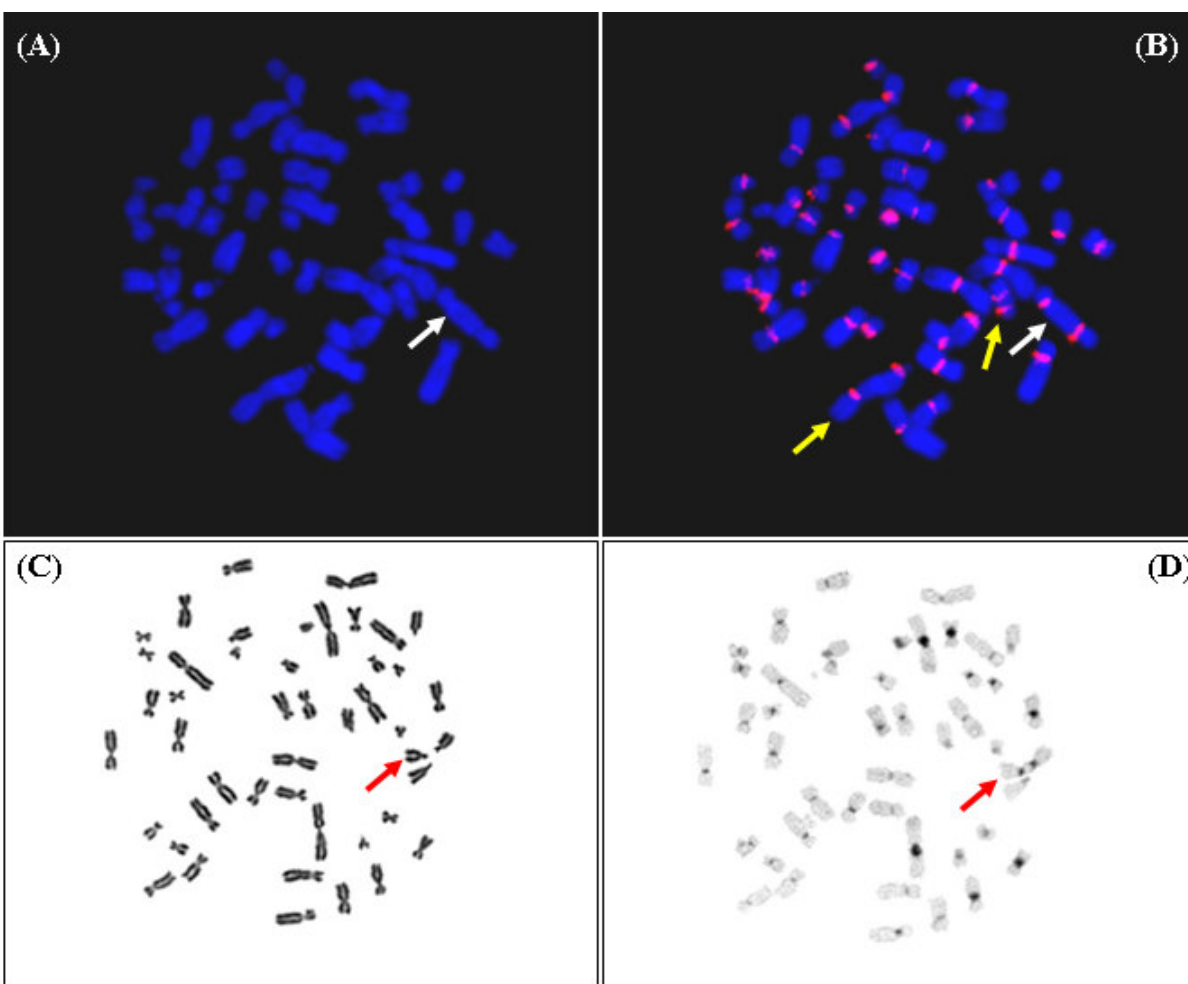


Figura 27 Presença de dicêntricos falso-positivos pelos métodos que evidenciam os centrômeros. (A) Um possível dicêntrico (seta branca) observado por DAPI e (B) sua confirmação por FISH (setas amarelas). (C) Metáfase com dois cromossomos acrocêntricos (seta) observados por Giemsa e (D) uma associação da região satélite entre eles dando a aparência de dicêntrico (falso-positivo) por bandeamento C.

Os resultados das estimativas de dose mostrados nas tabelas 1 e 2 demonstram que há, em geral, uma boa concordância entre as doses absorvidas estimadas usando diretamente cada método de coloração e a real dose estabelecida para irradiar as amostras de sangue. A dose estimada está dentro dos 95 % de limite de confiança para todos os quatro métodos investigados. O teste-u e a taxa de variância para a média indicam que a distribuição de dicêntricos na maioria dos casos seguiu uma distribuição de Poisson (ver **ANEXO 1** sobre distribuição de Poisson), como esperado para raios-X (EDWARDS et al., 1979; EDWARDS et al., 2007).

Há indicação de dispersão dos dados de aberrações cromossômicas pelo método de bandeamento C, tanto para a dose de 1,5 quanto de 3,0 Gy. Isso pode indicar que o método de bandeamento C é menos eficiente em detectar as células com mais de um dicêntrico que os outros métodos. Isso pode ser explicado pelo fato de que, com o tratamento com hidróxido de bário, a qualidade da coloração cromossômica torna-se inferior e algumas metáfases são destruídas por ação dessa base, ou há formação de sujeiras de cristais de bário sobre a lâmina que impedem a visualização total de algumas metáfases (PROSSER, 1975).

Outra possível explicação é que o bandeamento C cora mais fortemente os centrômeros dos cromossomos 1, 9, 16 e a maior porção do cromossomo Y. Portanto, dicêntricos envolvendo os demais cromossomos podem não ser identificados. Além disso, variações devido às razões subjetivas ou de interpretações individuais podem vir a interferir na contagem de um ou mais dicêntricos por células. Entretanto, as doses estimadas por bandeamento C foram coerentes com as doses estimadas pelos demais métodos, o que indica que o emprego dessa técnica é apropriado para dosimetria citogenética.

O método que produziu a melhor estimativa de dose próxima a 1,5 Gy (Tabela 4) foi o FISH e o bandeamento C, provavelmente porque a evidência dos centrômeros por essas técnicas permite o reconhecimento de uma fração de dicêntricos menos óbvia (BAUCHINGER et al., 1993; SCHMID et al., 1995). Entretanto, o método de Giemsa foi a que resultou na melhor estimativa para a dose de 3,0 Gy (Tabela 5).

Tabela 4 Frequência de aberrações cromossômicas em células irradiadas com 1,5 Gy analisadas por diferentes métodos de coloração, apresentando a distribuição de dicêntricos e testes para sua conformidade com distribuição de Poisson e doses estimadas com erros padrão e 95% de limite de confiança.

Aberrações Cromossômicas em 600 células					Distribuição de dicêntricos							
Método	AC	FA	Dic	Freq±EP	D0	D1	D2	D3	D4	Var/μ	Teste-u	Dose estimada (Gy)
Giensa	4	53	105	0,175 ± 0.016	503	89	8	0	0	0,979 ± 0,058	-0,365	1,40 ± 0,08
DAPI	3	62	102	0,170 ± 0.016	507	84	9	0	0	1,010 ± 0,057	0,142	1,37 ± 0,08
Banda C	7	52	125	0,208 ± 0.017	480	115	5	0	0	0,873 ± 0,058	-2,200	1,55 ± 0,08
FISH	5	77	124	0,207 ± 0.017	482	112	6	0	0	0,892 ± 0,058	-1,880	1,54 ± 0,08

Dic = Dicêntricos

AC = Anéis Cêntricos

FA = Fragmentos Acêntricos

Freq±EP = Frequência de dicêntricos e Erro Padrão

Var/μ = Variância pela média

D0, D1, D2, D3 e D4 = Número de células com 0, 1, 2, 3, 4 dicêntricos, respectivamente.

Tabela 5 Frequência de aberrações cromossômicas em células irradiadas com 3 Gy analisadas por diferentes métodos de coloração, apresentando a distribuição de dicêntricos e testes para sua conformidade com distribuição de Poisson e doses estimadas com erros padrão e 95% de limite de confiança.

Aberrações Cromossômicas em 160 células					Distribuição de dicêntricos							
Método	AC	FA	Dic	Freq±EP	D0	D1	D2	D3	D4	Var/μ	Teste-u	Dose estimada (Gy)
Giensa	9	41	102	0,637 ± 0,038	81	61	14	3	1	0,937 ± 0,112	-0,565	2,94 ± 0,16
DAPI	3	39	86	0,537 ± 0,039	88	61	9	1	1	0,887 ± 0,112	-1,020	2,67 ± 0,16
Banda C	8	18	94	0,588 ± 0,039	74	78	8	0	0	0,586 ± 0,112	-3,710	2,81 ± 0,16
FISH	6	21	88	0,55 ± 0,039	90	53	16	1	0	0,887 ± 0,112	-1,010	2,70 ± 0,16

Dic = Dicêntricos

AC = Anéis Cêntricos

FA = Fragmentos Acêntricos

Freq±EP = Frequência de dicêntricos e Erro Padrão

Var/μ = Variância pela média

D0, D1, D2, D3 e D4 = Número de células com 0, 1, 2, 3, 4 dicêntricos, respectivamente.

Por conseguinte, pode-se observar que não houve diferença estatística entre as frequências de dicêntricos obtidas pelos quatro métodos de coloração citogenética, para ambas as doses de 1,5 e 3,0 Gy (χ^2 p: 0,27 e 0,64, respectivamente; ANOVA p > 0,99), ilustrado graficamente na Figura 28. Essa coerência entre as análises por método convencional e por FISH estão de acordo com trabalhos prévios encontrados na literatura (MEYNE et al., 1989; PANTELIIAS et al., 1993; FINNON et al., 1995; ROY et al., 1996).

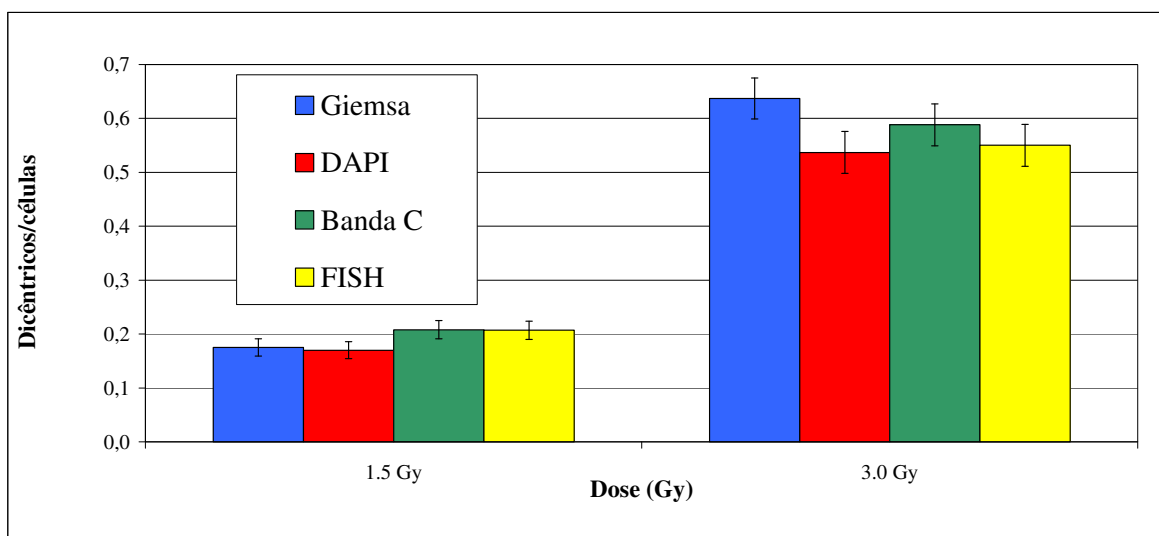


Figura 28 Frequências $\pm$ EP (erro padrão) de dicêntricos encontrados em linfócitos para cada dose pelos quatro métodos de coloração selecionados.

Apesar disso, esses resultados apresentados não refutam a idéia de que métodos de coloração citogenética que evidenciam a região centromérica podem ser ferramentas importantes em dosimetria citogenética, por identificar de maneira mais fácil, precisa e rápida, as aberrações cromossômicas instáveis como os cromossomos dicêntricos (MEYNE et al., 1989).

Em concordância com a atual pesquisa, têm-se sugerido que a técnica de FISH seja empregada de forma complementar aos métodos convencionais para solucionar imagens duvidosas de cromossomos dicêntricos (MEYNE et al., 1989; PROSSER, 1975; BAUCHINGER et al., 1993; ROY et al., 1996; FERNANDES et al., 2006).

A Tabela 6 resume um quadro das possíveis imagens ambíguas e as vantagens de se utilizar a análise combinada com métodos que evidenciam a região centromérica dos cromossomos humanos.

Tabela 6 Causas de ambigüidade e suas resoluções por quarto diferentes métodos (Giemsa, bandeamento C, DAPI e FISH).

<i>Imagens</i>	<i>Métodos</i>			
	Giemsa	Bandeamento C	DAPI	FISH
Sobreposição entre cromátides	Dúvida	Negativo	Dúvida	Negativo
Associação da região satélite	Negativo	Falso-positivo	Negativo	Falso-positivo
Cromossomos do grupo B	Dúvida	Negativo	Dúvida	Negativo
Possível dicêntrico	Dúvida	Positivo	Dúvida	Positivo

A maioria dos erros associados à questão subjetiva da análise pode ser resolvida utilizando sistemas de captura de imagem e ferramentas computacionais (FERNANDES 2008a; 2008b). Além disso, a presença de fragmento acêntrico pode também confirmar a presença de dicêntricos, independentemente do método de coloração citogenética (PROSSER, 1975).

Ainda há outros fatores relevantes para a escolha do método de coloração em dosimetria citogenética, tal como os custos dos reagentes, o tempo necessário para realizar a metodologia e as análises citogenéticas, e a acurácia intrínseca de cada método. A Tabela 7 resume esses critérios que são especialmente importantes em situações onde a identificação de vários indivíduos supostamente expostos às radiações ionizantes é requerida e o tempo neste caso é um fator crucial, ou, em sentido contrário, em casos onde o número de indivíduos é reduzido, há verba suficiente e o tempo não é fator limitante.

Tabela 7 Resumo do tempo, custos e acurácia relativa a cada método de coloração citogenética avaliado.

<i>Método</i>	<i>Critério</i>			
	Tempo (método)	Tempo (análise)	Custos	Acurácia
Giemsa	+	++	+	++
Bandeamento C	++	+	+	+++
DAPI	+	++	++	++
FISH	+++	+	+++	+++

+ *baixo*
 ++ *médio*
 +++ *alto*

O procedimento por FISH não é apenas de custo elevado em termos de reagentes, mas também requer um tempo maior para a realização da metodologia, em torno de 72 horas, enquanto Giemsa e DAPI requerem alguns poucos minutos e o bandeamento C poucas horas (3 horas). No entanto, segundo Roy e colaboradores (1996), o tempo em excesso gasto para a realização da técnica de FISH seria compensado pela maior rapidez e precisão na identificação de dicêntricos, justificando o emprego desse método em dosimetria citogenética.

Em situações onde há um requerimento para avaliar uma suspeita de exposição humana em larga escala às radiações ionizantes, como em incidentes radiológicos, o método de coloração convencional é o mais adequado para a análise de dicêntricos como um modo de triagem devido à rapidez desse método (ROY et al., 1996). Neste caso, a dosimetria citogenética não precisa ser tão exata, uma vez que os indivíduos gravemente irradiados já devem ter sido identificados pelos sintomas clínicos (LLOYD, 1997).

Em contrapartida, em situações de exposições a baixas doses de radiação, onde o tempo de liberação do laudo citogenético não é fator crucial, é importante identificar cada aberração cromossômica para atingir uma boa estatística. Neste caso, cada dicêntrico

contribui significativamente para a dose absorvida, sendo recomendado o uso de técnicas que evidenciem os centrômeros na confirmação de dicêntricos, a exemplo do FISH e do bandeamento C.

A Figura 29 apresenta um esquema do planejamento de escolha dos métodos de coloração citogenética para diferentes níveis de exposição humana às radiações ionizantes. Esses critérios são sugeridos como pontos a serem considerados por programas de proteção radiológica e laboratórios destinados a realizar a dosimetria citogenética, seja na estimativa da dose absorvida envolvendo emergências radiológicas, ou na avaliação da dose recebida por trabalhadores ocupacionalmente expostos às radiações ionizantes.

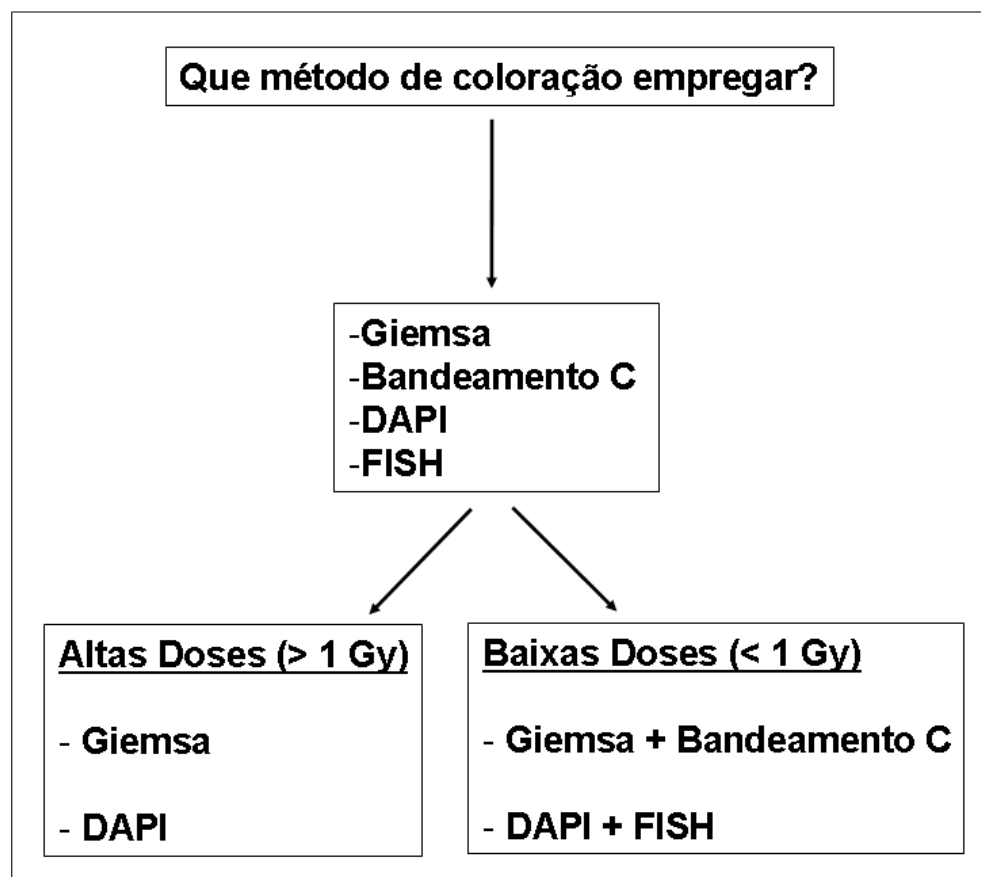


Figura 29 Planejamento de escolha do método de coloração citogenética a ser empregado em dosimetria, envolvendo exposições a elevadas e baixas doses de radiação.

5 CONCLUSÕES

- Em casos reais ou de suspeita de exposição parcial do corpo humano, os resultados obtidos nesta pesquisa demonstram que a quantificação de dicêntricos em células em primeira divisão (M1) em culturas prolongadas (72 horas) é um método eficaz de se obter estimativas da dose absorvida mais próximas do real.
- Para confirmar se uma exposição foi parcial, as estimativas de dose pelos métodos Qdr e CP provenientes de culturas de 48 horas podem ser comparadas com as obtidas com o prolongamento do tempo de cultura para 72 horas. No entanto, foi evidenciado que este método causa uma excessiva condensação cromossômica. Apesar desta observação, este protocolo demonstra ser de grande importância em dosimetria citogenética, tendo em vista que a maioria das exposições humanas às fontes de radiação ocorre em regiões localizadas do corpo, e não de corpo inteiro.
- A escolha do método de coloração citogenética deve ser realizada com base na urgência de liberação do laudo citogenético, e não apenas levando em consideração a eficácia e o tempo relacionado com cada método. Em situações de emergência radiológica envolvendo exposições a altas doses de radiação (> 1 Gy), o método de Giemsa ainda é o mais apropriado para a contagem de aberrações cromossômicas.
- Em situações onde o tempo de liberação do laudo citogenético não é um fator crucial, como na avaliação da dose recebida por trabalhadores ocupacionalmente expostos às radiações ionizantes, sugere-se o uso do bandeamento C e do FISH como testes confirmatórios da presença de dicêntricos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, A. Trends in biological dosimetry: an overview. **Brasilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, p. 119-124, 2002.

BAUCHINGER, M.; SCHMID, E.; DRESP, J. Calculation of the dose-rate dependence of the dicentric yield after ^{60}Co -irradiation of human lymphocytes. **International Journal of Radiation Biology**, v. 35, p. 229-233, 1979.

BAUCHINGER, M.; SCHMID, E.; ZITZELSBERGER, H.; BRASELMANN, H.; NAHRSTEDT, U. Radiation-induced chromosome aberrations analysed by two-colour fluorescence in situ hybridization with composite whole chromosome-specific DNA probes and a pancentromeric DNA probe. **International Journal of Radiation Biology**, v. 64, p. 179-184, 1993.

BOEI, J. J. W. A.; VERMEULEN, S.; NATARAJAN, A. T. Detection of chromosomal aberrations by fluorescence in situ hybridization in the first three postirradiation divisions of human lymphocytes. **Mutation Research**, v. 349, p. 127-135. 1996.

BOEI, J. J. W. A.; VERMEULEN, S.; NATARAJAN, A. T. Differential involvement of chromosomes 1 and 4 in the formation of chromosomal aberrations in human lymphocytes after x-irradiation. **International Journal of Radiation Biology**, v. 72, p. 139-145, 1997.

BUCKTON, K. E.; PIKE, M.C. Time in culture. An important variable in studying in vivo radiation-induced chromosome damage in man. **International Journal of Radiation Biology**, v. 8, p. 439-452, 1964.

Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN). **Diretrizes Básicas de Proteção Radiológica**, CNEN/NN - 3.01, 2005.

COSTA, S. F. **Introdução ilustrada à Estatística**. 4 ed., São Paulo: HARBRA, 2005.

DOLPHIN, G. W. Biological dosimetry with particular reference to chromosome aberration analysis. A review of methods. **Handling of Radiation Accidents**, p. 215-224, 1969.

EDWARDS, A. A.; LLOYD, D. C.; PURROTT, R. J. Radiation induced chromosome aberrations and the Poisson distribution. **Radiation and Environmental Biophysics**, v. 16, p. 89-100, 1979.

EDWARDS, A. A.; LINDHOLM, C.; DARROUDI, F.; STEPHAN, G.; ROMM, H.; BARQUINERO, J.; BARRIOS, L.; CABALLIN, M. R.; ROY, L.; WHITEHOUSE, C. A.; TAWN, E. J.; MOQUET, J.; LLOYD, D. C.; VOISIN, P. Review of translocations detected by FISH for retrospective biological dosimetry applications. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 113, n. 4, p. 396-402, 2005.

EDWARDS, A. A.; SZLUINKA, M.; LLOYD, D. Reconstruction of doses from ionizing radiation using fluorescence in situ hybridization techniques. **The British Journal of Radiology**, v. 80, p. S63-S67, 2007.

EITOKU, M.; SATO, L.; SENDA, T.; HORIKOSHI, M. Histone chaperones: 30 years from isolation to elucidation of the mechanisms of nucleosome assembly and disassembly. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, p. 414-444, 2008.

FENECH, M.; CHANG, W. P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research**, v. 534, p. 65-75, 2003.

FERNANDES, T. S.; AMARAL, A.; CAVALCANTI, M. B.; BRAGA, L. R. P.; MELO, R. A. M. Unstable chromosomal aberrations and micronuclei analyses in the biomonitoring of workers occupationally exposed to ionizing radiation. **International Journal of Low Radiation**, v. 3, p. 299-309, 2006.

FERNANDES, T. S.; LLOYD, D. C.; AMARAL, A. A comparison of different cytological stains for biological dosimetry. **International Journal of Radiation Biology**, v. 84, p. 703-711, 2008a.

FERNANDES, T. S.; LLOYD, D.; AMARAL, A. Biodosimetry for dose assessment of partial-body exposures: a methodological improvement. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, special number, p. 97-102, 2008b.

FINNON, P.; LLOYD, D. C.; EDWARDS, A. A. Fluorescence in situ hybridization detection of chromosomal aberrations in human lymphocytes: applicability to biological dosimetry. **International Journal of Radiation Biology**, v. 68, p. 429-435, 1995.

GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M. **Introdução à Genética**. Rio de Janeiro, RJ: Ed. GUANABARA KOOGAN S.A., 2002. 794p.

GUERRA, M. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro, RJ, Ed. GUANABARA KOOGAN S.A., 1988. 142 p.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto, SP: Ed. FUNPEC, 2002. 131p.

GUERRERO-CARBAJAL, Y. C.; MOQUET, J. E.; EDWARDS, A. A.; LLOYD, D. C. The persistence of FISH translocations for retrospective biological dosimetry after simulated whole or partial body irradiation. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 76, p. 159-168, 1998.

GUMRICH, K.; VIRSIK-PEUCKERT, R. P.; HARDER, D. Temperature and the formation of radiation-induced chromosome aberrations. I. The effect of irradiation temperature. **International Journal of Radiation Biology**, v. 49, n. 4, p. 665-672, 1986.

HALL, E. J.; GIACCIA, A. J. **Radiobiology for the Radiologist**. 6. ed. Philadelphia: Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2006. 546 p.

HAN, T.; DADAY, B. T lymphocytes dependency of B lymphocyte blastogenic response to phytomitogens. **Immunology**, v. 34, p. 625-69, 1978.

HARPER, P. S. The discovery of the human chromosome number in Lund, 1955-1956. **Human Genetics**, v. 119, p. 226-232, 2006.

HAYATA, I.; KAJIMA, J.; OKABE, N. Distinction of metaphases in the first cell cycle for automated system in radiation dosimetry. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 39, p. 517-520, 1992.

HEIMERS, A.; BREDE, H. J.; GIESEN, U.; HOFFMANN, W. Influence of mitotic delay on the results of biological dosimetry for high doses of ionizing radiation. **Radiation and Environmental Biophysics**, v. 44, p. 211-218, 2005.

HEIMERS, A.; BREDE, H. J.; GIESEN, U.; HOFFMANN, W. Chromosome aberration analysis and the influence of mitotic delay after simulated partial-body exposure with high doses of sparsely and densely ionizing radiation. **Radiation and Environmental Biophysics**, v. 45, p. 45-54, 2006.

HENEGARIU, O.; BRAY-WARD, P.; ARTAN, S.; VANCE GAIL H., QUMSYICH, M.; WARD DAVID C. Small marker chromosome identification in metaphase and interphase using centromeric multiplex FISH (FISH). **Laboratory Investigation**, v. 81, p. 475, 2001.

HOFFMANN, G. R.; SAYER, A. M.; LITTLEFIELD, L. G. Higher frequency of chromosome aberrations in late-arising first-division metaphases than in early-arising metaphases after exposure of human lymphocytes to x-rays in G0. **International Journal of Radiation Biology**, v. 78, p. 765-772, 2002.

HONE, P. A.; EDWARDS, A. A.; LLOYD, D. C.; MOQUET, J. E. The yield of radiation-induced chromosomal aberrations in first division human lymphocytes depends on the culture time. **International Journal of Radiation Biology**, v. 81, p. 523-529, 2005.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA). **Cytogenetic analysis for radiation dose assessment**. Technical report series. Vienna, n. 405, 2001.

INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIATION UNITS AND MEASUREMENTS. **Linear energy transfer**. ICRU. Report 16. Washington, 1970.

KANDA, R.; JIANG, T.; HAYATA, I.; KOBAYASHI, S. Effects of Colcemid concentration on chromosome aberration analysis in human lymphocytes. **Journal of Radiation Research**, v. 35, p. 41-47, 1994.

KANDA, R.; HAYATA, I. Comparison of the yields of translocations and dicentrics measured using conventional Giemsa staining and chromosome painting. **International Journal of Radiation Biology**, v. 69, n. 6, p. 701-705, 1996.

KOVACS, M. S.; EVANS, J. W.; JONSTONE, I. M.; BROWN, J. M. Radiation-induced damage, repair and exchange formation in different chromosomes of human fibroblasts determined by fluorescence in situ hybridization. **Radiation Research**, v. 147, p. 34-43, 1994.

LLOYD, D. C.; DOLPHIN, G. W. Radiation-induced chromosome damage in human lymphocytes. **British Journal of Industrial Medicine**, v. 34, p. 261-273, 1977.

LLOYD, D. C.; EDWARDS, A. A.; PROSSER, J. S.; CORP, M. J. The dose response relationship obtained at constant irradiation times for the induction of chromosome aberrations in human lymphocytes by cobalt-60 gamma rays. **Radiation Environment Biophysics**, v. 23, p. 170-189, 1984.

LLOYD, D. C.; EDWARDS, A. A.; NATARAJAN, A. T.; DARROUDI, F. Biological dosimetry applied to in vitro simulated partial body irradiation. **In: Treatment and Biological Dosimetry of Exposed Persons: Post-Chernobyl Action** (K. Chadwick and G. Gerber, Eds.), p. 51–80. Report No. EUR 12558, Commission of the European Communities, Luxembourg, 1991.

LLOYD, D. Chromosomal analysis to assess radiation dose. **In: Radiation Injury and the Chernobyl Catastrophe, Stem Cells**, v. 15 (suppl 2), p. 195-201, 1997.

LLOYD, D. C. **New Developments in Chromosomal Analysis for Biological Dosimetry.** Radiation Protection Dosimetry, v. 77, p. 33-36, 1998.

LLOYD, D. C.; EDWARDS, A. A.; MOQUET, J. E.; GUERRERO-CARBAJAL, Y. C. The role of cytogenetics in early triage of radiation casualties. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 52, p. 1107-1112, 2000.

MAGNATA, S. P.; SERAFIM, I; NETTO, J.; GOMES, P.; M. NETTO, A. M.; AMARAL, A. Unstable chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes from patients with cervical uterine cancer following radiotherapy. **Cellular and Molecular Biology**. v. 48, p. 809-811, 2002.

MEYNE, J.; LITTLEFIELD, L. G.; MOYSIS, R. K. Labelling of human centromeres using an alphoid DNA consensus sequence: application to the scoring of chromosome aberrations. **Mutation Research**, v. 226, p. 75-79, 1989.

NATARAJAN, A. T.; BERNI, A.; MARIMUTHU, A. M.; PALITTI, F. The type and yield of ionising radiation induced chromosomal aberrations depend on the efficiency of different DSB repair pathways in mammalian cells. **Mutation Research**, v. 642, p. 80-85, 2008.

PALA, F. S.; MOQUET, J. E.; EDWARDS, A. A.; LLOYD, D. C. In vitro transmission of chromosomal aberrations through mitosis in human lymphocytes. **Mutation Research**, v. 474, p. 139-146, 2001.

PANTELIAS, G. E.; ILIAKIS, G. E.; SAMBANI, C. D.; POLITIS, G. Biological dosimetry of absorbed radiation by C-banding of interphase chromosomes in peripheral blood lymphocytes. **International Journal of Radiation Biology**, v. 63, n. 3, p. 349-354, 1993.

PRESTON, J. Radiation biology: concepts for radiation protection. **Health Physics Society**, v. 88, n. 6, p. 545-556, 2005.

PERRY, P.; WOLFF, S. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. **Nature**, v. 258, p. 121-125, 1974.

PRASANNA, P. G. S.; MARTIN, P. R.; SUBRAMANIAN, U.; BERDYCHEVSKI, R.; KRASNOPOLSKY, K.; DUFFY, K. L.; MANGLAPUS, G. L.; LANDAUER, M. R.; SRINIVASAN, V.; BOREHAM, D.; HAGAN, M. P.; JINARATANA, V.; BLAKELY, W. F. Cytogenetic biodosimetry for radiation disasters: Recent advances. **Bethesda, MD, USA: NATO RTG-099**, 2005.

PROSSER, J. S. Identification of dicentric chromosomes in irradiated lymphocytes by C-banding. **Mutation Research**, v. 27, p. 131-3, 1975.

RAMALHO, A. T.; NASCIMENTO, A. C. The fate of chromosomal aberrations in ^{137}Cs -exposed individuals in the Goiania radiation accident. **Health Physics**, v. 60, n. 1, p. 67-70, 1991.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. 1. ed. Canoas: Ed. ULBRA, 2003. 355p.

ROY, L.; SOROKINE-DURM, I.; VOISIN, P. Comparison between fluorescence in situ hybridization and conventional cytogenetics for dicentric scoring: a first-step validation for the use of FISH in biological dosimetry. **International Journal of Radiation Biology**, n. 70, p. 665-669, 1996.

SASAKI, M. S.; MIYATA, H. Biological dosimetry in atom bomb survivors. **Nature** (London), v. 220, p. 1189-1193, 1968.

SASAKI, M. S.; KOBAYASHI, K.; HIEDAS, K.; YAMADA, T.; EJIMA, Y.; MAEZAWA, H.; FURUSAWA, Y.; ITO, T.; OKADA, S. Induction of chromosome aberrations in human lymphocytes by monochromatic X-rays of quantum energy between 4.8 and 14.6 keV. **International Journal of Radiation Biology**, v. 56, p. 975-988, 1989.

SCHMID, E.; ZITZELSBERGER, H.; BRASELMANN, H.; GRAY, J. W.; BAUCHINGER, M. Radiation-induced chromosome aberrations analysed by fluorescence in situ hybridization with a triple combination of composite whole chromosome-specific DNA probes. **International Journal of Radiation Biology**, v. 62, p. 673-678, 1992.

SCHMID, E.; BRASELMANN, H.; NAHRSTEDT, U. Comparison of γ -ray induced dicentric yields in human lymphocytes measured by conventional analysis and FISH. **Mutation Research**, v. 348, p. 125-130, 1995.

SENTHAMIZHCHELVAN, S.; PANT, G. S.; RATH, G. K.; JULKA, P. K.; NAIR, O.; JOSHI, R. C.; MALHOTRA, A.; PANDEY, R. M. Biodosimetry using chromosome aberrations in human lymphocytes. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 123, n. 2, p. 241-245, 2007.

SILVA-BARBOSA, I.; MAGNATA, S. P.; AMARAL, A.; SOTERO, G.; CAVALCANTI-MELO, H. Dose assessment by quantification of chromosome aberrations and micronuclei in peripheral blood lymphocytes from patients exposed to gamma radiation. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, p. 452-457, 2005.

SNUSTAD, P.D.; SIMMONS, M.J. **Fundamentos de Genética**. 2. ed, Ed. Guanabara Koogan, 2001.

SOKAL, R; ROHLF, F. J. **Biometry: the principles and practice of statistics in biological research**. 3 ed., W. H. Freeman and Company, 1995.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v. 75, n. 1, p. 304-306, 1972.

TESSARD, I.; DUTRILLAUX, B.; SABATIER, L. Chromosomal aberration induced in human lymphocytes by high-LET irradiation. **International Journal of Radiation Biology**, v. 72, p. 423-433, 1997.

TUCKER, J.D.; RAMSEY, M. J.; LEE, D. A.; MINKLER, J. L. Validation of chromosome painting as a biodosimeter in human peripheral lymphocytes following acute exposure to ionizing radiation in vitro. **International Journal of Radiation Biology**, v. 64, p. 27-37, 1993.

UNITED NATIONS SCIENTIFIC COMMITTEE ON THE EFFECTS OF ATOMIC RADIATION (UNSCEAR). **Sources, effects and risks of ionizing radiation**. New York, 2000.

VIRSIK-PEUCKERT, R. P.; HARDER, D. Temperature and the formation of radiation-induced chromosome aberrations. II. The temperature dependence of lesion repair and lesion interaction. **International Journal of Radiation Biology**, v. 49, n. 4, p. 673-681, 1986.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. **Nature**, v. 171, p. 964–967, 1953.

WUTTKE, K.; STREFFER, C.; MÜLLER, W-U. Radiation induced micronuclei in subpopulations of human lymphocytes. **Mutation Research**, v. 286, p. 181-188, 1993.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e prática**. São Paulo: Atheneu, 2001.1043p.

ANEXOS

ANEXO 1: DISTRIBUIÇÃO DE ABERRAÇÕES INSTÁVEIS POR CÉLULAS

Em casos de exposições de corpo inteiro a radiações de baixo LET (e.g. raios-X), as frequências de aberrações cromossômicas instáveis (dicêntricos, anéis e fragmentos acêntricos) seguem a distribuição de Poisson ao longo dos linfócitos do sangue periférico humano (EDWARDS et al., 1979).

Essa distribuição recebeu esse nome após a sua descrição pelo matemático francês Siméon-Denis Poisson em 1837, e consiste em uma distribuição de frequência discreta do número de vezes que um evento raro ocorre (SOKAL e ROHLFF, 1995). A probabilidade de que existam exatamente **k** ocorrências (sendo **k** um número inteiro não negativo, $k = 0, 1, 2, \dots$) é dada pela Equação 11:

$$p(X = k) = \frac{e^{-\alpha} \alpha^k}{k!}, k = 0, 1, \dots, n, \dots, \quad (11)$$

Onde **e** é a base do logaritmo natural ($e = 2,71828$), **k!** é o fatorial de **k** e α é um número real, igual ao número esperado de ocorrências (no caso, dicêntricos) que ocorrem num intervalo de tempo (SOKAL e ROHLFF, 1995).

Com isso, a distribuição de Poisson é utilizada para um número de eventos raros da natureza com o objetivo de testar se os eventos ocorrem independentemente um do outro. Se eles ocorrem, os mesmos seguem uma distribuição de Poisson. Se a ocorrência de um evento aumenta a probabilidade de um segundo evento também ocorrer, diz-se que a

distribuição de Poisson é contaminada. Se a ocorrência de um evento impede o surgimento de outro, a distribuição é dita espacialmente ou temporalmente repulsada (SOKAL e ROHLFF, 1995).

A distribuição de Poisson pode ser usada como um teste de aleatoriedade ou independência da distribuição, não apenas espacialmente, mas também em função do tempo. Para computar a frequência esperada é preciso saber a média da distribuição. Portanto, a distribuição de Poisson possui apenas um parâmetro e nesse caso a média é igual à variância ($\mu = \sigma^2$) (SOKAL e ROHLFF, 1995).

De uma distribuição de aberrações por células, o número total de células (N), o número médio de aberrações por células Y, e uma estimativa da variância (σ^2) da população, podem ser derivados. Um coeficiente de dispersão “d” é definido pela Equação 12 abaixo (EDWARDS et al., 1979).

$$d = \frac{(N-1)\sigma^2}{Y} \quad (12)$$

Esse valor deve ser próximo de 1 em distribuições que são essencialmente Poisson, maiores que 1 em amostras contaminadas, e menores que 1 em casos de distribuição repulsada (SOKAL e ROHLFF, 1995).

A Figura 30 apresenta as curvas de uma distribuição de Poisson para diferentes médias. Esse gráfico mostra as frequências dos polígonos (as linhas conectando os pontos medianos da barra do diagrama) para cinco distribuições de Poisson. Para os valores de média (μ) acima de 10, a curva toma um aspecto simétrico (SOKAL e ROHLFF, 1995).

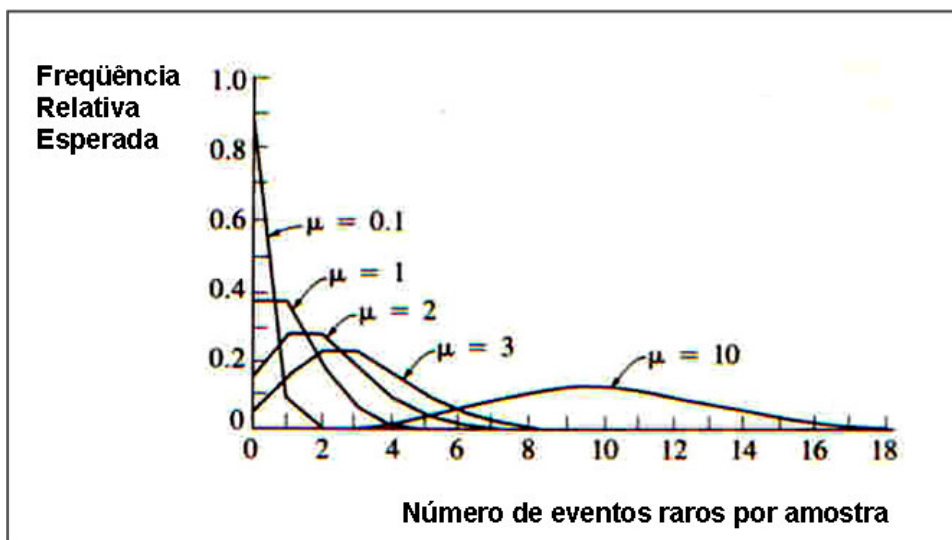


Figura 30 Frequências dos polígonos de distribuições de Poisson para vários valores de média (μ). Modificado de: (SOKAL e ROHLFF, 1995).

Nos experimentos realizados neste trabalho, as frequências de dicêntricos foram submetidas ao teste-u com base no método adaptado por Papworth e descrito por Savage (1970), descrito na Equação 13 abaixo (SAVAGE, 1970 apud EDWARDS et al., 1979).

$$u = \frac{d - (N - 1)}{\sqrt{\text{var } d}} \quad (13)$$

Onde d é o coeficiente de dispersão, N o número total de células, e $\text{var } d$ é a variância do coeficiente de dispersão.

Esse teste é útil para avaliar se o número de dicêntricos por células seguiu uma distribuição de Poisson, como esperado para exposições aos raios-X de corpo inteiro. Em caso de irradiação parcial do corpo, espera-se uma distribuição dispersa, uma vez que há uma heterogeneidade na amostra contendo células irradiadas e não irradiadas (IAEA, 2001). O software utilizado para calcular o teste-u foi o MLPOL, desenvolvido pelo pesquisador Alan Edwards da Agência de Proteção à Saúde (HPA), Chilton, Didcot, Inglaterra (www.hpa.org.uk) (EDWARDS et al., 1979; 2007).

ANEXO 2 PRODUÇÃO CIENTÍFICA.

- 1- **FERNANDES, T. S.**; AMARAL, A.; CAVALCANTI, M. B.; BRAGA, L. R. P.; MELO, R. A. M. Unstable chromosomal aberrations and micronuclei analyses in the biomonitoring of workers occupationally exposed to ionizing radiation. **International Journal of Low Radiation**, v. 3, p. 299-309, 2006.
- 2- CAVALCANTI, M. B.; AMARAL, A.; **FERNANDES, T. S.**; MELO, J. A.; MACHADO, C. G. F. p53 protein expression levels as bioindicator of individual exposure to ionizing radiation by flow cytometry. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 308, p. 127-131, 2008.
- 3- **FERNANDES, T. S.**; LLOYD, D. ; AMARAL, A. . A comparison of different cytological stains for biological dosimetry. **International Journal of Radiation Biology**, v. 84, p. 703-711, 2008a.
- 4- **FERNANDES, T. S.**; LLOYD, D. ; AMARAL, A. . Biodosimetry for dose assessment of partial-body exposures: a methodological improvement. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, special number, p. 97-102, 2008b.
- 5- AMARAL, A.; **FERNANDES, T. S.**; CAVALCANTI, M. B. Bioindicators in Radiation Protection. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 91-96, 2008.

Unstable chromosomal aberrations and micronuclei analyses in the biomonitoring of workers occupationally exposed to ionising radiation

Thiago de Salazar e Fernandes*,
Ademir Amaral, Mariana Brayner Cavalcanti,
and Lidiane Régia Pereira Braga

Grupo de Estudos em Radioproteção e Radioecologia (GERAR),
Departamento de Energia Nuclear – Centro de Tecnologia e
Geociências, Universidade Federal de Pernambuco,
Avenida Professor Luiz Freire, 1000,
50740-540 Cidade Universitária, PE, Brazil
E-mail: thiagosalazar@hotmail.com E-mail: amaral@ufpe.br
E-mail: maribrayner@yahoo.com.br
E-mail: lidianeregiab@yahoo.com.br

*Corresponding author

Raul A. Morais Melo

Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco
(HEMOPE), Rua Joaquim Nabuco, 171, Graças,
52011-000 Recife, PE, Brazil
E-mail: rmelo@elogica.com.br

Abstract: The quantification of unstable chromosomal aberrations and micronuclei in peripheral blood lymphocytes is a method commonly used in biodosimetry by cytogenetic analysis, especially when physical dosimetry cannot be performed. In this context, the aim of this research was to compare these methods in the biomonitoring of health professionals occupationally exposed to ionising radiation. In parallel, the C-banding technique was applied to confirm the presence of unstable chromosomal aberrations (dicentric and rings). For this, samples of peripheral blood from health professionals of three hospitals (Recife – Brazil) were collected and lymphocyte cultures were carried out based on classical cytogenetic techniques. The number of cells scored per subject was the same (1000) for each assay. Among the individuals, those who do not usually wear a lead apron had higher frequencies of unstable chromosomal aberrations and micronuclei than the ones who carefully observe the radioprotection rules.

Keywords: biomonitoring; chromosome aberrations; cytogenetic analysis; micronuclei.

Reference to this paper should be made as follows: Fernandes, T. de S., Amaral, A., Cavalcanti, M.B., Braga, L.R.P. and Melo, R.A.M. (2006) 'Unstable chromosomal aberrations and micronuclei analyses in the biomonitoring of workers occupationally exposed to ionising radiation', *Int. J. Low Radiation*, Vol. 3, No. 4, pp.299–309.

Biographical notes: Thiago de Salazar e Fernandes graduated in biomedical sciences at the Federal University of Pernambuco, Brazil. He obtained an MSc and is currently a PhD student at the Nuclear Energy Department of that University. He is a member of the Grupo de Estudos em Radioprotecao e Radioecologia (GERAR), developing research on biological dosimetry. He is a member of the Brazilian Society of Mutagenesis and the Brazilian Society of Clinical Analysis. He has published in the area of biological dosimetry and participated in national and international congresses.

Ademir de Jesus Amaral has an MSc in Dosimetry from the Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil and a DSc in Biophysics from the Paris Val de Marne University. He is a Professor at UFPE, head of the radiation research group GERAR since 2001 and an invited professor at the Xavier Bichat Faculty of Medicine (Paris, France). He is vice-president of the Brazilian Society of Nuclear Biosciences.

Mariana Brayner Cavalcanti graduated in biomedical sciences at the Federal University of Pernambuco, Brazil, obtained an MSc and is a PhD student at the Nuclear Energy Department of that University. She is a member of GERAR, developing research with protein expression in lymphocytes of peripheral blood after in vitro irradiation. She has published in the area of biological dosimetry and participated in congresses.

Lidiane Regia Pereira Braga graduated in biology at the Federal University of Pernambuco and obtained an MSc at the Nuclear Energy Department of that university. She has researched and published on the levels of chromosomal aberrations in lymphocytes of workers occupationally exposed to ionising radiation. She is a member of GERAR and of the Brazilian Society of Genetics.

Raul Antônio Moraes Melo obtained an MD at the University of Pernambuco and a PhD in Clinical Medicine at the University of São Paulo. He is Professor in the Department of Clinical Medicine at the University of Pernambuco and Head of the Molecular Biology Laboratory at the Hemope Foundation. His main research area of interest is in the use of molecular methods in haematology.

1 Introduction

The fundamental physical quantity for the monitoring of individuals exposed to ionising radiation (IR) is the absorbed dose, which is defined as the average energy deposited by the radiation per unit of mass of the irradiated volume (ICRP, 1990). Knowledge about levels of doses is important in radiological protection in order to evaluate the consequences to the health of exposed people (Amaral, 2002). In general, the absorbed dose can be directly determined by physical dosimeters (such as film or TLD badges, semiconductors and ionisation chambers) or indirectly, by numerical models (Germain, 1995).

In most cases of real or suspected accidental exposures to IR, however, physical dosimetry cannot be performed for retrospective estimates, principally due to the lack of information about the irradiation conditions. In such situations, biological dosimetry (biodosimetry) has been proposed as an alternative method, which is based on the investigation of cellular and molecular changes (biomarkers) induced by IR, in order to

correlate them with the radiation dose (Bonassi and Au, 2002; IAEA, 2001). In particular, scoring of chromosomal aberrations from peripheral blood lymphocytes has been developed into a valuable biodosimetric tool in radiological protection (Lloyd, 1998).

This has proved its value on many occasions. For example, in real cases of overexposure to IR, information on biological effects assists the medical team in the planning of therapy of the exposed people and alerts them to the deterministic health consequences that could arise in the following weeks and months (IAEA, 2001; Lloyd, 1998; Voisin et al., 2001). For exposures below the level where treatment is needed, as in the case of workers occupationally exposed to IR, chromosome damage information is important in counselling irradiated persons on risks of developing late biological effects, such as cancer (IAEA, 2001; Lloyd, 1998). Finally, the assay can relieve a lot of anxiety when persons wrongly suspect that they have been irradiated (Lloyd, 1998).

Stable and unstable chromosomal aberrations are the most extensively investigated effects in cytogenetic dosimetry. Stable chromosomal aberrations (translocations, deletions and insertions) are gross structural changes on the chromosomes that tend to remain in the cells for a long period of time. Generally they can pass successfully through cell divisions and therefore they are recommended for retrospective evaluations (Lloyd, 1998; Natarajan, 2002; Ramalho et al., 1995; Voisin et al., 2002). On the other hand, the assay for unstable chromosomal aberrations (dicentrics, rings and fragments) is well established and accurate, especially when the blood samples are obtained within a few weeks after radiation exposure (IAEA, 2001; Lloyd, 1998; Voisin, 2001).

The union of two different chromosomes forms a dicentric after irradiation. The union of the extremities of the same chromosome forms a ring and the fragment is the part of the chromosome without the centromeric region (IAEA, 2001). Besides the use of this biomarker, there is another easier and potentially faster cytogenetic technique, namely the micronucleus test (Voisin et al., 2000). Micronuclei are formed from chromosomal fragments or lagging chromosomes at an anaphase, and are not included in the principal nuclei of daughter cells. They are therefore seen as distinctly separate objects within the cytoplasm of the binuclear cell (IAEA, 2001).

However, the analysis of alterations involving visualising the centromeric region is sometimes difficult. For this reason, techniques such as fluorescent *in situ* hybridisation (FISH) and C-banding were developed to aid the identification of the heterochromatic region, which accompanies the centromeres of all human chromosomes, except Y (Guerra and Souza, 2002).

In this context, the aim of this research was to compare the analysis of unstable chromosomal aberrations and micronuclei in the biomonitoring of workers occupationally exposed to IR. Another objective was to evaluate the use of the C-banding technique as a quality control tool to confirm the presence of dicentrics and rings.

2 Materials and methods

2.1 Subjects

Eight health professionals (four males and four females) from three different hospitals in Recife (Brazil), were investigated. They were chosen based on their work functions:

302 *T. de Salazar e Fernandes, A. Amaral, M. Brayner, et al.*

- 1 auxiliary nurse
- 1 administrator
- 1 technician
- 3 medical physicists
- 2 orthopedic traumatologists.

The first two were selected as control subjects who do not work with radiation and the other six subjects have received radiation doses.

All subjects gave written informed consent before the beginning of this study for approval from the hospital ethical practices committees and completed a questionnaire about work and lifestyle. Table 1 summarises some information obtained from the questionnaires. None of the subjects had received medical irradiation as patients.

Table 1 Data of the professionals studied

<i>Professionals</i>	<i>Hospitals</i>	<i>Job</i>	<i>Time of work (years)</i>	<i>Age (years)</i>	<i>Sex</i>
A	I	Auxiliary nurse	9	48	F
B	I	Administrator	10	39	F
C	I	Technician	5	34	M
D	I	Medical physicist	8	33	F
E	I	Medical physicist	2	43	M
F	II	Medical physicist	18	41	M
G	III	Traumatologist	13	36	M
H	III	Traumatologist	15	43	F

2.2 *Lymphocyte culture*

2.2.1 *Unstable chromosomal aberrations*

Five ml blood samples were collected into heparinised tubes and peripheral lymphocytes were cultured for 48 h in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ in air at 37°C. Whole blood (0.3 ml) of each subject was added to a culture medium that consisted of 4 ml of RPMI 1640 supplemented with 20% fetal calf serum and 2% phytohaemagglutinin (Cultilab, Campinas-SP, Brazil). To block the cells in the metaphase stage, Colcemid (Sigma-Aldrich, Irvine, UK) was added for the last two hours of culture at a final concentration of 0.1 µg/ml. The lymphocytes were harvested by centrifugation and hypotonic shock with 75 mM KCl. Following this, the cells were washed and fixed with 3:1 methanol: acetic acid. Slides were made for each sample and stained with 10% Giemsa and mounted. The slides were examined with an optical microscope (Olympus BX 60) and cells were classified as aberrant if they had one or more unstable chromosomal aberrations (dicentrics, rings and fragments).

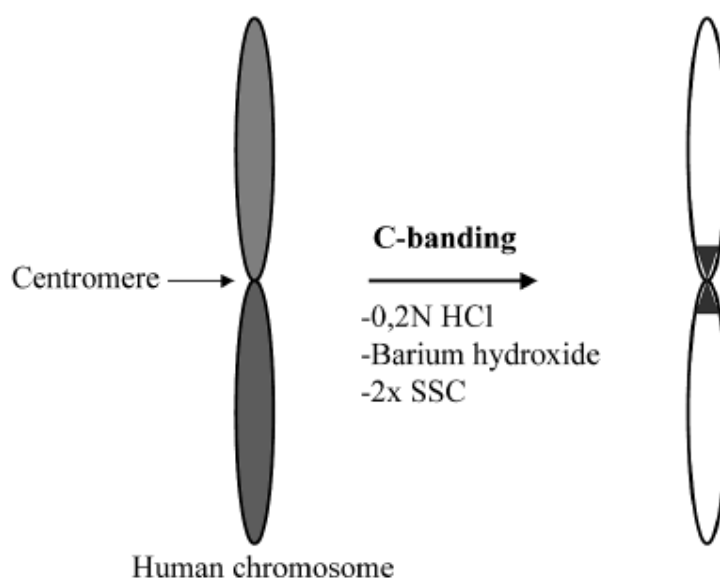
2.2.2 Micronuclei

The lymphocytes were cultured as described above but for 72 h. The culture medium consisted of 4 ml of RPMI 1640, supplemented with 27% of fetal calf serum and 1.8% of phytohaemagglutinin (Cultilab, Campinas-SP, Brazil). Cytochalasin B (Sigma-Aldrich, Irvine, UK) was added to the medium at a final concentration of 5 µg/ml for the last 28 h of culture to inhibit cytokinesis. The hypotonic shock was applied with NaCl 0.9% and the cells were fixed with 3:1 methanol: acetic acid. Slides were made for each sample and stained with 10% Giemsa, mounted and examined with an optical microscope (Leitz Wetzlar MPV2) and the frequency of micronuclei was scored in binucleate cells.

2.3 C-banding

The metaphase preparation slides previously scored for unstable aberrations were restained by the C-banding technique, to make evident the centromeric region of human chromosomes (Figure 1) and confirm the presence of dicentrics and rings. The slides were placed in 0.2 N HCl at room temperature for 30 min, followed by 5% barium hydroxide at 60°C for 30 sec–1 min and then 2×SSC at 60°C for a further 45 min (Prosser, 1975).

Figure 1 Diagram of C-banding technique



3 Results and discussion

3.1 Aberration frequencies

All the frequencies of unstable chromosomal aberrations and micronuclei are summarised in Table 2.

Table 2 Frequencies of unstable chromosomal aberrations and micronuclei each in 1000 cells of the study subjects

<i>Workers</i>	<i>Dc</i>	<i>R</i>	<i>Fr</i>	<i>FUCA</i>	<i>MN</i>	<i>FMN</i>
A	0	0	0	0.000	5	0.005
B	0	0	0	0.000	9	0.009
C	1	0	2	0.003	14	0.014
D	3	0	2	0.005	18	0.018
E	2	1	2	0.005	14	0.014
F	6	1	0	0.007	40	0.040
G	1	0	0	0.001	2	0.002
H	9	1	1	0.011	33	0.033

Notes: Dc – dicentrics; R – centric rings; Fr – fragments; FUCA – frequency of unstable chromosomal aberrations; MN – micronuclei; FMN – frequency of micronuclei.

Analyses of unstable chromosomal aberrations and micronuclei in lymphocytes of the auxiliary nurse (A) and administrator (B), who are not occupationally exposed to radiation, served to indicate the contribution of the background radiation in hospital activities. No unstable aberrations were observed in 1000 metaphases from these two people and their micronucleus frequencies, also in 1000 binucleate cells, can be considered as baseline and were similar to results obtained elsewhere with an unexposed control individual (Magnata, 2002). Considering different populations, the spontaneous frequency of dicentrics does not vary significantly, being of the order of 1 per 2000 lymphocytes (Bonassi and Au, 2002; Voisin, 1997).

Table 2 shows that, compared with persons A and B, the results for the technician C and three physicists (D, E and F) were all elevated. D and E primarily work with diagnostic X-ray equipment in hospital I while F works in the nuclear medicine department of hospital II. During questioning, F declared that he did not always use a lead apron, which might account for his cytogenetic aberration frequencies being higher than those of the other two physicists.

With regard to the two traumatologists, G had a lower frequency of unstable chromosomal aberrations and micronuclei than H. Both work with X-rays including fluoroscopy procedures in hospital III. At interview, G confirmed that he followed the radioprotection rules, while H admitted that he rarely uses a lead apron during the surgical procedures. These results are in agreement with Zakeri and Assaei (2004), who observed a higher frequency of unstable chromosomal aberrations and micronuclei in cardiologists, nurses and technicians who do not always use a lead apron in angiocardiology clinics in Iran.

Also in both cases the traumatologists' exposures were to their hands frequently in the primary beam and, for person G, these repeated exposures were sufficient to have caused chronic radio-dermatitis over both hands. For person H, who worked less, there was one small patch of dermatitis noted, but for this person, working routinely without an apron, the whole body was regularly exposed to scattered radiation. It is this exposure in H that is reflected in the frequency of chromosomal damage shown in Table 1, representing whole body irradiation. In situations such as person G, with exposure confined to a very small percentage of the body volume, cytogenetics is inefficient in detecting this, so that an aberration frequency consistent with normal background is unsurprising.

The hospitals' safety regulations state that radiation exposed staff should wear lead aprons and also personal dosimeter badges. However, it had already been noted that most of the radiation workers in these hospitals do not always strictly adhere to these requirements during their routine procedures (Zakeri and Assaei, 2004). As a result, an investigation of radioprotection conditions of work on the basis of personal physical dosimetry may lead to a misinterpretation of safety conditions. It was for this reason that cytogenetics was proposed as a complementary method for the monitoring of such workers.

The *Comissão Nacional de Energia Nuclear* (CNEN) is the Brazilian authority on radiation safety, which has endorsed the ICRP recommended dose limits of 20 mSv per year for occupational exposures, averaged over five years, with the restriction that the dose should not exceed 50 mSv in a single year (CNEN, 2005).

CNEN requires that all professionals occupationally exposed to ionising radiation must wear dosimeters, such as thermoluminescent or film badges or other devices used for recording cumulative dose (CNEN, 2005). These data must not be released to workers or the public and therefore have not been included in this paper. However, it may be stated that all personal physical dosimetric reports showed no instance of a person having exceeded the dose limit. However, as discussed above, adherence to the regulations concerning wearing of dosimeters is haphazard and when local officials were questioned about how often non-wearing would happen, the answer was 'very frequently'. It was added by some officials that this is particularly so when staff were undertaking non-routine emergency procedures.

In Brazil, as in all countries, monitoring by physical dosimeters is the legally required method of personal dosimetry for radiation workers and it is the results of this monitoring that becomes the official record of their cumulative radiation exposure (CNEN, 2005; ICRP, 1990). The issuing and processing of film or TLD badges is simple and relatively cheap so that they can be applied to many thousands of workers. Badges are very sensitive to low levels of radiation and accurately record the dose. However this monitoring suffers from one major disadvantage, namely that the dose on the badge may not truly reflect the dose to the individual. Persons may choose not to wear their badge, badges may be accidentally left near radiation sources or persons may work with beams of radiation so that the exposure to a primary beam or to scattered radiation incident on the body is heterogeneous. The badge is monitoring just a few square centimetres of the body at the wearing position and so in heterogeneous fields it is difficult to relate this to the average whole body dose.

In contrast, biological cytogenetic monitoring uses circulating blood lymphocytes which are ubiquitous throughout the body. The effect is therefore to indicate an averaging of the body exposure. One drawback of biological monitoring is cost, which prevents it being used routinely on all workers in a way analogous to the dosimeter badge. It is therefore better deployed, as in the present study, where there are grounds for concern.

Another important difference is that the badge record is cumulative throughout the working life of the individual. On the other hand, chromosome monitoring by unstable aberrations or micronuclei is using a signal that declines with time as lymphocyte renewal occurs. Fortunately the cell types used have a relatively long lifespan. In persons with normal haematology the replacement half time is around three years, although individual variability will exist. This means that, in effect, aberrations or micronuclei are indicating radiation exposures received during the most recent few years (IAEA, 2001) and, therefore, in the context of the present study, would not indicate exposure to persons C-H during the early stages of their careers.

3.2 Comparison between methods

The time required to obtain cells in metaphase to evaluate the frequency of unstable chromosomal aberrations is shorter than that to evaluate micronuclei in binucleate cells. However the analysis of chromosomal aberrations is more laborious and time consuming than for micronuclei. In 2 h it was possible to count about 50 metaphases and 500 binucleate cells, similar to values reported by Voisin et al. (2000). Therefore, the time required for the analyses of unstable chromosomal aberrations was ten times higher than that required for the micronucleus assay (Table 3).

Whilst the micronucleus assay is clearly more time and therefore cost efficient Table 4 summarises the relative advantages and limitations of the two assays.

Table 3 Comparison between the methods of unstable chromosomal aberrations (UCA) and micronuclei (MN)

<i>Method parameters</i>	<i>UCA</i>	<i>MN</i>
Blood volume/culture	0.3 mL	0.3 mL
Culture time	48 h	72 h
Colcemid add	46 h	X
Cytochalasin B add	X	44 h
Number of observed cells	1000	1000
Staining	Giemsa	Giemsa
Cells scoring time	40 h	4 h

Table 4 Advantages and limitations of the analysis of unstable chromosomal aberrations and micronuclei

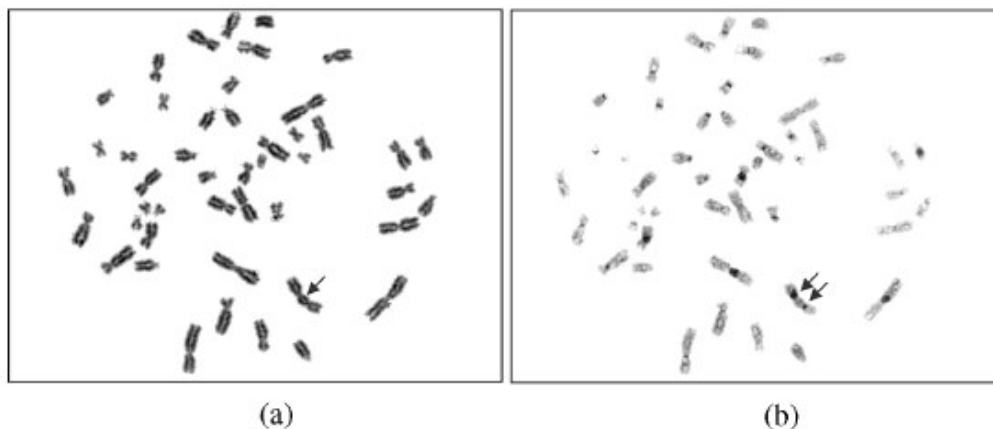
	<i>Advantages</i>	<i>Limitations</i>
MN	Faster and easier microscope analysis	Higher background – less specific to radiation. Can be induced by chemicals too
UCA	Less background – more specific to radiation because few chemicals and drugs induce dicentrics and rings	Slow and laborious microscope analysis, requiring more skill

These comparisons suggest the use of micronucleus assay for a preliminary investigation of a cohort of people with suspected overexposure to ionising radiation, followed-up by the analysis of chromosomal aberrations to confirm such exposures and assess the radiation dose more accurately.

3.3 C-banding

The C-banding technique was effective in confirming the presence of dicentric chromosomes, as shown in Figure 2. Figure 2a shows a metaphase and the presence of a possible dicentric chromosome (arrow) with Giemsa block staining. Figure 2b shows the same metaphase and confirmation of the dicentric by the C-banding technique, where denser staining highlights the regions of constitutive heterochromatin (centromeres).

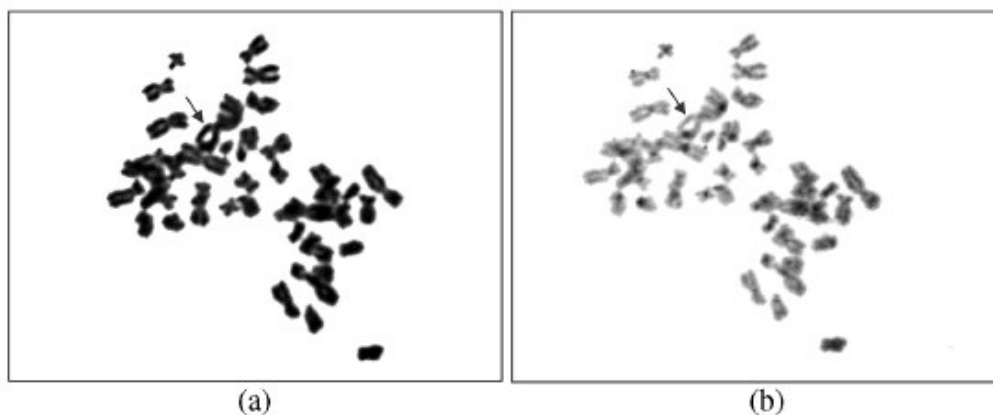
Figure 2 Metaphases presenting one probable dicentric chromosome (A) and its confirmation by C-banding (B)



The same enhancement of staining by C-banding could confirm ring chromosomes.

Figure 3a shows a ring (arrowed) in a poorly spread metaphase somewhat over-stained with Giemsa and in Figure 3b it can be seen that the centromeric region becomes much more easily distinguished after C-banding.

Figure 3 Metaphase containing one possible ring chromosome (A) and its better appearance after C-banding (B)



The results obtained with C-banding are similar to those that can be obtained with fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) using a pan-centromeric probe but C-banding is much cheaper and requires less complicated laboratory processing.

4 Conclusions

The results obtained in this study of a relatively small number of individuals clearly showed that the frequencies of unstable chromosomal aberrations and micronuclei in

lymphocytes of the peripheral blood from health professionals occupationally exposed to ionising radiation are correlated with their individual conditions of radioprotection. In contrast, routine personal physical monitoring with dosimeter badges had given no cause for concern. The study has shown that there is room for improvement in enforcing observance of good radiation protection practices. The demonstration of actual biological effects in exposed staff is a salutatory lesson that may be used to improve the perception of risk and the radiation safety ethos of these professionals. Comparison between the biological assays showed that the analysis of micronuclei is faster than that of unstable chromosomal aberrations, leading to a suggestion for the use of the micronucleus assay as a preliminary screening test in the investigation of suspected accidental exposures to ionising radiation. The C-banding technique was useful in removing ambiguity in the microscope identification of some dicentric and ring chromosomes.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE-Brazil) for the contribution in this research and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil) for supporting this work.

References

- Amaral, A. (2002) 'Trends in biological dosimetry: an overview', *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Vol. 45, No. especial, pp.119–124, September 2002.
- Bonassi, S. and Au, W.W. (2001) 'Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction', *Mutation Research*, Vol. 551, pp.73–86.
- Bonassi, S. and Au, W.W. (2002) 'Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction', *Mutation Research*, Vol. 511, pp.73–86.
- Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) (2005) Diretrizes Básicas de Proteção Radiológica, CNEN/NN – 3.01.
- Germain, J. St. (1995) 'Radiation monitoring with reference to the medical environment', *Health Physics*, Vol. 69, No. 5, pp.728–749.
- Guerra, M. and Souza, M.J. (2002) *Como Observar Cromossomos*, Ribeirão Preto, SP: Ed. FUNPEC-Editora, p.131.
- International Atomic Energy Agency (IAEA) (2001) 'Cytogenetic analysis for radiation dose assessment', *Technical Report Series*, Vienna, No. 405.
- International Commission on Radiological Protection (ICRP) (1990) Recommendations of the International Commission on Radiological Protection, *ICRP Report 60*, Elmsford, NY: Pergamon Press, ICRP Publication.
- Lloyd, D. (1998) 'New developments in chromosomal analysis for biological dosimetry', *Radiation Protection Dosimetry*, Vol. 77, pp.33–36.
- Magnata, S.P., Serafim, I., Netto, J., Gomes, P., Netto, A.M. and Amaral, A. (2002) 'Unstable chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes from patients with cervical uterine cancer following radiotherapy', *Cellular and Molecular Biology*, Vol. 48, pp.809–811.
- Natarajan, A.T. (2002) 'Chromosomal aberrations: past, present and future', *Mutation Research*, Vol. 504, pp.3–16.

- Prosser, J.S. (1975) 'Identification of dicentric chromosomes in irradiated lymphocytes by C-banding', *Mutation Research*, Vol. 27, pp.131–133.
- Ramalho, A.T., Curado, M.P. and Natarajan, A.T. (1995) 'Lifespan of human lymphocytes estimated during a six year cytogenetic follow-up of individuals accidentally exposed in the 1987 radiological accident in Brazil', *Mutation Research*, Vol. 331, pp.47–54.
- Voisin, P. (1997) 'Chromosome lesions as short and medium term biological indicator of acute irradiation', in: L. Court and A. Lallemand (Eds.) *L'Homme Blessé*, Paris, pp.139–150.
- Voisin, P., Barquinero, F., Blakely, B., Lindholm, C., Lloyd, D., Luccioni, C., Miller, S., Palitti, F., Prasanna, P.G.S., Stephan, G., Thierens, H., Turai, I., Wilkinson, D. and Wojcik, A. (2002) 'Towards a standardization of biological dosimetry by cytogenetics', *Cellular and Molecular Biology*, Vol. 48, No. 5, pp.501–504.
- Voisin, P., Benderitter, M., Claraz, V., Chambrette, I., Sorokine-Durm, M., Delbos, V., Durand, A.L. and Paillole, N. (2001) 'The cytogenetic dosimetry of recent accidental overexposure', *Cellular and Molecular Biology*, Vol. 47, pp.557–565.
- Voisin, P., Paillole, N., Benderitter, M., Claraz, M., Chambrette, V., Delbos, M., Durand, V., Leroy, A. and Sorokine-Durm, I. (2000) 'Improvement of biological dosimetry by cytogenetics for operational purposes: dicentrics or micronuclei?', *Proceedings of the 10th International Congress of the International Radiation Protection Association on Harmonization of Radiation, Human Life and Ecosystem*, Japan, Health Physics Society, Vol. 1, P-3a-217, p.6.
- Zakeri, F. and Assaei, R.G. (2004) 'Cytogenetic monitoring of personnel working in angiocardiology laboratories in Iran hospitals', *Mutation Research*, Vol. 562, pp.1–9.

Notes

This paper was presented at the 2005 International Nuclear Atlantic Conference – INAC 2005, Santos, SP, Brazil, August 28–September 2, 2005.

A comparison of different cytological stains for biological dosimetry

THIAGO SALAZAR FERNANDES¹, DAVID LLOYD², & ADEMIR AMARAL¹

¹Grupo de Estudos em Radioproteção e Radioecologia (GERAR), Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências/Departamento de Energia Nuclear, Cidade Universitária, Pernambuco, Brazil, and ²Health Protection Agency/Radiation Protection Division, Chilton, Didcot, Oxfordshire, UK

(Received 27 November 2007; revised 9 May 2008; accepted 21 May 2008)

Abstract

Purpose: This paper examines the relative accuracy of analysis of unstable chromosomal aberrations (dicentric, rings and fragments) in lymphocyte metaphases using four microscope slide staining options, widely used to assess radiation overdose or to survey occupationally exposed subjects.

Materials and methods: Peripheral blood lymphocytes from a healthy donor were irradiated with 1.5 and 3.0 Gy of X-rays at a dose rate of 0.715 Gy/min. Dicentric were scored by different cytological stains in order to compare block staining: Giemsa and 4', 6-Diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI); with techniques that highlight centromeres: C-banding and Centromere Multiplex Fluorescence *in situ* Hybridization (CM-FISH).

Results: At each of the two doses, the values for dicentric per cell observed with each staining method were compared. In terms of dose estimation, no statistical difference was observed between the evaluated methods (χ^2 p: 0.27 and 0.64, respectively; analysis of variance – ANOVA, $p > 0.99$). Therefore, the evidence of centromeres by C-banding and CM-FISH did not promote an increased discovery of dicentric. On the other hand, when confirmation of unequivocal identification of dicentric is needed, C-banding and CM-FISH can be a suitable method to confirm its presence. Economical and social factors must be taken into account in the decision of method as well.

Conclusion: For routine use where several hundreds of cells need to be reliably processed and analyzed daily, processing slides by block staining with Giemsa and DAPI is preferable. However, to assist in resolving the minority of images that are ambiguous, C-banding and CM-FISH provide a better identification of suspected dicentric.

Keywords: Cytological stains, biological dosimetry, FISH, C-banding, DAPI, Giemsa

Introduction

The estimation of absorbed dose based on bioindicators is an important tool in the investigation of suspected or actual exposure of persons to ionizing radiation. It is particularly valuable in radiological or nuclear emergencies where subjects, such as members of the public, are not wearing conventional physical dosimeters. In such cases, physical dosimetry is not straightforward and the dose evaluation based on bioindicators, so-called biodosimetry, can often provide the necessary information. This information can assist clinicians preparing to treat patients displaying the effects of high dose exposures (International Atomic Energy Agency [IAEA] 2001).

It is also informative for dealing with persons receiving low dose exposures which is likely to be the

majority of people involved in most emergency scenarios. Here, the need is for reliable dosimetric information that can form the basis for counselling persons about risks of later arising stochastic disease. These people generally have exaggerated fears for their risk of radiation-induced cancer (Lloyd 1998, IAEA 2001).

The analysis of unstable chromosome aberrations (dicentric, fragments and rings) in metaphases of cultured peripheral blood lymphocytes is a long established method of biological dosimetry for ionizing radiation (IAEA 2001, Amaral 2002).

The dicentric chromosomes characterized by possessing two centromeres instead of the single one that is borne on normal chromosomes, has been described as the 'gold standard' for biological dosimetry. There is an extensive literature illustrating

Correspondence: Thiago Salazar Fernandes, Grupo de Estudos em Radioproteção e Radioecologia (GERAR), Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências/Departamento de Energia Nuclear, Avenida Professor Luiz Freire, 1000 50740-540, Cidade Universitária, PE, Brazil.
E-mail: thiagosalazar@hotmail.com

how the method can confirm or refute suspected cases of overexposure and, where confirmed, provide an estimate of dose quite independent of physical and mathematical methods (Lloyd 1997, 1998, Lloyd et al. 2000, IAEA 2001).

The radiation dose is derived by comparing the frequency of dicentrics in lymphocyte metaphases from the irradiated subject with an *in vitro* dose response curve produced in the same laboratory with a comparable quality of radiation. Since its beginnings in the mid-1960s, the method has been extensively refined and calibrated so that it now occupies a significant place in the radiological protection programmes of many countries and, in some, has been given special forensic status (Bender 1964, Voisin et al. 2001, 2002).

The most commonly used stain for aberration scoring and for obtaining the calibration curves is Giemsa; either as a block stain or in the differential 'harlequin' (fluorescence plus Giemsa – FPG) mode to distinguish the cell's *in vitro* cycling history. Giemsa stain requires simple bright field microscopy. Other block stains may be used such as DAPI (4', 6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride) or PI (propidium iodide) combined with UV (ultraviolet) fluorescence microscopy.

Block staining requires the distinction of centromeres as constrictions of the chromosomes, or possibly by a different intensity of stain uptake compared with the chromosome arms. This can lead to interpretational problems when, for example, chromosomes bear secondary constrictions or are acrocentric with satellite association and perhaps with widely separated arms beginning to enter anaphase. Also a dicentric with two juxtapositioned centromeres may be difficult to distinguish from a simple monocentric chromosome. This is why it is often remarked that the assay requires experienced skilled microscopists (Kanda & Hayata 1996, Roy et al. 1996).

Intuitively, staining methods that permit preferential staining of the critical centromeric regions such as C-banding should enhance the discrimination of centromeres and it may therefore be possible to identify dicentrics more positively, eliminating some of the scorer error. However, some options may cause concomitant swelling of chromosomes which distort the optical resolution of the chromosome structure (Prosser 1975, Fernandes et al. 2006).

This paper describes the use of two block stains, Giemsa and 4', 6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI), and two centromere highlighting methods, C-banding and Centromeric Multiplex Fluorescence *in situ* Hybridization (CM-FISH) on replicate slides, for the visualization of dicentric chromosomes for biological dosimetry, pointing out the advantages and limitations of each method, and

compares the resultant estimates of absorbed doses with known doses given to *in vitro* irradiated human lymphocytes.

Materials and methods

Irradiation and lymphocyte cultures

Heparinized peripheral blood samples were obtained from a healthy male non-smoker donor and exposed to 1.5 and 3.0 Gy of 250 kVp X-rays, at a dose rate of 0.715 Gy/min and 37°C. The radiation beam filtration and exposure geometry were the same as that employed in the same laboratory for constructing its *in vitro* calibration curve for biological dosimetry (Lloyd & Edwards 1983).

The irradiated blood samples were kept at 37°C for 2 h to allow biological repair process, and then placed into culture (Gumrich et al. 1986). The culturing, fixation and slide making followed a standard procedure as described in an IAEA (2001) Manual. In brief, the culture medium used was Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) with Earle's Salts (Gibco, USA) supplemented with penicillin (10,000 units/ml), streptomycin (10,000 µg/ml), heparin (2,000 units/ml), L-glutamin (200 mM), 5-bromodeoxyuridine (20 µM), 20% foetal bovine serum and phytohaemagglutinin (reconstituted in 10 ml of sterile analytical grade water).

Each replicate culture comprised 0.3 ml of irradiated blood added to 4 ml of culture medium. They were incubated at 37°C for 48 h with Colcemid (25 µg/ml in 0.85% saline) added at 45 h. The cells were then harvested and fixed by the routine hypotonic potassium chloride/methanol: acetic acid method. Replicate fixed cultures at each radiation dose were pooled into a common stock and two drops of pelleted fixed cell suspension placed on each slide and allowed to dry. All replicate slides used in the study were prepared together in the same conditions of room temperature and humidity.

Fluorescence plus Giemsa (FPG)

This method followed the protocol given in IAEA (2001). In brief, bromodeoxyuridine (BrdU) was included in the cultures in order to permit fluorescence plus Giemsa (FPG) staining. This thymine analogue is taken up preferentially into replicating DNA. When one chromatid is bifilarly and the other one unifilarly substituted, FPG staining produces a 'harlequin' effect in the metaphase chromosome of cells which are in their second or later post-substitution division. Aberrations are normally scored in guaranteed first division metaphases, i.e., those where the chromosomes stain uniformly.

DAPI (4', 6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride)

Air-dried slides were mounted with 27 μ l of 400 ng/ml of DAPI in Vectashield antifade mountant that consist of 500 μ l Vectashield plus 2 μ l of DAPI stock 100 μ g/ml.

CM-FISH (Centromeric Multiplex FISH with DAPI counterstained)

This method was adapted from two published protocols: Finnon et al. (1995) and Hone et al. (2005). In essence, a human pan-centromere probe (Cambio, UK) was hybridized onto the metaphases. The fluorochrome Texas Red was then added by the immunological avidin/biotinylated anti-avidin procedure. The metaphases were then counterstained with DAPI.

C-banding

This technique was adapted from two published protocols: Prosser (1975) and Fernandes et al. (2006). Basically, three-day-old slides were placed in hydrochloric acid 0.2 N at room temperature for 30 min and then washed three times in distilled water. Next, they were incubated in barium hydroxide 5% at 60°C for 1 min, washed for 2 min each in 0.2 N HCl and distilled water, then 2 $\times$ SSC solution at 60°C for 45 min and finally in distilled water. Air-dried slides were stained with a solution of Giemsa 2% in phosphate buffer pH 6.8 for 10 min. The stain intensity was checked and if insufficient the slides were re-immersed in Giemsa for a further 5–10 min.

Aberration scoring

The microscopy was carried out by one technician on coded slides. Strict scoring criteria were employed based on those recommended in IAEA (2001). Metaphases were required to be complete, i.e., to contain 46 centromeres. Thus from the examination of all chromosomes in the spread acentric fragments were either classed as excess acentrics or associated with dicentrics or centric rings. It was verified from the FPG material that the frequency of second cycle metaphases was acceptably low (<10%) in the material from both radiation doses (1.5 and 3.0 Gy). The M2 cells were ignored during scoring with FPG. Chromosome Y was not misidentified as a fragment because of the clear demarcation of its heterochromatic region by both C-banding and CM-FISH. The Giemsa and C-banding assays were carried out with a bright field microscope and the DAPI and CM-FISH assays

with a UV fluorescence microscope. With the latter, a DAPI filter was used for both assays to observe the DAPI signal alone and for CM-FISH a triple pass filter also allowed the blue DAPI and red centromeres to be observed together. The images were captured in the magnification of 100 $\times$ using the MetaSystem Karyotyping and FISH Imaging Isis software (Germany). For each staining method, 600 metaphases were scored from the blood samples irradiated to 1.5 Gy and 160 metaphases for 3.0 Gy.

Dose estimation

Doses were estimated from each experimental point for comparison with the given doses (1.5 or 3.0 Gy). For this, the dicentric frequencies observed at the two doses and by the four staining methods were referred to a linear quadratic dose response curve ($Y = 0.001 + 0.04D + 0.06D^2$), not including standard deviations, previously produced in the same laboratory using the same X-ray source and geometry, the same lymphocyte culture method and stained by FPG.

The u-test and ratio of variance to mean were calculated for each method in order to verify that the dicentric frequencies followed a Poisson distribution. Chi squared testing was used to check for homogeneity of the data at each dose. Analysis of variance (ANOVA) was carried out in order to test for differences between the methods at each dose.

Results

Figure 1 illustrates how the addition of centromere highlighting by CM-FISH (A and B) and in a different metaphase by C-banding (C and D) can enhance the identification of a dicentric, particularly where, as in these examples, the two centromeres are close together (Meyne et al. 1989, Finnon et al. 1995, Schmid et al. 1995, Terzoudi & Pantelias 2006). The juxtaposed centromeres are almost indistinguishable, but when the same metaphase was analyzed with the two centromeres highlighted or as dark bands a dicentric chromosome could be seen.

The analysis of such highlighted spots on the same chromosome, or two dark bands in the case of C-banding, should not only aid scoring by eye using block staining methods, such as Giemsa and DAPI, but also improve detection when using computer assisted image analysis systems.

Chromosomes, particularly those in the B group, can sometimes contain a secondary constriction or a band between sister chromatids giving the appearance of a second centromere. Figure 2 shows two chromosomes, one in (A) in a metaphase stained by DAPI and another in (C) stained with Giemsa,

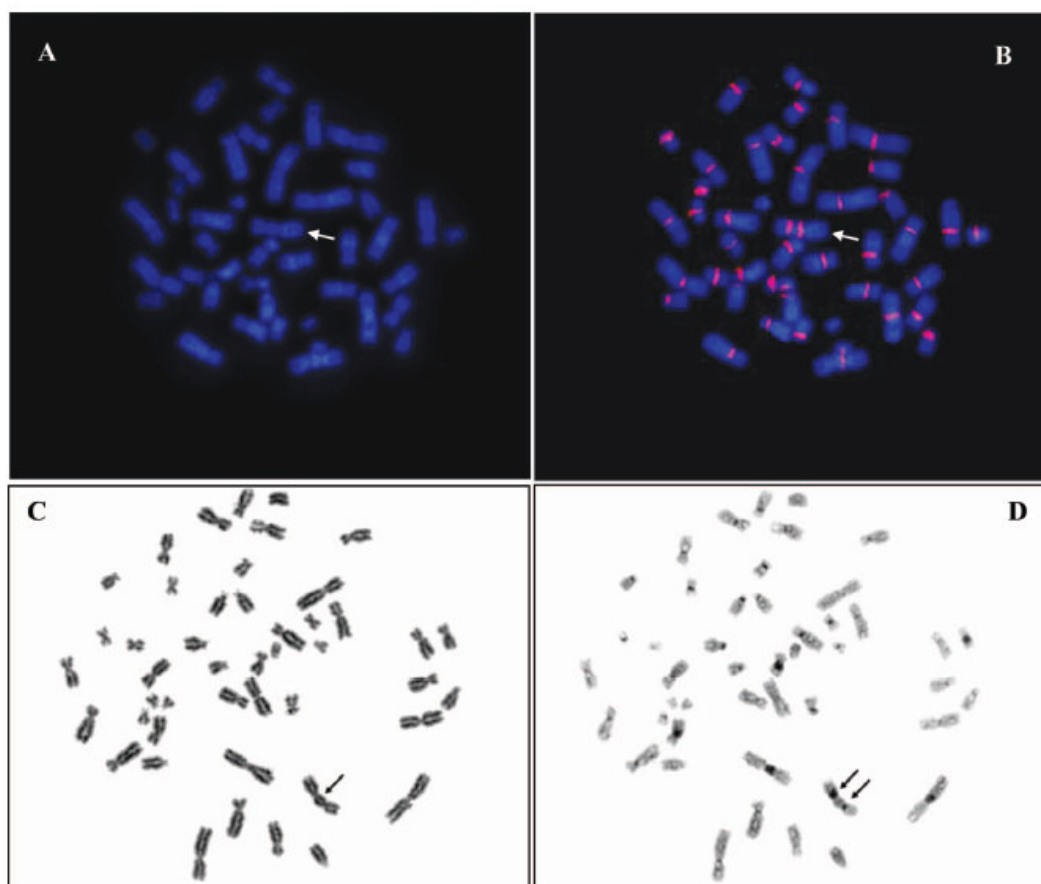


Figure 1. Confirmation of dicentrics by techniques that highlight the centromeres on optical microscope (magnification 100 $\times$). (A) A metaphase containing a possible dicentric (arrow) observed by DAPI staining and (B) its confirmation by CM-FISH. (C) Other metaphase containing a suspected dicentric (arrow) analyzed by Giemsa staining and (D) its confirmation by C-banding.

which seem to have two centromeres. When examined with CM-FISH (B) and C-banding (D), respectively, they transpired to be monocentric.

Figure 3 illustrates another situation where two chromosomes are linearly aligned and touching end-on and giving the appearance of a dicentric in a metaphase analysed by DAPI (A) or very close to each other in other observed by Giemsa (C). Here, however, their resolution as two separate objects is easier in the DAPI stained and Giemsa preparation without centromere highlighting (B) or in the case of C-banding (D), where it can be observed a satellite association between two acrocentric chromosomes giving to it the appearance of a dicentric.

In this example, if analysis had proceeded straight to the highlighted image there would have been an increased chance of a false-positive dicentric having been recorded. The same would also apply to cases of overlapping chromosomes and this experience reinforces the recommendation that block staining methods and centromeric highlighting should be

applied together, the latter as a confirmatory test of the first. The same conclusion was reached by Prosser (1975) and elsewhere by Fernandes et al. (2006) using only C-banding and Giemsa staining.

At each of the two doses, the values for dicentrics per cell observed with each staining method were compared. The results of scoring unstable chromosome aberrations (dicentrics, centric rings and acentric fragments), and the doses estimated using dicentrics frequencies for each method, are presented in Tables I and II. For better comparison of these results, the dicentric frequencies are also presented in Figure 4. The errors presented are based on the scoring statistics alone and the relatively minor contribution from the curve is ignored. This is the so-called 'simplified approach C' in the IAEA Manual (IAEA 2001).

Discussion

The results in both Tables I and II show that there is an overall good agreement between the estimated

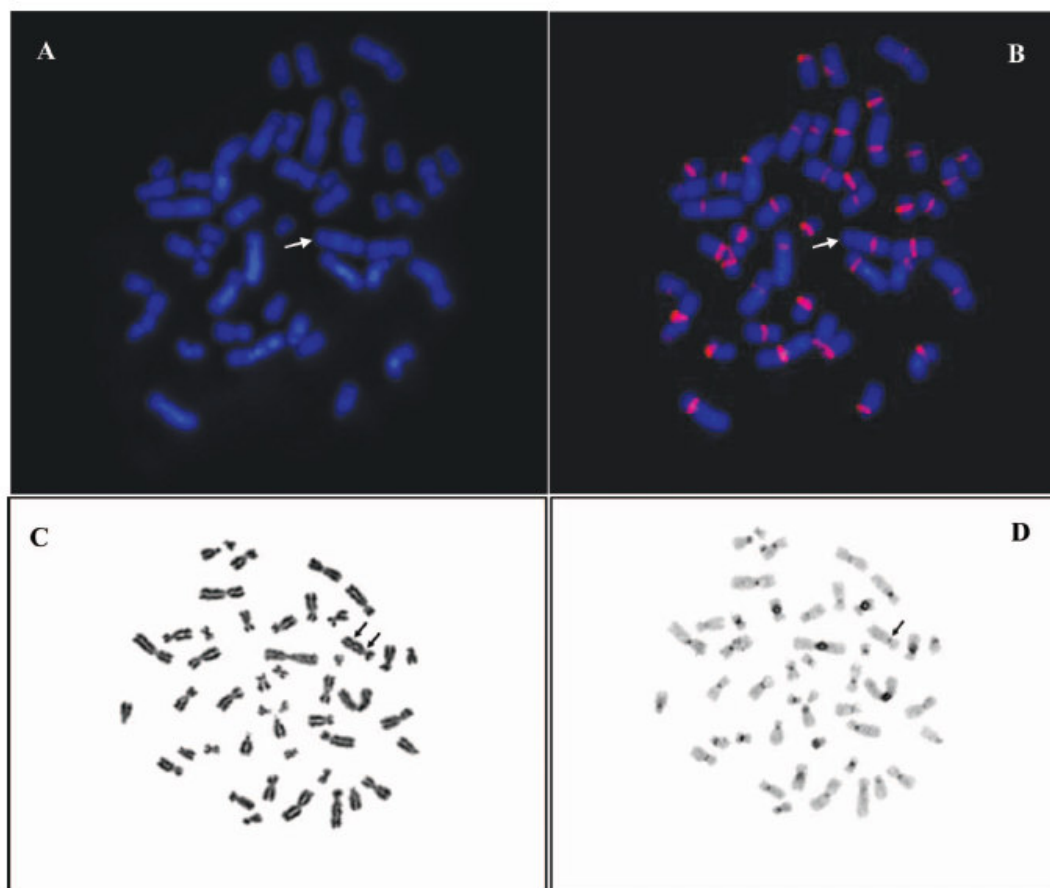


Figure 2. Confirmation of monocentric chromosomes on optical microscope (magnification $100\times$). (A) A metaphase containing a possible dicentric (arrow) observed by DAPI and (B) its confirmation as monocentric with CM-FISH. (C) Other metaphase containing a suspected dicentric (arrow) analysed by Giemsa and (D) its confirmation as monocentric with C-banding.

absorbed doses using each method and the actual ones given to the blood samples. The actual dose is within the 95% confidence limits ($2 \times \text{SE}$) of the estimated values for all staining methods. The u-tests and ratios of variance to mean indicate that, in most cases, the dicentric distribution was Poissonian as expected for X-rays (Edwards et al. 1979).

There is some indication of under-dispersion with the C-banding method at both 1.5 and 3 Gy. This might indicate that the C-banding method is less efficient at detecting cells with more than one dicentric than the other methods. This can be explained by the fact that with barium hydroxide treatment the quality of chromosome staining becomes inferior and some metaphases are disrupted or are with dirty of barium crystals on the slides, most of them impeding the total visualization of metaphases.

Other additional explanation is that C-banding stains heavily centromeres of 1, 9, 16 and entire Y

chromosome, thus, some dicentrics involving the others chromosomes can be mis-scored. Furthermore, scorer variation can interfere in the scoring of more than one dicentric per cell by C-banding, for subjective reasons. Nevertheless, estimated dose results are close to the estimates using the other three methods indicating that C-banding is reliable method for biological dosimetry.

The method which yielded a dose estimate closest to 1.5 Gy (Table I) was CM-FISH. It was a small improvement over DAPI alone and Giemsa and this is perhaps not surprising as the specific highlighting allows recognition of a fraction of less obvious centromeres. CM-FISH produced a dose estimate essentially the same as obtained with C-banding, but also the contribution of false-positive dicentrics must be considered here for the higher yield of dicentrics scored by these methods.

However this trend is not so obvious at 3.0 Gy (Table II) where Giemsa staining resulted in the

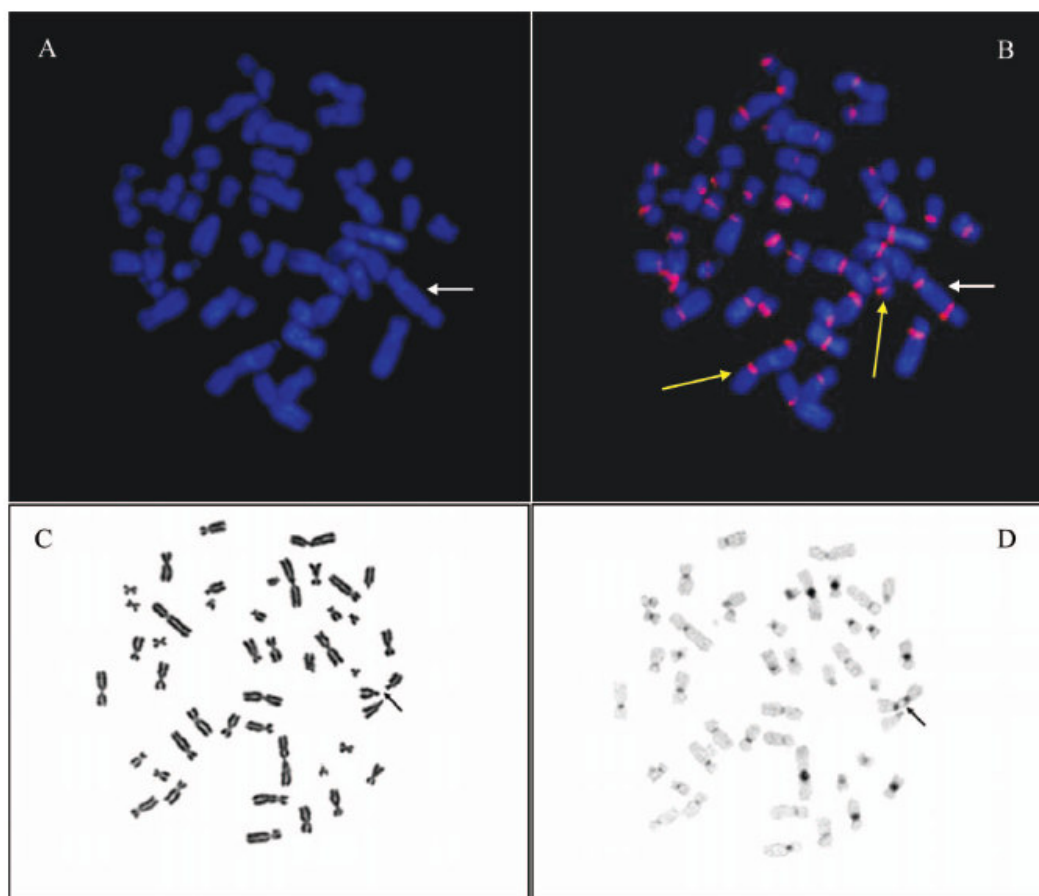


Figure 3. Presence of false-positive dicentrics by block staining methods on optical microscope (magnification $100\times$). (A) A possible dicentric (arrow) observed with DAPI and (B) its confirmation with CM-FISH. The CM-FISH staining also shows two examples of false-positive dicentrics. (C) Other metaphase with two separate acrocentric chromosomes (arrow) observed by Giemsa and (D) a satellite association between them giving the appearance of dicentric (false-positive) after C-banding.

Table I. The aberration yields scored with various staining methods, dicentric distributions and tests for their conformity with Poisson and estimated doses with standard errors and 95% confidence limits from cells irradiated with 1.5 Gy.

Aberrations in 600 cells					Dicentric distribution					Var/mean	u-test	Estimated dose (Gy)
Method	Dicentrics	Centric rings	Acentric fragments	Dicentric yield	0	1	2	3	4			
Giemsa	105	4	53	$0.175 \pm 0.016^*$	503	89	8	0	0	0.979 ± 0.058	-0.365	1.40 ± 0.08 (1.24 – 1.57)
DAPI	102	3	62	$0.170 \pm 0.016^*$	507	84	9	0	0	1.010 ± 0.057	0.142	1.37 ± 0.08 (1.22 – 1.55)
C-band	125	7	52	$0.208 \pm 0.017^*$	480	115	5	0	0	0.873 ± 0.058	-2.200	1.55 ± 0.08 (1.40 – 1.73)
FISH	124	5	77	$0.207 \pm 0.017^*$	482	112	6	0	0	0.892 ± 0.058	-1.880	1.54 ± 0.08 (1.39 – 1.72)

*The errors on the dicentric yield indicate the Poisson standard error in the mean of 600 cells.

estimate closest to the true dose. It is interesting to note that all staining methods at 3.0 Gy tended to underestimate the dose but the upper confidence limits nevertheless extend to over 3.0 Gy. Overall, there were no statistical differences between the estimated doses at 1.5 or 3.0 Gy (χ^2 p: 0.27 and 0.64,

respectively; analysis of variance – ANOVA $p > 0.99$).

Cytological staining methods that highlight centromeres such as C-banding and Centromeric-Multiplex FISH technique can be an important tool in cytogenetic dosimetry for identifying more easily

Table II. The aberration yields scored with various staining methods, dicentric distributions and tests for their conformity with Poisson and estimated doses with standard errors and 95% confidence limits from cells irradiated with 3.0 Gy.

Aberrations in 160 cells				Dicentric distribution					Var/mean	u-test	Estimated dose (Gy)*
Method	Dicentrics	Centric rings	Acentric fragments	Dicentric yield	0	1	2	3			
Giemsa	102	9	41	$0.637 \pm 0.038^*$	81	61	14	3	0.937 ± 0.112	-0.565	2.94 ± 0.16 (2.63 – 3.27)
DAPI	86	3	39	$0.537 \pm 0.039^*$	88	61	9	1	0.887 ± 0.112	-1.020	2.67 ± 0.16 (2.36 – 3.01)
C-band	94	8	18	$0.588 \pm 0.039^*$	74	78	8	0	0.586 ± 0.112	-3.710	2.81 ± 0.16 (2.50 – 3.14)
FISH	88	6	21	$0.55 \pm 0.039^*$	90	53	16	1	0.887 ± 0.112	-1.010	2.70 ± 0.16 (2.40 – 3.04)

*The errors on the dicentric yield indicate the Poisson standard error in the mean of 160 cells.

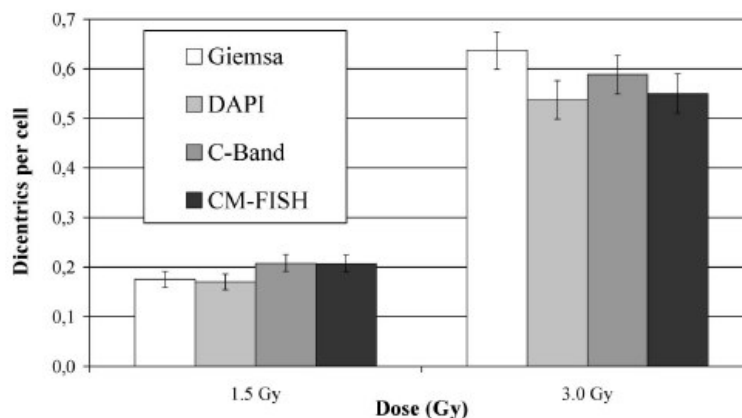


Figure 4. Frequencies $\pm$ SE (standard error) of dicentrics scored at each dose by the four staining methods.

the asymmetrical chromosome aberrations, such as dicentrics (Meyne et al. 1989). On the other hand, this method still has risk of mis-scoring due to loss of resolution associated with fluorescence compared with bright-field staining (Bauchinger et al. 1993, Kanda & Hayata 1996, Roy et al. 1996, Henegariu et al. 2001).

The quality of the chromosome images can be affected by the procedures used for C-banding because the chromosomes may become swollen after barium hydroxide treatment and a proportion of metaphases are disrupted (Prosser 1975). This swelling may make it difficult to resolve individual chromosomes where, for example, acrocentric chromosomes tend to be arranged with satellite association in metaphase spreads (Fernandes et al. 2006).

Table III resumes the ambiguous images and the perceived advantage of combining block staining with centromere highlighting with either fluorescence or bright field microscopy. The possibility in combining DAPI staining with centromeric probes, and the ability to C-band slides previously stained with Giemsa, raises the possibility of re-examining aberrations when identification is uncertain providing

confirmation in cases of doubts. It must be considered here the personal-dependence or scorer variation, in addition to technical factors, which may influence precise aberration identification for subjective reasons.

On the other hand, most of the scorer errors can be solved by using the MetaSystem Karyotyping and FISH Imaging Isis software (Germany), which provides a variety of tools to enhance, edit, annotate, archive, measure, and print the images.

Moreover, supplementary evidence of acentric fragments may draw attention to the presence of dicentrics or provide confirmation in cases of doubt, independently of the staining method.

In addition to scoring accuracy of the various methods there are other factors, such as cost of reagents and overall slide processing time that have to be considered when undertaking biodosimetry investigations. Processing by CM-FISH is not only the most expensive for reagents but also requires about 72 h to perform the method (Finnon et al. 1995, Hone et al. 2005); whilst Giemsa or DAPI staining takes just a few minutes. C-banding is intermediate at about 3 h. Although dicentrics were readily identified in C-banded and CM-FISH

preparations, scoring speeds were no quicker than with normally stained material.

Table IV summarizes these factors. Where the screening of several persons is required conventional block staining (Giemsa) is quite adequate when employing the dicentric analysis in a rapid response triage mode (Lloyd et al. 2000) or where following a serious overexposure biodosimetry is primarily being undertaken to advise clinicians of the magnitude of likely tissue and organ injuries that will need active management. Moreover, initial biological dose estimates need not be very precise when highly irradiated persons have already been identified by the symptoms of the acute radiation syndrome (Lloyd 1997).

However, in situations where confirmation of suspected dicentrics is vital, the ability of re-examine material with C-banding or CM-FISH may be an advantage, especially because every single aberration is important in order to achieve good statistics and each dicentric contributes significantly to the overall estimate of the absorbed dose. Then it is recommended that centromere highlighting techniques such as C-banding and CM-FISH could be used as a confirmatory test for the identification of dicentrics in such cases. On the other hand, costs are relevant for social and economic reasons, depending on the financial resources from the country or laboratory. This is particularly crucial when a great number of samples should be analyzed.

The present research was performed with blood samples from just one donor in order to evaluate

whether the cytological stain method influences *per se* in the identification and scoring of unstable chromosome aberrations. Despite a degree of variability in individual radiosensitivity, this parameter was not considered here once the experience from biological dosimetry would suggest that such variability would have a little influence on this practical application (IAEA 2001, Hone et al. 2005). In this context, independent of the number of studied subjects, it can be expected that the performance here obtained for each investigated method will be the same as for one donor.

Conclusions

The comparison among Giemsa, C-banding, DAPI and CM-FISH in the analysis of unstable aberrations, especially dicentrics, has shown no statistical difference between the yields of dicentrics or doses estimated using all these methods. However, these centromere highlighting methods (C-banding and CM-FISH) allows a more precise detection of dicentrics and provide confirmation in cases of doubt resolving unequivocal identification of suspected dicentrics. This suggests the use of centromere painting and C-banding as a complementary method in biological dosimetry where each dicentric makes a significant contribution to the overall dose estimate. However, for routine use, standard block staining methods still appear preferable because of its less cost and time for slide preparation.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Health Protection Agency (HPA), UK, especially Alan Edwards, Jayne Moquet, Pat Hone and Liz Ainsbury, for the contribution in this research; and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Brazil) for supporting this work.

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

- Amaral A. 2002. Trends in biological dosimetry: An overview. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 45:119–124.
- Bauchinger M, Schmid E, Zitzelsberger E, Braselmann H, Nahrstedt U. 1993. Radiation-induced chromosome aberrations analysed by two-colour fluorescence *in situ* hybridization with composite whole chromosome-specific DNA probes and a pancentromeric DNA probe. *International Journal of Radiation Biology* 64:179–184.

Table III. Causes of ambiguity and its resolution by the different methods (Giemsa, DAPI, C-banding and FISH).

Ambiguous images	Interpretation of ambiguous images (is it a dicentric?)	
	By Giemsa or DAPI	By C-banding or CM-FISH
Chromatids overlap	Doubt	Negative
Satellite association	Not seen	False-positive
Secondary constrictions	Doubt	Negative
Possible dicentric	Doubt	Positive or negative

Table IV. A summary of the relative time, cost and accuracy of the four methods.

Method	Parameters		
	Slide processing time	Costs	Accuracy
Giemsa	Few minutes	Low	Good
C-banding	3 hours	Low	High
DAPI	Few minutes	Medium	Good
FISH	72 hours	High	High

- Bender MA. 1964. Chromosome aberrations in irradiated human subjects. *Annual New York Academy of Science* 114: 249–251.
- Edwards AA, Lloyd DC, Purrott, RJ. 1979. Radiation induced chromosome aberrations and the Poisson distribution. *Radiation and Environmental Biophysics* 16:89–100.
- Fernandes TS, Amaral A, Cavalcanti MB, Braga LR, Melo RA. 2006. Unstable chromosome aberrations and micronuclei analyses in the biomonitoring of workers occupationally exposed to ionizing radiation. *International Journal of Low Radiation* 3:299–309.
- Finnon P, Lloyd DC, Edwards AA. 1995. Fluorescence *in situ* hybridization detection of chromosomal aberrations in human lymphocytes: Applicability to biological dosimetry. *International Journal of Radiation Biology* 68:429–435.
- Gumrich K, Virsik-Peuckert, Harder D. 1986. Temperature and the formation of radiation-induced chromosome aberrations. I. The effect of irradiation temperature. *International Journal of Radiation Biology* 49:665–672.
- Henegariu O, Heerema NA, Wright LL, Bray-Ward P, Ward DC, Vance GH. 2001. Improvements in cytogenetic slide preparation: Controlled chromosome spreading, chemical aging and gradual denaturing. *Cytometry* 43:101–109.
- Hone PA, Edwards AA, Lloyd DC, Moquet JE. 2005. The yield of radiation-induced chromosomal aberrations in first division human lymphocytes depends on the culture time. *International Journal of Radiation Biology* 81:523–529.
- International Atomic Energy Agency (IAEA). 2001. Cytogenetic analysis for radiation dose assessment. A manual. Tech Rept. 405. Vienna: IAEA.
- Kanda R, Hayata I. 1996. Comparison of the yields of translocations and dicentric chromosomes measured using conventional Giemsa staining and chromosome painting. *International Journal of Radiation Biology* 69:701–705.
- Lloyd DC, Edwards AA. 1983. Chromosome aberrations in human lymphocytes: Effect of radiation quality, dose and dose rate. *Radiation-Induced Chromosome Damage in Man* 23–49.
- Lloyd DC. 1997. Chromosomal analysis to assess radiation dose. *Stem Cells (Suppl. 2)*.
- Lloyd DC. 1998. New developments in chromosomal analysis for biological dosimetry. *Radiation Protection Dosimetry* 77: 33–36.
- Lloyd DC, Edwards AA, Moquet JE, Guerrero-Carbajal YC. 2000. The role of cytogenetics in early triage of radiation casualties. *Applied Radiation and Isotopes* 52:1107–1112.
- Meyne J, Littlefield LG, Moysis RK. 1989. Labelling of human centromeres using an alphoid DNA consensus sequence: Application to the scoring of chromosome aberrations. *Mutation Research* 226:75–79.
- Prosser JS. 1975. Identification of dicentric chromosomes in irradiated lymphocytes by C-banding. *Mutation Research* 27: 131–133.
- Roy L, Sorokine-Durm I, Voisin P. 1996. Comparison between fluorescence *in situ* hybridization and conventional cytogenetics for dicentric scoring: A first-step validation for the use of FISH in biological dosimetry. *International Journal of Radiation Biology* 70:665–669.
- Schmid E, Braselmann H, Nahrstedt U. 1995. Comparison of γ -ray induced dicentric yields in human lymphocytes measured by conventional analysis and FISH. *Mutation Research* 348: 2934–2938.
- Terzoudi GI, Pantelias GE. 2006. Cytogenetic methods for biodosimetry and risk individualisation after exposure to ionizing radiation. *Radiation Protection Dosimetry* 122:513–520.
- Voisin P, Benderitter M, Claraz V, Chambrette I, Sorokine-Durm M, Delbos V, Durand AL, Paillole N. 2001. The cytogenetic dosimetry of recent accidental overexposure. *Cellular and Molecular Biology* 47:557–565.
- Voisin P, Barquinero F, Blakely B, Lindholm C, Lloyd D, Luccioni C, Miller S, Palitti F, Prasanna PGS, Stephan G, Thierens H, Turai I, Wilkinson D, Wojcik A. 2002. Towards a standardization of biological dosimetry by cytogenetics. *Cellular and Molecular Biology* 48(5):501–504.

Biodosimetry for Dose Assessment of Partial-Body Exposure: A Methodological Improvement

Thiago Salazar Fernandes^{1*}, David C. Loyd² and Ademir Amaral¹

¹Grupo de Estudos em Radioproteção e Radioecologia; Departamento de Energia Nuclear; Universidade Federal de Pernambuco; Av. Professor Luiz Freire, 1000; 50740-540; thiagosalazar@hotmail.com; Recife - PE - Brasil.

²Health Protection Agency/Radiation Protection Division; Chilton, Didcot, OX11 0RQ, United Kingdom

ABSTRACT

This study has explored the possibility of combining culture times with extending the duration for which Colcemid is present in cell culture in order to obtain better dose estimations following partial-body exposures. Irradiated and unirradiated blood was mixed to simulate a partial-exposure. Dicentric frequencies and resultant dose estimations were compared from 48 and 72 h cultures with Colcemid added at the beginning, after 24 h or for the final 3 h. The frequencies of dicentrics in first division cells increased with the cell culture time, providing better dose estimations. Unwanted excessive contraction of chromosomes caused by prolonged contact with Colcemid was measured and ways to avoid this are discussed. It is suggested that the combination of a lower than usual concentration of this drug combined with its earlier addition and longer culture time may provide metaphases better suited for interpreting partial-body exposures.

Key words: Biodosimetry, partial-body exposure, dicentrics, chromosome contraction

INTRODUCTION

Most human exposures to ionizing radiation occur to part of the body and as a result, peripheral blood samples contain a mixture of exposed and unexposed lymphocytes (IAEA, 2001; Fernandes et al., 2006; Heimers et al., 2006).

For biodosimetry based on the scoring of chromosome aberrations (dicentrics, rings and fragments), it is important to consider only first-division (M1) lymphocytes. However, following partial-body irradiations, the irradiated fraction of cells may not have enough time to reach the first metaphase in traditional 48 h cell cultures because they may be selectively delayed or held for longer at check points during the cell cycle (Amaral, 2002; Hoffmann et al., 2002; Hone et al., 2005;

Heimers et al., 2006). Irradiated cells may also be selectively removed by apoptosis.

Considering this, two mathematical methods were proposed to interpret the aberration frequencies in terms of partial-body dose, known as the Qdr and contaminated Poisson (CP) (Sasaki and Miyata, 1968; Dolphin, 1969; Lloyd et al., 1973; IAEA, 2001). The usual time of cell culture is 48 h, because with longer times many cells enter into their second or later cell cycles so that selective elimination of chromosomal damage starts to occur by mitotic non-disjunction.

Nevertheless, if culture time is prolonged to 72 h to compensate for the delay, there is the possibility of slow growing irradiated T cells or other sub-populations, e.g. B cells with differing

* Author for correspondence

radiosensitivities, coming to M1 (Han and Daday, 1978; Wuttke et al., 1993).

The technique of harlequin staining (Fluorescence plus Giemsa – FPG) allows unambiguous identification of cells in the M1 stage (Scott and Lyons, 1979). An alternative to FPG is to add Colcemid earlier to prevent fast growing cells from escaping the mitotic block (Hayata et al., 1992; Kanda et al., 1994; Senthamizchelvan et al., 2006). This could be combined with longer culture times in order to permit the slower cells to reach M1.

Prolonged contact with Colcemid has been reported as causing excessive chromosome contraction. However, this may be overcome by reducing the concentration of this drug (Senthamizchelvan et al., 2006).

This paper examines two different cell culture durations combined with the addition of Colcemid at three different times to evaluate how varying these parameters might improve the accuracy of dose assessment following partial-body exposures.

MATERIAL AND METHODS

Samples and Irradiation

Venous blood from a 28-year-old healthy non-smoking male donor was collected with informed consent and according to the local ethics protocol. Blood was irradiated at 37 °C with 4.0 Gy 250 kVp X-rays (HVL 1.2 mmCu) acutely (0.7 Gy/min). The remaining tubes were treated identically but received zero doses. All tubes were then held for 2 h at 37 °C and then a mixture of 70% irradiated 30% unirradiated blood was made.

Cell Culture

From this mixture, whole blood lymphocyte cultures were set up using a standard protocol (IAEA, 2001), in Eagle's MEM with Bromodeoxyuridine, 20% Foetal Bovine Serum, Phytohaemagglutinin (PHA) and antibiotics. Replicate cultures were incubated for 48 and 72 h and for each Colcemid (0.5 µg/mL) was added at 0, 24 or 3 h before termination.

After hypotonic treatment with 0.075 M KCl, cultures were fixed by the standard method with methanol:acetic acid (3:1) and cells were dropped onto microscope slides (IAEA, 2001).

Chromosome analysis

Replicate slides from each culture were stained with fluorescence plus Giemsa (FPG) and Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) highlighting chromosomes 2 in green with FITC, chromosomes 3 in red with Texas Red, and using DAPI blue as counterstaining (Finnon et al., 1995; IAEA, 2001).

Additionally, other slides were stained with Giemsa for scoring of chromosome aberrations (Fernandes et al., 2008).

All the microscope analyses were carried out by one person on coded slides and strict scoring criteria were adopted whereby metaphases had to be complete with 46 centromeres and 46 or more objects present in the spread (IAEA, 2001). Aberrations recorded from the Giemsa and FPG stained cells were unstable chromosome types; dicentrics, centric rings and excess acentrics. For the FPG material the scoring was confined to M1 metaphases (IAEA, 2001). For each data point, scoring was terminated when 30 complete dicentrics, i.e. with their accompanying acentric fragments and in M1 metaphases, had been found. In the FISH stained material, Karyotyping and FISH Imaging MetaSystems Isis software (Germany) was used to capture the images and to measure the lengths of the highlighted chromosomes 2 and 3.

Statistical analysis

The chi-squared test for homogeneity of proportions was used to test for significance of difference between the Colcemid addition time points, and also the differences between incubation times. The Student's t-test was used for significance of the difference in chromosome lengths.

Dicentric frequencies were used to estimate doses by reference to a dose-effect curve previously calibrated in the same laboratory with the same X-ray source, filtration and geometry. This curve fitted to the linear quadratic model: $Y = 0.0005 (\pm 0.0005) + 0.046 (\pm 0.005) D + 0.065 (\pm 0.003) D^2$, where Y = dicentrics per cells and D = dose in gray (Gy). The standard method considered the dose estimation without correction to the irradiated fraction of the body. In addition, the 70% was used to calculate dose to the irradiated fraction. For estimation of the partial-body dose, two mathematical methods were also used; the Qdr and Contaminated Poisson (CP), explained in full in the IAEA Manual (2001).

RESULTS

Table 1 (column 3) shows whole-body dose estimates obtained for each time point by referring the dicentric frequencies to the X-ray calibration curve. As expected, these values underestimate the dose for 48 h culture, but it also shows that they increase for longer cultures (72 h).

Column 5 shows the estimated dose to the irradiated fraction, where better estimations were obtained in 72 h. Columns 7 and 8 show the partial-body doses estimated by the Qdr and CP methods and from the latter the estimated irradiated fraction (*F*) is also derived (column 9).

The Qdr method estimates approximately the real dose in 48 h cultures, and overestimates were obtained in 72 h. Better estimates using the CP method were obtained at 72 h, however, this method provided better estimation of *F* in 48 h cell culture.

Earlier addition of Colcemid (0 and 24 h) in order to reduce the confounding presence of non-M1 metaphases without the need for FPG technique carries the risk of excessive chromosome condensation, as shown in Fig. 1-B with painted 2 (light gray) and 3 (dark gray) chromosomes.

Analyzing 50 metaphases, the length of pairs of chromosomes 2 and 3 from 72 h cell culture with 69 h Colcemid were 9.2 and 7.9 μm , respectively. In 72 h culture with 24 h Colcemid, the lengths reduced to values of 6.4 and 5.8 μm , statistically significant ($p < 0.05$).

DISCUSSION

It is axiomatic in biodosimetry that aberration scoring should be confined to M1 metaphases, because in prolonged cultures beyond the customary 48 h the dicentric frequency in M1 cells can increase. Hone et al. (2005), for example, have shown that the dicentric yield remains constant up to 51 h, but rises by about 50% to a constant value beyond 60 h.

The effect of culture time on aberration frequencies may be exacerbated in the situation of a partial-body exposure (Amaral, 2002). The irradiated fraction of cells may be selectively delayed in response to mitotic stimulation with PHA, slower progression around the cell cycle, or apoptotic elimination (Hoffmann et al., 2002; Hone et al., 2005).

The present study has shown (Table 1) improvement in dose estimates in the case of simulated partial-exposure, when the time for cell culture is prolonged from 48 to 72 h. Thus, this allows more time for the irradiated fraction of cells to reach metaphase.

In practice, following most partial-body overexposures, knowledge about the irradiated fraction of the body (column 5 in Table 1) is generally not straightforward, unless there was reliable independent information on the irradiated volume, e.g. radiotherapy and very occasionally industrial radiation accidents. In these cases, precise exposure geometry may be well defined or obtained by questionnaire.

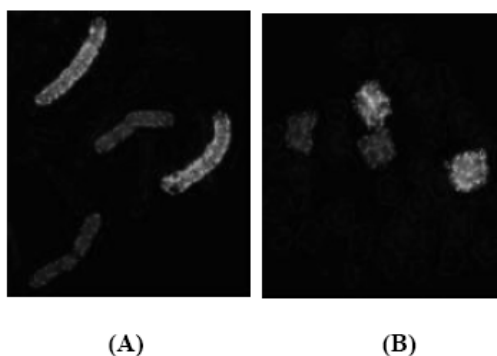


Figure 1 - Pairs of chromosomes 2 (light gray) and 3 (dark gray) painted after FISH. Normal length chromosomes (A) and highly contracted chromosomes induced by Colcemid (B).

Table 1 - Estimation of absorbed dose by standard method, considering the irradiated fraction (70%) and using the Qdr and CP methods.

Time (h)		Standard method		70% Fraction		Qdr	CP	
Culture	Colcemid	Dose (Gy)	SE dose (Gy)	Dose (Gy)	ratio	Dose (Gy)	Dose (Gy)	F (%)
48	45	1.81	0.17	2.34	0.42	3.59	2.31	79.3
	24	1.76	0.16	2.28	0.40	4.22	3.04	62.1
	0	2.04	0.18	2.64	0.52	3.98	2.80	76.3
72	69*	1.69	0.16	2.20	0.38	4.53	3.53	54.1
	69	2.94	0.18	3.77	0.93	4.61	4.02	82.3
	24	2.80	0.18	3.58	0.91	4.18	3.29	89.0
	0	2.76	0.18	3.54	0.89	4.18	3.29	88.2

* Without FPG staining / SE = Standard error / F (%) = Irradiated fraction.

Qdr is the only method which provides better dose estimates for 48 h cultures. On the other hand, for this same culture time, CP method provides better estimations of F, which may be of vital importance to the medical team in planning the therapy of highly irradiated persons.

Colcemid at 69 h produced post-M1 lymphocytes. Those dicentric that do pass through to daughter cells should be distinguishable by the absence of a fragment, although it is possible for some to retain fragments in daughter cells. Therefore, searching for M1 cells becomes laborious and time consuming due to the contamination with the later division cells.

This problem can be solved by adding Colcemid earlier to arrest most of the cells in M1 (Hayata et al., 1992; Kanda et al., 1994). However, this approach and using the standard Colcemid concentration (0.5 µg/mL) leads to an excessive contraction of the chromosomes (Fig. 1-B) that could make the cytogenetic analysis more difficult, especially for less experienced technicians.

The practice of earlier addition of Colcemid was introduced some years ago particularly in some Japanese laboratories. Sasaki et al. (1989), used a 10 times lower concentration (0.05 µg/mL) than that used for this experiment and do not refer to the phenomenon of chromosome contraction.

Hayata et al. (1992) used a slightly lower concentration of Colcemid of 0.043 µg/mL also added at the start of 48 h lymphocyte culture and they do not mention problems of chromosome contraction nor is it apparent in their published photomicrographs.

An even lower concentration (0.02 µg/mL) of Colcemid was added at 24 h by Senthamizhchelvan et al. (2006), who reported that the metaphase spreads were adequate for the identification of dicentric.

These papers, therefore, suggest that both the concentration of Colcemid and its addition time are important factors and the correct combination makes it possible to avoid chromosome contraction.

However, it has to be cautioned that reducing the concentration of Colcemid could lead to an insufficient amount for effective mitotic arrest. Then, cells will progress into second and further cycles, diluting the dicentric frequency and particularly for partial-body exposures, leading to an underestimation of absorbed dose.

Therefore, it is important to find a window of Colcemid concentration that is low enough to avoid chromosome contraction but high enough to accumulate exclusively M1 metaphases. This possibility requires more investigation.

Blood samples from just one donor were intentionally used for this experiment in an attempt to confirm whether the interpretation of partial exposure being dependant on culture time is a phenomenon that exists *per se*.

Clearly, inter-individual variability in cell cycling speeds would vary among different donors. However, the experience from biodosimetry would suggest that this is not relevant because of the reproducibility of dose effect curves calibrated with blood from a small panel of donors and used to estimate the dose from other persons who have been exposed to ionizing radiation.

CONCLUSIONS

Prolonged cell culture time and earlier addition of Colcemid was shown to be better suited for estimating dose in cases of partial-exposures. Using this protocol, a good agreement was obtained with the actual dose used circumventing the need for mathematical calculations (Qdr and CP methods). Adding Colcemid earlier can cause excessive chromosome condensation but this can be eliminated by reducing its concentration.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank: Alan Edwards, Jayne Moquet and Pat Hone (Health Protection Agency – HPA), for their contribution during this research; Liz Ainsbury (HPA), for the English language revision; CNPq and CAPES for supporting this work.

RESUMO

Este trabalho avaliou a estimativa da dose de radiação simulando uma exposição parcial do corpo através da irradiação *in vitro* de amostras de sangue misturadas com amostras não irradiadas. Foi observado que o prolongamento do tempo de cultura permite que a real fração de linfócitos em M1 contendo aberrações cromossômicas seja detectada, propiciando melhores estimativas de dose, sem a necessidade de correções matemáticas.

REFERENCES

- Amaral, A. (2002), Trends in biological dosimetry: an overview. *Braz Arch Biol Technol.*, **45**, 119-124.
- Dolphin, G. W. (1969), Biological dosimetry with particular reference to chromosome aberration analysis. A review of methods. In: *Handling of Radiation Accidents*, IAEA, Vienna, pp. 215-224.
- Fernandes, T. S.; Amaral, A.; Cavalcanti, M. B.; Braga, L. R.; Melo, R. A. (2006), Unstable chromosome aberrations and micronuclei analyses in the biomonitoring of workers occupationally exposed to ionizing radiation. *Int J Low Radiat.*, **3**, 299-309.
- Fernandes, T. S.; Lloyd, D. C.; Amaral, A. (2008), A comparison of different cytological stains for biological dosimetry. *Int J Radiat Biol.*, **84**, 703-711.
- Finnon, P.; Lloyd, D. C.; Edwards, A. A. (1995), Fluorescence in situ hybridization detection of chromosomal aberrations in human lymphocytes: applicability to biological dosimetry. *Int J Radiat Biol.*, **68**, 429-435.
- Han, T.; Daday, B. (1978), T lymphocyte dependency of B lymphocyte blastogenic response to phytomitogens. *Immunology*, **34**, 625-629.
- Hayata, I.; Kajima, J.; Okabe, N. (1992), Distinction of metaphases in the first cell cycle for automated system in radiation dosimetry. *Radiat Phys Chem.*, **39**, 517-520.
- Heimers, A.; Brede, H. J.; Giesen, U.; Hoffmann, W. (2006), Chromosome aberration analysis and the influence of mitotic delay after simulated partial-body exposure with high doses of sparsely and densely ionizing radiation. *Radiat Environ Biophys.*, **45**, 45-54.
- Hoffmann, G. R.; Sayer, A. M.; Littlefield, L. G. (2002), Higher frequency of chromosome aberrations in late-arising first-division metaphases than in early-arising metaphases after exposure of human lymphocytes to x-rays in G0. *Int J Radiat Biol.*, **78**, 765-772.
- Hone, P. A.; Edwards, A. A.; Lloyd, D. C.; Moquet, J. E. (2005), The yield of radiation-induced chromosomal aberrations in first division human lymphocytes depends on the culture time. *Int J Radiat Biol.*, **81**, 523-529.
- Kanda, R.; Jiang, T.; Hayata, I.; Kobayashi, S. (1994), Effects of Colcemid concentration on chromosome aberration analysis in human lymphocytes. *J Radiat Res.*, **35**, 41-47.
- Lloyd, D. C.; Purrot, R. J.; Dolphin, G. W. (1973), Chromosome aberration dosimetry using human lymphocytes in simulated partial body irradiation. *Phys Med Biol.*, **18**, 421-431.
- International Atomic Energy Agency (IAEA). (2001), Cytogenetic analysis for radiation dose assessment. in *Technical Report Series 405*, IAEA, Vienna.

- Sasaki, M. S.; Miyata, H. (1968), Biological dosimetry in atom bomb survivors. *Nature* (London), **220**, 1189-1193.
- Sasaki, M. S.; Kobayashi, K.; Hiedas, K.; Yamada, T.; Ejima, Y.; Maezawa, H.; Furusawa, Y.; Ito, T.; Okada, S. (1989), Induction of chromosome aberrations in human lymphocytes by monochromatic X-rays of quantum energy between 4.8 and 14.6 keV. *Int J Radiat Biol.*, **56**, 975-988.
- Senthamizhchelvan, S.; Pant, G. S.; Rath, G. K.; Julka, P. K.; Nair, O.; Joshi, R. C.; Malhotra, A.; Pandey, R. M. (2006), Biodosimetry using chromosome aberrations in human lymphocytes. *Radiat Prot Dosim.*, **5**, 1-5.
- Scott, D.; Lyons, C. Y. (1979), Homogeneous sensitivity of human peripheral blood lymphocytes to radiation induced chromosome damage. *Nature* (London), **278**, 756-758.
- Wuttke, K.; Streffer, C.; Müller, W. U. (1993), Radiation induced micronuclei in subpopulations of human lymphocytes. *Mut Res.*, **286**, 181-188.

Received: August 20, 2008;
Revised: September 10, 2008;
Accepted: September 12, 2008