

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

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

**EMPREGO DAS ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS INSTÁVEIS E
MICRONÚCLEOS NO BIOMONITORAMENTO INDIVIDUAL:
ESTUDO COMPARATIVO**

THIAGO DE SALAZAR E FERNANDES

**RECIFE - PERNAMBUCO - BRASIL
FEVEREIRO – 2005**

**EMPREGO DAS ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS INSTÁVEIS E
MICRONÚCLEOS NO BIOMONITORAMENTO INDIVIDUAL:
ESTUDO COMPARATIVO**

THIAGO DE SALAZAR E FERNANDES

**EMPREGO DAS ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS INSTÁVEIS E
MICRONÚCLEOS NO BIOMONITORAMENTO INDIVIDUAL:
ESTUDO COMPARATIVO**

Dissertação 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 Mestre em Ciências. Área de Concentração: Dosimetria e Instrumentação Nuclear.

ORIENTADOR: PROF. DR. ADEMIR DE JESUS AMARAL

**RECIFE - PERNAMBUCO - BRASIL
FEVEREIRO – 2005**

Fernandes, Thiago de Salazar e
Emprego das aberrações cromossômicas
instáveis e micronúcleis no biomonitoramento
individual : estudo comparativo / Thiago de Salazar e
Fernandes. – Recife : O Autor, 2005.
vii, 69 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal
de Pernambuco. CTG. Energia Nuclear, 2005.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Energia nuclear – Biodosimetria. 2.
Profissionais expostos à radiação ionizante –
Aberrações cromossômicas instáveis e micronúcleos
– Comparação entre métodos. 3. Alterações
cromossômicas – Bandeamento C – Controle de
qualidade. 4. Exposições ocupacionais –
Conscientização dos riscos - Radioproteção. I. Título.

621.039
621.4835

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
BC2005-222

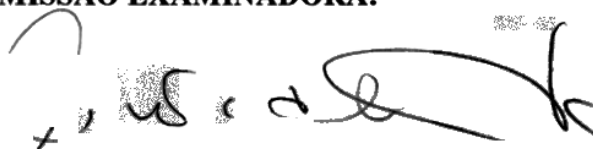
**EMPREGO DAS ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS INSTÁVEIS E
MICRONÚCLEOS NO BIOMONITORAMENTO INDIVIDUAL:
ESTUDO COMPARATIVO**

Thiago de Salazar e Fernandes

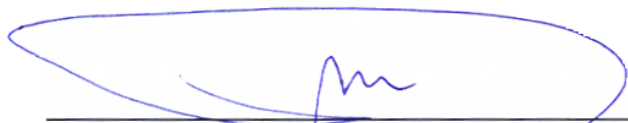
APROVADO EM: 25.02.2005

ORIENTADOR : Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral

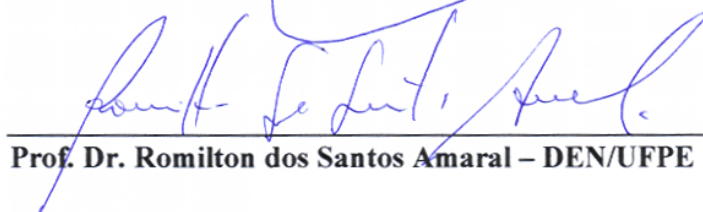
COMISSÃO EXAMINADORA:



Prof. Dra. Cíntia Gonsalves de Faria Machado – HEMOPE

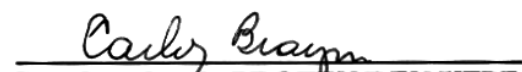


Prof. Dr. Mário Bernardo Filho - DBB/UERJ



Prof. Dr. Romilton dos Santos Amaral – DEN/UFPE

Visto e permitida a impressão


Coordenador do PROTEN/DEN/UFPE

Dedico à minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por mais uma etapa concluída.

Aos meus pais, Pedro e Vera Fernandes, e irmãos, Henrique e Rodrigo, por sempre me apoiarem em todos os momentos da minha vida.

A Raissa, pelo incentivo durante o período de mestrado.

Ao Prof. Dr. Ademir Amaral, pela orientação, transmissão de conhecimentos e amizade.

Aos professores do Departamento de Energia Nuclear (DEN), membros da banca examinadora, Mário Bernardo-Filho, Romilton Amaral, Cíntia Machado, Waldeciro Colaço, Raul Melo, bem como ao coordenador do Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares (PROTEN), professor Carlos Brayner, por contribuírem para o meu aperfeiçoamento científico e tecnológico.

Aos colegas e amigos do Grupo de Estudos em Radioproteção e Radioecologia (GERAR), Laélia Campos, Isvânia Barbosa, Simey Magnata, Cleomácio Miguel, Mariana Brayner, Lidiane Régia, José Araújo, Fabiana Aquino, por me ajudarem com sugestões e/ou com a realização dos experimentos científicos.

A todos os colegas e amigos do DEN, em especial Ricardo Aguiar, e aos funcionários, por proporcionarem um agradável ambiente de trabalho.

Aos profissionais de saúde, por participarem de forma voluntária desta pesquisa com a doação das amostras de sangue, e aos médicos e físicos que se dispuseram a nos ajudar, recebendo-nos em suas salas.

Ao Laboratório de Citogenética da Unidade de Laboratórios Especializados (UNILABE) da Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE), por disponibilizar o espaço físico, materiais e equipamentos necessários para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos profissionais do HEMOPE, Raul Melo, Fátima Coeli, Cíntia Machado, Márcia Costa, Júlia Netto, Graça Sotero, Bernadete Brito, Ana Pedrosa, Washington Batista, por estabelecerem um excelente ambiente de convívio, pesquisa, aprendizagem e amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por disponibilizar o apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
RESUMO	vi
SUMMARY	vii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 Efeitos Biológicos das Radiações Ionizantes	4
2.2 Radiosensibilidade dos Tecidos	7
2.3 Síndrome da Radiação Aguda	11
2.4 Dosimetria Física	13
2.5 Dosimetria Biológica	13
2.5.1 Linfócitos humanos	14
2.5.2 Cromossomos humanos e bandeamento cromossômico	16
2.5.3 Ciclo celular	20
2.5.4 Análise de aberrações cromossômicas	22
2.5.5 Análise de micronúcleos	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Indivíduos Estudados	30
3.2 Metodologia para a Análise de Aberrações Cromossômicas Instáveis	32
3.2.1 Cultura de linfócitos do sangue periférico	32
3.2.2 Procedimento técnico para a retirada da cultura	32
3.2.3 Preparo das lâminas e análise	33
3.2.5 Técnica de bandeamento C	35
3.3 Metodologia para a Análise de Micronúcleos	36
3.3.1 Cultura de linfócitos do sangue periférico	36

3.3.2 Retirada da cultura	36
3.3.3 Preparo das lâminas	37
3.3.4 Interpretação microscópica	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Estudos Preliminares	38
4.2 Profissionais de Saúde Estudados	39
4.2.1 Auxiliar de enfermagem e auxiliar administrativo	39
4.2.2 Técnico em radiologia e físicos-médicos	40
4.2.3 Médicos traumatologistas	41
4.3 Comparação entre os Métodos Avaliados	45
4.4 Bandeamento C	49
5 CONCLUSÃO	56
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXO 1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.	64
ANEXO 2: Grandezas Dosimétricas – INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION (ICRP). Report 60, 1990.	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Efeito Direto e Indireto. A radiação ionizante interage indiretamente ou diretamente na molécula de DNA (HALL, 1994)	5
Figura 2 Representação simplificada da radiólise da água com formação de elétrons (e^-), radicais livres ($OH^\cdot$ e $H^\cdot$) e íons (H_2O^+ , H_2O^- , H^+ e OH^-)	6
Figura 3 LET e efeito biológico. Os “x” representam as ionizações ao longo das trajetórias das radiações de alto LET (A) e baixo LET (B) ao incidir numa célula	9
Figura 4 Relação generalizada entre RBE e LET (HALL, 1994)	10
Figura 5 Linfócito Humano (RIBEIRO et al., 2003)	14
Figura 6 Níveis de compactação do DNA no núcleo da célula (IAEA, 2001)	17
Figura 7 Cariótipo humano normal do sexo masculino (XY) (IAEA, 2001)	18
Figura 8 Bandeamento C de um cromossomo humano, com o destaque da região centromérica	19
Figura 9 Esquema do ciclo celular, mostrando as fases G0, G1, S, G2 e M	20
Figura 10 Estágios da mitose: Intérfase – Prófase – Prometáfase – Metáfase – Anáfase – Telófase – Citocinese (ALBERTS et al., 1997)	21
Figura 11 Metáfase de um indivíduo exposto à radiação ionizante, mostrando dois cromossomos dicêntricos (seta vermelha) e um em anel (seta azul) (IAEA, 2001)	23
Figura 12 Curva de dose versus efeito biológico (IAEA, 2001)	24
Figura 13 Célula linfocitária humana binucleada com presença de um micronúcleo indicado pela seta (RIBEIRO et al., 2003)	27
Figura 14 Curva dose-resposta de micronúcleos (VENKATACHALAM et al., 2000)	28
Figura 15 Fluxograma mostrando as etapas de coleta, incubação da cultura, preparo das lâminas e análise microscópica	34
Figura 16 Frequências de aberrações cromossômicas instáveis nos indivíduos estudados	43
Figura 17 Gráfico apresentando as frequências de micronúcleos nos indivíduos estudados	44
Figura 18 Fotomicrografia de uma célula binucleada com presença de micronúcleo indicado pela seta (100x)	46

Figura 19 <i>Metáfases apresentando um suposto cromossomo dicêntrico (A) e sua confirmação pelo bandeamento C (B)</i>	50
Figura 20 <i>Metáfases apresentando um suposto cromossomo dicêntrico (A) e o resultado negativo pelo bandeamento C (B)</i>	51
Figura 21 <i>Metáfase apresentando dois cromossomos muito próximos (A) e a forma dicêntrica após o bandeamento C (B), sendo um resultado falso-positivo</i>	52
Figura 22 <i>Metáfase apresentando um cromossomo em anel (A) e o destaque do centrômero após o bandeamento C (B)</i>	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 <i>Sumário dos efeitos clínicos de uma irradiação aguda</i>	12
Tabela 2 <i>Dados obtidos através do questionário apresentado aos profissionais de saúde</i>	31
Tabela 3 <i>Frequências de aberrações cromossômicas instáveis em 1000 linfócitos em metáfase e de micronúcleos em 1000 linfócitos binucleados dos indivíduos não expostos à radiação ionizante</i>	38
Tabela 4 <i>Concentração de linfócitos nos profissionais de saúde</i>	39
Tabela 5 <i>Frequências de aberrações cromossômicas instáveis em 1000 células em metáfase e de micronúcleos em 1000 células binucleadas da auxiliar de enfermagem (A) e auxiliar administrativo (D)</i>	40
Tabela 6 <i>Frequências de aberrações cromossômicas instáveis em 1000 células em metáfase e de micronúcleos em 1000 células binucleadas do técnico (B) e físico-médicos (C, E e F)</i>	41
Tabela 7 <i>Frequências de aberrações cromossômicas instáveis em 1000 células e micronúcleos em 1000 células binucleadas dos médicos traumatologistas (G e H)</i>	42
Tabela 8 <i>Comparação entre as metodologias de aberrações cromossômicas instáveis (ABI) e micronúcleos (MN)</i>	45
Tabela 9 <i>Vantagens e limitações dos métodos de aberrações cromossômicas instáveis (ABI) e micronúcleos (MN)</i>	47
Tabela 10 <i>Possíveis resultados na confirmação de cromossomos dicêntricos pela técnica de bandeamento C</i>	54
Tabela I <i>Fatores de ponderação das RI (w_R)</i>	68
Tabela II <i>Fatores de ponderação para órgãos ou tecidos (w_T)</i>	69

EMPREGO DAS ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS INSTÁVEIS E MICRONÚCLEOS NO BIOMONITORAMENTO INDIVIDUAL: ESTUDO COMPARATIVO

Autor: Thiago de Salazar e Fernandes

Orientador: Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral

RESUMO

A biodosimetria é baseada na investigação de efeitos biológicos radioinduzidos objetivando relacioná-los com a dose absorvida. A quantificação de aberrações cromossômicas instáveis e de micronúcleos, em linfócitos do sangue periférico, são os dois métodos comumente utilizados em biodosimetria. Neste contexto, o objetivo desta pesquisa foi o de comparar estes métodos para o biomonitoramento de profissionais de saúde ocupacionalmente expostos à radiação. Em paralelo, a técnica de bandeamento C foi empregada no controle de qualidade das análises de aberrações cromossômicas instáveis. Para tanto, foram coletadas amostras de sangue periférico de profissionais de saúde em três hospitais de Recife, e as culturas de linfócitos foram realizadas com base na técnica de citogenética clássica. Foi constatado que a análise de micronúcleos é mais rápida que a de aberrações cromossômicas instáveis, o que sugere sua utilização numa avaliação preliminar em casos de suspeita de exposição à radiação ionizante. A técnica de bandeamento C foi eficiente, como teste confirmatório, na identificação de dicêntricos e anéis durante as análises de aberrações cromossômicas instáveis, podendo ser aplicada no controle de qualidade em biodosimetria. A comparação entre as condições individuais de trabalho com as frequências de aberrações instáveis e micronúcleos, obtidas das análises citogenéticas, resultaram na mudança de comportamento dos profissionais envolvidos nesta pesquisa, no que se refere a uma melhor observância das normas de radioproteção.

THE USE OF UNSTABLE CHROMOSOME ABERRATIONS AND MICRONUCLEI IN THE INDIVIDUAL BIOMONITORING: A COMPARATIVE STUDY

Author: Thiago de Salazar e Fernandes

Adviser: Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral

SUMMARY

Biodosimetry is based on the investigation of radioinduced biological effects in order to correlate them with the absorbed dose. The quantification of unstable chromosome aberrations and micronuclei, in peripheral blood lymphocytes, are two methods commonly used in biodosimetry. In this context, the aim of this research was to compare these methods in the biomonitoring of health care professionals occupationally exposed to ionizing radiation. In parallel, the technique of C-banding was evaluated for quality control of unstable chromosome aberrations analyses. Thus, samples of peripheral blood from health care professionals of three hospitals from Recife (Brazil) were collected, and the lymphocytes cultures were carried out based on the cytogenetic classical technique. It was pointed out that analysis of micronuclei is faster than the unstable chromosome aberrations ones, which suggests the use of the former in preliminary evaluation in cases of suspected accidental exposure. C-banding technique was efficient, as confirmatory test, in the identification of dicentrics and rings during the analyses of unstable chromosome aberrations, being able to be applied in the quality control in biodosimetry. The comparison between the individual work conditions with the frequencies of unstable aberrations and micronuclei, obtained from cytogenetic analysis, resulted in the change of behavior of the professionals involved in this research, with a better observance of the radioprotection standards.

1 INTRODUÇÃO

A grandeza física fundamental na monitoração de indivíduos expostos à radiação ionizante (RI) é a dose absorvida, a qual é definida como a energia média depositada pela RI por unidade de massa do volume irradiado (ICRP, 1990). Em geral, a determinação da dose é obtida diretamente com auxílio de dosímetros físicos (dosímetros fotográficos, semicondutores, gasosos, químicos), ou indiretamente, pelo emprego de modelos numéricos (GERMAIN, 1995). O conhecimento dos níveis de dose em proteção radiológica é um importante passo na avaliação dos riscos à saúde dos indivíduos irradiados (AMARAL, 2002).

Entretanto, observa-se que nem sempre os indivíduos expostos à radiação ionizante portam dosímetros físicos, como é comum em casos de exposições ocupacionais de trabalhadores, ou mesmo em acidentes nucleares. Neste contexto, a biodosimetria, que se baseia na quantificação de parâmetros biológicos modificados pela radiação (biomarcadores), é considerada um método complementar à dosimetria física. Este método vem sendo proposto em alguns países como um instrumento médico-legal em casos de suspeita de exposições excessivas de indivíduos à radiação (VOISIN et al., 2002). No caso de um acidente nuclear, o emprego da biodosimetria tem papel importante na triagem médica, por permitir um melhor planejamento do tratamento das vítimas, antes mesmo do agravamento dos sintomas da síndrome da radiação aguda nas semanas e meses após o acidente (IAEA, 2001; VOISIN et al., 2001).

A dosimetria citogenética é um caso particular de biodosimetria que utiliza geralmente as aberrações cromossômicas e micronúcleos presentes em linfócitos do sangue

periférico como biomarcadores de exposição à radiação ionizante. Em muitos casos, a estimativa da dose tem sido efetuada com base na utilização de curvas de calibração (dose *versus* efeito biológico) obtidas em experimentos realizados com linfócitos humanos irradiados “*in vitro*” (RAMALHO et al., 1990; NATARAJAN, 2002; IAEA, 2001).

Os dois tipos de aberrações cromossômicas mais estudados são as estáveis e as instáveis. As aberrações cromossômicas estáveis (translocações, deleções e inserções) tendem a permanecer nas células ao longo dos processos de divisão celular, sendo sua análise principalmente recomendada em avaliações retrospectivas da dose absorvida, envolvendo um longo período entre a exposição e a análise das amostras (RAMALHO et al., 1990; NATARAJAN, 1998). A análise deste tipo de aberração cromossômica pode ser realizada através da análise do cariótipo por bandeamento G ou pela técnica de hibridização fluorescente “*in situ*” (FISH), com o uso de sondas de DNA (ácido desoxirribonucléico) marcadas com substância fluorescente (SAVAGE, 1975).

As aberrações cromossômicas instáveis (cromossomos dicêntricos, em anel e fragmentos acêntricos) caracterizam-se por alterações na estrutura dos cromossomos, sendo mais amplamente quantificadas em casos de exposições recentes à radiação ionizante (IAEA, 2001). Os cromossomos dicêntricos apresentam dois centrômeros, resultado da união das extremidades de dois cromossomos após a irradiação (IAEA, 2001). Sua análise pode ser realizada pela técnica de citogenética convencional, sendo uma metodologia já bem estabelecida em biodosimetria (VOISIN et al., 2002).

Os micronúcleos são um subproduto das aberrações cromossômicas instáveis ou de perdas de cromossomos inteiros, e sua quantificação também está relacionada à dose absorvida. Eles consistem numa pequena massa nuclear revestida por membrana e separada do núcleo principal da célula linfocitária, sendo de fácil identificação quando comparada às aberrações cromossômicas instáveis (IAEA, 2001; RIBEIRO et al., 2003).

Com o desenvolvimento de técnicas que permitem visualizar a região de heterocromatina constitutiva, a exemplo da região centromérica dos cromossomos humanos

e parte do cromossomo Y, as análises de dicêntricos, anéis e fragmentos tornam-se mais rápidas e fáceis. Dentre as técnicas aplicadas com esta finalidade, destaca-se a de bandeamento C, pelo seu baixo custo e reprodutibilidade (PROSSER, 1975; PANTELIIAS et al., 1993).

Diante disso, esta pesquisa foi realizada focalizando os seguintes objetivos:

- a) Comparar os métodos de análise de aberrações cromossômicas instáveis e micronúcleos em linfócitos periféricos no biomonitoramento de profissionais de saúde expostos à radiação ionizante.
- b) Avaliar o emprego da técnica de bandeamento C no controle de qualidade em análises de aberrações cromossômicas instáveis, em especial de cromossomos dicêntricos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Efeitos Biológicos das Radiações Ionizantes

Os primeiros efeitos biológicos atribuídos às radiações ionizantes (RI) foram observados no fim do século XIX, pouco depois da descoberta dos raios X por Roentgen, em 1895, e da radioatividade natural por Becquerel, em 1896. Dentre estes efeitos, foi evidenciado o surgimento de radiodermite (efeito resultante da irradiação da pele) logo após uma exposição à radiação ionizante, e o surgimento de câncer radioinduzido, alguns anos após as primeiras aplicações dos raios X para a obtenção de imagens do interior do corpo humano (BUSHONG, 1997; DOWD & TILSON, 1999).

A radiação ionizante é capaz de induzir alterações na molécula de DNA, molécula esta localizada no núcleo das células e responsável pela transmissão das características hereditárias de todos os seres vivos (BUSHONG, 1997; DOWD & TILSON, 1999).

Os efeitos da radiação sobre a molécula de DNA podem ser classificados em diretos e indiretos, ilustrados na Figura 1. No efeito direto, a radiação interage com o DNA promovendo uma modificação dessa molécula, e no efeito indireto a radiação ionizante interage primeiramente com a molécula de água, originando produtos tóxicos que lesionam a molécula de DNA (BUSHONG, 1997; DOWD & TILSON, 1999).

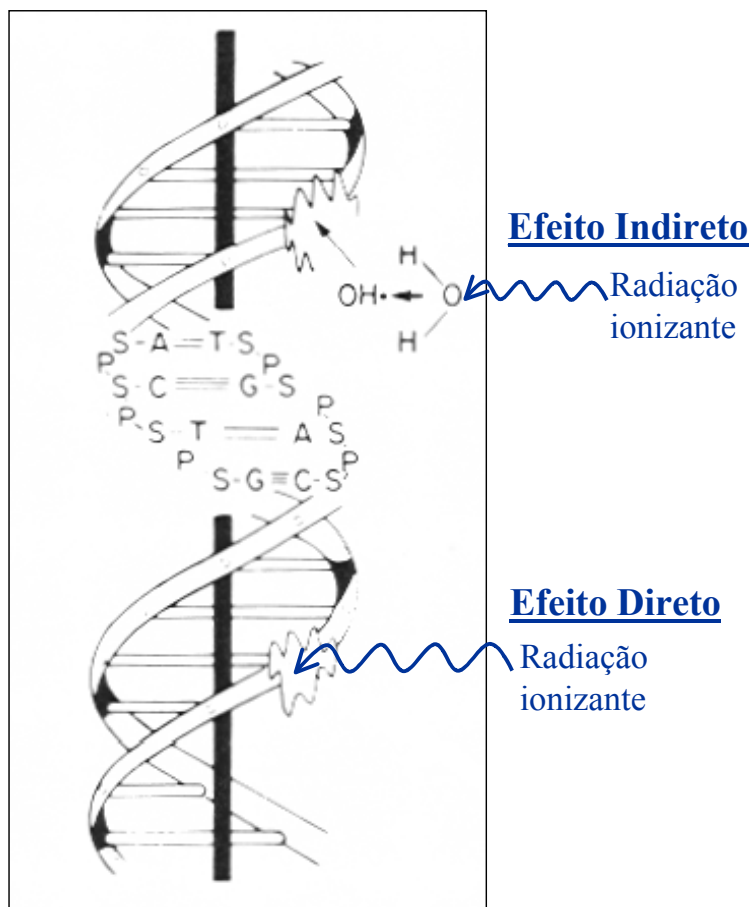


Figura 1 Efeito Direto e Indireto. A radiação ionizante interage indiretamente ou diretamente na molécula de DNA (HALL, 1994).

Ao interagir de forma indireta, a radiação ionizante promove alterações na molécula de DNA por meio de efeitos químicos tais como a radiólise da água presente na célula. Este tipo de interação é responsável pela formação de produtos tóxicos (oxidantes) para o DNA, a exemplo de radicais livres, íons e elétrons, conforme o esquema mais detalhado da Figura 2 (BUSHONG, 1997; DOWD & TILSON, 1999).

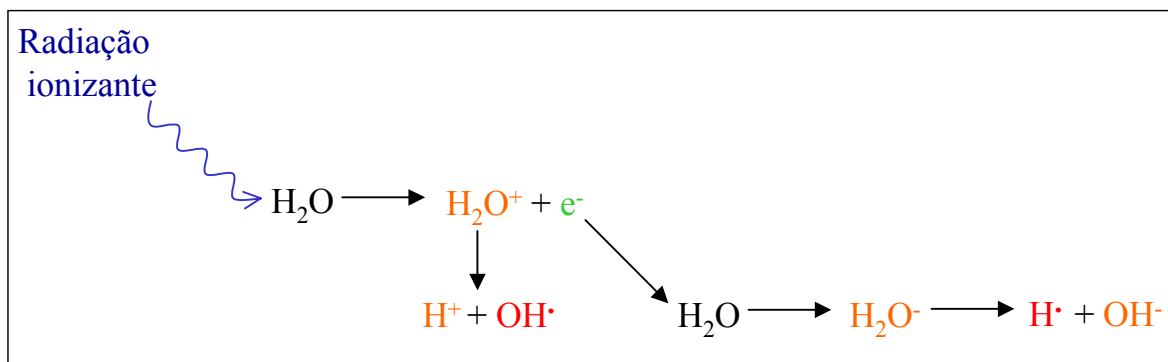


Figura 2 Representação simplificada da radiólise da água com formação de elétrons (e^-), radicais livres ($\text{OH}\cdot$ e $\text{H}\cdot$) e íons (H_2O^+ , H_2O^- , H^+ e OH^-).

Desta maneira, a radiação pode produzir, de forma direta ou indireta, as seguintes alterações na molécula de DNA (BUSHONG, 1997):

- ❖ Cisão de apenas uma fita de DNA;
- ❖ Cisão da dupla fita;
- ❖ Cisão da cadeia principal com subsequente ligação-cruzada;
- ❖ Quebra de ligação e separação entre as bases nitrogenadas;
- ❖ Mudança ou perda de uma base.

A ligação cruzada pode ser uma ligação entre o DNA que foi lesionado pela radiação ionizante e outra molécula de DNA ou proteína. Além disso, pode haver uma ligação entre uma base nitrogenada e outra adjacente, e não com a base correspondente da fita de DNA complementar, o que seria a ligação correta.

Os danos na molécula de DNA podem dar origem às seguintes aberrações cromossômicas instáveis visíveis ao microscópio (BUSHONG, 1997):

- ❖ Deleção da porção terminal dos cromossomos, resultando em quebra cromatídica;
- ❖ Formação de cromossomos dicêntricos resultantes das quebras das regiões terminais de dois cromossomos distintos;

- ❖ Formação de cromossomos em anel resultantes da quebra das porções terminais de um mesmo cromossomo;
- ❖ Formação de fragmentos acêntricos resultantes das quebras cromossômicas que não possuem a região centromérica.

As mutações na molécula de DNA consistem em alterações na sequência de bases nitrogenadas, tais como deleções, inserções ou translocações de genes, que podem levar ao surgimento de câncer. As mutações podem ser classificadas em: somáticas (nas células do corpo) e germinativas (nas células das gônadas sexuais masculinas ou femininas). Caso estas alterações genéticas ocorram em células somáticas, não há propagação para a geração futura, sendo os efeitos classificados em determinísticos e estocásticos (JAYARAMAN & LAWRENCE, 1996).

Os efeitos determinísticos são os que certamente ocorrerão, uma vez ultrapassado um limiar de dose, e a severidade destes danos aumenta com o aumento da dose absorvida. São exemplos dos efeitos determinísticos a radiodermite, catarata, infertilidade e a Síndrome da Radiação Aguda. Para os efeitos estocásticos, a probabilidade de ocorrência do dano biológico é proporcional à dose e não existe um limiar de dose para que ele venha a acontecer, a exemplo de tumores sólidos e leucemias (JAYARAMAN & LAWRENCE, 1996).

Em suma, a radiação ionizante é um agente físico responsável por muitos dos processos que levam à mutagênese e carcinogênese no homem. Além disso, a intensidade do dano biológico vai depender do tipo de radiação, bem como da radiosensibilidade dos tecidos.

2.2 Radiosensibilidade dos Tecidos

Em 1906, dois cientistas franceses, Bergonié e Tribondeau, observaram que a radiosensibilidade era uma função do estado metabólico do tecido que está sendo irradiado.

Este conceito tornou-se conhecido como a “Lei de Bergonié e Tribondeau”, e estabelece que a radiosensibilidade dos tecidos vivos pode variar da seguinte maneira:

1. Quanto mais diferenciada for a célula, maior é a sua resistência à radiação;
2. Quanto mais jovem for o tecido ou órgão, mais radiosensível ele será;
3. Quanto maior a atividade metabólica, maior a radiosensibilidade;
4. Quando a taxa de proliferação celular e a taxa de crescimento tecidual aumentam, a radiosensibilidade também aumenta.

Esta lei tem sido aplicada em radioterapia e radiodiagnóstico, servindo para relembrar, por exemplo, que o feto é consideravelmente mais sensível à exposição à radiação do que a criança ou o adulto, por conter células indiferenciadas de tecidos e órgãos jovens, com elevada atividade metabólica e alta taxa de proliferação celular e tecidual (BUSHONG, 1997).

A resposta das células de um tecido ou órgão irradiado também vai depender do tipo e da energia média da radiação (dE) que é depositada na matéria por unidade de comprimento (dl), definida como Transferência Linear de Energia (LET), conforme apresentado na Equação 1 abaixo. A unidade prática do LET é o keV/ μm (ICRU, 1970; HALL, 1994).

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

Quando a radiação ionizante atravessa um meio, ela promove o efeito de ionização ao longo de sua trajetória e ao longo da trajetória dos elétrons secundários que foram gerados. A densidade linear de ionização, ou seja, o número de íons gerados por unidade de comprimento, é uma função do LET. A densidade de ionização ao longo da trajetória é maior para radiações

de alto LET quando comparado com as radiações de baixo LET (JAYARAMAN & LAWRENCE, 1996; DOWD & TILSON, 1999).

A Figura 3 exemplifica as trajetórias de uma radiação de alto LET (A) e outra de baixo LET (B), ao incidir numa célula, sendo as densidades de ionização ao longo das trajetórias representadas por “x”. Se forem necessárias cinco ionizações no interior da célula para produzir um dano biológico permanente, então a radiação de alto LET será responsável por este efeito. Portanto, a probabilidade de dano permanente numa célula aumenta com o LET da radiação incidente (HALL, 1994; JAYARAMAN & LAWRENCE, 1996; BUSHONG, 1997).

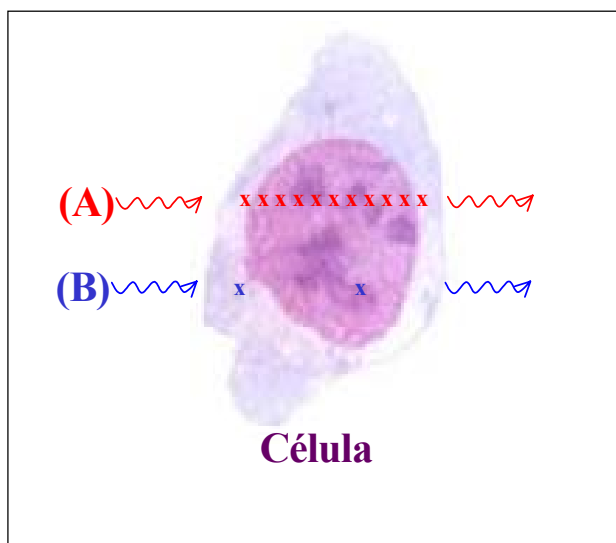


Figura 3 LET e efeito biológico. Os “x” representam as ionizações ao longo das trajetórias das radiações de alto LET (A) e baixo LET (B) ao incidir numa célula.

Em outras palavras, quando o LET da radiação aumenta, a habilidade da radiação em produzir um dano biológico também aumenta (DOWD & TILSON, 1999). Este efeito relativo é quantitativamente descrito pela eficiência biológica relativa (RBE), definida para servir de medida da eficiência biológica de qualquer radiação teste com respeito a uma radiação de referência, que tem sido tradicionalmente escolhida como raios X de baixa energia. A dose absorvida é definida como a energia média depositada pela RI por unidade

de massa do volume irradiado (ICRP, 1990). Então, se a dose teste (D_t), de um determinado tipo de radiação produz um efeito biológico particular, e o mesmo efeito biológico é produzido pela dose de referência (D_{ref}), a RBE da radiação de escolha é dado pela relação da Equação 2 abaixo (BUSHONG, 1997).

$$RBE = \frac{D_{ref}}{D_t} \quad (2)$$

Tem sido demonstrado que para muitos efeitos biológicos, tais como mutações, apoptose (morte celular programada) e aberrações cromossômicas, a RBE pode variar com o LET de acordo com a curva da Figura 4 (HALL, 1994).

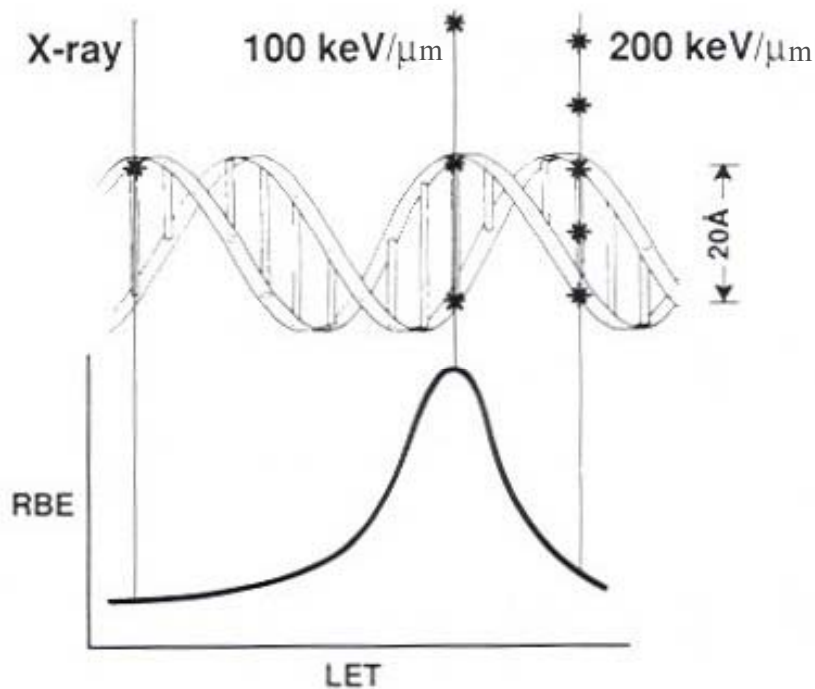


Figura 4 Relação generalizada entre RBE e LET (HALL, 1994).

Esta curva mostra que a RBE aumenta para um valor máximo de cerca de 100 keV/μm de LET e então decai para valores mais elevados. Em relação ao valor

máximo, a média de separação entre dois eventos de ionização coincide com o diâmetro da dupla hélice de DNA (cerca de 2 nm). Radiações com este valor de LET incluem nêutrons rápidos, prótons de baixa energia e partículas- α . A RBE máxima será para valores de LET onde a ionização que produz dano no alvo ocorre sem perda de energia, isto é, sem depositar mais ionização do que é preciso. Portanto, radiações com LET acima de 100 keV/ μ m depositarão mais energia no alvo que necessário para produzir a quebra da dupla fita de DNA, e nestas circunstâncias, a RBE decai com o aumento do LET (HALL, 1994; IAEA, 2001).

A RBE também pode depender de outras variáveis, como da taxa e fracionamento da dose, oxigenação do tecido irradiado, distribuição espacial da dose e o volume da amostra irradiada (HALL, 1994). Segundo a ICRP (1990), em termos de proteção radiológica, a influência da RBE é traduzida como um fator de ponderação da radiação no cálculo da dose (ANEXO 2).

Em se tratando de uma irradiação individual de corpo inteiro, os primeiros sistemas e órgãos a serem afetados serão os mais radiosensíveis, de acordo com a lei de Bergonié e Tribondeau, tais como o Sistema Hematológico e o Sistema Gastrointestinal.

2.3 Síndrome da Radiação Aguda

A depender da dose absorvida, o indivíduo irradiado pode manifestar a Síndrome da Radiação Aguda, com efeitos apresentados na Tabela 1. Os sintomas imediatos característicos são a manifestação de náuseas, vômitos e diarreia, caracterizando a fase prodrômica. Na fase latente, não há sinais clínicos e sintomas, podendo ser confundida com a recuperação do estado de saúde do indivíduo irradiado (BUSHONG, 1997).

Se a dose absorvida for entre 2 e 10 Gy, ocorre a síndrome Hematológica, caracterizada pela diminuição da contagem de células sanguíneas (eritrócitos, leucócitos e plaquetas), resultando no quadro de anemia, devido à diminuição de eritrócitos,

infecção, por diminuição de leucócitos e hemorragia, com a diminuição de plaquetas (BUSHONG, 1997).

Caso a dose seja entre 10 e 50 Gy, ocorre o aparecimento da fase Gastrointestinal, a qual é associada a um desequilíbrio eletrolítico proveniente da destruição das células do epitélio intestinal (BUSHONG, 1997).

Uma irradiação que implique numa dose absorvida superior a 50 Gy, acarretará o aparecimento da fase comumente conhecida como Sistema Nervoso Central, na qual há uma destruição das células nervosas (neurônios), levando a uma perda da coordenação motora, ataxia, convulsões, podendo levar ao óbito dentro de poucos dias após a irradiação (BUSHONG, 1997).

Tabela 1 Sumário dos efeitos clínicos de uma irradiação aguda.

Fase	Dose (Gy)	Tempo de sobrevivência (dias)	Sinais Clínicos e Sintomas
Prodrômica	> 1	-----	Náusea, vômito e diarreia
Latente	1 - 100	-----	Nenhum
Hematológica	2 - 10	10 – 60	Náusea, vômito, diarreia, anemia, leucopenia, hemorragia, febre, infecção
Gastrointestinal	10 - 50	4 – 10	O mesmo da hematológica, mais desequilíbrio eletrolítico, letargia, fadiga e choque
Sistema Nervoso Central	> 50	0 – 3	O mesmo da gastrointestinal, mais ataxia, edema, vasculite, meningite

* BUSHONG, 1997

2.4 Dosimetria Física

A dosimetria física avalia a dose absorvida por meio de instrumentos sensíveis à radiação (dosímetros), e foi introduzida no início do século XX (KNOLL, 1989). Com isso, os dosímetros são detectores de radiação, úteis na monitoração individual, e capazes de quantificar a dose absorvida. Exemplos típicos de detectores comumente usados como dosímetros são: fotográficos, gasosos, semicondutores, termoluminescentes e químicos (KNOLL, 1989).

Por outro lado, a dosimetria física pode ser também desenvolvida com base nas informações referentes às condições de irradiação. Nesses casos, lança-se mão de modelos numéricos, dados antropomórficos e distribuição de fontes (externas e/ou internas), para avaliação da dose individual ou coletivamente absorvida.

No entanto, a realização da dosimetria física nem sempre é uma tarefa simples. Isto pode ser constatado, por exemplo, em situações de exposições acidentais ou ocupacionais nas quais os indivíduos irradiados não portam dosímetros, ou os portam de maneira incorreta ou não freqüente; ou ainda nos casos nos quais as condições de irradiação não são conhecidas. Além disso, os valores de dose nem sempre fornecem a percepção real do risco para os indivíduos irradiados. Nesses tipos de situações, a correlação da dose absorvida com os biomarcadores de exposição à radiação ionizante, através da dosimetria biológica, vem sendo empregada como método alternativo ou complementar à dosimetria física, sendo melhor detalhada adiante (AMARAL, 2002).

2.5 Dosimetria Biológica

A dosimetria biológica ou biodosimetria baseia-se na correlação de biomarcadores com a dose absorvida de radiação. Biomarcadores são parâmetros biológicos modificados pela radiação ionizante, a exemplo dos sinais clínicos e sintomas manifestados por

indivíduos irradiados, da queda do número de leucócitos, hemácias e plaquetas, aberrações cromossômicas e micronúcleos. Estes últimos são os mais amplamente empregados com a finalidade de avaliar a dose absorvida, em casos de exposições acidentais ou ocupacionais, através da dosimetria citogenética (IAEA, 2001).

Para melhor compreender a relação entre a dose absorvida e o dano citogenético radioinduzido, faz-se necessária uma breve revisão das células analisadas (linfócitos), das estruturas alteradas (cromossomos) e dos processos celulares envolvidos (ciclo celular e mitose).

2.5.1 Linfócitos humanos

Os linfócitos são células sangüíneas de tamanho pequeno (6 a 15 μm), regulares e arredondadas, com o núcleo ocupando cerca de 90% da área da célula. Seu citoplasma é escasso e basófilo, núcleo regular e esférico, de tonalidade azul-arroxeadada e com cromatina sem nucléolo evidente (Figura 5).



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

Do ponto de vista fisiológico, os linfócitos incluem três diferentes subpopulações de células: os linfócitos T, linfócitos B e linfócitos NK. Os linfócitos T correspondem de 65 a 80% dos linfócitos circulantes e originam-se de um precursor na medula óssea que posteriormente migra para o timo, onde a maturação destas células se completa. Eles são subdivididos em linfócitos T8 ou citotóxicos (T8 por expressarem o antígeno CD8 na membrana) e T4 ou auxiliares (T4 por expressarem o antígeno CD4). Estes últimos são, por

sua vez, subdivididos em T auxiliar 1 (Th1 – “T helper 1”) e T auxiliar 2 (Th2 – “T helper 2”), por secretarem diferentes citocinas em resposta à estimulação por IL-2 (interleucina 2) e IFN- γ (interferon γ) ou IL-4, respectivamente. Por outro lado, os linfócitos B correspondem de 5 a 15% dos linfócitos circulantes, e originam-se de um precursor na medula óssea onde, nos mamíferos, se inicia ao processo de maturação dessas células. A sua característica fundamental é a de possuir moléculas de imunoglobulina inseridas na membrana plasmática que são produzidas endogenamente e que funcionam como receptores para antígenos específicos. Apesar da diferença funcional, os diferentes tipos de linfócitos não são distinguíveis por coloração convencional (ZAGO et al., 2001).

Além dos tipos citados, encontram-se também os linfócitos NK, a minoria das células linfóides em circulação. Como os demais, estes se originam de um precursor linfóide na medula óssea. O processo de maturação destes linfócitos ainda é pouco conhecido. Sua fisiologia distingue-se das dos demais por destruir a célula-alvo sem a participação da molécula do complexo de histocompatibilidade principal (MHC – “major histocompatibility complex”), agindo sobre células tumorais e células infectadas por vírus. Em relação aos linfócitos T e B, os NK possuem morfologia diferenciada, por serem linfócitos maiores e granulares (ZAGO et al., 2001).

Após completarem sua maturação em órgãos linfóides primários (timo e medula óssea, respectivamente), os linfócitos T e B vão para a corrente sangüínea sem terem sido estimulados por antígenos. Uma vez na corrente sanguínea, eles migram 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. Por outro lado, os linfócitos ativados por antígenos, ou linfócitos de memória, recirculam para atingir sítios específicos extranodais, também chamados de tecidos linfóides terciários, onde o antígeno é encontrado. Desta forma, os linfócitos T de memória tendem a se acumularem em áreas associadas a epitélios como: intestino, trato respiratório e regiões inflamatórias na pele e sinóvia (ZAGO et al., 2001).

A concentração de linfócitos no sangue periférico é variável. Por exemplo, para um adulto saudável, o limite normal é de 1300-4800/mm³. No caso de irradiação de corpo inteiro, para doses em torno de 2 a 10 Gy, observa-se a diminuição queda do número linfócitos (leucopenia) presentes na circulação sanguínea (IAEA, 2001).

A vida-média de um linfócito em circulação é bastante variada, podendo ser divididos em dois grupos quanto ao tempo de vida: os de curta duração (menos de duas semanas) e os de longa duração (ZAGO et al., 2001).

2.5.2 Cromossomos humanos e bandeamento cromossômico

A cromatina consiste em uma dupla hélice de DNA contínua e única que forma um complexo com proteínas, que quando condensada no processo de divisão celular, recebe o nome de cromossomo. Nos cromossomos, a molécula de DNA forma um complexo com uma família de quatro proteínas cromossômicas básicas denominadas histonas, que são as H2A, H2B, H3 e H4, além de um grupo de proteínas ácidas não-histonas bem menos caracterizadas. Os níveis de compactação da molécula de DNA estão esquematizados na Figura 6 a seguir (IAEA, 2001).

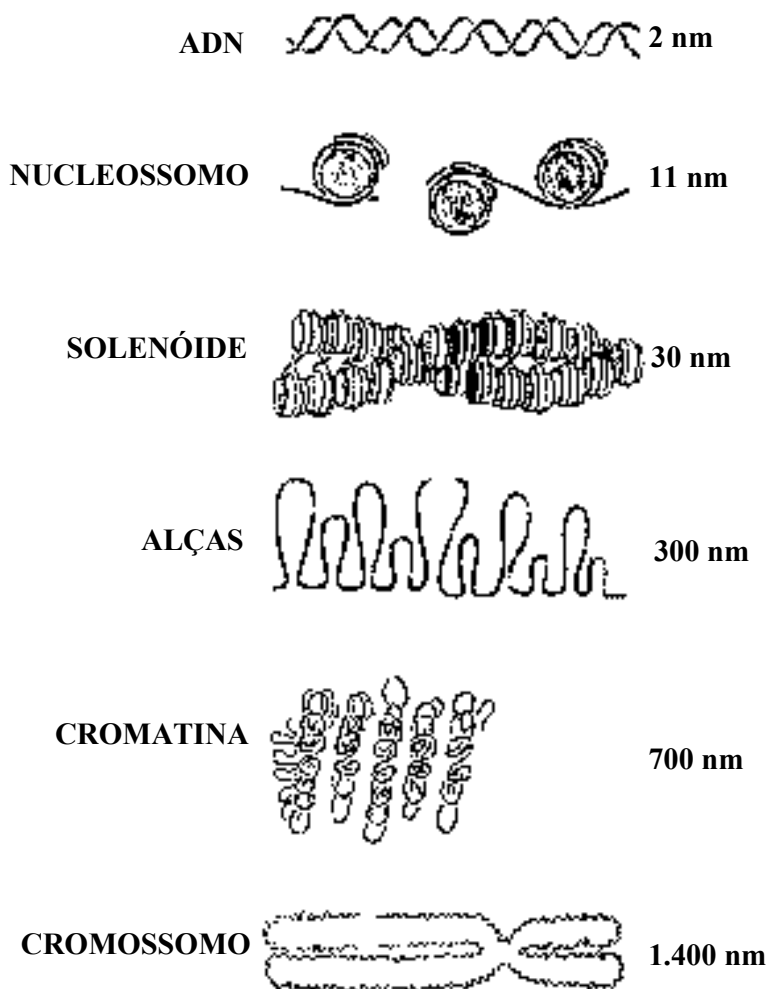


Figura 6 Níveis de compactação do DNA no núcleo da célula (IAEA, 2001).

As proteínas histonas desempenham um papel crucial no acondicionamento apropriado do DNA, o que se evidencia pela notável conservação destas proteínas em diferentes espécies. Duas cópias de cada uma dessas quatro histonas constituem um octâmero, em torno do qual um seguimento de dupla hélice de DNA se enrola. O DNA está associado a cada centro de histona, realizando quase duas voltas em torno do octâmero. Cada complexo de DNA com histonas centrais é considerado um nucleossomo, que é a unidade estrutural básica da cromatina. Os longos cordões de nucleossomos são ainda compactados em estruturas helicóides, denominadas solenóides. Os solenóides são acondicionados em alças ou domínios fixados a uma proteína não histona, denominada de

matriz. A estrutura composta por solenóides e alças é conhecida por cromatina, que recebe o nome de cromossomo quando condensada no processo de divisão celular (THOMPSON, 2002).

O termo cariótipo é usado para um conjunto básico de cromossomos de uma espécie. Na espécie humana, os cromossomos são em número de 46, sendo 22 pares de autossomos e 1 par de cromossomos sexuais: dois do tipo X nas mulheres, e um X e outro Y nos homens, podendo ser identificados pela técnica de bandeamento G, como na Figura 7. De acordo com a posição da região central do cromossomo, conhecida por centrômero, eles podem ser classificados em: metacêntricos, com um centrômero mais ou menos central e braços de comprimento aproximadamente igual; submetacêntricos, com um centrômero excêntrico e braços de comprimentos nitidamente diferentes; e acrocêntricos, com o centrômero próximo a uma extremidade. No processo de divisão celular, os cromossomos passam a ter duas cromátides, constituídas por uma dupla fita de DNA, idênticas e unidas pelo centrômero (THOMPSON, 2002).



Figura 7 Cariótipo humano normal do sexo masculino (XY) (IAEA, 2001).

A heterocromatina constitutiva se caracterizava por permanecer condensada durante todo o ciclo celular e em todas as células do indivíduo. Sabe-se que esta região corresponde à cromatina da região centromérica dos cromossomos autossomos e do cromossomo X. No caso do cromossomo Y, a heterocromatina constitutiva não se limita apenas à região centromérica, estando presente em boa parte deste cromossomo (TILGEN, N. et al., 2001).

Técnicas especiais que permitem localizar a região de heterocromatina constitutiva, a exemplo do bandejamento C, facilitaram a identificação de cromossomos dicêntricos (PROSSER, 1975). A Figura 8 mostra um esquema do destaque da região centromérica de um cromossomo humano após a realização da técnica de bandejamento C.

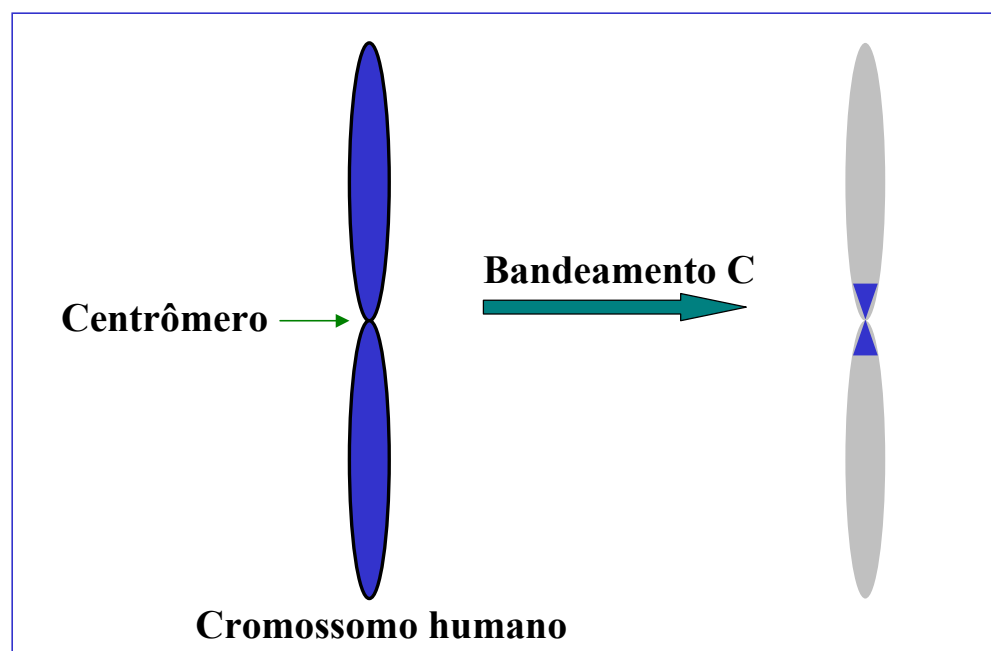


Figura 8 Bandejamento C de um cromossomo humano, com o destaque da região centromérica.

Na técnica de bandejamento C, os cromossomos espalhados na lâmina são mergulhados numa solução de hidróxido de bário. Durante este procedimento, o DNA é fragmentado e progressivamente eliminado do cromossomo. No entanto, o DNA da heterocromatina é menos extraído (TILGEN, N. et al., 2001).

Nos cromossomos humanos, a heterocromatina constitutiva forma pequenos blocos idênticos para cada par de homólogos, exceto o par sexual. No homem, o cromossomo Y é mais fortemente corado pelo bandejamento C (TILGEN, N. et al., 2001).

De um modo geral, no bandejamento C, os cromossomos 1, 9, 16 e Y são os que apresentam polimorfismo (várias formas) mais evidente, e são os mais facilmente identificados por esta técnica, apresentando uma coloração mais intensa da região centromérica (TILGEN, N. et al., 2001).

2.5.3 Ciclo celular

O esquema do ciclo celular da Figura 9 mostra o estágio de interfase, constituído pelos períodos G1, S e G2, e mitose (M) (ALBERTS et al., 1997).

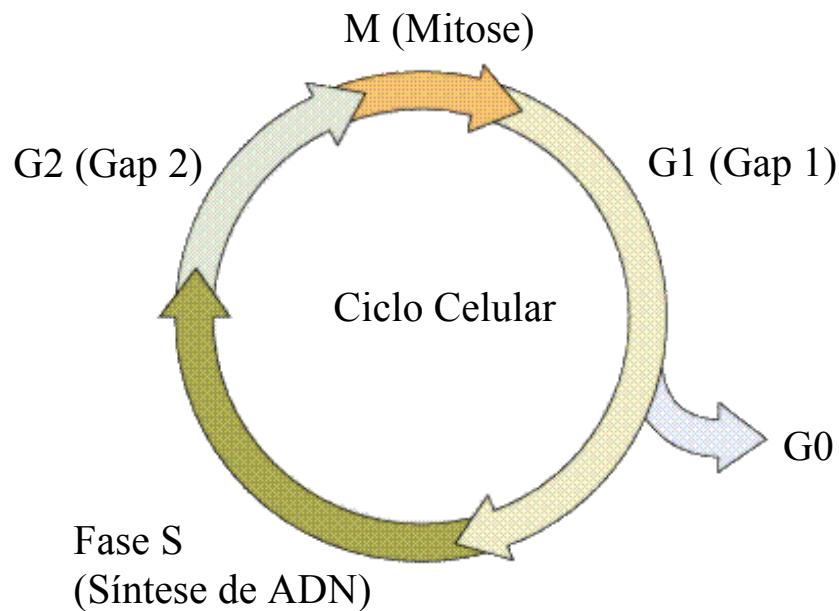


Figura 9 Esquema do ciclo celular, mostrando as fases G0, G1, S, G2 e M.

O período entre duas divisões celulares é conhecido por G0 (G de *gap*, ou intervalo), no qual a célula não se divide, como ocorre com a maioria dos linfócitos presentes no sangue periférico. A célula depende de estímulos externos (mitógenos extracelulares ou fatores de crescimento) para sair da fase G0 e dar continuidade ao ciclo celular. Na fase G1, a célula sintetiza as proteínas necessárias para a replicação do DNA. Na fase S, a célula duplica o seu material genético e os cromossomos passam a ter duas cromátides unidas pelo centrômero, cada uma constituída de dupla fita de DNA idênticas. Na fase G2, a célula produz as proteínas necessárias para a mitose, que ocorre de fato na fase M (ALBERTS et al., 1997; BUSHONG, 1997).

A Figura 10 mostra um esquema representativo da mitose, que pode ser dividida nas seguintes etapas: prófase, prometáfase, metáfase, anáfase, telófase.

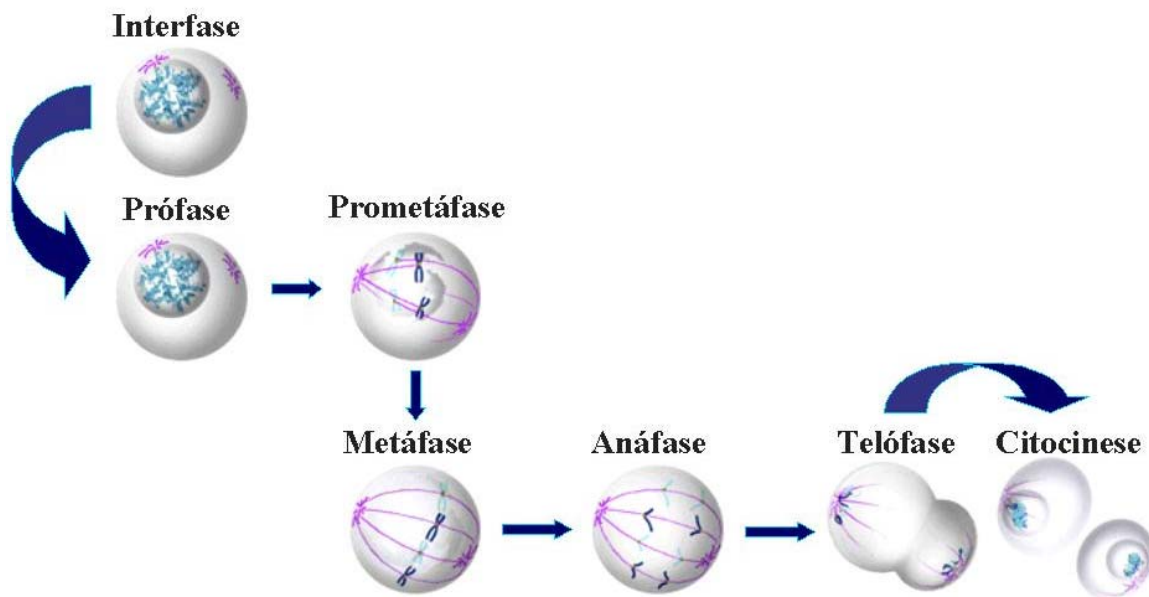


Figura 10 Estágios da mitose: Intérfase – Prófase – Prometáfase – Metáfase – Anáfase – Telófase – Citocinese (ALBERTS et al., 1997).

Na metáfase, os cromossomos estão localizados na placa equatorial da célula no seu estado mais condensado. Nesta fase, são estudadas as aberrações cromossômicas instáveis,

bem como é possível estudar o cariótipo na investigação de doenças hematológicas. Na anáfase, as cromátides irmãs são separadas, e cada uma migra para extremidades opostas das células que darão origem às células filhas. Na telófase, ocorre a reconstituição da membrana nuclear e a divisão do citoplasma (citocinese), que dá origem às duas células filhas. Os micronúcleos, que resultam das aberrações cromossômicas instáveis ou de perdas de cromossomos inteiros, podem ser visualizados nesta etapa (RIBEIRO et al., 2003).

2.5.4 Análise de aberrações cromossômicas

Em geral, dois tipos de aberrações cromossômicas são investigados em dosimetria citogenética: estáveis e instáveis. As aberrações cromossômicas estáveis consistem em alterações tais como translocações, deleções e inserções de genes envolvendo o mesmo cromossomo ou diferentes cromossomos, podendo ser identificadas pelo bandejamento G ou pela técnica de hibridização fluorescente in situ (FISH). As aberrações estáveis são consideradas melhores biomarcadores para a avaliação da dose em casos onde há um longo período entre a exposição e o momento da investigação por este método (SAVAGE, 1975; RAMALHO et al., 1995; PALA et al., 2001).

As aberrações cromossômicas instáveis são alterações na estrutura dos cromossomos, que podem se apresentar na forma dicêntrica, em anel ou como fragmentos, identificados pela técnica de citogenética convencional. As aberrações instáveis são geralmente consideradas específicas da exposição à radiação ionizante e vêm sendo amplamente empregadas para estimativa da dose absorvida em casos de exposições mais recentes, envolvendo dias a semanas (VOISIN et al., 2002). A Figura 11 apresenta um exemplo de metáfase de um indivíduo exposto à radiação ionizante, evidenciando dois cromossomos dicêntricos (seta vermelha) e um em anel (seta azul).

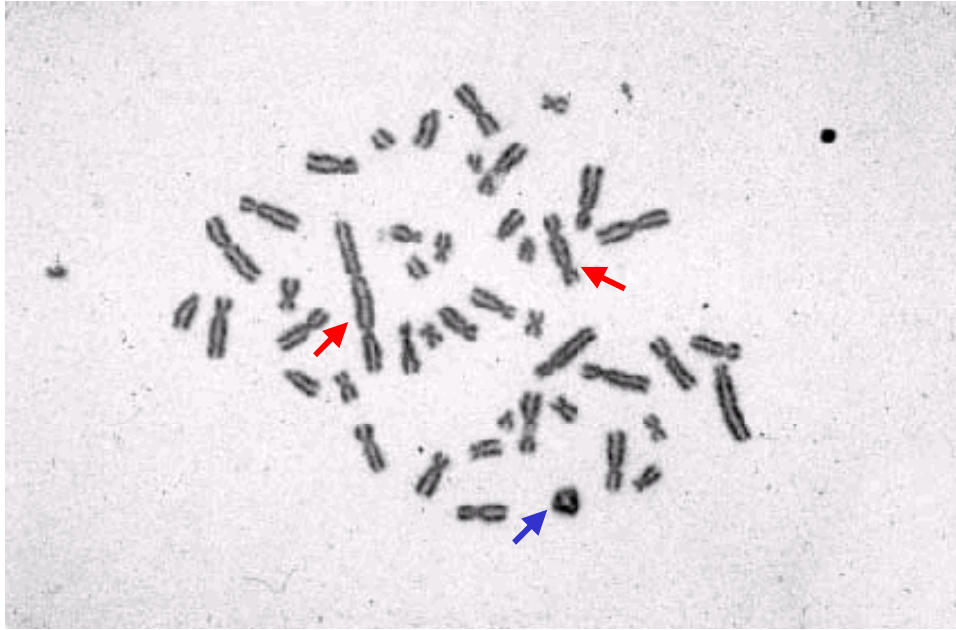


Figura 11 Metáfase de um indivíduo exposto à radiação ionizante, mostrando dois cromossomos dicêntricos (seta vermelha) e um em anel (seta azul) (IAEA, 2001).

A avaliação de aberrações cromossômicas instáveis vem sendo recomendada como método alternativo ou complementar à dosimetria física, principalmente em acidentes radiológicos, onde os indivíduos geralmente não portam dosímetros. O estudo dos danos citogenéticos permite, para os efeitos determinísticos (doses superiores a 1 Gy), alertar os médicos quanto aos efeitos da Síndrome da Radiação Aguda, auxiliando no planejamento da terapia do indivíduo irradiado antes mesmo do agravamento dos sintomas. Para os efeitos estocásticos (doses inferiores a 1 Gy), como é o caso de trabalhadores ocupacionalmente expostos à radiação ionizante, este método permite avaliar o provável risco de câncer (IAEA, 2001).

A demonstração de um baixo nível de aberrações cromossômicas, e conseqüentemente de uma baixa dose absorvida, pode auxiliar consideravelmente os médicos em tranquilizar e aconselhar as pessoas que invariavelmente tem exagerado seus medos de vir a desenvolver câncer (LLOYD, 1998).

Para a estimativa da dose absorvida, compara-se o efeito biológico observado “in vivo” com o obtido em culturas de linfócitos irradiados “in vitro” com doses conhecidas (HALL, 1994; IAEA, 2001; OLIVEIRA, 2002). A Figura 12 mostra duas curvas de dose *versus* número de cromossomos dicêntricos por células, produzidos por radiação gama. Numa delas, os dados estão ajustados numa relação linear-quadrática, como esperado para cromossomos dicêntricos e cromossomos em anel que resultam das quebras das regiões terminais de cromossomos (IAEA, 2001).

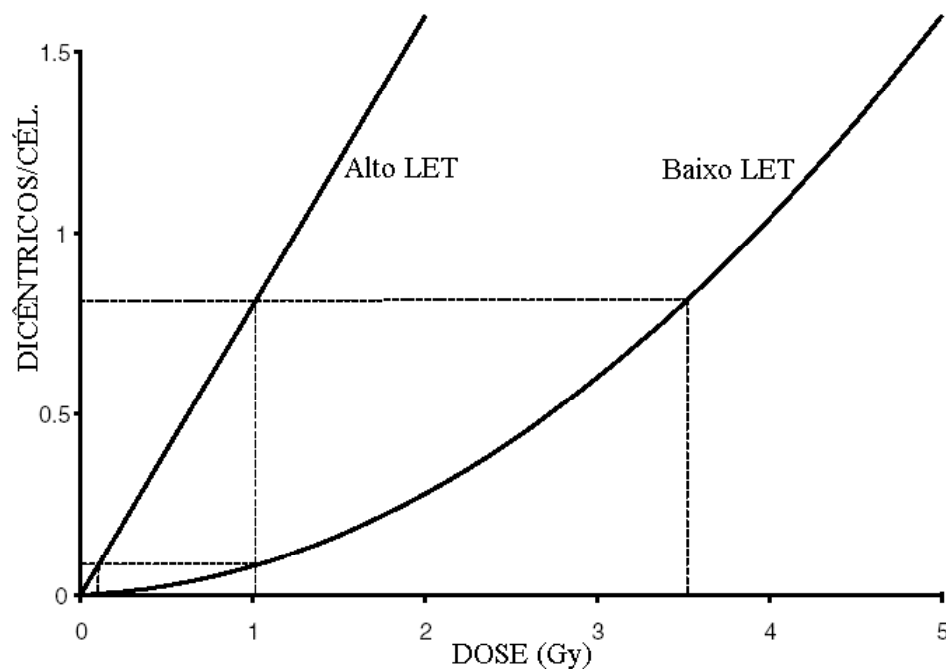


Figura 12 Curva de dose versus efeito biológico (IAEA, 2001).

Observa-se ainda na Figura 12 que, quanto maior for o LET da radiação, as aberrações cromossômicas instáveis se aproximam de uma resposta linear à dose, pois a densidade de ionizações ao longo da trajetória da radiação é capaz de provocar um número maior de quebras cromossômicas. Portanto, a curva dose-efeito biológico é necessária para interpretar os resultados de cromossomos aberrantes em função da dose de radiação, e pode ser construída com base em parâmetros físicos básicos que caracterizam um feixe de

radiação, como o tipo de radiação (baixo ou alto-LET) e a taxa de dose. (VENKATACHALAM et al., 1999; TESTARD et al., 1997).

A equação desta curva é descrita geralmente por uma equação polinomial do segundo grau, também conhecida por “linear-quadrática”, descrita na Equação 3 (IAEA, 2001):

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

Na Equação 3, Y é a frequência de aberrações cromossômicas radioinduzidas, D é a dose, A representa a frequência de aberrações devido à radiação natural, α é o coeficiente linear e β o coeficiente quadrático da dose (IAEA, 2001).

A correlação entre a frequência de aberrações cromossômicas instáveis e a dose absorvida pode ser realizada pelo cálculo de Monte Carlo, que simula através de experimentos teóricos, o comportamento das partículas/fótons ao interagirem com o sistema biológico e suas interações com o meio absorvente (AMARAL, 2002).

A IAEA publicou um relatório sobre dosimetria citogenética, em 1986, o qual foi revisado em 2001, contendo informações de pesquisa e desenvolvimento sobre a análise de cromossomos dicêntricos, incluindo as suas vantagens, utilidade em casos particulares de circunstâncias acidentais e protocolos para o laboratório (VOISIN et al., 2002).

No acidente de Chernobyl em 1986, por exemplo, este método teria sido útil em alertar os médicos quanto ao real risco à saúde das vítimas, evitando que muitas delas viessem a óbito por reação enxerto *versus* hospedeiro após transplante de medula óssea. na cidade de Goiânia (Brasil) em 1987, com a exposição de indivíduos a uma fonte radioativa de Césio (^{137}Cs) de aplicação na medicina, realizou-se a análise citogenética para averiguar a frequência de aberrações cromossômicas instáveis logo após a exposição, como também foi possível investigar a validade de se aplicar a dosimetria retrospectiva anos mais tarde (LLOYD, 1998).

O papel significativo da dosimetria citogenética em muitos países tem demonstrado a necessidade de uma padronização da técnica, compatível com os programas nacionais de proteção radiológica. Neste sentido, a Organização Internacional de Padronização (ISO) criou um grupo de trabalho destinado à padronização da dosimetria citogenética. Este grupo consiste em 13 cientistas de 11 países representativos da Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA), que definiram um texto incluindo os aspectos críticos para o uso da análise das aberrações cromossômicas instáveis como dosímetro biológico e o estabelecimento de uma curva referência do tipo dose *versus* efeito biológico (VOISIN et al., 2002).

2.5.5 Análise de micronúcleos

Em 1967, Carter descobriu que era possível demonstrar a inibição da citocinese de células de camundongo “in vitro”, através da adição de citocalasina B ao meio de cultura, sem que houvesse bloqueio da mitose. A citocalasina B (CtB) é um inibidor da polimerização da proteína actina requerida para a formação do anel de microfilamentos que induzem a contração do citoplasma e separação da célula em duas células filhas (citocinese). No teste do micronúcleo, o uso da citocalasina B leva ao bloqueio da citocinese, mas não da divisão nuclear, resultando em um acúmulo de células binucleadas a partir de células que passaram por apenas um ciclo de divisão (RIBEIRO et al., 2003).

O micronúcleo é um subproduto das aberrações cromossômicas instáveis ou de perdas de cromossomos inteiros, sendo uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal, como mostrado na Figura 13. Os micronúcleos são formados durante a telófase da mitose ou meiose, quando o envelope nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos das células filhas (RIBEIRO et al., 2003).

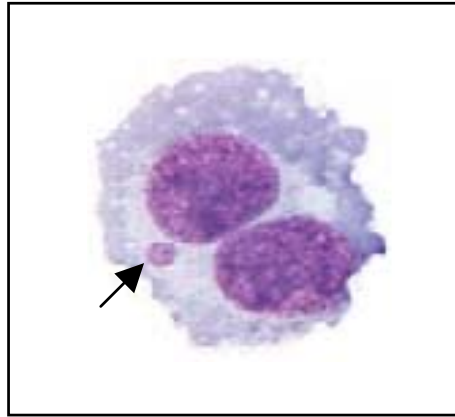


Figura 13 Célula linfocitária humana binucleada com presença de um micronúcleo indicado pela seta (RIBEIRO et al., 2003).

Portanto, os micronúcleos são resultado de danos cromossômicos estruturais ou do aparelho mitótico. Os danos no DNA causados pela exposição à radiação ionizante somente são expressos em micronúcleos após um ciclo de divisão celular (VOISIN et al., 2002).

A quantificação de micronúcleos em linfócitos do sangue periférico é um método de análise mais fácil e conseqüentemente mais rápido, que não requer profissional especializado em citogenética, ao contrário da quantificação de aberrações cromossômicas instáveis pela técnica de citogenética convencional (VOISIN et al., 2002).

De maneira similar à avaliação de aberrações cromossômicas, é possível estabelecer uma curva de calibração de dose *versus* efeito biológico para a análise de micronúcleos, com amostras de sangue irradiadas “in vitro” (Figura 14). Com isso, é possível relacionar o número de micronúcleos observados num total de células binucleadas analisadas com a dose absorvida (VENKATACHALAM et al., 2000; VOISIN et al., 2002).

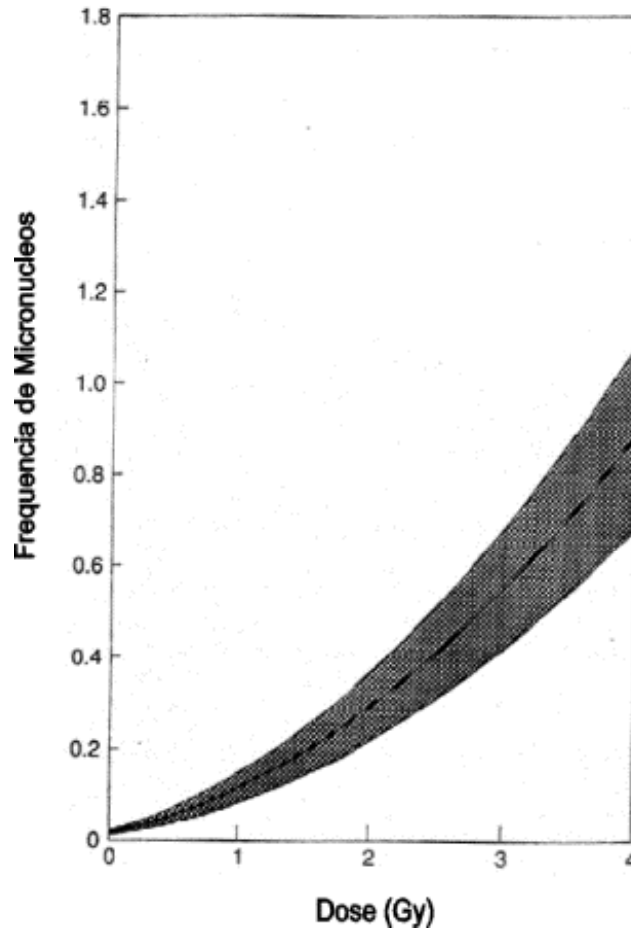


Figura 14 Curva dose-resposta de micronúcleos (VENKATACHALAM et al., 2000).

O surgimento de micronúcleos não é específico de uma exposição à radiação ionizante, podendo ser útil para o monitoramento genotóxico de populações na avaliação do potencial mutagênico de uma variedade de agentes químicos e físicos, bem como em estudos sobre a radiosensibilidade individual e predição da radiosensibilidade de tumores (BURRIL et al., 2000).

Com o desenvolvimento de técnicas de citogenética molecular, foi possível distinguir os micronúcleos resultantes de quebras cromossômicas induzidas pela radiação ionizante dos provenientes de perdas cromossômicas causadas por agentes químicos. Para tanto, utilizam-se sondas de DNA específicas para os centrômeros. Assim, caso o micronúcleo contenha centrômero, ele é proveniente de perdas cromossômicas. Caso não

tenham centrômeros, são resultantes de fragmentos acêntricos, característicos da ação de agentes físicos clastogênicos (que quebram os cromossomos), que é o caso das radiações ionizantes (VOISIN et al., 2002).

Esta pesquisa objetivou avaliar os dois métodos mais amplamente empregados em biodosimetria, a quantificação de aberrações cromossômicas instáveis e micronúcleos, bem como o emprego da técnica de bandeamento C no controle de qualidade em análises de cromossomos dicêntricos e em anel. Desta forma, os resultados obtidos neste trabalho serão úteis para posteriores avaliações de exposições de indivíduos à radiação ionizante.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Indivíduos Estudados

Foram realizados estudos preliminares em pessoas não expostas à radiação ionizante, denominadas X e Y, de 25 e 43 anos de idade, respectivamente. O propósito destes estudos foi o de reproduzir as metodologias previamente definidas em pesquisas anteriores, comparando os resultados obtidos com os apresentados na literatura (VOISIN et al., 2001; 2002; MAGNATA, 2002; BARBOSA; 2003; SUZUKI, 2003).

Com o objetivo de comparar as metodologias de aberrações cromossômicas instáveis e micronúcleos, foram avaliados profissionais de saúde que trabalham diretamente ou indiretamente com radiação ionizante. Neste sentido, buscou-se identificar os trabalhadores interessados em participar desta pesquisa, tendo todos assinado o termo de consentimento livre e esclarecido e preenchido um questionário conforme apresentado no Anexo 1.

Os indivíduos estudados receberam os códigos A, B, C, D, E, F, G, H e I, para facilitar a identificação das amostras e preservar suas identidades. Desta forma, procurou-se realizar o biomonitoramento destes profissionais que desempenham atividades em diferentes clínicas: Radioterapia (Clínica I); Medicina Nuclear (Clínica II); Radiologia Intervencionista (Clínica III).

Os indivíduos A e D, apesar de trabalharem na clínica de Radioterapia, não trabalham diretamente com a fonte de radiação, servindo de controle para o estudo da

contribuição da radiação de fundo da clínica I para as frequências de aberrações cromossômicas instáveis e micronúcleos. Um resumo das respostas do questionário é apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 Dados obtidos através do questionário apresentado aos profissionais de saúde.

Profissionais de saúde	Função	Clínica	Tempo (anos)	Idade (anos)	Sexo	Fumante
A	Auxiliar de Enfermagem	I	9	48	F	Sim
B	Técnico de Radiologia	I	5	34	M	Não
C	Físico Médico	I	8	33	F	Não
D	Auxiliar administrativo	I	10	39	F	Não
E	Físico Médico	I	2	43	M	Não
F	Físico Médico	II	18	41	M	Não
G	Médico Traumatologista	III	13	36	M	Sim
H	Médico Traumatologista	III	15	43	F	Sim

➤ Na clínica I, os profissionais estudados trabalham com dois equipamentos de radioterapia:

- 1) Acelerador Linear (Clinac 4 MV; fabricante – VARIAN) com taxa de dose de 1 Gy (100 cGy) por minuto;
- 2) Teleterapia com fonte de ^{60}Co com taxa de dose de 0,3274 Gy min⁻¹ (32,74 cGy.min⁻¹).

- Na clínica II, o profissional F trabalha com o radionuclídeo ^{99m}Tc .
- Na clínica III os profissionais trabalham com radiologia intervencionista. O equipamento consiste num Arco Cirúrgico (SIEMENS), modelo Unimax, e um intensificador de imagem (PRECISE OPTICS).

3.2 Metodologia para a Análise de Aberrações Cromossômicas Instáveis

3.2.1 Cultura de linfócitos do sangue periférico

Através de punção venosa, foram coletados cerca de 5 mL de sangue periférico de doadores voluntários, com seringa estéril descartável contendo o anticoagulante heparina sódica (ACTPARIN – BERGAMO) na concentração de 5000 U/mL (IAEA, 2001).

O meio de cultura consistiu em 4 mL de meio de cultura RPMI 1640 (CULTILAB-Campinas-SP), suplementado com 20% (1 mL) de soro fetal bovino (CULTILAB-Campinas-SP) e 2% (0,1 mL) de fitohemaglutinina (CULTILAB-Campinas-SP), para estimular a divisão celular. Em seguida, foram adicionados 0,3 mL de sangue total. A cultura foi incubada em estufa de CO_2 (5%) a 37° C por 48 horas (IAEA, 2001). Estas etapas foram previamente discutidas por BARBOSA (2003) e MAGNATA (2002).

3.2.2 Procedimento técnico para a retirada da cultura

Aproximadamente 2 horas antes do término da incubação, adicionou-se colchicina ou colcemid (SIGMA) para uma concentração final de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ em cada frasco de cultivo de linfócitos, para a obtenção de células em metáfase (IAEA, 2001).

Após completar 48 horas de incubação da cultura de linfócitos, o material foi transferido para um tubo afunilado e centrifugado a 400 g por 6 minutos. Em seguida, o

sobrenadante foi desprezado, sendo realizada a lavagem do sedimento com 7 mL de solução de KCl 0,56% para o rompimento das membranas celulares e nucleares (IAEA, 2001; RIBEIRO, 2003).

O material foi para a estufa de CO₂ a 5% na temperatura de 37°C por mais 15 minutos. Decorrido este tempo, foi adicionado 1 mL de fixador, que consiste em metanol e ácido acético na proporção de 3:1. Centrifugou-se a 400 g por 6 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento suspenso em 7 mL de fixador (IAEA, 2001; RIBEIRO, 2003).

Após o repouso de 30 minutos, à temperatura ambiente, o material foi centrifugado novamente a 400 x g por 6 minutos, sendo desprezado o sobrenadante e ressuspenso o sedimento em 7 mL de fixador. Repetiu-se esta etapa por duas vezes ou até o sedimento se tornar límpido (esbranquiçado), deixando por último cerca de 1 mL de fixador (IAEA, 2001; RIBEIRO, 2003).

3.2.3 Preparo das lâminas e análise

Antes do preparo das lâminas, as mesmas foram armazenadas imersas em água destilada a 4 °C, lavadas e sem resíduos de gordura. Retirou-se a lâmina do reservatório, deixando escorrer o excesso de água em papel absorvente e esperando secar à temperatura ambiente. Gotejaram-se 2 a 4 gotas da suspensão de células sob a lâmina em posição horizontal, inclinando levemente para o espalhamento do material (IAEA, 2001).

Após secagem, à temperatura ambiente ou à 37° C em estufa de secagem, as lâminas foram coradas com a solução de 0,5 mL de corante Giemsa e 12 mL de tampão fosfato a um pH de 6,8, cobrindo toda a lâmina com uma camada uniforme, por 3 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente e colocadas na estufa de secagem por alguns minutos (IAEA, 2001). Após a preparação das lâminas, as mesmas foram analisadas por microscopia óptica. A Figura 15 é um esquema simplificado destas etapas.

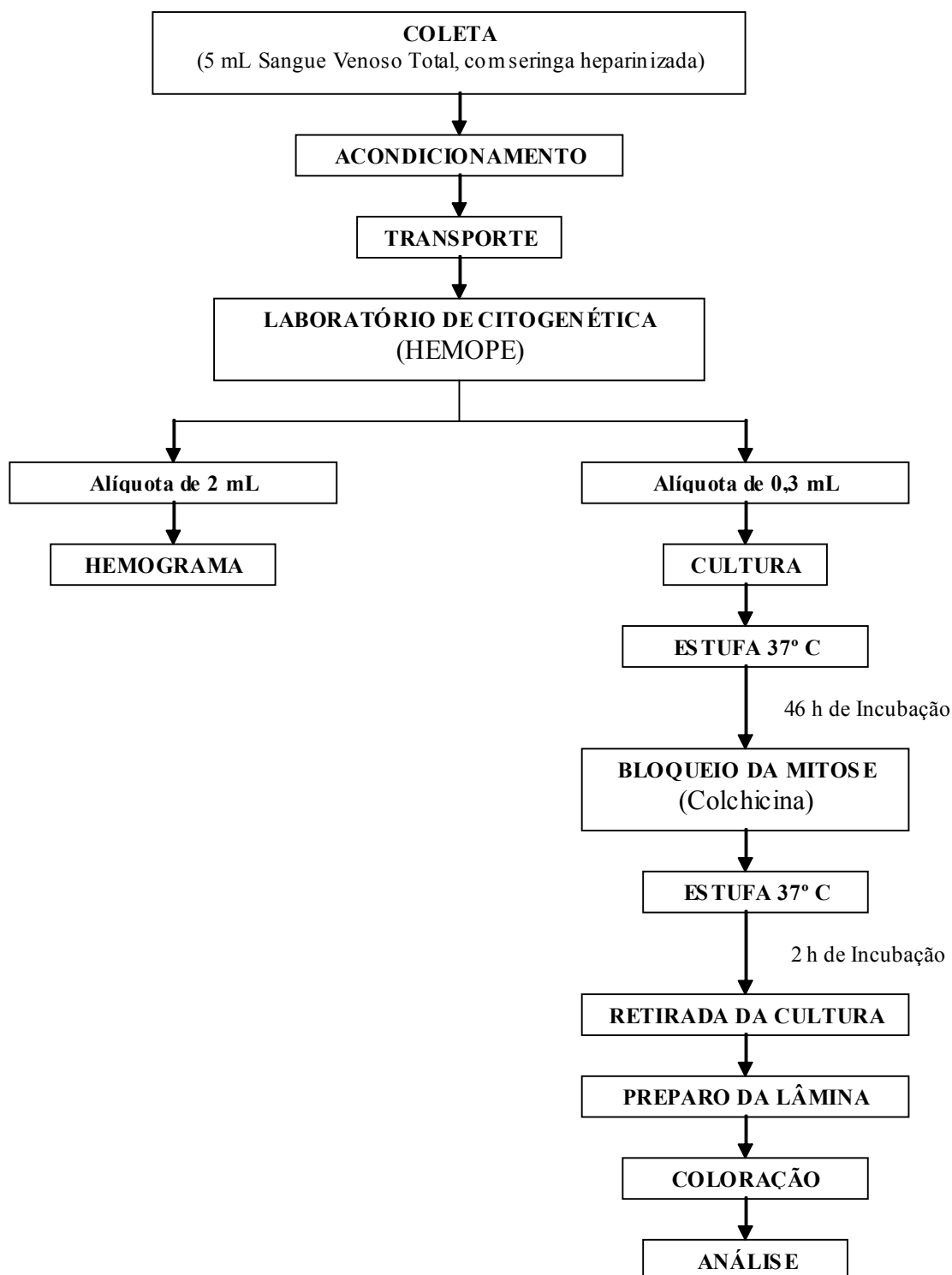


Figura 15 Fluxograma mostrando as etapas de coleta, incubação da cultura, preparo das lâminas e análise microscópica.

As análises citogenéticas foram realizadas ao microscópio óptico (OLYMPUS BX 60) na objetiva de aumento de 20X, e após a localização de uma célula em metáfase, mudou-se para a objetiva de imersão, de aumento de 100X (MAGNATA, 2002; BARBOSA, 2003).

Investigou-se a presença de alterações no número de cromossomos e/ou de presença de aberrações cromossômicas instáveis. As aberrações cromossômicas instáveis foram quantificadas em 1000 células em metáfase de cada indivíduo. Em 10 indivíduos investigados, analisou-se um total de 10000 metáfases (IAEA, 2001). As fotomicrografias de células em metáfase foram obtidas através da captura de imagens com câmera digital PIPER GMBH FK-7512-IQ e software Leica CW 4000 karyo Version 1.0 (LEICA).

3.2.5 Técnica de bandeamento C

A técnica de bandeamento C foi realizada segundo GUERRA & SOUZA (2002). As lâminas foram submetidas inicialmente à hidrólise com HCl 0,2N por 30 minutos à temperatura ambiente. A hidrólise foi interrompida fazendo-se mergulhar a lâmina três ou quatro vezes em água destilada.

Em seguida, as lâminas foram incubadas em uma 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 envelhecidas a 3 dias e 1 minuto para lâminas mais recentes.

A ação do hidróxido de bário foi interrompida após lavar a lâmina em banhos rápidos de HCl (0,2N) e água destilada, dois minutos em cada. A etapa seguinte foi a

incubação durante 45 minutos em solução salina citrato duplamente concentrada (SSC-2x) a 60° C. A incubação em SSC-2x foi seguida de lavagem das lâminas com água destilada e secagem ao ar. As lâminas foram coradas durante 10 minutos em solução de GEMSA e analisadas ao microscópio óptico.

3.3 Metodologia para a Análise de Micronúcleos

3.3.1 Cultura de linfócitos do sangue periférico

O procedimento técnico da cultura de linfócitos para a análise de micronúcleos é semelhante ao da metodologia para aberrações cromossômicas instáveis, com as seguintes modificações (FENECH, 1998; IAEA, 2001; MAGNATA, 2002; BARBOSA, 2003):

- Adicionou-se ao meio de cultura 1,5 mL de soro fetal bovino, em lugar de 1 mL;
- Incubou-se por 72 horas, ao invés de 48 horas;
- Após 44 horas de incubação, foram adicionados à cultura citocalasina B (SIGMA), numa concentração final de 5 µg/mL, para a obtenção de células linfocitárias binucleadas.

3.3.2 Retirada da cultura

Este procedimento também é similar ao da técnica de aberrações cromossômicas instáveis, porém acrescenta-se no início 7 mL de NaCl (0,9%), em lugar de KCl 0,56%, para que não haja o rompimento da membrana celular e nuclear, tornando possível visualizar os núcleos principais da célula binucleada bem como a possível presença de micronúcleos (FENECH, 1989; IAEA, 2001).

3.3.3 Preparo das lâminas

Foram gotejadas de 2 a 4 gotas da suspensão de células por lâmina, a depender da concentração do material obtido. As lâminas foram previamente lavadas e secas a temperatura ambiente e coradas com Giemsa por 3 minutos (IAEA, 2001; MAGNATA, 2002; BARBOSA, 2003).

3.3.4 Interpretação microscópica

A lâmina corada foi analisada ao microscópio óptico (LEITZ WETZLAR MPV2) na objetiva de aumento de 20X, percorrendo a lâmina para a observação de células binucleadas. Na objetiva de aumento de 100X, realizou-se a análise dos micronúcleos encontrados para a confirmação dos mesmos. Os micronúcleos foram quantificados em 1000 células binucleadas de cada indivíduo (IAEA, 2001). Em 10 indivíduos investigados, analisou-se um total de 10000 células binucleadas. As fotomicrografias de células binucleadas foram obtidas através da captura de imagens com câmera digital KODO KC-512-NT e software Leica Qwin Lite V 2.6 (LEICA). No total desta pesquisa, foram analisados 20000 linfócitos humanos para ambas as metodologias.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudos Preliminares

A Tabela 3 mostra as frequências de aberrações cromossômicas instáveis e micronúcleos em linfócitos do sangue periférico dos indivíduos X e Y não expostos ocupacionalmente às radiações ionizantes.

Tabela 3 Frequências de aberrações cromossômicas instáveis em 1000 linfócitos em metáfase e de micronúcleos em 1000 linfócitos binucleados dos indivíduos não expostos à radiação ionizante.

Indivíduo (idade/sexo)	Dc	An	Fr	FABI	MN	FMN
X: 25/M	0	0	0	0,000	2	0,002
Y: 40/M	0	0	0	0,000	5	0,005

Dc- Dicêntricos

An – Anéis

Fr – Fragmentos

FABI – Frequência de aberrações cromossômicas instáveis

MN - Micronúcleos

FMN – Frequência de micronúcleos

Não foram encontrados cromossomos dicêntricos, em anel ou fragmentos em 1000 linfócitos analisados em metáfase de cada indivíduo, tendo sido obtidas frequências basais de micronúcleos em 1000 linfócitos binucleados de ambos, conforme apresentado na Tabela 3. Estes valores eram esperados com base em trabalhos internacionais de referência (IAEA n. 405, LLOYD, 1998; VOISIN et al., 2002), bem como em trabalhos regionais (MAGNATA, 2003;

BARBOSA, 2003). Os leucogramas também apresentaram valores dentro dos limites normais de referência (IAEA, 2001).

4.2 Profissionais de Saúde Estudados

Todos os profissionais de saúde estudados apresentaram resultados de leucogramas dentro dos valores considerados normais, independentemente do sexo, idade e atividade desempenhada, com uma concentração de linfócitos no sangue periférico dentro do limite normal de 1300-4800/mm³ (IAEA, 2001), conforme observado na Tabela 4.

Tabela 4 Concentração de linfócitos nos profissionais de saúde.

Profissionais de saúde	Linfócitos / mm³ de sangue
A	2500
B	3400
C	2800
D	3700
E	2300
F	3700
G	2400
H	2300

Todos os indivíduos acima relataram não ter tido contato anterior com agentes químicos, o que poderia vir a interferir nos leucogramas e nas frequências de aberrações cromossômicas instáveis e micronúcleos (AMARAL, 2002).

4.2.1 Auxiliar de enfermagem e auxiliar administrativo

Foram realizadas análises buscando identificar e quantificar as aberrações cromossômicas instáveis e micronúcleos nos indivíduos auxiliar de enfermagem (A) e auxiliar administrativo (D), que trabalham na clínica I. Estes profissionais não trabalham diretamente

com a fonte de radiação, servindo de controle no estudo da contribuição da radiação de fundo da clínica I para a formação de aberrações cromossômicas instáveis e micronúcleos.

A Tabela 5 resume os resultados obtidos, mostrando que estes indivíduos não apresentaram cromossomos dicêntricos, em anel ou fragmentos, em 1000 linfócitos de cada indivíduo analisados em metáfase. Além disso, observou-se uma frequência basal de micronúcleos, para cada 1000 células binucleadas, resultado este semelhante àqueles obtidos com indivíduos não expostos ocupacionalmente à radiação ionizante.

Tabela 5 Frequências de aberrações cromossômicas instáveis em 1000 células em metáfase e de micronúcleos em 1000 células binucleadas da auxiliar de enfermagem (A) e auxiliar administrativo (D).

Trabalhador (idade/sexo)	Dc	An	Fr	FABI	MN	FMN
A: 48/F	0	0	0	0,000	5	0,005
D: 39/F	0	0	0	0,000	9	0,009

Dc- Dicêntricos

An – Anéis

Fr – Fragmentos

FABI – Frequência de aberrações cromossômicas instáveis

MN - Micronúcleos

FMN – Frequência de micronúcleos

4.2.2 Técnico em radiologia e físicos-médicos

Ao realizar esta investigação tanto no técnico em radiologia (C) quanto nos físicos-médicos (E e F), observou-se a presença de aberrações cromossômicas instáveis, assim como uma maior frequência de micronúcleos quando comparado aos resultados apresentados acima, conforme mostra a Tabela 6.

Tabela 6 Frequências de aberrações cromossômicas instáveis em 1000 células em metáfase e de micronúcleos em 1000 células binucleadas do técnico (B) e físico-médicos (C, E e F).

Trabalhador (idade/sexo)	Dc	An	Fr	FABI	MN	FMN
B: 34/M	1	0	2	0,003	14	0,014
C: 33/F	3	0	2	0,005	18	0,018
E: 43/M	2	1	2	0,005	14	0,014
F: 41/M	6	1	0	0,007	40	0,040

Dc- Dicêntricos

An – Anéis

Fr – Fragmentos

FABI – Frequência de aberrações cromossômicas instáveis

MN - Micronúcleos

FMN – Frequência de micronúcleos

Os físicos C e E trabalham em radioterapia no mesmo hospital. O físico F é o único que trabalha em medicina nuclear (clínica II), e foi o que apresentou a maior frequência de aberrações cromossômicas instáveis e micronúcleos, mesmo a leitura de seu dosímetro físico estando dentro dos limites recomendáveis da ICRP (1990). Durante o preenchimento do questionário, o mesmo comunicou que nem sempre faz uso do avental de chumbo, justificando as frequências obtidas.

Observa-se uma maior frequência de fragmentos acêntricos nos profissionais que trabalham em radioterapia, estando de acordo com o trabalho de ZAKERI & ASSAEI (2004), o qual avaliou aberrações cromossômicas instáveis e micronúcleos em enfermeiras, técnicos e médicos cardiologistas que trabalham em laboratórios de Angiocardiografia em hospitais do Iran.

4.2.3 Médicos traumatologistas

Na Tabela 7, verifica-se que o médico traumatologista que trabalha com radiologia intervencionista (G) apresentou uma menor frequência de aberrações cromossômicas instáveis e micronúcleos quando comparado à médica (H) que desempenha a mesma função, sendo

ambos da clínica III. Em entrevista, o mesmo afirmou seguir as normas de radioproteção, enquanto o indivíduo H revelou não usar avental de chumbo.

Ambos apresentaram radiodermite na mão esquerda como consequência dos procedimentos cirúrgicos realizados rotineiramente no exercício de suas profissões, tendo o médico G uma lesão mais grave que a lesão observada na mão da médica H. Este fenômeno foi atribuído ao tempo excessivo de exposição das mãos durante as referidas intervenções cirúrgicas.

Tabela 7 Frequências de aberrações cromossômicas instáveis em 1000 células e micronúcleos em 1000 células binucleadas dos médicos traumatologistas (G e H).

Trabalhador (idade/sexo)	Dc	An	Fr	FABI	MN	FMN
G: /M	1	0	0	0,001	2	0,002
H: /F	9	1	1	0,011	33	0,033

Dc- Dicêntricos

An – Anéis

Fr – Fragmentos

FABI – Frequência de aberrações cromossômicas instáveis

MN - Micronúcleos

FMN – Frequência de micronúcleos

Através do gráfico de barras mostrado na Figura 16, pode-se notar que os indivíduos não irradiados e auxiliares não apresentaram aberrações cromossômicas instáveis, ao contrário dos tecnólogos e médicos, sendo maior no físico em medicina nuclear e na médica que trabalha com radiologia intervencionista, justamente nos dois que revelaram não usar o avental de chumbo.

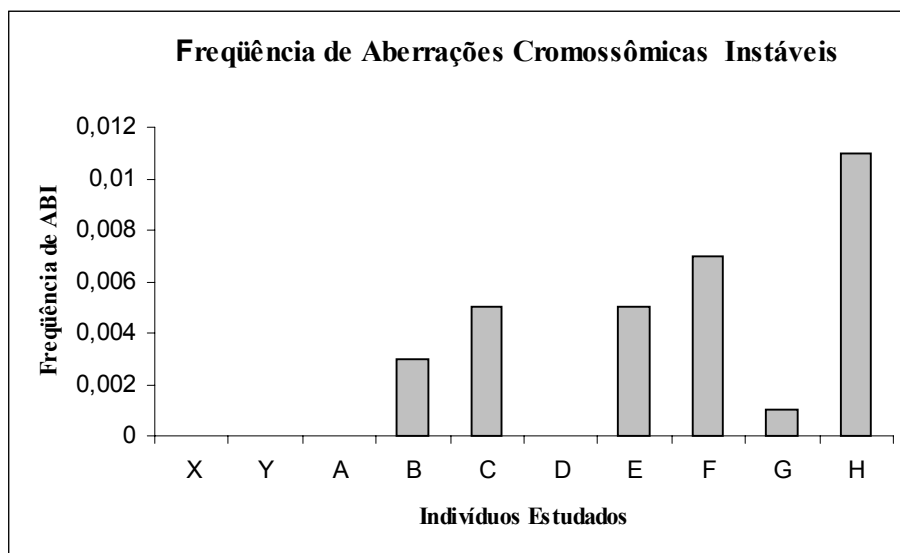


Figura 16 Frequências de aberrações cromossômicas instáveis nos indivíduos estudados

Quanto às frequências de micronúcleos, o gráfico de barras da Figura 17 evidencia a existência de uma frequência basal tanto para os indivíduos não expostos quanto para os profissionais de saúde que desempenham a função de auxiliares. Entretanto, as frequências de micronúcleos foram maiores novamente nos indivíduos F e H. Este resultado está de acordo com os resultados de uma pesquisa anterior, que constatou que as frequências de aberrações cromossômicas instáveis e micronúcleos são maiores em profissionais de saúde expostos à radiação ionizante, tais como enfermeiras, técnicos e médicos que trabalham com angiocardiorrafia, com relação às frequências obtidas de um grupo controle de pessoas não expostas à radiação (ZAKERI & ASSAEI, 2004).

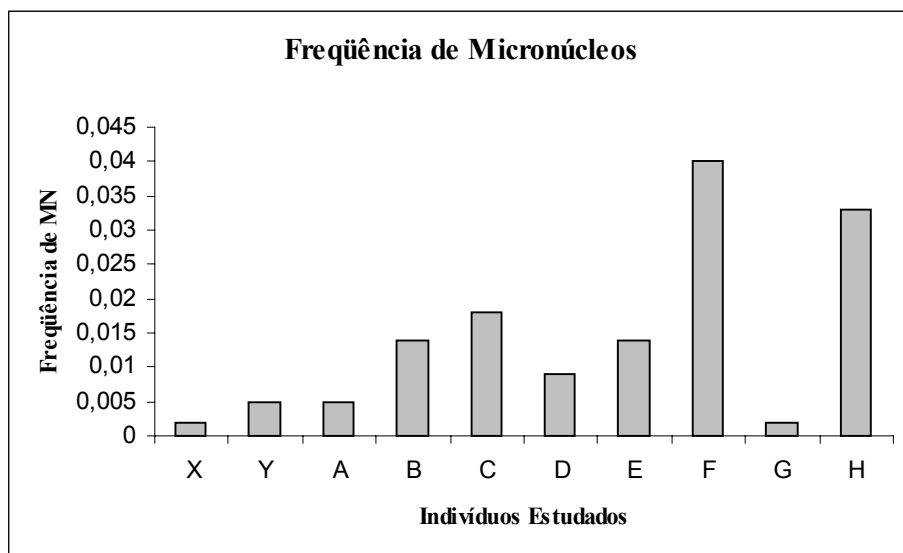


Figura 17 Gráfico apresentando as frequências de micronúcleos nos indivíduos estudados.

Estudos realizados por SLOZINA et al. (1997) e THIERENS et al. (2000), demonstraram não haver uma relação entre o fumo e as frequências de cromossomos dicêntricos, em anel, fragmentos e micronúcleos, quando comparados aos indivíduos não fumantes. Com isso, os resultados apresentados neste trabalho encontram-se dentro do esperado, uma vez que os indivíduos fumantes A e G obtiveram frequências dentro da faixa de normalidade.

A comparação entre as condições individuais de trabalho com as frequências de aberrações instáveis e micronúcleos, obtidas das análises citogenéticas, resultaram na mudança de comportamento dos profissionais envolvidos nesta pesquisa, no que se refere a uma melhor observância das normas de radioproteção. O mesmo não era evidenciado com o emprego da dosimetria física e da realização de leucogramas, já que nem sempre os indivíduos portavam seus dosímetros pessoais e os leucogramas não apresentavam qualquer alteração.

Portanto, as aberrações cromossômicas instáveis e micronúcleos em linfócitos do sangue periférico são importantes biomarcadores de exposição à radiação ionizante, úteis no biomonitoramento de trabalhadores expostos à radiação ionizante (THIERENS, 2000; 2002). O uso de biomarcadores também é ferramenta importante para estimar o provável risco de câncer

em populações expostas à agentes genotóxicos, tais como a radiação (BONASSI & W. AU, 2002).

4.3 Comparação entre os Métodos Avaliados

O tempo necessário para a obtenção de células em metáfase na avaliação de aberrações cromossômicas instáveis é inferior ao tempo requerido para o estudo de células binucleadas no estudo de micronúcleos. Por outro lado, a análise de aberrações cromossômicas instáveis foi mais demorada e laboriosa que a análise de micronúcleos. O tempo de contagem de aberrações cromossômicas instáveis e micronúcleos foi de 50 metáfases a cada 2 horas, e 500 células binucleadas neste mesmo tempo, similar ao trabalho de VOISIN e colaboradores (2000). Assim, o tempo requerido para a análise de células em metáfase foi 10 vezes superior ao tempo de análise de células binucleadas, como pode ser observado na Tabela 8.

Tabela 8 Comparação entre as metodologias de aberrações cromossômicas instáveis (ABI) e micronúcleos (MN).

Parâmetros Metodológicos	ABI	MN
Volume de sangue por cultura	0,3 mL	0,3 mL
Tempo de cultura	48 horas	72 horas
Adição de Colchicina	46 horas	X
Adição de Citocalasina B	X	44 horas
Número de células observadas	1000	1000
Corante	Giemsa	Giemsa
Tempo de contagem	40 horas	4 horas
Estimativa da dose	~ 1 Gy	~ 0,5 Gy
Limite inferior	1 Gy	0,5 Gy

Com base nos resultados obtidos, verifica-se que a análise de aberrações cromossômicas instáveis permanece uma técnica laboriosa e limitada a profissionais especializados em citogenética. O ensaio de micronúcleo é uma técnica mais fácil e

potencialmente mais rápida, a qual poderia substituir a avaliação de aberrações cromossômicas em caso de triagem. Segundo a IAEA (2001), os critérios para a contagem de micronúcleos incluem:

- a) O diâmetro do micronúcleo em linfócitos humanos usualmente varia entre 1/16 e 1/3 do diâmetro do núcleo principal;
- b) Os micronúcleos não são refratáveis e podem ser distinguidos dos artefatos como partículas do corante;
- c) Os micronúcleos não estão conectados ao núcleo principal;
- d) Os micronúcleos possuem membrana separada da membrana nuclear, visível ao microscópio;
- e) Os micronúcleos têm a mesma intensidade de coloração dos núcleos principais, mas ocasionalmente podem ter coloração mais intensa.

De acordo com estes critérios, foram incluídos nas contagens apenas os micronúcleos bem característicos, conforme a imagem da fotomicrografia da Figura 18 obtida nesta pesquisa.

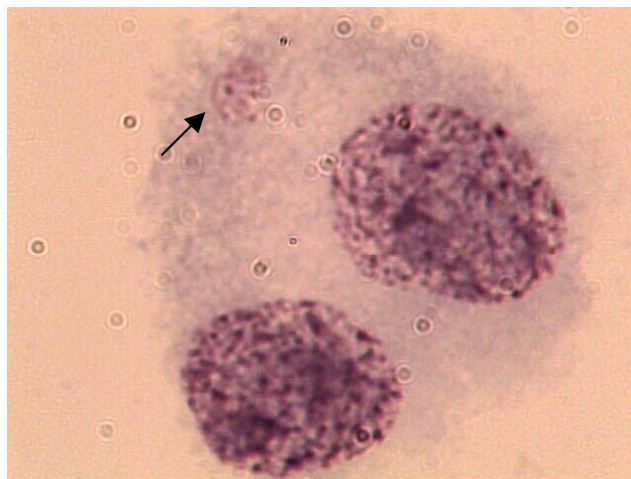


Figura 18 Fotomicrografia de uma célula binucleada com presença de micronúcleo indicado pela seta (100x).

A Agência Internacional de Energia Atômica considera como valor normal da frequência de micronúcleos o intervalo entre 0,002 a 0,036 para linfócitos do sangue periférico de indivíduos normais não expostos à radiação ionizante, cultivados em meio RPMI 1640 com fitohemaglutinina (IAEA, 2001). Contudo, estes valores de referência possuem uma larga faixa de variação entre laboratórios de diferentes países, relacionados a fatores como estilo de vida, habito alimentar, exposição a fatores ambientais diversos, estágio da doença como o câncer, diferentes radios sensibilidades, alterações no sistema imune ou na capacidade de reparo do DNA, faixa etária, sexo, fumo, etc (FENECH, 1998; SUZUKI, 2003).

De acordo com STREFFER et al. (1998), uma maior sensibilidade do teste do micronúcleo pode ser obtida quando os linfócitos são isolados e os micronúcleos são contados apenas em linfócitos B. Outra possibilidade é diferenciar os micronúcleos com centrômeros dos que não os contém, através de sondas centroméricas pela técnica de FISH. Assim, com o aumento das doses de radiação, mais fragmentos acêntricos são formados, resultando em micronúcleos sem centrômeros que, uma vez discriminados, aumentam a especificidade do teste.

A Tabela 9 resume as vantagens e limitações dos dois métodos de biomonitoramento, a avaliação de aberrações cromossômicas instáveis e micronúcleos em linfócitos do sangue periférico.

Tabela 9 Vantagens e limitações dos métodos de aberrações cromossômicas instáveis (ABI) e micronúcleos (MN).

Vantagens		Limitações
MN	De análise mais rápida e fácil	Elevado “background” – menor especificidade
ABI	Análise mais laboriosa	Menor “background” – maior especificidade

Portanto, em casos de suspeita de exposição individual à radiação ionizante, deve-se realizar a quantificação de micronúcleos em linfócitos do sangue periférico como teste preliminar, por ser de análise mais rápida que a de aberrações cromossômicas instáveis. A investigação de aberrações cromossômicas instáveis, por ser mais específica de uma exposição individual à radiação, deve ser a etapa subsequente em situações nas quais a frequência de micronúcleos for elevada.

VOISIN et al. (2001) sugere que o número de metáfases analisadas seja reduzido para 50 e o número de células binucleadas para 500, em triagens em casos de acidentes nucleares. Segundo o mesmo autor, em casos de irradiações excessivas de um ou mais indivíduo, a dosimetria citogenética é de importância fundamental em dois aspectos:

- 1) Alertar a equipe médica quanto ao planejamento do tratamento de vítimas de acidentes nucleares, em geral membros do público, antes mesmo da manifestação dos primeiros sintomas da síndrome da radiação aguda (SAR).
- 2) Confirmar uma suspeita de exposição excessiva, em geral, de trabalhadores ocupacionalmente expostos à radiação ionizante, e informá-lo quanto aos possíveis riscos para a sua saúde a curto e longo prazo.

Estes métodos também podem ser empregados quando o resultado da dosimetria física é duvidoso, principalmente em situações nas quais um trabalhador irradia o seu dosímetro no intuito de obter licença do serviço ou indenização da instituição onde trabalha. Este argumento justificaria o emprego das aberrações cromossômicas instáveis e micronúcleos como um instrumento médico-legal, como vem sendo observado em alguns países (VOISIN et al., 2002).

4.4 Bandeamento C

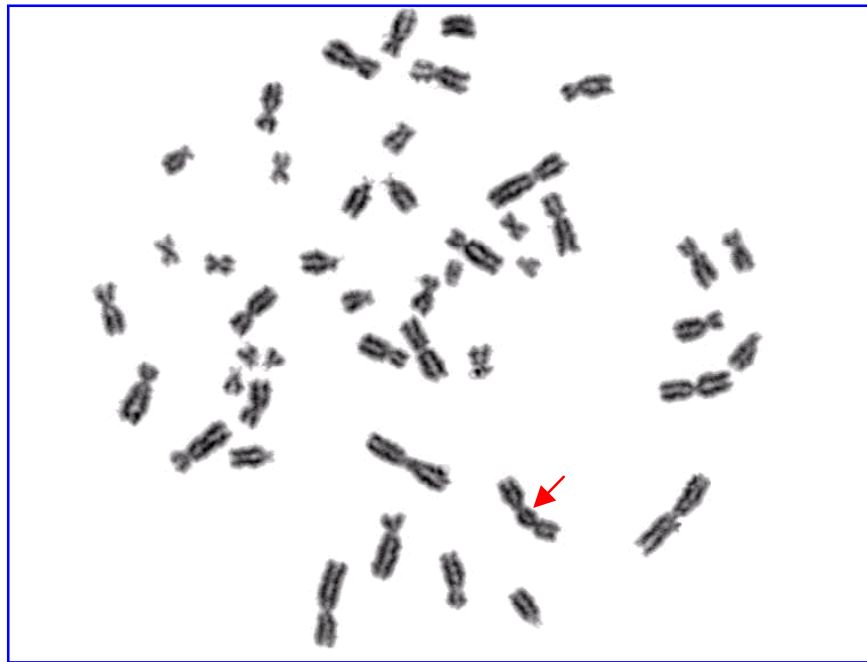
A confirmação de cromossomos dicêntricos foi realizada através da técnica de bandeamento C, que permite a coloração apenas da região centromérica dos cromossomos humanos, sem o custo das sondas de DNA pela técnica de FISH.

Após a visualização de um cromossomo com características de um dicêntrico por coloração convencional (Figura 19 – A), foi realizada a técnica de bandeamento C, sendo positivo ao apresentar duas bandas escuras referentes às regiões centroméricas (Figura 19 – B).

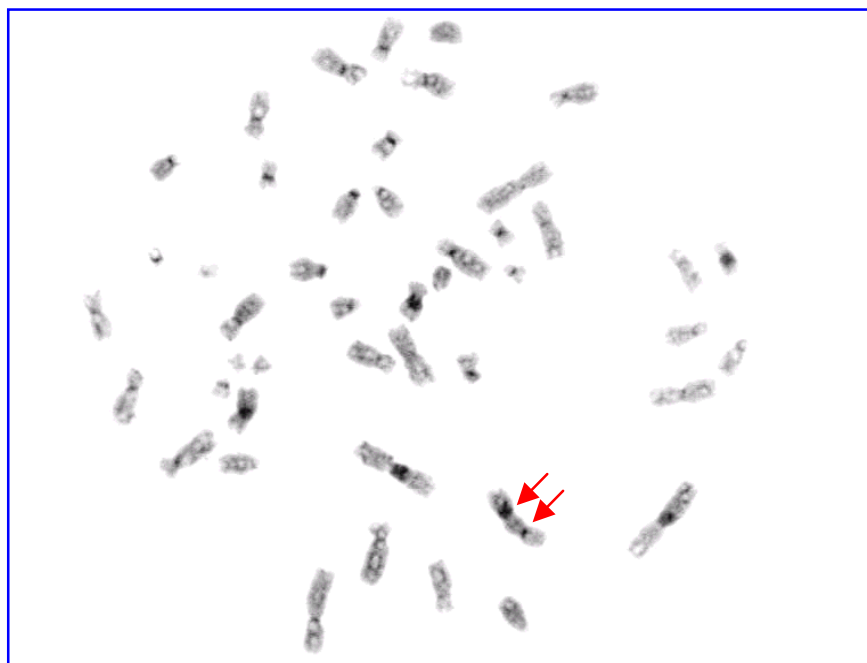
Na Figura 20 – A, um cromossomo apresentando uma constrição das cromátides em uma das extremidades, foi considerado duvidoso por apresentar características de um dicêntrico. Ao ser realizado o bandeamento C, foi visualizada apenas uma banda escura (Figura 20 – B), tratando-se portanto de um resultado negativo.

É importante ressaltar que a técnica de bandeamento C só é válida como teste confirmatório e não como teste de análise direta, uma vez que os cromossomos ficam muito claros, tornando mais difícil a sua visualização. Outro fato é que foi encontrado um resultado “falso-positivo”, ou seja, dois cromossomos muito próximos um do outro, identificados pela técnica de coloração convencional (Figura 21 – A), apareceram unidos após o bandeamento C, assumindo a forma dicêntrica (Figura 21 – B).

Ademais, a técnica de bandeamento C para a confirmação do cromossomo em anel analisado por coloração convencional (Figura 22 – A), uma vez que esta técnica facilita a observação do centrômero e da união entre as cromátides de um mesmo cromossomo (Figura 22 – B).

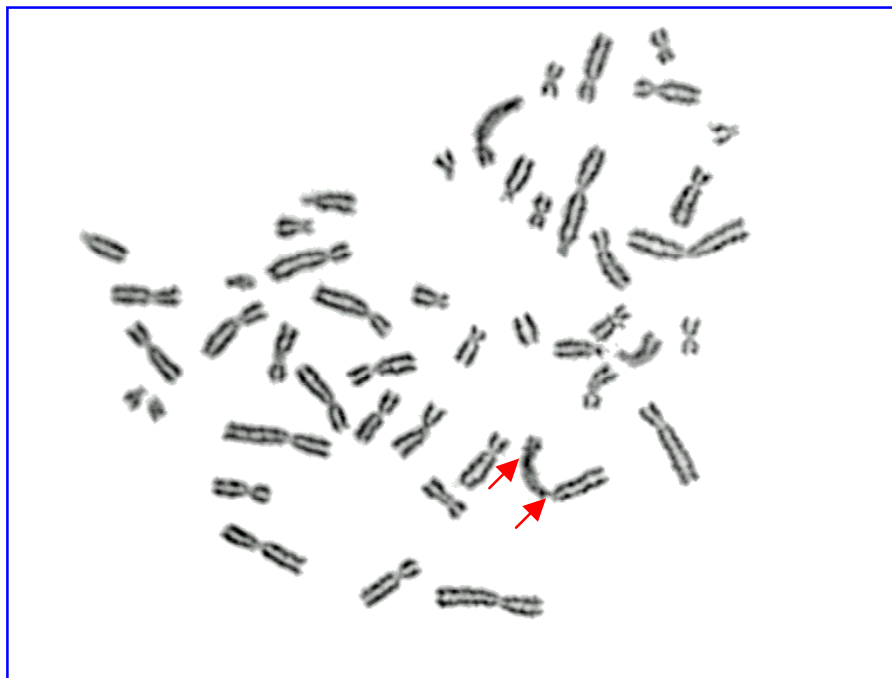


(A)



(B)

Figura 19 Metáfases apresentando um suposto cromossomo dicêntrico (A) e sua confirmação pelo bandeamento C (B).

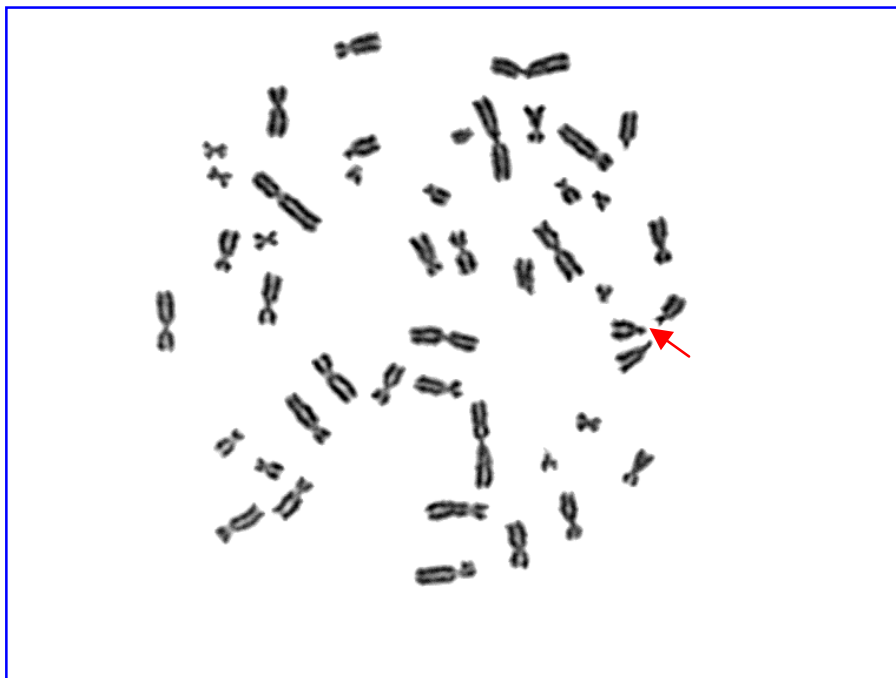


(A)

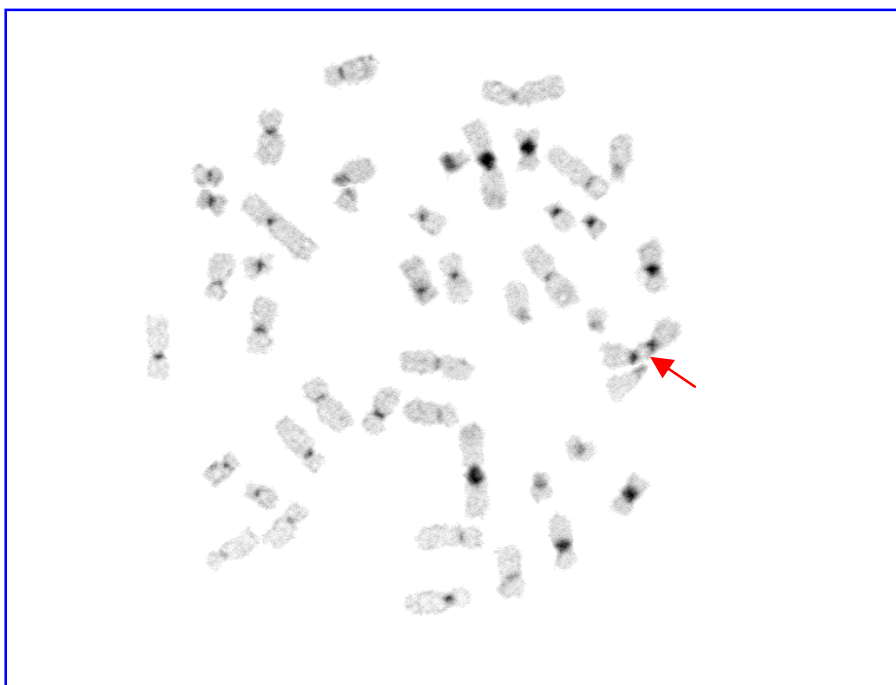


(B)

Figura 20 Metáfases apresentando um suposto cromossomo dicêntrico (A) e o resultado negativo pelo bandejamento C (B).



(A)



(B)

Figura 21 Metáfase apresentando dois cromossomos muito próximos (A) e a forma dicêntrica após o bandeamento C (B), sendo um resultado falso-positivo.

**(A)****(B)**

Figura 22 Metáfase apresentando um cromossomo em anel (A) e o destaque do centrômero após o bandeamento C (B).

Os possíveis resultados para o bandejamento C em análises de cromossomos dicêntricos estão resumidos na Tabela 10 abaixo.

Tabela 10 Possíveis resultados na confirmação de cromossomos dicêntricos pela técnica de bandejamento C.

CONFIRMAÇÃO DE DICÊNTRICOS		
	GIEMSA	Bandeamento C
Cromossomo dicêntrico	Positivo	Positivo
Constricção das cromátides	Dúvida	Negativo
Dois cromossomos muito próximos	Negativo	Falso-Positivo

Os resultados obtidos nesta pesquisa com a técnica de bandejamento C estão de acordo com a literatura, que cita a importância da visualização do padrão de bandas C para a confirmação de cromossomos dicêntricos, principalmente em casos duvidosos (PROSSER, 1975). Outros autores utilizam o bandejamento C para a técnica de PCC (Condensação Prematura do Cromossomo), que permite a identificação das aberrações cromossômicas no núcleo da célula ainda no estágio de interfase, não necessitando, portanto, induzir as células a entrarem no processo de divisão celular (PANTELIAS et al., 1993).

Alguns autores utilizam para a identificação de cromossomos dicêntricos a técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH), através de sonda de DNA marcada com substância fluorescente, específica para os centrômeros (PALA et al., 2001). Esta técnica é mais laboriosa e de elevado custo quando comparada à técnica de bandejamento C, sendo seu emprego mais recomendado para o estudo das aberrações cromossômicas estáveis (NATARAJAN et al., 1999).

VOISIN e colaboradores utilizaram sondas de DNA para a visualização de centrômeros em núcleos interfásicos, o que permite identificar os micronúcleos resultantes de fragmentos

acêntricos causados pela radiação (VOISIN et al., 2001; 2002). Como perspectiva, a técnica de bandeamento C poderia ser empregada com esta finalidade, uma vez que ela evidencia a região de heterocromatina constitutiva em qualquer fase do ciclo celular.

5 CONCLUSÃO

- Os resultados obtidos nesta pesquisa mostraram que as frequências de aberrações cromossômicas instáveis e micronúcleos, em linfócitos do sangue periférico de profissionais de saúde expostos à radiação ionizante, estão correlacionadas às atividades desempenhadas por cada profissional, bem como às condições de radioproteção durante a realização dessas tarefas.
- Em casos de suspeita de exposição individual à radiação ionizante, recomenda-se a quantificação de micronúcleos em linfócitos do sangue periférico como teste preliminar. O estudo das aberrações cromossômicas instáveis, por citogenética convencional, deverá constituir a etapa subsequente em situações nas quais a frequência de micronúcleos for elevada. Com isso, essas técnicas constituem ferramentas importantes em casos de investigações médico-legais envolvendo exposição individual à radiação ionizante.
- A técnica de bandeamento C se mostrou ser eficiente como teste confirmatório em análises de aberrações cromossômicas instáveis, em especial de cromossomos dicêntricos, podendo ser aplicada no controle de qualidade em biodosimetria.
- O emprego das técnicas de aberrações cromossômicas instáveis e micronúcleos é um instrumento eficaz para uma melhor conscientização dos riscos associados às exposições ocupacionais de trabalhadores à radiação ionizante.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHPMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia celular e molecular**, Rio de Janeiro: Ed. Revinter, 1995. 440p.

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D. **Biologia molecular da célula**. 3. ed. São Paulo: Artes Médicas, 1997. 1294 p.

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

BARBOSA, Isvânia Maria Serafim da Silva. Quantificação de micronúcleos em linfócitos como dosímetro biológico em pacientes expostas à radiação gama, 2003. **Dissertação (Mestrado em Tecnologias Energéticas Nucleares)** - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

BONASSI, S.; AU, W. Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. **Mutation Research**, v. 551, p. 73-86, 2002.

BURRIL, W.; LEVINE, E. L.; HINDOCHA, P., ROBERTS, S. A., SCOTT, D. The use of cryopreserved lymphocytes in assessing Inter.-individual radiosensitivity with the micronucleus assay. **International Journal of Radiation Biology**, v. 76, p. 375-382, 2000.

BUSHONG, S. C. **Radiologic science for technologists: physics, biology, and protection**. 6. ed. St. Louis: Ed. Mosby-Year Book, Inc, 1997. 586 p.

CASARETT, A. P. **Radiation Biology**. Washington, D. C.: United States Atomic Energy Commission, 1968.

DOWN, S. B.; TILSON, E. R. **Practical radiation protection and applied radiobiology**. 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1999. 352 p.

FENECH, M. The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. **Mutation Research**, v. 404, p. 155-165, 1998.

GERMAIN, J. St. Radiation Monitoring with reference to the medical environment. **Health Physics**, v.69, p.728 – 749, 1995.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos**. Ribeirão Preto, SP: Ed. FUNPEC-Editora, 2002. 131p.

HALL, E. J. **Radiobiology for the Radiologist**. 4. ed. Philadelphia: Ed. Lippincott Company, 1994. 478 p.

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 (CM-FISH). **Laboratory Investigation**, v. 81, p. 475, 2001.

HUBER, R.; LÖRCH, Th.; KULKA, U.; BRASELMANN, H.; BAUCHINGER, M. Technical report: automated classification of first and second cycle metaphases. **Mutation Research**, v. 419, p. 27-32, 1998.

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

INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION (ICRP).
Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP Report 60, Elmsford, NY: Pergamon Press, ICRP Publication, 1990.

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

JAYARAMAN, S.; LAWRENCE, H. **Clinical Radiotherapy Physics: Clinical Planning and Radiation Safety**, v. 2. New York: Ed. CRC Press, 1996. 235p.

KNOLL, G. F. **Radiation Detection and Measurement.** 2. ed. New York: Ed. John Wiley & Sons, 1989.

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

MAGNATA, S. de S. L. P. Aberrações cromossômicas instáveis nos linfócitos de pacientes com câncer de colo do útero, 2003. **Dissertação (Mestrado em Tecnologias Energéticas Nucleares)** - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

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.

NATARAJAN, A. T.; SANTOS, S. J.; DARROUDI, F.; HADJIDIKOVA, V.; VERMEULEN, S.; CHATTERJEE, S.; BERG, M. V.; GRIGOROVA, M.; SAKAMOTO-HOJO, E. T.; GRANATH, F.; RAMALHO, A. T.; CURADO, M. P. ¹³⁷Cesium-induced chromosome aberrations analyzed by fluorescence *in situ* hybridization: eight years follow

up of the Goiânia radiation accident victims. **Mutation Research**, v. 400, p. 299-312, 1998.

NATARAJAN, A. T. Chromosomal aberrations: past, present and future. **Mutation Research**, v. 504, p. 3-16, 2002.

NUSSBAUM, R. L.; McINNES, R. R.; WILLARD, H. F. **Thompson & Thompson Genética Médica**. 6 ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2002.

OLIVEIRA, R. M. B. M. Efeitos biológicos em linfócitos irradiados com ^{99m}Tc : determinação da curva dose-resposta, 2002. **Dissertação (Mestrado em Tecnologias Energéticas Nucleares)** - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

PAILLOLE, N.; VOISIN, P. Is micronuclei variability a problem for overexposure dose assessment to ionising radiation? **Mutation Research**, v. 413, p. 47-56, 1998.

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. **Radiation Biology**, v. 63, p. 349-354, 1993.

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., BELLIDO, P. Dose estimates and the fate of chromosomal aberrations in Cesium-137 exposed individuals in the Goiania radiation accident. In: **Chromosomal Aberrations – Basic and Applied Aspects**. (OBE, G. and NATARAJAN, A. T., eds). Berlin-Heidelberg: Ed. Springer-Verlag, p. 224-230, 1990.

RAMALHO, A. T.; CURADO, M. P.; NATARAJAN, A. T. Lifespan of human estimated during a six year cytogenetic follow-up of individuals accidentally exposed in the 1987 radiological accident in Brazil. **Mutation Research**, v. 331, p. 47-54, 1995.

RIBEIRO, Lucia Regina; SALVADORI, Daisy Maria Fávero; MARQUES, Edmundo Kanan. **Mutagênese Ambiental**. 1. ed. Canoas: Ed. ULBRA, 2003. 355p.

SAVAGE, J. R. K. Classification and relationships of induced chromosome structural changes. **Journal of Medical Genetics**, v. 12, p. 103-122, 1975.

SLOZINA, N.; NERONOVA, E.; KHARCHENKO, T; NIKIFOROV, A. Increased level of chromosomal aberrations in lymphocytes of Chernobyl liquidators 6-10 years after the accident. **Mutation Research**, v. 379, p. 121-125, 1997.

STREFFER, C.; MULLER, W. U.; KRYSCIO, A.; BOCKER, W. Micronuclei – biological indicator for retrospective dosimetry after exposure to ionizing radiation. **Mutation Research**, v. 404, p. 101-105, 1998.

SUZUKI, M. F. Avaliação dos efeitos genotóxicos e citotóxicos do ^{153}Sm -EDTMP em linfócitos periféricos de pacientes com metástase óssea, 2003. **Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear – Aplicações)** - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

TESTARD, 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.

THIERENS, H.; VRAL, A.; MORTHIER, R.; AOUSALAH, B.; DE RIDDER, L. Cytogenetic monitoring of hospital workers occupationally exposed to ionizing radiation using the micronucleus centromere assay. **Mutagenesis**, v. 15, p. 245-249, 2000.

THIERENS, H.; VRAL, A.; MARINA, B.; RIDDER, LEO DE. Micronucleus assay reveals no radiation effects among nuclear power plant workers. **Health Physics**, v. 83, p. 178-182, 2002.

TILGEN, N.; GUTTENBACH, M.; SCHMID, M. Heterocromatin is not an adequate explanation for close proximity of interphase chromosomes 1 – Y, 9 – Y, and 16 – Y in human spermatozoa. **Experimental Cell Research**, v. 256, p. 283-287, 2001.

VENKATACHALAM, P., SOLOMON, F.D.P., PRABHU, B.K., MOHANKUMAR, M.N., GAJENDIRAN, N., JEEVANRAM, R.K. Estimation of dose in cancer patients treated with fractionated radiotherapy using translocation, dicentrics and micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes. **Mutation Research**, v.429, p.1-12, 1999.

VENKATACHALAM, P., PAUL, S.F.D., MOHANKUMAR, M.N., PRABHU, B.K., GAJENDIRAN, N., JEEVANRAM, R.K. Dose-response curve for translocation frequency with a single pair of painted chromosomes: a comparison with dicentric and micronuclei frequency. **Radiation Protection and Dosimetry**, v.87, p.101-108, 2000.

VOISIN, P.; PAILLOLE, N.; BENDERITTER, M.; CLARAZ, M.; CHAMBRETTE, V.; DELBOS, M.; DURAND, V.; LEROY, A. and SOROKINE-DURM, I. 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, v 1, P-3a-217, 2000. 6 p.

VOISIN, P.; BENDERITTER, M.; CLARAZ, V.; CHAMBRETTE, I.; SOROKINE-DURM, M.; DELBOS, V.; DURAND, A. L.; PAILLOLE, N. The cytogenetic dosimetry of recent accidental overexposure. **Cellular and Molecular Biology**, v. 47, p. 557-565, 2001.

VOISIN, P.; BARQUINERO, F.; BLAKELY, B.; LINDHOLM, C.; LLOYD, D.; LUCCIONI, C.; MILLER, S.; PALITTI, F.; PRASSANNA, P.G.S.; STEPHAN, G.; THIERENS, H.; TURAI, I.; WILKINSON, D.; WOJCIK, A. Towards a standardization of biological dosimetry by cytogenetics. **Cellular and Molecular Biology**, v. 48, p. 501-504, 2002.

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

ZAKERI, F.; ASSAEI, R. G. Cytogenetic monitoring of personnel working in angiocardiology laboratories in Iran hospitals. **Mutation Research**, v. 562, p. 1-9, 2004.

ANEXOS

ANEXO 1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Projeto: Emprego das Aberrações Cromossômicas Instáveis e Micronúcleos no
Biomonitoramento Individual: Estudo Comparativo.

Eu _____
residente em _____
município de _____ Estado _____
portador da identidade Nº _____, autorizo a coleta de amostra de
meu sangue periférico com a finalidade científica, cujo objetivo é estabelecer uma
comparação com os níveis de alterações cromossômicas normalmente observadas em
pacientes submetidos à radioterapia.

Recife, _____ de _____ de _____.

Assinatura do doador (ou responsável): _____.

Assinatura do responsável pela coleta: _____.

Testemunhas:

Identificação

Nome: _____ . Código: _____ .

Data da coleta: _____ .

Data de Nascimento: _____ .

Sexo: Feminino ☐

Masculino ☐

Local de Trabalho: _____ .

Função: _____ .

Tempo que exerce esta função: _____ .

Trabalhos anteriores com radiação ionizante:

SIM ☐

NÃO ☐

Obs.:

_____ .

Fumante:

SIM ☐

NÃO ☐

Outras informações (por exemplo: Medicamentos, Agrotóxicos, Veneno, etc):

_____.

Observações:

_____.

Responsável pelo questionário: _____.

ANEXO 2: Grandezas Dosimétricas – INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION (ICRP). Report 60, 1990.

Dose absorvida

A dose absorvida (D) é a grandeza expressa por:

$$D = \frac{\overline{dE}}{dm} \quad (3)$$

Onde: $\overline{dE}$ é a energia média depositada pela radiação em um volume elementar de matéria de massa dm .

A unidade de dose absorvida no SI é o joule (J) por quilograma (kg), que recebe o nome especial de gray (Gy).

Dose equivalente

A dose equivalente no tecido ou órgão (H_T) é definida pela expressão:

$$H_T = \sum_R w_R \cdot D_{T,R} \quad (4)$$

Onde: $D_{T,R}$ é a dose absorvida média no tecido ou órgão T devido à radiação ionizante R, e w_R é o fator de ponderação da radiação. A unidade da dose equivalente no SI também é o joule por quilograma com o nome especial de sievert (Sv).

Dose Efetiva (E)

A dose efetiva (E) é a grandeza expressa por:

$$E = \sum_T w_T \cdot H_T \quad (5)$$

Onde: H_T é a dose equivalente média no tecido ou órgão T e w_T é o fator de ponderação para o tecido ou órgão T. A unidade é o sievert (Sv).

Tabela I Fatores de ponderação das RI (w_R)

Tipo e faixa de Radiação	w_R^*
Fótons, todas as energias	1
Elétrons, todas as energias	1
Nêutrons, energia <10 keV	5
Nêutrons, energia entre 10 a 100 keV	10
Nêutrons, energia > 100 keV a 2 MeV	20
Nêutrons, energia > 2 MeV a 20 MeV	10
Nêutrons, energia > 20 MeV	5
Prótons, com exceção de prótons de recuo, energia > 2MeV	5
Partícula alfa, fragmentos de fissão e íons pesados	20

* - ICRP 60

Tabela II Fatores de ponderação para órgãos ou tecidos (w_T)

Tecido ou Órgão	w_T^*
Gônadas	0,20
Medula óssea vermelha	0,12
Cólon	0,12
Pulmão	0,12
Estômago	0,12
Bexiga	0,05
Mama	0,05
Fígado	0,05
Esôfago	0,05
Tireóide	0,05
Pele	0,01
Superfície óssea	0,01
Restante²	0,05
TOTAL	1,00

1 – Baseado em um risco total de ocorrência de efeitos estocásticos de $1,65 \times 10^{-2} \text{ Sv}^{-1}$

2 – Para fins de cálculo, “restante” refere-se a qualquer dos órgãos listados a seguir, os quais podem ser irradiados seletivamente: adrenais, cérebro, intestino grosso superior, intestino delgado, rins, músculo, pâncreas, vesícula, timo e útero.

* - ICRP 60