

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

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

**OTIMIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE PARÂMETROS
METODOLÓGICOS EM DOSIMETRIA CITOGENÉTICA**

MARCELA MARIA PEREIRA DE LEMOS PINTO

**RECIFE – PERNAMBUCO – BRASIL
MARÇO – 2012**

**OTIMIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE PARÂMETROS METODOLÓGICOS
EM DOSIMETRIA CITOGENÉTICA**

MARCELA MARIA P. L. PINTO

**OTIMIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE PARÂMETROS METODOLÓGICOS
EM DOSIMETRIA CITOGENÉTICA**

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

ORIENTADOR: PROF. DR. ADEMIR DE JESUS AMARAL

CO-ORIENTADORA: PROF^a. DRA. ADRIANA FONTES

**RECIFE – PERNAMBUCO – BRASIL
MARÇO – 2012**

Catálogo na fonte
Bibliotecária Margareth Malta, CRB-4 / 1198

P659o Pinto, Marcela Maria Pereira de Lemos.
Otimização e aplicação de parâmetros metodológicos em dosimetria citogenética / Marcela Maria Pereira de Lemos Pinto. - Recife: O Autor, 2012.
110 folhas, il., gráfs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral.
Co-Orientadora: Profa. Dra. Adriana Fontes.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, 2012.
Inclui Referências Bibliográficas e Apêndices.

1. Energia Nuclear. 2. Radiações ionizantes. 3. Dosimetria citogenética. 4. Curva de calibração dose-efeito. 5. Colcemid. 6. Temperatura de armazenamento. I. Amaral, Ademir de Jesus. (Orientador). II. Fontes, Adriana. (Co-Orientadora). III. Título.

UFPE

612.01448 CDD (22. ed.)

BCTG/2012-180

**OTIMIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE PARÂMETROS
METODOLÓGICOS EM DOSIMETRIA CITOGENÉTICA**

Marcela Maria Pereira de Lemos Pinto

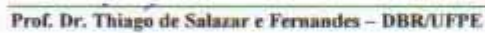
APROVADA EM: 29.03.2012

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral
CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Adriana Fontes

COMISSÃO EXAMINADORA:



Profa. Dra. Ana Maria Mendonça Albuquerque – DBR/UFPE



Profa. Dra. Neide Santos – DG/UFPE





Visto e permitida a impressão


Coordenador do PROTEN/DEN/UFPE

Dedico este trabalho a minha família e aos meus entes queridos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a **Deus**, por ter me ajudado em todos os momentos vividos nesse doutorado, ao colocar no meu caminho pessoas generosas e verdadeiras que acreditaram em mim, e me apoiaram nos momentos mais críticos dessa árdua, porém importante etapa.

Aos meus pais, **Marcos e Edileuza Pinto**, pelo grande apoio dado, pelos conselhos e palavras de conforto tão necessários ao desenvolvimento e conclusão dessa almejada vitória. Aos meus irmãos **Josué e Marquinhos** que me mostraram através de seus exemplos até onde a força de vontade, e determinação de uma pessoa, podem levá-la até os seus objetivos. Ao amor da minha vida, **Rafael Thomaz** pelo imenso carinho, afeto, amizade e por estar sempre presente nas horas alegres e tristes, na saúde e na doença, em todos esses 3 anos, 4 meses e 19 dias!

Ao professor **Ademir Amaral** pela confiança e orientação fornecida ao longo de todo o doutorado, as quais foram fundamentais na minha formação acadêmico-profissional e pessoal. Suas sugestões e observações foram cruciais na elaboração, desenvolvimento e apresentação de resumos, artigos científicos, palestras, cursos e aulas ministradas. À professora **Adriana Fontes** por ter me apresentado novos horizontes e possibilidade no âmbito científico através dos quantum dots.

Aos pesquisadores e professores **Francisco Amâncio, Ana Mendonça, Edvane Borges, Neide Santos, Raul Melo, Waldecir Colaço e Thiago Fernandes**, por todas as observações e críticas proferidas nos Seminário I e II, Exame de Qualificação e Defesa de Tese, as quais contribuíram imensamente para o aperfeiçoamento e melhoria da redação final dos trabalhos realizados.

A todos os meus estimados amigos e colegas que fizeram ou fazem parte do **Grupo de Radioproteção e Radioecologia Aplicada (GERAR)**, Mariana Brayner, Edvane Borges, Rodrigo Bezerra, Thiago Tenório (“Thiaguinho”), Thiago Augusto (“Harry Potter”), Neyliane Santos (“Nani”), Fátida Coeli (“Tia Fada”), Rebeca Cantinha, Rafael Freitas (“Rafa”), Thiago Fernandes (“Thiagão”), Suelen Lima, Thaísa Feliciano, Jonathan Melo, Inês Barata, Maria

Helena, Luanna Ribeiro, Carlos Eduardo, Gustavo Santos, Laury Cosata, Heberton Ferreira, Isabel Spacov, Sloana Giesta, Mariel Cadena, Edvaldo Araújo, Ivanessa Martins, Julyanne Melo, Williams, Geane, Amanda, Hector, Camilla. Dentre eles, eu gostaria de fazer uma menção especial a **Thiago** por ter me ajudado e apoiado em minha busca por novos caminhos no meio científico, a **Nani** e **Rafa** por serem amigos verdadeiros e sinceros de todas as horas, fazendo ou não ciência, sempre se dispondo a me ouvir e aconselhar quando mais precisei; a **Suelen** e **Thaísa** pela eterna disposição nas nossas contagens e momentos de distração, a **Mariel** por ser sempre divertida e prestativa nas minhas empreitadas nos campos da matemática e da física, e também a **Rebeca**, **Thiaguinho** e **Rodrigo** pela ótima e agradável companhia que tivemos em todos esses anos; e como não se esquecer de **Jonathan** e **Heberton** que além de nunca terem se negado a nos auxiliar nas irradiações das amostras também são pessoas maravilhosas.

A todos os professores, alunos e funcionário do Departamento de Energia Nuclear – **DEN** – por terem sido todos sempre muito receptivos e prestativos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco – **CAPES** e **FACEPE** – pelo auxílio financeiro fornecido no tempo vigente e na prorrogação do doutorado.

“A maioria das ideias fundamentais da ciência é essencialmente simples e, como regra geral, pode ser expressa em linguagem compreensível a todos”.

Albert Einstein.

RESUMO

Desde o início da década de 60, a dosimetria citogenética – padrão ouro em biodosimetria – tem sido utilizada na avaliação da dose absorvida de profissionais ocupacionalmente expostos, bem como em investigações de exposições acidentais às radiações ionizantes (RIs). Embora essa técnica dosimétrica seja considerada bem estabelecida, a influência de alguns parâmetros metodológicos nos ensaios biodosimétricos permanece controversa, em especial aqueles relacionados à escolha do método matemático para construção de curvas dose-efeito, ao momento ideal para adição de Colcemid e à temperatura adequada para o armazenamento prolongado de amostras de sangue periférico. Neste contexto, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar a otimização dos parâmetros, relativos à adição de Colcemid, à construção de curvas dose-efeito e à temperatura de armazenamento de sangue periférico. Uma vez avaliados, estes parâmetros foram aplicados em investigações de casos envolvendo suspeita de exposição acidental e/ou ocupacional às radiações ionizantes. Na execução das etapas de cada ensaio, amostras de sangue periférico de doadores sadios foram irradiadas com uso de aceleradores lineares com taxas de dose de 0,54 Gy/min e 2 Gy/min. Para construção de curvas de calibração dose-efeito, foram utilizados os softwares *Dose estimate* (HPA-UK) e *CABAS* que empregam o Método dos Mínimos Quadrados (MMQ) e de Máxima Verossimilhança (MV), respectivamente. Nesta pesquisa, o MV do programa *CABAS* foi escolhido como método de referência por produzir um menor erro associado ao ajuste de baixas doses e por este ser um software de livre acesso. Em seguida, foi determinado o melhor intervalo de tempo para adição de Colcemid nas culturas celulares, bem como a melhor temperatura de estocagem das amostras de sangue. Os resultados obtidos indicaram que ambos os métodos matemáticos (MMQ e MV) promovem um bom ajuste dos coeficientes da curva de calibração. Utilizando amostras de sangue não irradiadas (controle) e irradiadas com 2 Gy, verificou-se que a adição de uma baixa concentração de Colcemid no início do cultivo celular (0,05 µg/ml – 0 h) gera índices mitóticos mais elevados, sem comprometer a qualidade das preparações cromossômicas. Além disso, o acondicionamento das amostras irradiadas com 2 Gy a 25 °C gerou uma maior aproximação entre a dose estimada e a dose de radiação utilizada na irradiação *in vitro*, indicando que essa temperatura de estocagem é a mais adequada para o armazenamento prolongado do sangue periférico. Após a otimização desses parâmetros metodológicos – a saber, o tempo de adição do Colcemid e programa para cálculo da dose absorvida (*CABAS* – MV) - a dosimetria citogenética foi aplicada com sucesso na investigação da dose absorvida por profissionais ocupacionalmente expostos às radiações ionizantes.

Palavras-chave: Radiações ionizantes. Dosimetria citogenética. Curva de calibração dose-efeito. Colcemid. Temperatura de armazenamento.

ABSTRACT

Since the early 1960s, cytogenetic dosimetry – the gold standard of biological dosimetry – has been used to evaluate the absorbed dose of occupationally exposed individuals as well as to investigate accidental exposures to ionizing radiations (IR). Although this dosimetric technique is considered well established, the influence of some methodological approaches on biodosimetric assays remains controversial, in particular those related to mathematical method of choice for fitting dose-response curves, optimal protocol for Colcemid addition, and temperature suitable for prolonged storage of peripheral blood samples. In this context, the aim of this research was to evaluate the optimization of methodological parameters on cytogenetic dosimetry relatives to Colcemid addition, for fitting dose-response curves and about temperature storage for peripheral blood samples. Then, these parameters were applied into investigations of suspected cases of overexposures to ionizing radiation. In assays, peripheral blood samples from healthy donors were irradiated using linear accelerators with dose rate of 0.54 and 2 Gy/min. The establishment of dose-response curves was performed with curve-fitting softwares called Dose estimate (HPA-UK) and CABAS using the methods of Reweighted Least Squares (RLS) and Maximum Likelihood (ML), respectively. After, it was evaluated different concentration and time of Colcemid addition on whole-blood cultures and defined the better storage temperature of blood samples for prolonged periods. The results pointed out that both mathematical methods (RLS and ML) provide similar calibration curve coefficients. In this work, the RLS of CABAS was chosen as the reference method to provide minor error associated to fitting of low doses and be freely accessible online. Using non-irradiated (control) and 2 Gy-irradiated blood samples, it was demonstrated that the addition of low Colcemid concentrations (0.05 µg/ml – 0 h) at the beginning of cell culture triggers higher mitotic index, without compromise the quality of chromosome preparations. Furthermore, the storage of irradiated blood samples with 2 Gy at 25 °C produce a higher approximation between estimated dose and dose employed during *in vitro* irradiation. After optimization of those methodological parameters– namely, Colcemid addition protocol and software to estimate the absorbed dose (CABAS – RLS) – the cytogenetic dosimetry was successfully applied to investigate absorbed doses of workers occupationally exposure to ionizing radiations.

Key words: Ionizing radiation. Cytogenetic dosimetry. Dose-response calibration curve. Colcemid. Storage temperature.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Páginas

Figura 1 – Características das fases de produção dos efeitos biológicos pelas radiações ionizantes -----	5
Figura 2 – Necrose apresentada na mão esquerda de médico traumatologista após contínua exposição aguda às RIs. Seta indica a região lesada-----	9
Figura 3 – Efeitos direto e indireto das RIs na molécula de DNA -----	11
Figura 4 – Tipos de alterações mais frequentes nas cadeias do DNA -----	12
Figura 5 – Esquema geral das vias de reparo HRR (a) e NHEJ (b)-----	13
Figura 6 – Representação esquemática das etapas do ciclo celular mitótico. Em destaque estão as principais vias de formação das ACIs -----	15
Figura 7 – Cromossomos dicêntricos (setas vermelhas), em anel (seta azul) e fragmentos acêntricos (círculos): aberrações cromossômicas instáveis (ACIs) em metáfase irradiada -----	16
Figura 8 – Semelhança entre a estrutura molecular do Colcemid e da colchicina. Em vermelho está evidenciado o radical (R) que é particular de cada molécula -----	18
Figura 9 – Metáfase em segunda divisão corada com FPG -----	20
Figura 10 – Pares cromossômicos 2 (verde - FITC) e 3 (vermelho – Texas red) marcados por FISH. Em (a), os cromossomos exibem tamanho normal e em (b) estão altamente contraídos pela adição de alta concentração de Colcemid no início da cultura-----	21
Figura 11 – Curva dose-efeito para radiações de alto e baixo LET-----	22
Figura 12 – Frequência de ACIs para altas e baixas doses de radiação -----	23
Figura 13 – Influência da taxa de dose na conformação de curvas dose-efeito para radiações de alto e baixo LET -----	24
Figura 14 – Arranjo experimental utilizado na irradiação das amostras -----	39
Figura 15 – Influência do método de preparação na qualidade das lâminas, utilizando banho-maria a 70 °C com secagem em placa de Petri (a), banho-maria a 70 °C com secagem em placa metálica (b), água gelada a 4 °C (c) e lâminas estocadas em freezer a -20 °C (d)-----	47

Figura 16 – Similaridade do grau de contração cromossômica induzido pelo protocolo não convencional (a) e convencional com Colcemid (b) em células linfocitárias irradiadas com 2 Gy-----	48
Figura 17 – Efeito das diferentes concentrações de Colcemid no índice mitótico de células linfocitárias controle e irradiadas-----	49
Figura 18 – Frequência de dicêntricos e anéis em células linfocitárias irradiadas com 2 Gy, cultivadas com diferentes concentrações de Colcemid-----	50
Figura 19 – Curva de calibração gerada pelo programa CABAS -----	54
Figura 20 – Curva de calibração produzida com o software DOSE ESTIMATE -----	54
Figura 21 – Análise comparativa do índice mitótico das amostras armazenadas a 4 e 25 °C e cultivadas por 48 e 96 horas-----	59
Figura 22 – Dose de radiação estimada das amostras mantidas a 4 e 25 °C e cultivadas por 48 e 96 horas -----	62

LISTA DE TABELAS

Páginas

Tabela 1 – Correlação entre manifestações clínicas e nível de exposição -----	8
Tabela 2 – Principais lesões epiteliais e relativos níveis de radiação em exposições agudas parciais -----	9
Tabela 3 – Ajustamento da frequência de dicêntricos para radiações de baixo e alto LET -----	28
Tabela 4 – Efeito da inclusão de altas doses no ajustamento dos dados para uma radiação de baixo LET -----	28
Tabela 5 – Influência do número de metáfases contabilizadas, nos intervalos de confiança, da dose estimada, considerando uma exposição aguda a partir de uma fonte de ^{137}Cs ---	30
Tabela 6 – Resumo das etapas desenvolvidas nesta pesquisa -----	37
Tabela 7 – Índice mitótico de células linfocitárias, controle e irradiadas, cultivadas com distintas concentrações de Colcemid -----	49
Tabela 8 – Relação dose-efeito em células irradiadas para diferentes concentrações de Colcemid -----	50
Tabela 9 – Frequência de ACIs obtida após irradiação in vitro com diferentes doses. Destaque para o padrão de distribuição dos dicêntricos nas células analisadas -----	53
Tabela 10 – Coeficientes das curvas de calibração ajustadas com base nos métodos MMQ e MV -----	55
Tabela 11 – Síntese da análise comparativa dos programas CABAS e DOSE ESTIMATE -----	56
Tabela 12 – Comparação entre os coeficientes lineares e quadráticos de radiações de baixo LET -----	57
Tabela 13 – Índice mitótico de células linfocitárias irradiadas e armazenadas por 48 e 96 horas sob temperaturas de estocagem de 4 e 25 °C -----	58
Tabela 14 – Relação dose-efeito em células irradiadas, estocadas por 48 horas sob temperaturas de estocagem de 4 e 25 °C -----	61
Tabela 15 – Relação dose-efeito em células irradiadas e armazenadas por 96 horas sob temperaturas de estocagem de 4 e 25 °C -----	61
Tabela 16 – Dados citogenéticos dos quatro casos investigados -----	65

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACs – Alterações cromossômicas

ACEs – Alterações cromossômicas estáveis

ACIs – Alterações cromossômicas instáveis

ALARA – *As Low as Reasonably Achievable*

AN – Anel acêntrico

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASO – Atestado de Saúde Ocupacional

BrdU – Bromodeoxiuridina

CABAS – *Chromosomal Aberration Calculation Software*

CNEN – Comissão Nacional de Energia Nuclear

CP – Poisson contaminada (*Contaminated Poisson*)

CRA – Cromossomo em anel

DIC – Dicêntricos

DMSO – Dimetil sulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*)

DSB – Quebras duplas na dupla fita do DNA (*Double Strand Breaks*)

FISH – Hibridização *in situ* Fluorescente

FPG – *Fluorescence plus Giemsa*

FRAG – Fragmento acêntrico

HRR – Reparo por recombinação homóloga (*Homologous recombination repair*)

IAEA – Agência Internacional de Energia Atômica (*International Atomic Energy Agency*)

ICRP – Comissão Internacional de Proteção Radiológica (*International Commission on Radiological Protection*)

IM – Índice mitótico

LAMBDA – Laboratório de Modelagem e Biodosimetria Aplicada

LCI – Limite de confiança inferior

LCS – Limite de confiança superior

LET – Transferência Linear de Energia (*Linear Energy Transfer*)

MIN – Minute

MMQ – Método dos Mínimos Quadrados

MV – Máxima Verossimilhança

NHEJ – União terminal de DNA não homóloga (*Nonhomologous DNA end joining*)

NR 7 – Norma regulamentadora 7

NR 32 – Norma regulamentadora 32

OER – Relação de aumento do oxigênio (*Oxygen enhancement ratio*)

OMS – Organização Mundial de Saúde

PHA – Fitohemaglutinina (*Phytohemagglutinin*)

RIIs – Radiações Ionizantes

RPMI – Roswell Park Memorial Institute medium

SIA – Síndrome da Irradiação Aguda

SSA – Pareamento de fita simples (*Single- strand annealing*)

SSB – Quebras simples na dupla fita do DNA (*Single Strand Breaks*)

TLD – Dosímetro termoluminescente

UNSCEAR – Comitê Científico das Nações Unidas sobre os Efeitos da Radiação Atômica

SUMÁRIO

Páginas

1 INTRODUÇÃO-----	1
2 REVISÃO DA LITERATURA-----	4
2.1 Efeitos biológicos das radiações ionizantes -----	5
2.2 Síndrome da irradiação aguda -----	7
2.3 Influência das radiações ionizantes sobre o DNA -----	10
2.4 Alterações cromossômicas (ACs) instáveis e estáveis -----	14
2.4.1 Classificação das ACs -----	14
2.4.2 Modelo biológico – Linfócitos ou fibroblastos? -----	18
2.4.3 Técnicas citogenéticas de coloração-----	19
2.4.3.1 Fluorescence plus Giemsa (FPG)-----	19
2.5 Dosimetria citogenética na avaliação dos níveis de exposição individual -----	21
2.5.1 Fatores de influência – LET, taxa de dose, temperatura e oxigênio -----	22
2.5.2 Produção in vitro da curva dose-resposta-----	26
2.5.3 Estimação da dose absorvida -----	29
2.5.4 Aplicações da dosimetria citogenética -----	30
2.5.4.1 Exposições acidentais -----	30
2.5.4.2 Exposições ocupacionais-----	31
2.5 Dosimetria citogenética na Legislação Brasileira-----	32
2.6 Padronização de critérios metodológicos em dosimetria citogenética-----	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS -----	35
3.1 Perfil da pesquisa -----	35
3.1.1 Critérios para seleção dos voluntários-----	35
3.2 Disposição dos ensaios experimentais realizados-----	36
3.3 Processamento das amostras -----	37
3.3.1 Coleta e irradiação do material biológico-----	37

3.3.2 Etapa I – Análise comparativa entre diferentes protocolos para adição de Colcemid--	38
3.3.3 Etapa II – Construção das curvas de calibração -----	40
3.3.4 Etapa III – Avaliação da temperatura de armazenamento para diferentes tempos de estocagem -----	41
3.3.5 Etapa IV – Investigação de profissionais ocupacionalmente expostos às RIs-----	41
3.3.5.1 Descrição dos estudos de caso – Profissionais ocupacionalmente expostos -----	41
3.5 Preparação das lâminas -----	43
3.6 Critérios para análise das lâminas e determinação do índice mitótico-----	44
3.6.1 Análise das lâminas -----	44
3.6.2 Determinação do índice mitótico -----	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	47
4.1 Preparação das lâminas -----	47
4.2 Determinação do protocolo ideal para adição de Colcemid às culturas celulares-----	48
4.3 Construção de Curvas de calibração com base nos métodos matemáticos dos Mínimos Quadrados e o de Máxima Verossimilhança -----	52
4.3.1 Curvas de calibração dose-efeito - intercomparações-----	56
4.4 Avaliação sobre a temperatura de armazenamento para diferentes tempos de estocagem--	58
4.5 Aplicação dos parâmetros otimizados em profissionais sob suspeita de exposição individual excessiva às RIs -----	65
5 CONCLUSÕES -----	67
6 Considerações finais-----	68
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	72
APÊNDICE A – parecer do Comitê de ética-----	82
APÊNDICE B – Termo de Livre Consentimento -----	83
APÊNDICE C– Questionário -----	84
APÊNDICE D – Folha de contagem das ACIs -----	86
APÊNDICE E – Produção científica -----	87

1 INTRODUÇÃO

Desde a década de 60, marcadores citogenéticos sensibilizados pela ação das radiações ionizantes (RIs) têm sido mensurados, quantitativa e qualitativamente, para reconstrução da dose de radiação absorvida. Em dosimetria citogenética, os cromossomos dicêntricos são considerados os biomarcadores mais sensíveis e específicos para avaliação dos efeitos biológicos produzidos pela ação das RIs (IAEA, 2011; LEMOS-PINTO et al., 2010).

Para análise dos dicêntricos, linfócitos presentes no sangue periférico são utilizados como modelo biológico, os quais são cultivados *in vitro* para obtenção de células em metáfase, cuja visualização é realizada por microscopia óptica. Na investigação de um acidente radiológico, envolvendo suspeita ou ocorrência de exposição excessiva à radiação, a estimativa da dose absorvida¹ é feita a partir da correlação entre a frequência obtida de dicêntricos e as curvas de calibração dose-efeito (CHAUHAN; WILKINS, 2010).

Após 50 anos de desenvolvimento, a dosimetria citogenética é considerada uma técnica bem estabelecida, com protocolos bem definidos. Todavia, recentes intercomparações entre laboratórios dessa área revelaram a existência de variações metodológicas entre as principais etapas vinculadas ao processo de estimação biológica da dose, relacionadas: 1) ao momento ideal para adição de Colcemid, 2) à escolha do método matemático para construção de curvas dose-efeito, e 3) à temperatura adequada para o armazenamento prolongado de amostras de sangue periférico (ROY et al., 2012).

No cultivo e processamento dos linfócitos, a adição de Colcemid – substância inibidora da polimerização das fibras do fuso mitótico – compreende uma das etapas cruciais na obtenção de preparações cromossômicas de boa qualidade, provenientes de células em primeira divisão (M1), e com elevado índice mitótico. Alguns estudos também têm apresentado dados contraditórios quanto à concentração ideal de Colcemid relativa ao tempo de adição (início ou ao final do cultivo celular), indicando a necessidade de estudos complementares nesse sentido (IAEA, 2011).

Atualmente, existem vários programas computacionais disponíveis para a construção de curvas dose-efeito. O emprego desses sistemas surgiu da necessidade de simplificar os cálculos

¹ Definição de dose absorvida – energia média (de) depositada pela radiação em volume elementar de massa (dm). Unidade – Joule por quilograma (J/kg), denominada Gray (Gy).

utilizados para esse fim. Nesses programas, os métodos matemáticos mais utilizados no ajuste dos dados são o Método dos Mínimos Quadrados (MMQ) e de Máxima Verossimilhança (MV) (DEPERAS et al., 2007; AINSBURY; BARQUINERO, 2009; AINSBURY; LLOYD, 2010). A não uniformização quanto ao método de referência pode promover diferenças entre as curvas de calibração geradas por laboratórios de dosimetria citogenética, que podem tanto comprometer a exatidão da dose estimada quanto dificultar possíveis intercomparações laboratoriais entre os resultados alcançados (WILKINS et al., 2008).

De maneira geral, há um consenso que, havendo suspeita de exposição excessiva às RIs, a coleta e processamento das amostras de sangue devem ser procedidas com máxima urgência. Entretanto, em emergências radiológicas, esse tempo pode ser consideravelmente maior, em decorrência do grande número de indivíduos afetados e da carência de laboratórios especializados nessa área que disponham de infraestrutura e mão de obra capacitada para a execução de ensaios dessa natureza. Em consequência dessa situação, a maior parte das amostras recebidas é então estocada a uma temperatura de aproximadamente 4 °C por um período médio de 48 horas (IAEA, 2011; LEMOS-PINTO; AMARAL, 2011). Considerando que variações na temperatura de estocagem podem comprometer a viabilidade das amostras, é de suma relevância avaliar o impacto que o fator temperatura pode exercer sobre a dose estimada.

Neste contexto, o objetivo geral deste trabalho foi realizar a otimização de parâmetros metodológicos em dosimetria citogenética, relativos à adição de Colcemid, à construção de curvas dose-efeito e à temperatura de armazenamento de sangue periférico. Posteriormente, estes parâmetros foram aplicados em investigações de casos envolvendo suspeita de exposição excessiva às radiações ionizantes. Como objetivos específicos:

- 1) Comparar dois protocolos em que o Colcemid é adicionado a zero e 45 horas após o início do cultivo celular, sob diferentes concentrações, em amostras irradiadas e controle, analisando a influência deste fator em função do índice mitótico e frequência de alterações cromossômicas instáveis;
- 2) Comparar curvas de calibração dose-efeito construídas com base nos métodos matemáticos MMQ e MV, comumente empregados no ajuste de curvas de calibração dose-efeito, com relação ao nível de dispersão dos coeficientes calculados;

- 3) Simular *in vitro* situações de exposição acidental e ocupacional excessivas às RIs, visando avaliar a interferência da temperatura e tempo de armazenamento sobre a dose estimada e o índice mitótico;
- 4) Aplicar os parâmetros otimizados nesta pesquisa na investigação de suspeitas de exposição individual excessiva às RIs.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Desde sua descoberta, as radiações ionizantes (RIs) têm tido uma crescente aplicação em diversos campos relacionados à medicina, indústria e agricultura de países desenvolvidos e em desenvolvimento. Atualmente, as exposições ocupacionais compreendem o principal veículo responsável pelo crescimento do número de incidentes envolvendo fontes ou aparelhos emissores de radiação, uma vez que os trabalhadores estão continuamente expostos aos efeitos das RIs na execução de suas atividades (UNSCEAR, 2008).

As aplicações radiológicas que mais contribuem para o aumento da exposição ocupacional estão na área médica, visto que cada vez mais as RIs têm sido utilizadas como ferramenta de diagnóstico por imagem e na terapia de tumores. Como resultado, os profissionais de saúde têm apresentado os maiores níveis de exposição à radiação dentre os profissionais desta área de atuação, fato acompanhado de perto pelas agências internacionais e órgãos fiscalizadores de radioproteção (LINET et al., 2010).

No Brasil, para práticas envolvendo raios-X e aplicação das radiações α , β e γ , a monitoração dos profissionais radioexpostos é regulamentada e fiscalizada pela Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), juntamente com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A CNEN estabelece os limites médios anuais de dose para trabalhadores (20 mSv) e indivíduos do público (1 mSv) ao nível nacional, em concordância com a publicação 90 da Comissão Internacional de Proteção Radiológica^{2,3} (ICRP) (MS/PORTARIA/ /SVS Nº 453, 1998; CNEN-NN-3.01, 2005).

Essas normas têm caráter preventivo e objetivam limitar os níveis de doses com base no princípio ALARA (acrônimo de “As Low As Reasonably Achievable”), pelo qual as radiações ionizantes devem ser aplicadas em níveis tão baixos quanto razoavelmente exequíveis e assim prevenindo que trabalhadores e membros do público em geral sejam submetidos a doses elevadas de radiação e apresentem efeitos biológicos radioinduzidos (ICRP 60, 1990).

²Limite anual para o trabalhador - média de 20 mSv em cinco anos, sendo tolerável até 50 mSv por ano (ICRP 60, 1990).

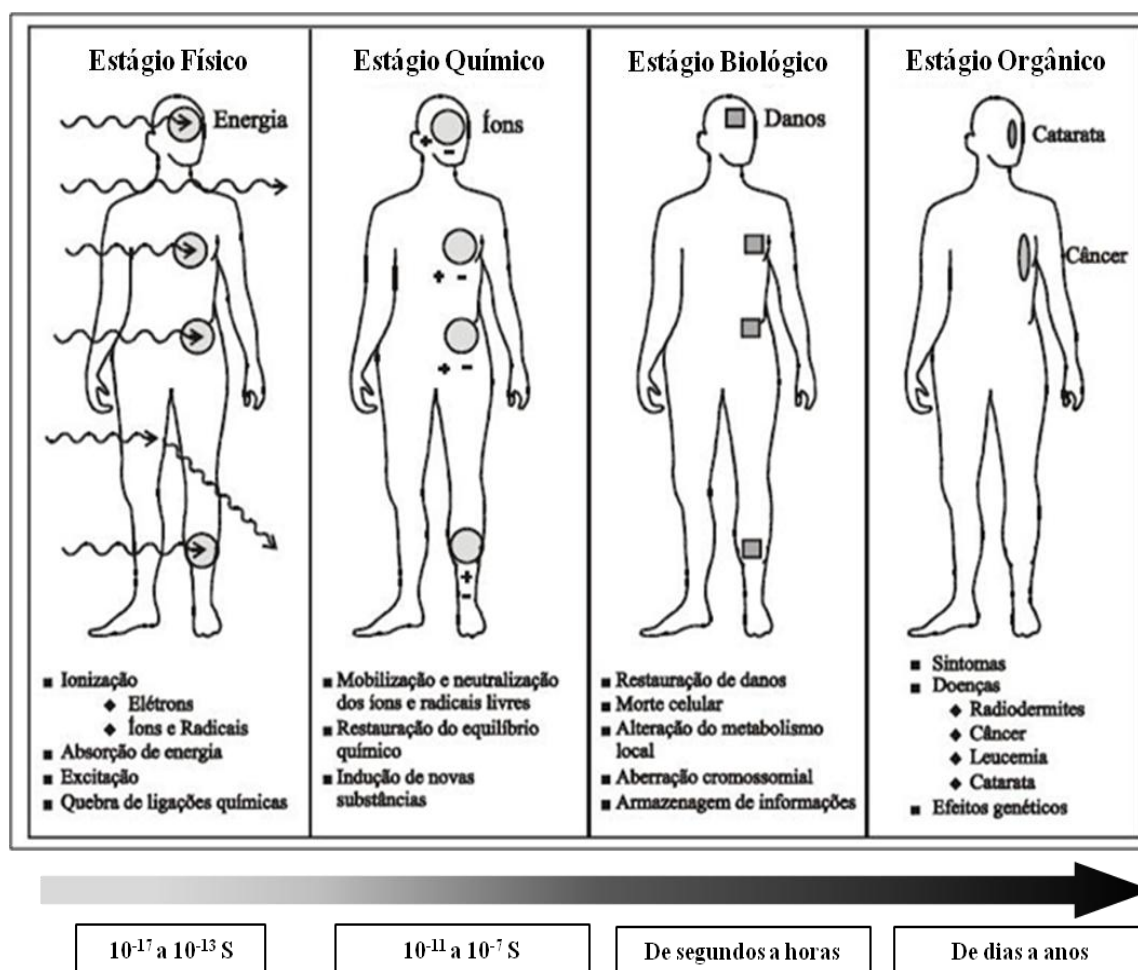
³ Limite anual para o público - média de 1 mSv em cinco anos, sendo tolerável até 5 mSv por ano (ICRP 60, 1990).

2.1 Efeitos biológicos das radiações ionizantes

As radiações ionizantes são agentes físicos que, ao interagirem com o meio biológico, são capazes de romper as ligações físico-químicas dos átomos que compõem os elementos primários da célula, induzindo assim uma série de modificações orgânicas locais ou sistêmicas (HANDE et al., 2005). Tais eventos, contudo, não são necessariamente deletérios ou nocivos aos seres vivos, uma vez que a resposta ou efeito biológico produzido depende principalmente da dose de radiação, do tipo da radiação, da área irradiada e das funções desempenhadas pela estrutura danificada (BOLUS, 2001).

Da interação da radiação ionizante ao dano biológico induzido pela radiação, ocorrem diferentes estágios: físico, químico, biológico e orgânico (Tauhata, 2003) (Figura 1).

Figura 1 – Características das fases de produção dos efeitos biológicos pelas radiações ionizantes



Fonte: Adaptado de Pouget e Mather (2001) e Tauhata (2003)

De modo geral, as exposições às RIs podem ser agudas ou crônicas e envolver diferentes frações do corpo (corpo inteiro ou parcial). Os efeitos biológicos radioinduzidos podem ser classificados em (BOLUS, 2001; IAEA, 2010):

1) Estocásticos ou Determinísticos:

- a) Efeitos estocásticos – são aqueles em que há probabilidade de ocorrência de um efeito biológico independente da dose de radiação, embora as chances de ocorrência aumentem com o aumento da dose (p.ex. câncer);
- b) Efeitos determinísticos – são aqueles que certamente ocorrerão após exposição a doses elevadas, e que possuem um limiar de dose a partir do qual a gravidade do dano será maior com o aumento da dose (p.ex. catarata e esterilidade).

2) Imediatos ou Tardios:

- a) Efeitos imediatos – ocorrem entre um período de poucas horas a algumas semanas (60 dias) após a exposição (p.ex. radiodermites);
- b) Efeitos tardios – manifestam-se anos ou décadas após o incidente radiológico (p.ex. câncer).

3) Somáticos ou Hereditários:

- c) Efeitos somáticos – surgem a partir dos danos presentes nas células afetadas, cujo efeito biológico apresenta-se no próprio indivíduo irradiado. A intensidade do dano depende de diversos fatores, tais como a dose absorvida, a taxa de absorção da energia de radiação, da região e da área do corpo que foi irradiada (p.ex. radiodermites);

- d) Efeitos hereditários – são aqueles que se manifestam nos descendentes da pessoa irradiada, em resultado ao dano produzido nas células germinativas dos órgãos reprodutores (testículos e ovários). Tais efeitos têm caráter acumulativo e independem da taxa de absorção de dose (p. ex. embriões anencéfalos).

Os primeiros relatos acerca de manifestações desta natureza iniciaram-se poucos anos após a descoberta dos raios-X por Roentgen em 1895. Atualmente sabe-se que a dose mínima necessária para induzir o aparecimento de efeitos determinísticos radioinduzidos é da ordem de 1 Gy, valor muitas vezes superior ao limite permitido pelas agências nacionais e internacionais de fiscalização da área radiológica (PRISE et al., 2001; KOENIG et al., 2005; LINET et al., 2010).

2.2 Síndrome da irradiação aguda

O conjunto de sinais e sintomas clínicos que se sucedem imediatamente após uma exposição aguda, de corpo inteiro (48 horas a 6 dias), com doses superiores a 1 Gy, denomina-se fase prodrômica da Síndrome da Irradiação Aguda (SIA). A duração dessa fase e sua letalidade dependem diretamente da dose absorvida e das características do sistema afetado (NOUAILHETAS, 2008) (Tabela 1).

A fase latente é caracterizada pela atenuação temporária dos sintomas, que pode durar de vários dias até 1 mês. Ao final desse período inicia-se a fase “patológica” da SIA, caracterizada por intensa imunodepressão, que pode se estender até várias semanas após a exposição (Tabela 1). Dentre os sistemas que constituem o corpo humano, o Sistema Hematopoiético exibe maior susceptibilidade aos efeitos prejudiciais da radiação em virtude de sua elevada radiosensibilidade. O maior comprometimento dos demais sistemas, tais como o Gastrointestinal e Nervoso Central, é alcançado apenas com doses superiores a 6 Gy (IAEA, 2000; WASELENKO et al., 2004).

Na SIA, a triagem inicial das vítimas afetadas é realizada com base no quadro clínico e nos dados obtidos por meio de hemograma (contagem leucocitária e de plaquetas). Esta estimativa de dose não é precisa, mas auxilia no manejo das vítimas e torna mais ágil a tomada de decisões quanto à indicação do melhor tratamento médico. Em situações de emergência, que por vezes podem atingir centenas ou milhares de pessoas, a obtenção de um prognóstico preliminar

pode ser fundamental na recuperação e sobrevivência dos indivíduos afetados (BERGER et al., 2006).

Tabela 1 – Correlação entre manifestações clínicas e nível de exposição

Tipo de manifestação	Dose (Gy)	Sintomatologia apresentada
Infra-clínica	< 1	Indivíduos assintomáticos
Reações leves generalizadas	1 a 2	Astenia, náuseas e vômitos, 2 horas após a exposição Desaparecimento dos efeitos após 24 horas
Síndrome Hematopoiética leve	2 a 4	Depressão da função medular (linfopenia, trombopenia e anemia ⁴) dentro de 3 semanas. Em geral, o retorno da normalidade é alcançado com 4 a 6 meses
Síndrome Hematopoiética grave	4 a 6	Depressão severa da medula óssea
Síndrome do Sistema Gastrointestinal	6 a 7	Diarreias, vômitos e hemorragias
Síndrome Pulmonar	6 a 10	Insuficiência respiratória aguda
Síndrome do Sistema Nervoso Central	> 10	Coma e morte, horas após a exposição

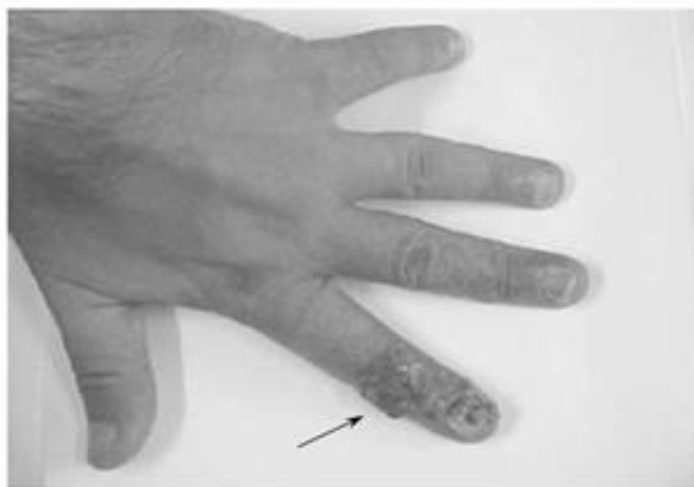
Fonte: Nouailhetas (2008)

Acidentes radiológicos que envolvem exposição aguda de grande parte do corpo (> 50 %) são considerados raros e estão comumente associados a uma série de manifestações clínicas adversas, tais como febre, náuseas, vômitos e diarreia. Por essa razão, os indivíduos afetados precisam ser rapidamente diagnosticados e tratados conforme a dose de radiação absorvida (WASELENKO et al., 2004).

Por outro lado, acidentes em que um órgão ou uma pequena porção do corpo (< 10 %) são irradiados com uma alta dose de radiação são muito mais frequentes do que aqueles que envolvem exposição de corpo inteiro, os quais se caracterizam pela manifestação de sintomatologia mais definida. As lesões surgem em resposta a elevadas doses de radiação (> 8 Gy), assemelhando-se a queimaduras térmicas (Figura 2) que, entretanto, necessitam de um prolongado período de recuperação (dias ou semanas) (IAEA, 2000).

⁴ Redução do número de linfócitos, plaquetas e hemácias, respectivamente.

Figura 2 – Necrose apresentada na mão esquerda de médico traumatologista após contínua exposição aguda às RIs. Seta indica a região lesada



Fonte: Amaral (2008)

Similarmente ao que ocorre para as irradiações de corpo inteiro, a gravidade dos danos gerados por exposições parciais também pode ser correlacionada com a dose de radiação (Tabela 2). Dentre eles, um dos primeiros indícios observados desta exposição é o aparecimento de eritemas, cuja relação com a dose é denominada de Dose-eritema (IAEA; WHO, 1998).

Tabela 2 – Principais lesões epiteliais e relativos níveis de radiação em exposições agudas parciais

Sintomatologia	Dose (Gy)	Manifestação dos sintomas
Eritema	3 – 10	14 – 21 dias
Epilação	> 3	14 – 18 dias
Escamação seca	8 – 12	25 – 30 dias
Escamação úmida	15 – 20	20 – 28 dias
Formação de bolhas	15 – 25	15 – 25 dias
Ulcerações internas	> 20	14 – 21 dias
Necroses cutâneas	> 25	> 21 dias

Fonte: IAEA e WHO (1998)

Os efeitos biológicos radioinduzidos descritos anteriormente possuem uma mesma origem de formação, pois são reflexo da ação clastogênica das radiações ionizantes sobre a molécula fundamental da célula – o DNA (ácido desoxirribonucleico) (NATARAJAN, 2002).

2.3 Influência das radiações ionizantes sobre o DNA

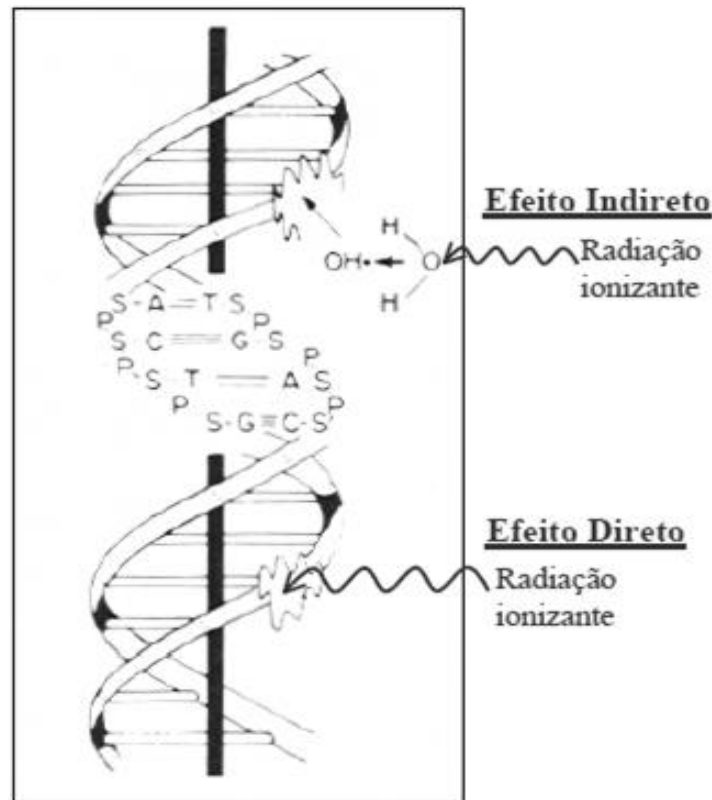
A avaliação do impacto mutagênico induzido pelas radiações ionizantes sobre o núcleo da célula, em particular no DNA, tem sido alvo de inúmeras pesquisas, inicialmente baseadas em modelos animais (p.ex. parasitas, gafanhotos e ratos) e vegetais (p.ex. plantas do gênero *Tradescantia* e *Vicia faba*) (NATARAJAN, 2002).

O elevado interesse sobre os tipos de danos deve-se ao fato de que é no DNA que estão contidas as informações necessárias ao funcionamento e manutenção das atividades metabólicas essenciais para a subsistência da célula. Além disso, várias evidências apontam o DNA como molécula alvo da ação genotóxica da radiação (p.ex. morte celular, carcinogênese e mutação) em vista de sua elevada radiosensibilidade (HALL; GIACCIA, 2006).

Há duas vias pelas quais se processam as lesões no DNA: 1) a direta, onde a radiação incide diretamente sobre a dupla fita do DNA, induzindo alterações na cadeia polipeptídica; e 2) a indireta, na qual as ionizações ocorrem inicialmente sobre as moléculas de água, em um processo conhecido como radiólise, gerando radicais livres e peróxidos tóxicos que, por sua vez, agem sobre o DNA (HALL; GIACCIA, 2006) (Figura 3).

Nas exposições às radiações que possuem alta transferência linear de energia (LET – *Linear Energy Transfer*), a exemplo das partículas alfa, nêutrons e elementos de fissão, 70 % das lesões radioinduzidas são do tipo direta. Por outro lado, para radiações de baixo LET (p.ex. radiação gama e raios-X) a prevalência do efeito direto cai para 40 %, como consequência da distribuição randômica (Poisson) de energia ao longo da trajetória do feixe de radiação (YOKOYA et al., 2008).

Figura 3 – Efeitos direto e indireto das RIs na molécula de DNA

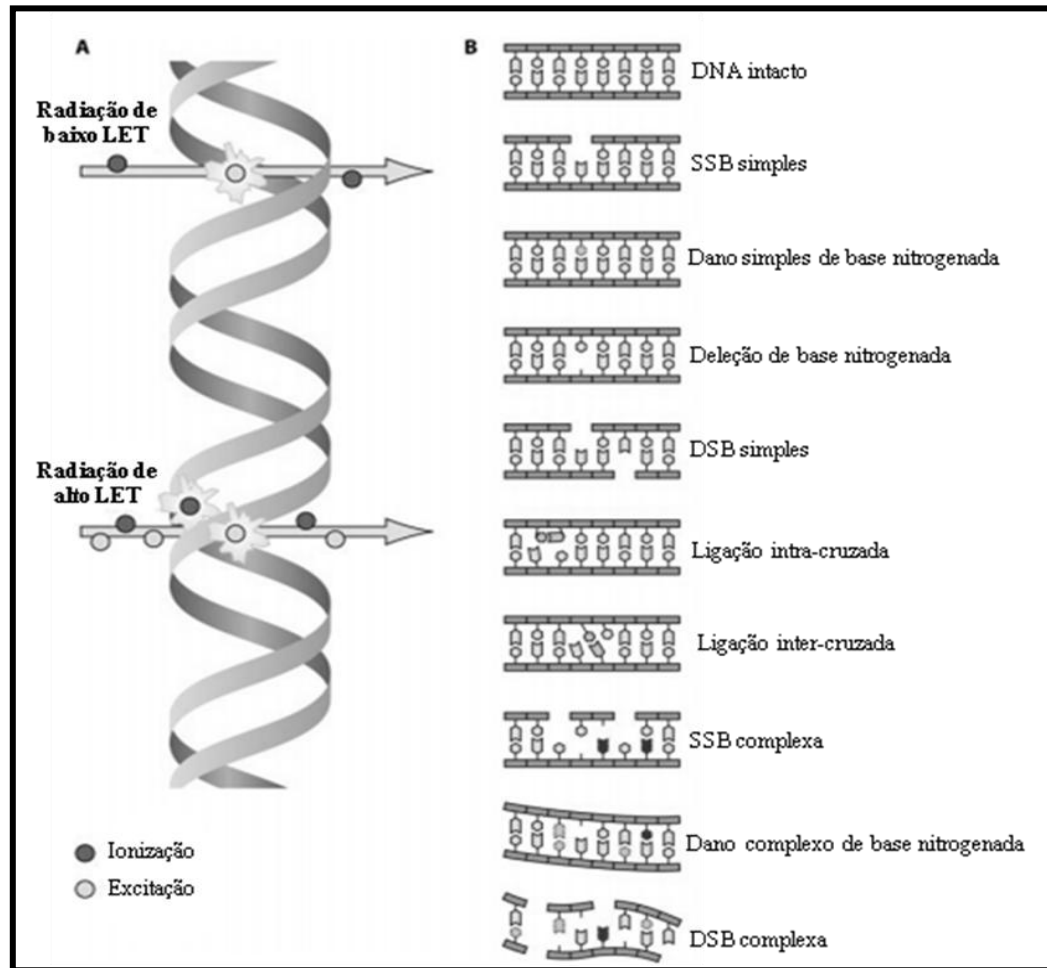


Fonte: Fernandes (2005)

As radiações ionizantes podem gerar alterações estruturais na cadeia polipeptídica que incluem substituição de base nitrogenada, formação de quebras simples (SSB – *Single Strand Breaks*) e duplas (DSB – *Double Strand Breaks*), entre outras (Figura 4) (JOKSIC et al., 2000; CARLONI et al., 2001; HANDE et al., 2005).

Dentre as lesões estruturais descritas anteriormente, a formação de DSBs complexas representa o dano celular mais severo, responsável por grande parte dos efeitos biológicos radioinduzidos (GARCIA-SAGREDO, 2008).

Figura 4 – Tipos de alterações mais frequentes nas cadeias do DNA



Fonte: IAEA (2011)

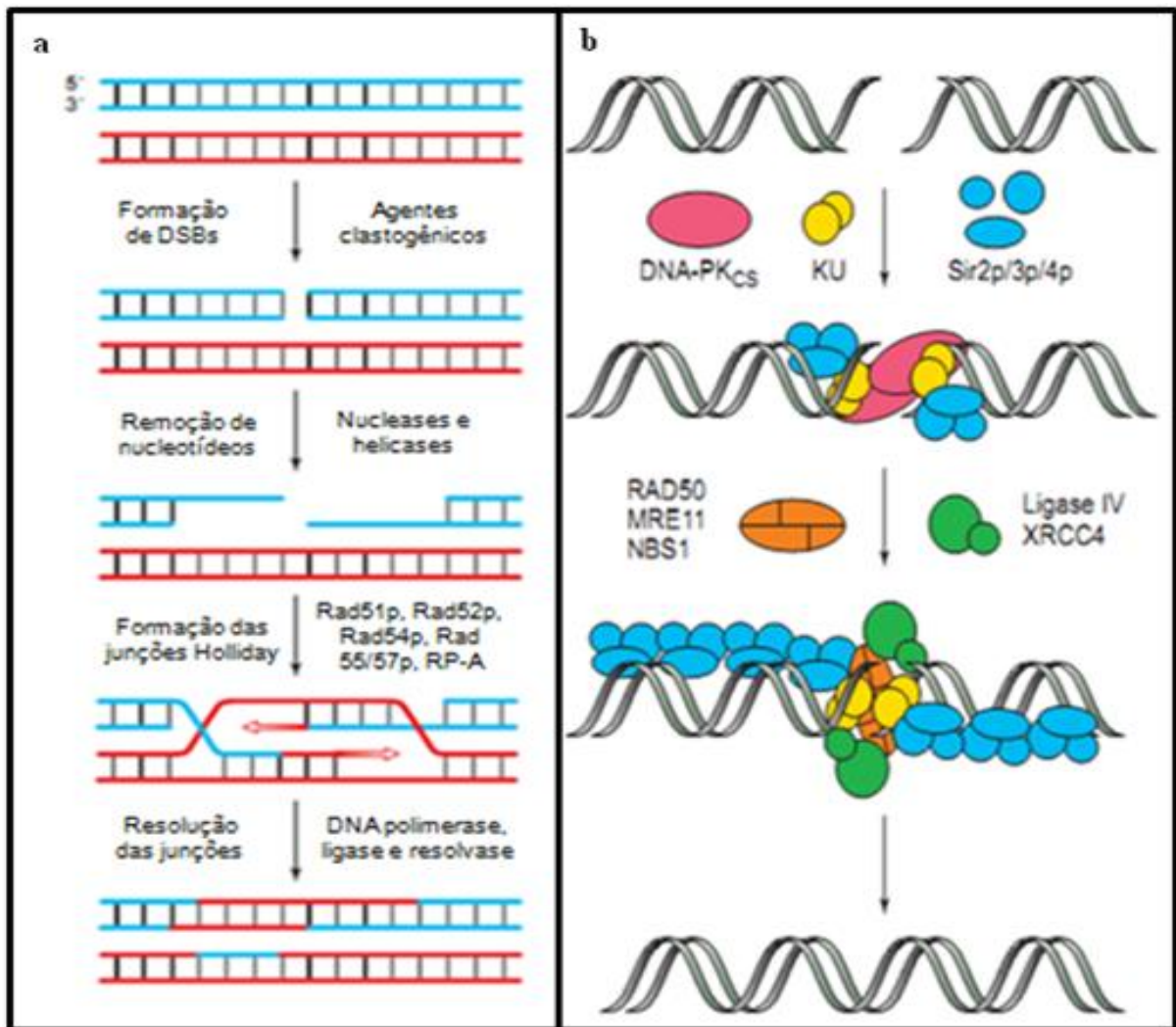
Nos eucariontes, o reparo das DSBs dá-se por pelo menos três mecanismos diferentes (NATARAJAN et al., 2008):

- 1) Reparo por recombinação homóloga (Homologous recombination repair – HRR), via de reparo altamente precisa pela qual a sequência original de DNA é corrigida a partir de uma sequência homóloga;
- 2) Pareamento de fita simples (Single-strand annealing – SSA), via de reparo semelhante à HRR que, contudo, não envolve recombinação e leva à formação das principais deleções intersticiais;

- 3) União terminal de DNA não homóloga (Nonhomologous DNA end joining – NHEJ), via de reparo na qual duas quebras terminais são unidas diretamente, gerando alterações em pequena escala (p.ex. substituição de bases, inserções e deleções) no ponto em que houve a quebra do DNA.

Dentre eles, os mecanismos de reparo HRR e NHEJ são os mais utilizados por mamíferos e demais eucariontes superiores (Figura 5) (OBE et al., 2002).

Figura 5 – Esquema geral das vias de reparo HRR (a) e NHEJ (b)



Fonte: Adaptado de Kanaar e cols. (1998)

A ausência de reparo das DSBs, resultante do comprometimento e inativação dos mecanismos citados anteriormente, está intimamente associada a modificações na conformação da cromatina⁵, podendo gerar alterações cromossômicas instáveis e/ou estáveis (GARCIA-SAGREDO, 2008).

2.4 Alterações cromossômicas (ACs) instáveis e estáveis

A instabilidade genômica resultante de modificações estruturais na cromatina está diretamente relacionada ao aparecimento de alterações citogenéticas do tipo cromatídicas e cromossômicas. As alterações cromossômicas (ACs) são mais específicas às exposições envolvendo radiações ionizantes, enquanto que as cromatídicas geralmente estão associadas a algum tipo de estresse químico (BONASSI; AU, 2002).

O estudo das ACs em linfócitos do sangue periférico, como indicador de genotoxicidade de agentes mutagênicos, tem origem na relação entre elevadas frequências de ACs e maior risco de aparecimento de cânceres. Esta associação foi inicialmente observada no sentido de avaliar o impacto que tais danos cromossômicos exercem sobre a saúde de trabalhadores expostos a agentes cancerígenos (NORPA et al., 2006). Posteriormente, as ACs também passaram a ter importância no campo da radiobiologia como biomarcadores de exposição, na avaliação do risco de carcinogênese após incidentes radiológicos e no acompanhamento de pacientes em radioterapia (SACHS et al., 2000).

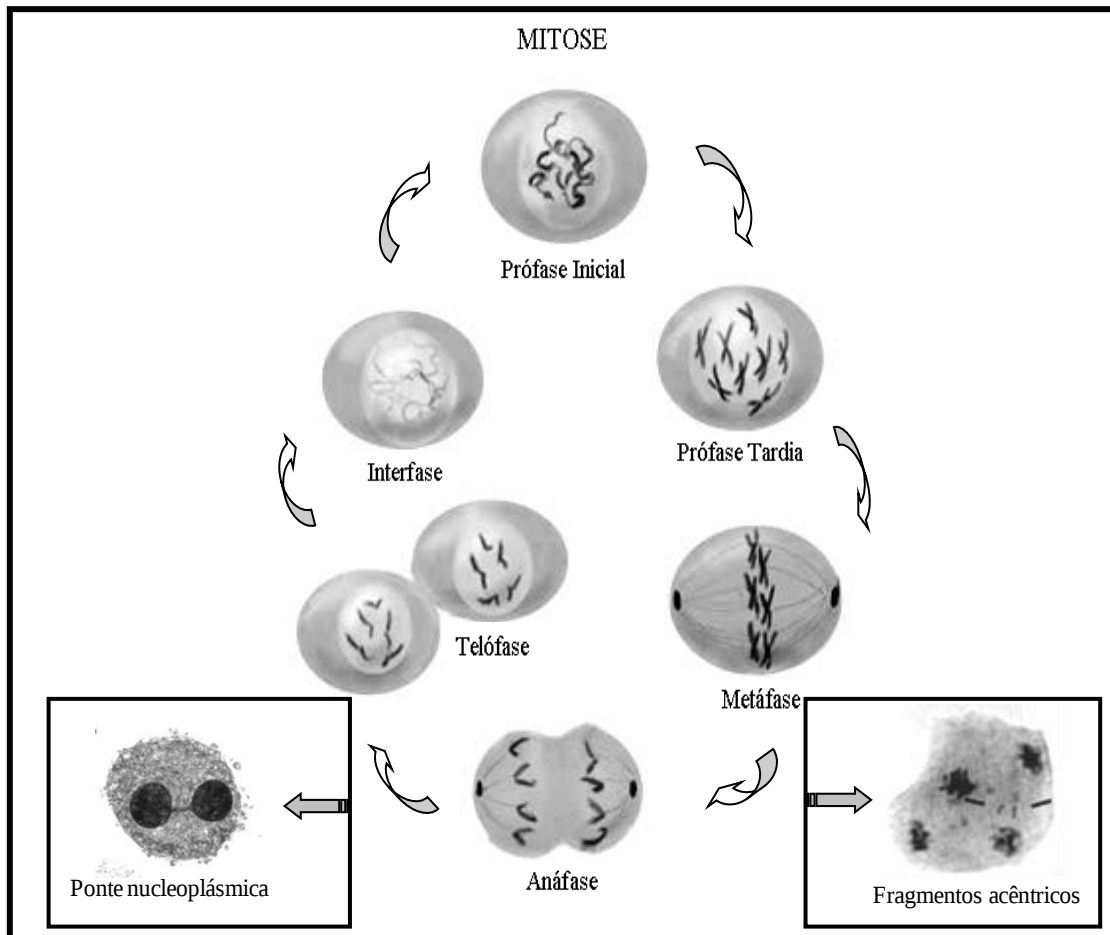
2.4.1 Classificação das ACs

As ACs são classificadas em instáveis ou estáveis de acordo com o tempo de vida médio e a viabilidade da célula portadora dessas aberrações (BONNER, 2003). As alterações cromossômicas instáveis (ACIs) exibem um caráter transitório em virtude do grau de rearranjo e do tipo de deleção sofrido na conformação original dos cromossomos, estando associadas à perda de material genético e comprometimento da viabilidade celular (LLOYD, 1998; BONASSI; AU, 2002).

⁵ A cromatina é estrutura formada pela associação da dupla fita de DNA às proteínas histônicas e não-histônicas, cujo empacotamento origina os cromossomos.

O material genético tende a ser perdido na mitose por duas vias principais: (1) dispersão de fragmentos acêntricos no meio extracelular, como resultado de sua reduzida capacidade de se fixar aos fusos mitóticos; e (2) ruptura das pontes nucleoplásmicas, geralmente formadas pelos dicêntricos no final da telófase (citocinese) (Figura 6) (ALEXANDER et al., 2006).

Figura 6 – Representação esquemática das etapas do ciclo celular mitótico. Em destaque estão as principais vias de formação das ACIs



Fonte: Adaptado de <<http://www.dartmouth.edu>>

Em contrapartida, as alterações cromossômicas estáveis (ACEs) não afetam de forma tão significativa o processo de divisão e a viabilidade da célula, permanecendo em linfócitos do sangue periférico e em células-tronco hematopoiéticas da medula óssea vários anos após a

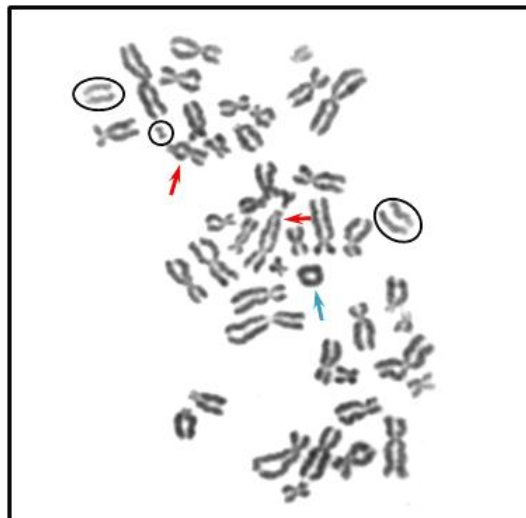
exposição. São exemplos de ACEs as translocações⁶ recíprocas e inserções, cujo mecanismo de formação envolve rearranjo entre segmentos cromossômicos homólogos e não homólogos (RODRÍGUEZ et al., 2004; TUCKER, 2008).

As translocações recíprocas ganharam destaque nos ensaios biodosimétricos por persistirem ao longo do processo de renovação celular por um período de tempo maior, o que as tornou biomarcadores de exposição mais apropriados que os dicêntricos em investigações retrospectivas (SOROKINE-DURM et al., 2000; EDWARDS et al., 2005).

Entretanto, a análise desse biomarcador não é recomendada como método de rotina em decorrência dos custos relativos às técnicas citogenéticas de coloração mais utilizadas (p.ex. Hibridização *in situ* fluorescente, SKY e m-FISH). Além disso, significativas variações interindividuais têm sido detectadas, em particular em indivíduos com idade acima de 40 anos. Tal variação é resultado da contribuição de outros fatores como senilidade, tabagismo e agentes químicos mutagênicos na produção das ACEs (MÜLLER et al., 2005; LEMOS-PINTO; AMARAL, 2011).

Os tipos mais comuns de ACIs são os cromossomos dicêntricos, os cromossomos em anel e os fragmentos acêntricos (IAEA, 2011) (Figura 7).

Figura 7 – Cromossomos dicêntricos (setas vermelhas), em anel (seta azul) e fragmentos acêntricos (círculos): aberrações cromossômicas instáveis (ACIs) em metáfase irradiada



Fonte: Autor

⁶ Definição: Trocas ou rearranjos cromossômicos que podem ou não ser recíprocos.

Os dicêntricos são formados a partir da clivagem de dois cromossomos adjacentes que, por meio de falhas do sistema enzimático de reparo (endonucleases), são unidos assimetricamente, gerando uma estrutura modificada com dois centrômeros, mais um fragmento acêntrico. O aparecimento de tri ou tetracêntricos ocorre principalmente devido a doses elevadas de radiação (> 4 Gy) (LÉONARD et al., 2005).

Por sua vez, os cromossomos em anel são originados da união das extremidades adesivas de um mesmo cromossomo, após a ruptura de seus respectivos segmentos terminais. Este tipo de alteração raramente é observado nos linfócitos irradiados, compreendendo apenas 10 % de todas as alterações instáveis. A incidência de cromossomos em anel está mais frequentemente associada a altas doses e a radiações com alto poder de ionização (VOISIN et al., 2004; STRICKLIN et al., 2005).

Os fragmentos acêntricos incluem anéis acêntricos, deleções terminais e intersticiais, que apesar de serem igualmente agrupados nesta classe, possuem distintas origens de formação, formas e tamanhos. A aplicação dos fragmentos acêntricos em dosimetria citogenética é restrita devido à sua elevada frequência basal (1 em cada 250 células) e à significativa influência positiva que agentes tóxicos não radioativos, como certos agentes mutagênicos químicos, exercem em sua formação. Contudo, alguns laboratórios o utilizam como indicativo da presença de cromossomos dicêntricos quando sua frequência está acima dos níveis basais (0-3 em 1000 células) (IAEA, 2011).

Dentre as ACIs, os cromossomos dicêntricos são considerados uma “assinatura biológica” das RIs devido (LEMOS-PINTO; AMARAL, 2011):

- A sua elevada especificidade às radiações ionizantes;
- Ao fato de que poucos agentes mutagênicos induzem a formação de dicêntricos (p.ex. bleomicina e neocarzinostatina), e de que esses agentes “radiomiméticos” possuem aplicação restrita a tratamentos quimioterápicos, devido a sua alta toxicidade;
- A sua alta incidência entre as ACIs (~ 60 %) e baixo nível de “background” em células de indivíduos não radioexpostos (0-1 em 1000);
- Às inexpressivas variabilidades interindividuais observadas nas populações estudadas;
- À possibilidade de determinação do grau de homogeneidade da exposição com base em seu padrão de distribuição.

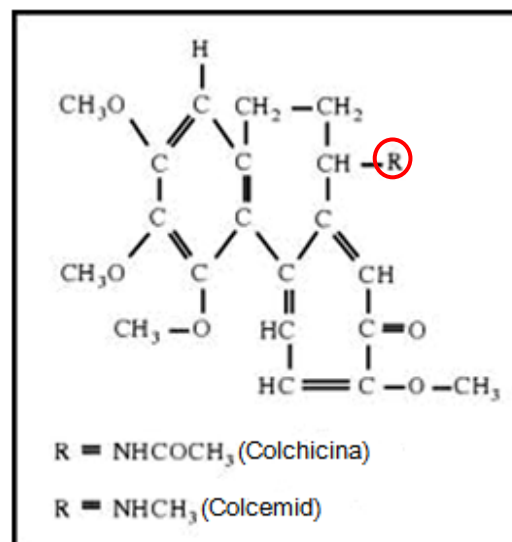
2.4.2 Modelo biológico – Linfócitos ou fibroblastos?

Os modelos biológicos mais comumente utilizados no estudo das ACIs são os fibroblastos e os linfócitos presentes no sangue periférico. Tratam-se de células quiescentes (fase G0 do ciclo celular) que, ao sofrerem a ação das RIs, armazenam o dano radioinduzido, ainda que sejam estimuladas e retomem o processo de divisão celular (FRINGER; GRINNELL, 2003; YUSUF; FRUMAN, 2003).

Ao serem cultivados *in vitro*, os fibroblastos e os linfócitos são estimulados a entrarem novamente em divisão (e passarem pelas fases G1, S, G2 e Mitose). Para tanto, a fitohemaglutinina (PHA – *Phytohemagglutinin*) é o mitógeno mais comumente utilizado. A visualização dos cromossomos é realizada na etapa do ciclo mitótico em que apresentam morfologia melhor definida e maior grau de condensação – a metáfase. O bloqueio da mitose em metáfase é obtido por meio da adição de Colcemid ao meio de cultivo celular (CARLONI et al., 2001).

O Colcemid é uma droga antimitótica sintética, análoga à colchicina (Figura 8), que possui uma toxicidade 30 vezes menor do que a colchicina e um bloqueio mais eficiente do ciclo mitótico (BANERJEE; BHATTACHARYYA, 1979; KANDA et al., 1994).

Figura 8 – Semelhança entre a estrutura molecular do Colcemid e da colchicina. Em vermelho está evidenciado o radical (R) que é particular de cada molécula



Fonte: [www. fx.damascgate.com](http://www.fx.damascgate.com)

Tanto os linfócitos quanto os fibroblastos podem ser cultivados *in vitro* de acordo com as condições descritas anteriormente. Entretanto, as células linfocitárias exibem características mais vantajosas aos ensaios biodosimétricos, tais como: tempo de cultivo reduzido (48 horas) em relação aos fibroblastos (1 semana), o que reduz o risco de contaminação; procedimento de coleta das amostras (punção venosa) mais simples e menos invasivo do que o dos fibroblastos (biópsia); além de serem células que estão em contínua circulação no sangue periférico (STANKEOVÁ et al., 2003; GARCIA-SAGREDO, 2008).

Adicionalmente, a transmissibilidade e relativa estabilidade das ACIs nas células linfocitárias permitem que a dose absorvida possa ser mensurada até 3,5 anos após uma exposição a baixas doses de radiação (GARCIA-SAGREDO, 2008).

2.4.3 Técnicas citogenéticas de coloração

O método de coloração comumente empregado na análise das ACIs é a coloração convencional com Giemsa, pela qual todos os cromossomos são uniformemente corados (IAEA, 2011). As vantagens desta coloração como método de rotina devem-se à simplicidade metodológica, ao baixo custo associado e à rapidez de execução. Por outro lado, por ser uma técnica que cora uniformemente toda a extensão do cromossomo, a identificação dos dicêntricos torna-se uma tarefa mais laboriosa, principalmente se houver sobreposição de cromátides-irmãs (FERNANDES et al., 2008a).

O desenvolvimento de métodos que permitem localizar de forma mais rápida e precisa a região centromérica dos dicêntricos tem auxiliado os citogeneticistas na identificação e análise das metáfases linfocitárias em investigações biodosimétricas. Como exemplo, podem ser citadas as técnicas de bandeamento C e de hibridização *in situ* fluorescente (IAEA, 2011).

2.4.3.1 Fluorescence plus Giemsa (FPG)

Em dosimetria citogenética, a técnica de FPG é aplicada como um método de controle do ciclo celular, que permite ao citogeneticista excluir da análise biodosimétrica células em M2 (2ª divisão mitótica). Esta distinção faz-se pela adição da 5-Bromo-2-desoxiuridina (BrdU) no

início do cultivo celular, permitindo uma coloração diferenciada das cromátides de acordo com seu progresso no ciclo de divisão celular em M1, M2, M3 e M4 (HAYATA et al., 1992).

O DNA das metáfases que incorporam BrdU na passagem de dois ciclos celulares torna-se sensível à luz ultravioleta. Como resultado, as cromátides-irmãs de cada cromossomo exibem uma coloração diferenciada, denominada de “Harlequin” (Figura 9).

Figura 9 – Metáfase em segunda divisão corada com FPG

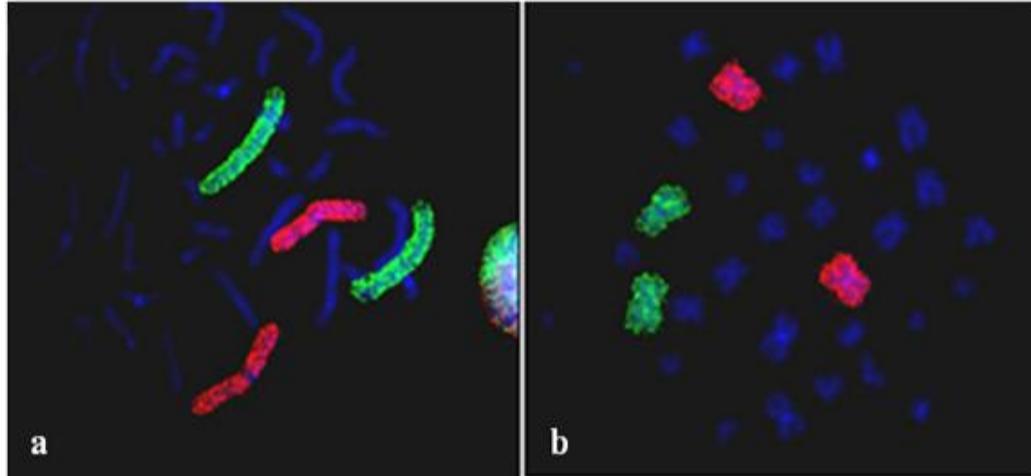


Fonte: IAEA (2011)

Embora este método gere uma maior acurácia nos ensaios biodosimétricos, a resolução das preparações cromossômicas pode ser seriamente comprometida, tornando os cromossomos “borrados”, o que pode dificultar o reconhecimento dos dicêntricos (ROY et al., 1996).

Como alternativa ao FPG, alguns estudos têm adicionado Colcemid 0 ou 24 horas após o início do cultivo celular, como forma de bloquear mais eficientemente a entrada dos linfócitos em M2 (KANDA, 2000). Este procedimento, contudo, pode gerar uma excessiva condensação cromossômica (Figura 10) a não ser que a concentração final de Colcemid normalmente utilizada (0,5 µg/ ml) seja substancialmente reduzida em cerca de 10 vezes (0,05 µg/ ml) (IAEA, 2011).

Figura 10 – Pares cromossômicos 2 (verde - FITC) e 3 (vermelho – Texas red) marcados por FISH. Em (a), os cromossomos exibem tamanho normal e em (b) estão altamente contraídos pela adição de alta concentração de Colcemid no início da cultura



Fonte: Fernandes (2009)

2.5 Dosimetria citogenética na avaliação dos níveis de exposição individual

Na investigação de exposições às RIs, a dosimetria citogenética surge como um caso particular da biodosimetria no qual a reconstrução da dose absorvida baseia-se na mensuração de marcadores citogenéticos sensibilizados (p.ex. ACIs e ACEs) pela ação das radiações ionizantes com a dose (MONTORO et al., 2009). Esse método tem sido aplicado de forma complementar, ou mesmo em substituição à dosimetria física na estimação do nível de exposição de trabalhadores e membros do público em geral, principalmente em casos de incidentes radiológico (AMARAL, 2005).

Os primeiros trabalhos a correlacionarem as ACIs com a dose absorvida foram iniciados por Bender e Gooch em 1962, através da quantificação de dicêntricos e fragmentos nas vítimas do acidente nuclear ocorrido em Hanford, Estados Unidos (KANDA, 2000; AGRAWALA et al., 2010). Estudos posteriores ratificaram as observações de Bender e Gooch, evidenciando a ausência de variações significativas entre a formação de dicêntricos *in vivo* e *in vitro* em amostras de sangue periférico uniformemente irradiadas. Tal princípio é utilizado na construção de curvas de calibração (KAWATA, 2004; LÉONARD et al., 2005).

A construção de curvas de calibração em dosimetria citogenética baseia-se na relação dose-efeito obtida em linfócitos humanos irradiados, com doses de radiação conhecidas,

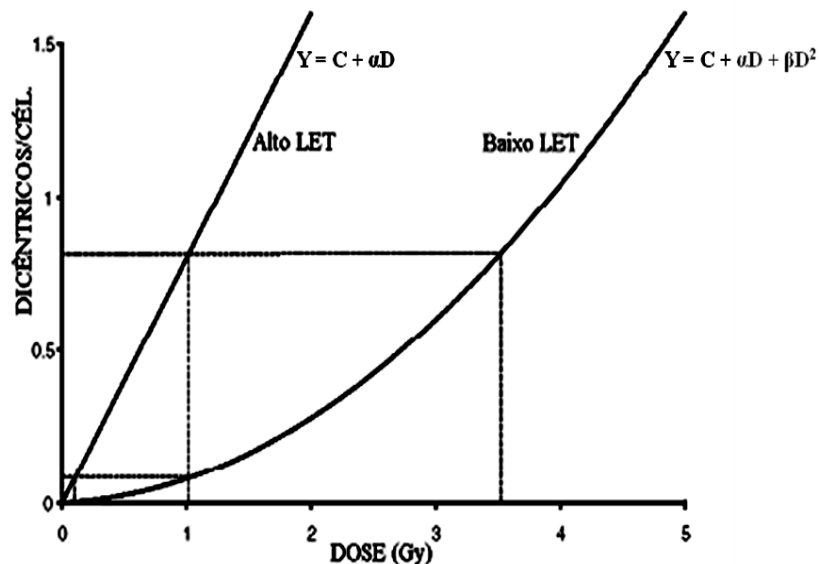
considerando as características físicas da radiação incidente e o tipo de exposição (aguda ou crônica) (AMARAL, 2002; VOISIN et al., 2002).

Fatores como a transferência linear de energia da radiação (*Linear Energy Transfer* - LET), a taxa de dose com a qual a radiação foi recebida, a temperatura do meio externo e o nível de oxigenação podem afetar o grau de resposta da célula, tecido ou órgão frente à ação clastogênica da radiação (VINNIKOV et al., 2010). Cada um desses parâmetros será discutido a seguir.

2.5.1 Fatores de influência – LET, taxa de dose, temperatura e oxigênio

Por definição, a transferência linear de energia ou LET é definida como a energia média de radiação depositada na matéria, por unidade de comprimento (keV/μm). Em termos citogenéticos, quanto maior for o LET da radiação ionizante incidente, maior será a sua eficácia biológica relativa (*Relative Biologic Effectiveness* – RBE) em produzir quebras cromossômicas radioinduzidas e, por conseguinte, cromossomos dicêntricos (IAEA, 2011) (Figura 11).

Figura 11 – Curva dose-efeito para radiações de alto e baixo LET



Fonte: IAEA (2011)

Para radiações de baixo LET (p.ex. radiação gama e raios-X), que possuem alto poder de penetração e cuja ionização dá-se de forma espaçada, a curva dose-efeito descreve uma equação

polinomial do 2º grau, denominada linear-quadrática (Equação 1). Isto ocorre porque na produção das DSBs pode haver a participação de mais de um feixe de radiação (Figura 12). Para doses inferiores a 0,5 Gy, a maior parte das DSBs é formada pela contribuição de um único feixe, enquanto que para doses acima de 1 Gy predomina a contribuição de dois feixes (IAEA, 2011).

$$Y = C + \alpha D + \beta D^2 \quad (1)$$

Onde:

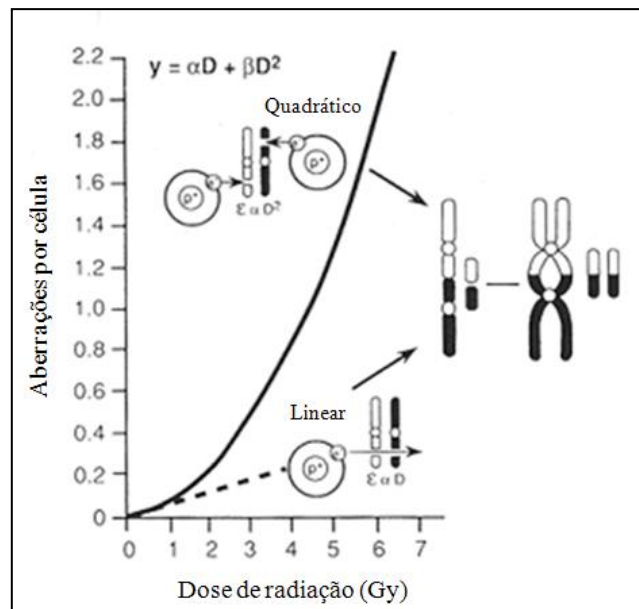
“Y” é a frequência de dicêntricos nas células analisadas;

“C” é a frequência de aberrações cromossômicas devido à radiação natural;

“α” e “β” são os coeficientes linear e quadrático, respectivamente;

“D” é a dose de radiação absorvida.

Figura 12 – Frequência de ACIs para altas e baixas doses de radiação



Fonte: Dainiak e cols. (2003)

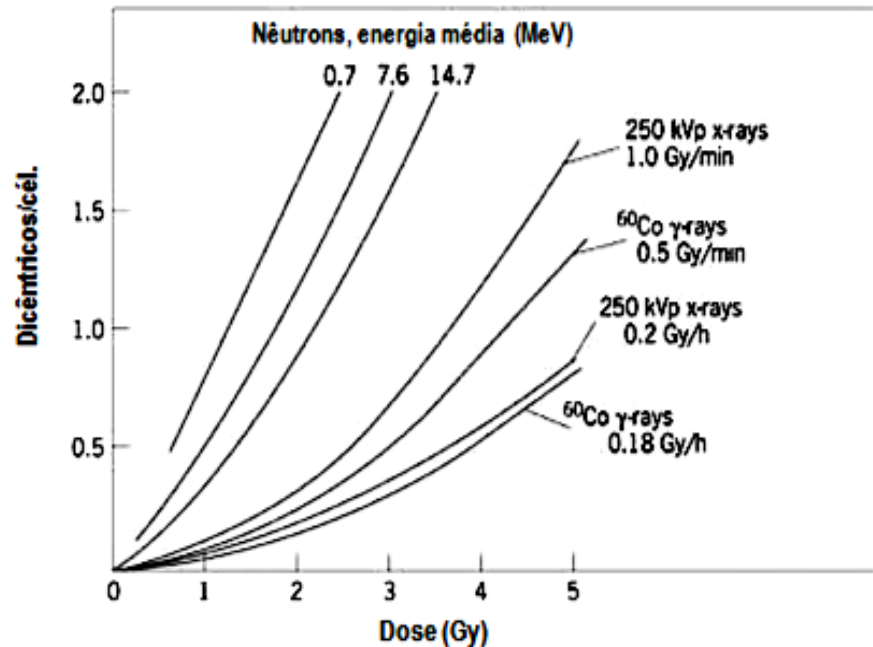
Para radiações de alto LET (p.ex. nêutrons, partículas alfa e elementos de fissão), que possuem alto poder de ionização e cuja deposição de energia ocorre de forma localizada, o componente quadrático desaparece e a curva passa a apresentar uma resposta linear em função da dose-resposta, definida pela equação abaixo (Equação 2). Neste caso, para cada partícula de radiação haverá produção de um dicêntrico (IAEA, 2011).

$$Y = C + \alpha D \quad (2)$$

Além do LET, outro fator que interfere na relação dose-efeito é o intervalo de tempo entre cada exposição. O fracionamento ou prolongamento da dose de radiação viabiliza a correção das SSBs pelo sistema de reparo celular antes que novas SSBs sejam formadas, impedindo assim que a dupla-fita de DNA seja dissociada por quebras duplas (DSBs). Dessa maneira, a frequência de ACIs produzida após uma exposição crônica será menor do que aquela gerada após uma exposição aguda (ROZGAJ et al., 2002).

Para radiações de baixo LET, a redução da taxa de dose altera a conformação da curva dose-efeito tornando-a cada vez mais linear. Caso o intervalo de tempo entre as exposições seja superior a 6 horas, a curva linear-quadrática se tornará linear. Esse raciocínio não é, todavia, aplicável às radiações de alto LET, que naturalmente apresentam uma resposta linear. Na Figura 13, é ilustrado o efeito que variações na taxa de dose promovem na conformação das curvas de dose-resposta (HALL; GIACCIA, 2006).

Figura 13 – Influência da taxa de dose na conformação de curvas dose-efeito para radiações de alto e baixo LET



Fonte: Lloyd e Purrott (1981)

Assim como o LET e a taxa de dose, a temperatura ambiente e o nível de oxigenação do meio extracelular também exercem um papel importante na frequência de ACIs. Estudos mostram que a indução de variações térmicas entre 4 e 37 °C, antes e após a irradiação, interfere tanto na formação quanto no reparo das lesões radioinduzidas, agindo como um “fator modificador da dose”. Algumas hipóteses têm sido propostas para justificar tal fenômeno (GUMRICH et al., 1986; VIRSIK-PEUCKERT; HARDER, 1986), a saber:

- 1) A temperatura determinaria a eficiência com a qual lesões moleculares precursoras seriam convertidas em lesões mais estáveis (SSBs → DSBs), por meio de rearranjos modulados pela temperatura;
- 2) A temperatura de irradiação afetaria a atividade das enzimas de reparo de ação rápida que participam da conversão de lesões precursoras em lesões mais estáveis;
- 3) A cromatina sofreria uma alteração temperatura-dependente em sua conformação a 15 °C, conferindo um efeito radioprotetor contra os efeitos danosos da radiação e, com isso, diminuindo a frequência das lesões radioinduzidas;
- 4) O efeito da temperatura inibiria o efeito indireto do oxigênio, ou seja, sua influência estaria atrelada a inibição da difusão do oxigênio até o núcleo da célula em decorrência de baixas temperaturas.

A radiosensibilização causada pelo efeito do oxigênio (O₂) é geralmente atribuída à capacidade do O₂ de se ligar aos radicais formados pela ação indireta da radiação, resultando em subprodutos danosos que dificultam o reparo imediato do DNA. Na prática, células irradiadas na presença de O₂ são cerca de três vezes mais sensíveis do que aquelas irradiadas sob condições de hipoxia. O grau de sensibilização produzido pelo oxigênio é caracterizado pela relação de aumento do oxigênio (“Oxygen enhancement ratio”) ou OER, que é obtido pela divisão da dose necessária para produzir um determinado efeito sob condições de hipóxia com a dose necessária para produzir o mesmo efeito, em condições aeróbicas (IAEA, 2010).

Vale salientar que não apenas os fatores físicos descritos anteriormente contribuem com a diminuição da frequência de ACIs nos linfócitos. As características do próprio linfócito (p.ex.

taxa de proliferação, de recirculação e o tempo médio de vida) favorecem igualmente a eliminação desses marcadores citogenéticos a cada ciclo de divisão celular. Em dosimetria citogenética, o resultado qualitativo da eliminação progressiva destas alterações é o aumento das incertezas associadas à estimação da dose de radiação absorvida (PALA et al., 2001; ROZGAJ et al., 2002; BELLONI et al., 2008).

2.5.2 Produção *in vitro* da curva dose-resposta

De acordo com a IAEA (2011), cada laboratório de dosimetria citogenética deve estabelecer sua própria curva de dose-resposta, a fim de reduzir as incertezas associadas às estimativas de dose. Isto porque o uso de diferentes reagentes e protocolos laboratoriais eventualmente geram variáveis que, somadas às incertezas relacionadas à análise das alterações cromossômicas radioinduzidas podem comprometer as investigações envolvendo casos de suspeita e/ou ocorrência de exposição excessiva às RIs.

Sabendo-se que o tipo predominantemente de exposição às RIs está associado a irradiações por raios-X e gama, a determinação de curvas dose-resposta *in vitro* para estas radiações é uma prioridade em laboratórios de dosimetria citogenética. Na produção de uma curva de calibração, é imprescindível que a dose-resposta gerada *in vitro* seja similar àquela observada *in vivo*. Nesse sentido, faz-se necessário a tomada de algumas precauções na etapa de irradiação dos linfócitos (IAEA, 2011), tais como:

- 1) A distância entre a fonte e o material a ser irradiado deve ser devidamente calculada de modo a proporcionar irradiação uniforme das amostras de sangue;
- 2) As amostras de sangue devem ser alocadas em material com densidade similar a do tecido sanguíneo (fantoma), de modo a garantir o equilíbrio na geração de partículas carregadas, em toda amostra;
- 3) Para que a curva de calibração possa ser utilizada em caso de exposições acidentais agudas, a taxa de dose deve ser ajustada de modo que o tempo total de irradiação não ultrapasse 15 minutos;

- 4) A geometria e os materiais adjacentes ao fantoma devem ser selecionados a fim de que correções quanto à distância, absorção, espalhamento e falhas na interface sangue/fantoma sejam minimizadas.

As amostras irradiadas devem ser devidamente acondicionadas e transportadas até o laboratório para então serem incubadas em meio enriquecido, processadas e fixadas. A partir das culturas fixadas são confeccionadas lâminas para análise das ACIs (dicêntricos, fragmentos e cromossomos em anel). Os dados obtidos sobre a frequência de dicêntricos são então “ajustados” e validados através de métodos matemáticos e estatísticos (IAEA, 2001).

No processo de construção das curvas de dose-resposta, o crescente emprego de softwares específicos tem contribuído para uma maior precisão e rapidez das análises citogenéticas voltadas a pesquisas e prestações de serviço em Biodosimetria (AINSBURY; BARQUINERO, 2009). Nesse sentido, primeiramente é preciso avaliar se a distribuição de dicêntricos obtida para cada dose segue uma distribuição de Poisson.

A partir da taxa de dispersão dos dados, a aplicação do Teste u (SAVAGE, 1970 apud IAEA, 2011) permitirá prever o quanto a variância das amostras corresponde ao esperado na distribuição de Poisson. Caso sejam identificados desvios na taxa média de variância, estes podem ser corrigidos pontualmente através da multiplicação da variância derivada de Poisson pela taxa de variância/média (IAEA, 2011).

Para obtenção dos termos “ α ”, “ β ” e “C”, a frequência de dicêntricos é ajustada para cada dose através de métodos matemáticos. Os mais utilizados são o Método dos Mínimos Quadrados (MMQ) e o de Máxima Verossimilhança (MV), normalmente executados por softwares que utilizam métodos iterativos para ajuste dos dados. Por definição, um método iterativo é um procedimento matemático computacional que gera uma melhor sequência de aproximação para a resolução de uma determinada classe de problemas. A implementação de um método iterativo depende da definição de um algoritmo e a inclusão de um critério de parada (AINSBURY; BARQUINERO, 2009).

No MMQ, a soma das diferenças ao quadrado é reduzida entre os valores observados, que são ajustados com o peso dos dados fornecidos pelo inverso de sua variância. Por outro lado, em MV os valores dos diferentes parâmetros do modelo estatístico são estimados de forma a maximizar a função de verossimilhança relacionada com a probabilidade dos dados observados.

A qualidade e a significância dos coeficientes α e β podem ser verificadas através do emprego do teste do qui-quadrado e do teste-F, respectivamente (Tabela 3) (AINSBURY; BARQUINERO, 2009).

Tabela 3 – Ajustamento da frequência de dicêntricos para radiações de baixo e alto LET

Fonte	C $\pm$ DP	α $\pm$ DP	β $\pm$ EP	χ^2	GL	F (p < 0,01)
^{60}Co	0,00128 $\pm$ 0,00047	0,02103 $\pm$ 0,00516	0,06307 $\pm$ 0,00401	6,61	8	15,73
^4He (20 Mev)	0,00143 $\pm$ 0,00093	0,32790 $\pm$ 0,02875	0,02932 $\pm$ 0,01636	7,40	6	11,41

DP – Desvio padrão; GL – Graus de liberdade

Fonte: IAEA (2011)

Do ponto de vista estatístico, o ajuste satisfatório da curva de calibração depende da utilização de um número suficiente de graus de liberdade. Idealmente, devem ser utilizadas cerca de 10 doses entre 0,1 e 5,0 Gy. Para radiações de baixo LET, a inclusão de doses superiores a 5 Gy é desnecessária, especialmente porque acima deste valor há saturação da frequência de aberrações, resultando em distorções do coeficiente β (IAEA, 2001). Tendo em vista que os coeficientes α e β são fatores correlatos, a diminuição do coeficiente β irá promover o consequente aumento do coeficiente α (Tabela 4).

Tabela 4 – Efeito da inclusão de altas doses no ajustamento dos dados para uma radiação de baixo LET

Dose (Gy)	α $\pm$ DP	β $\pm$ EP	χ^2	Graus de liberdade
30	180,0 $\pm$ 37,0	0,95 $\pm$ 0,24	205	10
25	149,0 $\pm$ 34,0	1,35 $\pm$ 0,28	142	9
20	120,0 $\pm$ 31,0	1,79 $\pm$ 0,32	99	8
12	49,0 $\pm$ 21,0	3,2 $\pm$ 0,35	30	7
8	16,0 $\pm$ 15,0	4,18 $\pm$ 0,36	11	6
6	3,4 $\pm$ 13,1	4,67 $\pm$ 0,37	5,9	5
5	- 5,9 $\pm$ 4,4	5,16 $\pm$ 0,44	2,5	4

DP: Desvio padrão

Fonte: Norman e Sasaki (1966) apud IAEA (2001)

Quanto ao termo “C” da equação linear-quadrática, a baixa incidência de dicêntricos na população em geral tem gerado problemas de ordem matemática devido à inclusão de um “ponto zero” na curva. Para evitar tal situação, tem sido proposta a inclusão de um valor pequeno, equivalente ao nível basal de dicêntricos, mas matematicamente representativo do valor de C ao ponto zero da curva (0-1 em 1000 células) (VINNIKOV et al., 2010).

No processo de construção das curvas de dose-resposta, o crescente emprego de softwares específicos tem contribuído com uma maior precisão e rapidez das análises citogenéticas voltadas a pesquisas e prestações de serviço em Biodosimetria (AINSBURY; BARQUINERO, 2009).

2.5.3 Estimação da dose absorvida

A dose absorvida é a grandeza física fundamental utilizada na avaliação dos potenciais efeitos biológicos, resultantes de exposições excessivas às RIs. No Sistema Internacional de medidas, sua unidade é J/kg e nome específico Gray (Gy). A partir desta grandeza, a ICRP estabeleceu duas outras grandezas físicas denominadas dose equivalente e dose efetiva, ambas expressas em Sievert (Sv), como forma de diferenciá-las da anterior (ICRP, 1990). O cálculo das doses equivalente e efetiva leva em conta não só a energia da radiação incidente, como também a radiação incidente e a radiosensibilidade de órgãos e tecidos do corpo humano (STREFFER, 2007).

Em dosimetria citogenética, um dos aspectos que mais contribui para o aumento das incertezas estatísticas na estimação da dose absorvida diz respeito ao número de metáfases que precisa ser contabilizado nas análises biodosimétricas (Tabela 5) (AINSBURY; BARQUINERO, 2009).

No estabelecimento da dose-resposta para construção da curva de calibração, por exemplo, até 10.000 metáfases podem ser contabilizadas para redução das incertezas associadas, a valores considerados desprezíveis (ROMM et al., 2009). Por outro lado, na investigação de incidentes radiológicos tem sido proposta a contagem de 500 metáfases ou 100 dicêntricos, como regra geral. Estatisticamente, a precisão dessas análises é de aproximadamente 200 ± 100 mGy (AINSBURY; BARQUINERO, 2009). Todavia, em se tratando de uma avaliação preliminar da dose absorvida em que grande parte da população local foi afetada, a contagem de 50 metáfases

ou 30 dicêntricos é suficiente para a obtenção de um prognóstico inicial quanto ao risco do paciente manifestar algum tipo de efeito determinístico radioinduzido. Vale salientar que a diminuição do número de células contabilizadas reduz a acurácia das análises para 400 ± 300 mGy, o que para uma situação de criticalidade radiológica é considerado aceitável (LLOYD et al., 2000; VOISIN et al., 2004).

Tabela 5 – Influência do número de metáfases contabilizadas, nos intervalos de confiança, da dose estimada, considerando uma exposição aguda a partir de uma fonte de ^{137}Cs

Metáfases contabilizadas	Dose estimada (Gy)	Intervalo de confiança		Nº de dicêntricos	Frequência de dicêntricos
		LCI	LCS		
250	0,25	0,05	0,58	205	10
500	0,25	0,09	0,47	142	9
750	0,25	0,12	0,43	99	8
1000	0,25	0,14	0,40	30	7
1500	0,25	0,16	0,37	11	6
2000	0,25	0,17	0,35	5,9	5

LCI: Limite de confiança inferior; LCS: Limite de confiança superior

Fonte: Romm e cols. (2009)

A decisão sobre o número de células a ser contabilizado na avaliação de indivíduos expostos ou com suspeita de exposição às RIs depende: 1) do tipo de exposição (corpo inteiro ou parcial); 2) da importância do caso analisado com relação ao número de pessoas afetadas; e 3) de evidências que indiquem a ocorrência de uma exposição excessiva ou crônica à radiação (LLOYD et al., 2000; IAEA, 2011).

2.5.4 Aplicações da dosimetria citogenética

2.5.4.1 Exposições acidentais

Acidentes radiológicos de larga escala, tais como os ocorridos em Chernobyl (1986), Goiânia (1987) e Fukushima (2011) estão comumente associados a exposições agudas, nas quais grande parte do corpo ($> 50\%$) é submetida a altos níveis de radiação, resultando em uma série

de manifestações clínicas adversas, tais como febre, náuseas, vômitos e diarreia. Nesses casos, a triagem inicial das vítimas é primariamente realizada por meio da avaliação das manifestações clínicas apresentadas (WASELENKO et al., 2004; IAEA, 2011; LEMOS-PINTO; AMARAL, 2011).

Quando a coleta de sangue ocorre até três meses após o incidente, a determinação da frequência de dicêntricos, anéis e fragmentos acêntricos é amplamente validada como método de referência para estimar a dose absorvida. Após períodos prolongados (> 3 meses – exposições agudas; > 3 anos – exposições crônicas), a análise e contagem de translocações recíprocas passa a representar de forma mais fidedigna o nível de exposição individual (MOQUET et al., 2000; PALA et al., 2001; BELLONI et al., 2008).

No caso particular dos acidentes nos quais um órgão ou uma pequena porção do corpo ($< 10\%$) foi exposta a altas doses de radiação, a contagem de ACIs presente nos linfócitos da vítima afetada torna-se ineficaz, uma vez que o número de células irradiadas é desprezível (LÉONARD et al., 2005).

2.5.4.2 Exposições ocupacionais

A maior parte das exposições ocupacionais está associada a exposições parciais, crônicas e não uniformes, envolvendo baixas doses de radiação, que induzem a diminuição do número de ACIs nas células analisadas em relação à frequência que seria esperada após uma exposição aguda, para a mesma dose (LÉONARD et al., 2005).

Diante desse cenário, comumente são efetuadas extrapolações matemáticas para o cálculo da dose absorvida, visando a não subestimação da dose absorvida. Em geral, os métodos Poisson contaminada (CP) e Qdr são utilizados em casos de exposição parciais, enquanto que a introdução de uma função $G(x)$ possibilita o ajuste da dose, em conformidade com a taxa de dose empregada (IAEA, 2011). Tendo em vista que a fração de células irradiadas sofre atraso mitótico devido aos danos radioinduzidos, o prolongamento do tempo de cultivo celular de 48 para 72 horas, com adição precoce de Colcemid (0 e 24 horas), também viabiliza a correção da dose em casos de exposição parcial, pois possibilita a análise de células M1 em atraso mitótico (FERNANDES et al., 2008b).

2.5 Dosimetria citogenética na Legislação Brasileira

O emprego da dosimetria citogenética como ferramenta de investigação em saúde ocupacional tem sido particularmente importante em questões médico-legais (perícias trabalhistas) e como método complementar à dosimetria física, onde a monitoração individual é realizada com auxílio de dispositivos sensíveis à radiação, genericamente denominados de dosímetros (AMARAL, 2002). Enquanto os dosímetros físicos medem grandezas operacionais utilizadas no estabelecimento de níveis de referência, a fim de limitar a probabilidade de ocorrência de efeitos biológicos; os dosímetros biológicos, por sua vez, são o produto da interação das RIs com o tecido vivo e por isso refletem com maior precisão os efeitos resultantes da exposição a esse agente genotóxico (AMARAL, 2005).

Em vários países da Europa e dos Estados Unidos, a prática da dosimetria citogenética é uma realidade. No Brasil, o tema é ainda pouco difundido entre os profissionais de saúde. Somente em 2005, o Ministério do Trabalho e Emprego aprovou a Norma Regulamentadora 32 (NR 32) – Segurança e Saúde no Trabalho em Serviços de Saúde – que estabelece procedimentos a serem seguidos no sentido de garantir a integridade física e mental do trabalhador da área de saúde. Dentre os vários aspectos abordados, esta norma inclui a dosimetria citogenética como um exame complementar em casos de suspeita ou ocorrência de exposição individual acidental às radiações ionizantes, a critério médico (MT/PORTARIA/ /SST Nº 32.4.5; 32.4.6, 2005).

O desconhecimento desta norma por muitos profissionais da área resulta na não solicitação da dosimetria citogenética, por médicos do trabalho, em diversos casos de suspeita de exposição acidental. Em paralelo, raros são os laboratórios que dispõem de infraestrutura e de profissionais capacitados para a realização de análises citogenéticas para fins de investigação de acidentes radiológicos (LEMOS-PINTO; AMARAL, 2011).

Embora o estabelecimento da NR 32 tenha revelado a preocupação e conscientização dos riscos inerentes às RIs pelos órgãos de radioproteção responsáveis, ainda podem ser identificadas algumas lacunas na legislação vigente. Dentre elas, alguns pontos merecem atenção especial:

- 1) Os demais profissionais do setor nuclear que estão ocupacionalmente expostos às RIs não foram legalmente incluídos nessa norma;

- 2) Observa-se uma carência de informações quanto ao método biodosimétrico de referência, mais especificamente, o tipo de marcador biológico a ser utilizado em virtude das condições em que se processou a exposição (aguda ou crônica);
- 3) A indicação da dosimetria citogenética na avaliação do nível exposição ocupacional se restringe tão somente aos casos de exposição acidental, que contribuem em menor escala no âmbito das irradiações.

2.6 Padronização de critérios metodológicos em dosimetria citogenética

Todos os critérios metodológicos precisam ser devidamente parametrizados em dosimetria citogenética com o intuito de evitar a subestimação da dose de radiação, o que prejudicaria o prognóstico de indivíduos expostos quanto ao risco de desenvolverem efeitos biológicos a curto ou em longo prazo. Isto é particularmente verdade em situações de exposição crônica prolongadas ou excessivas às RIs (acima dos limites recomendados) (WHITEHOUSE et al., 2005).

A IAEA, por meio de suas publicações em 2001 e 2011, tem procurado apresentar com detalhe revisões e atualizações com relação aos atuais métodos citogenéticos disponíveis em dosimetria citogenética, bem como sobre os critérios e recomendações internacionais empregados no controle de qualidade desta prática. A finalidade desta iniciativa é assegurar a uniformidade e otimização das técnicas e procedimentos aplicados nas várias etapas dos ensaios biodosimétricos, estejam eles relacionados ao cultivo e análise das amostras, à construção de curvas de calibração, ou ainda do simples conhecimento sobre a necessidade de se conhecer previamente o histórico de exposição do indivíduo a ser analisado, ao se mensurar a dose absorvida.

Uma aplicação direta do avanço em termos de conhecimento científico nesse âmbito foi, por exemplo, a redução do número de metáfases linfocitárias e dicêntricos contabilizados de 500 e 100 para 50 e 30, respectivamente, em situações de emergência radiológica (LLOYD et al., 2000). Este procedimento foi peça-chave para o encurtamento do tempo de análise em até 20 vezes, o que tem permitido a execução de uma triagem preliminar de vítimas acidentalmente expostas às RIs em função do grau de exposição (LLOYD, 2005).

No âmbito das exposições ocupacionais, que são significativamente mais frequentes e apresentam, portanto, maior risco associado, a otimização e padronização da dosimetria

citogenética é de suma importância na avaliação do impacto real que as RIs geram ao nível biológico, em função da dose de radiação recebida (LINET et al., 2010).

Muitos países têm constituído laboratórios de dosimetria citogenética de referência e estabelecido redes regionais e nacionais, com intuito de aprimorar as suas capacidades. Por sua vez, as agências das Nações Unidas (IAEA e OMS) que fornecem cooperação internacional em biodosimetria também têm reunido esforços para formar redes citogenéticas (WILKINS et al., 2008). Contudo, são poucos os países que possuem mais de um laboratório de dosimetria citogenética em atividade.

Nesse sentido, redes nacionais situadas na França, Coréia, Japão e Canadá têm implementado uma série de iniciativas pelas quais especialistas em citogenética humana possam ser treinados de modo a estarem aptos a participar de ensaios em dosimetria citogenética, caso seja necessário. De modo geral, tal processo requer uma adequada coordenação de diversos fatores, relacionados à infraestrutura, logística, manejo dos dados e comunicação (IAEA, 2011).

No Brasil, a carência de laboratórios especializados em dosimetria citogenética tem sido um dos principais fatores do desconhecimento e da falta de padronização desta metodologia, especialmente como ferramenta de investigação em saúde ocupacional em questões médico-legais (perícias trabalhistas) e no controle de qualidade da dosimetria física (LEMOS-PINTO; AMARAL, 2011). Esse quadro dificulta a realização de intercomparações laboratoriais ao nível nacional, importantes para a realização de triagens nos laboratórios biodosimétricos quanto à sua precisão e confiabilidade na estimativa da dose absorvida (STRICKLIN et al., 2007).

Neste contexto, o objetivo geral deste trabalho foi realizar a otimização de parâmetros metodológicos em dosimetria citogenética, relativos à adição de Colcemid, à construção de curvas dose-efeito e à temperatura de armazenamento de sangue periférico. Posteriormente, estes parâmetros foram aplicados em investigações de casos envolvendo suspeita de exposição excessiva às radiações ionizantes.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Perfil da pesquisa

Esta pesquisa foi do tipo experimental, na qual foram utilizadas células linfocitárias do sangue periférico de indivíduos do público considerados clinicamente saudáveis e de profissionais ocupacionalmente expostos. A casuística deste trabalho foi composta por 6 indivíduos, 5 mulheres e 1 homem, com idade entre 25 e 40 anos.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, sob registro de N° 031/09 (Apêndice A)

Os participantes desta pesquisa foram orientados sobre a proposta do estudo e, mediante concordância com os procedimentos a serem realizados, assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice B) e preencheram um questionário informativo (Apêndice C). Dados de identificação pessoal foram mantidos em sigilo.

3.1.1 Critérios para seleção dos voluntários

A seleção dos indivíduos voluntários foi baseada nos seguintes critérios:

❖ **Inclusão:**

- Não ser portador de patologias malignas que pudessem comprometer os resultados desta pesquisa, tais como câncer;
- Não ter sido submetido a tratamento radioterápico e/ou quimioterápico nos últimos dois anos;
- Não ter tido recente contato ocupacional com agrotóxicos e/ou veneno;
- Não ter realizado exames de raios-X, medicina nuclear e tomografia computadorizada nos últimos três meses.

❖ **Exclusão:**

- Em caso de recusa do indivíduo quanto à participação nesta pesquisa;
- Circunstâncias materiais ou logísticas que tornem impossível o desenvolvimento normal da investigação.

3.2 Disposição dos ensaios experimentais realizados

Primeiramente foi executada uma análise comparativa entre o protocolo convencional, em que o Colcemid é adicionado 3 horas antes (45 horas - 0,5 µg/ml) do fim do cultivo celular, e o não convencional, em que o Colcemid é acrescido às culturas no início do cultivo, a baixas concentrações (0 hora - 0,05 µg/ml), objetivando determinar o melhor protocolo para adição de Colcemid em amostras controle e irradiadas com 2 Gy. A análise comparativa das culturas teve como parâmetros: índice mitótico e frequência de alterações cromossômicas instáveis.

Em seguida, foram construídas curvas de calibração dose-efeito a partir dos dados obtidos *in vitro* em amostras de sangue irradiadas com raios-X, aplicando-se os métodos matemáticos MMQ e MV. Para tanto, foram seguidas as recomendações da IAEA, no que concerne às etapas de irradiação e processamento das amostras, contabilização das alterações cromossômicas instáveis e ajuste dos coeficientes linear e quadrático. A decisão sobre a escolha do método matemático fundamentou-se na qualidade do ajuste obtido.

Também foi avaliada a influência da temperatura de armazenamento em amostras de sangue periférico mantidas a 4 e 25 °C, cada qual foi mantida a essa temperatura por um período de 48 e 96 horas após a coleta de sangue. Neste experimento, pretendeu-se simular um incidente radiológico de larga escala, no qual inúmeras amostras são enviadas e mantidas nessas condições nos laboratórios de dosimetria citogenética. Neste ensaio foram avaliados parâmetros como índice mitótico e proximidade da dose estimada com a dose de radiação utilizada. A dose foi calculada com base na curva de calibração construída no primeiro ensaio.

Com base na otimização alcançada nos ensaios anteriores, profissionais sob suspeita de exposição excessiva às RIs foram investigados à luz da dosimetria citogenética. Em suma, os ensaios experimentais foram realizados sequencialmente em quatro etapas (Tabela 6).

Tabela 6 – Resumo das etapas desenvolvidas nesta pesquisa

Etapas	Descrição	Indivíduos amostrados	Dose de radiação (Gy)
<i>Etapa I</i>	Análise comparativa entre diferentes protocolos para adição de Colcemid (45 horas - 0,5 µg/ml e 0 horas - 0,05 µg/ml)	2	2,0
<i>Etapa II</i>	Construção de curvas de calibração dose-efeito com base nos métodos matemáticos dos Mínimos quadrados e de Máxima Versossimilhança	1*	0,25
			0,5
			1,0
			1,5
			2,0
			3,0
<i>Etapa III</i>	Avaliação da temperatura de armazenamento para diferentes tempos de estocagem (48 e 96 h)	2	2,0
<i>Etapa IV</i>	Aplicação dos parâmetros otimizados em profissionais sob suspeita de exposição individual excessiva às RIs	4	-

* Um dos indivíduos amostrado na etapa I

3.3 Processamento das amostras

3.3.1 Coleta e irradiação do material biológico

As amostras de sangue periférico dos indivíduos voluntários foram coletadas no Laboratório de Modelagem e Bodosimetria Aplicada (LAMBDA) por meio de venopunção, utilizando tubos a vácuo (Vacuette) contendo heparina sódica e obedecendo aos princípios de biossegurança, e de boas práticas laboratoriais. Nas etapas I, II e III, o material biológico foi acondicionado e transportado em isopor para manutenção de sua temperatura (37 °C) até o local de irradiação.

As irradiações foram realizadas nos aceleradores lineares⁷ do Real Hospital Português e do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira de Pernambuco (IMIP), de acordo com a disponibilidade de cada equipamento na execução dos ensaios.

Considerando que ambos os equipamentos têm diferentes taxas de dose, as irradiações foram realizadas sob distintos arranjos experimentais (altura, campo de irradiação e tempo de exposição) em fantoma construído com material de densidade semelhante à do tecido mole humano ($\rho = 1,0 \text{ g/cm}^3$), de forma a garantir que a dose fosse aplicada homogeneamente no material biológico. Maiores detalhes sobre esses parâmetros serão apresentados nos tópicos subsequentes.

Após a irradiação, as amostras foram novamente conduzidas ao LAMBDA, onde foram mantidas em banho-maria a 37 °C por 2 horas e incubadas em meio de cultivo, sob condições adequadas ao estímulo e proliferação das células linfocitárias.

3.3.2 Etapa I – Análise comparativa entre diferentes protocolos para adição de Colcemid

Para este experimento, foram coletados 9 mL de sangue periférico através de um 1 tubo heparinizado de cada um dos voluntários, os quais foram alíquotados em 3 seringas de 3 mL.

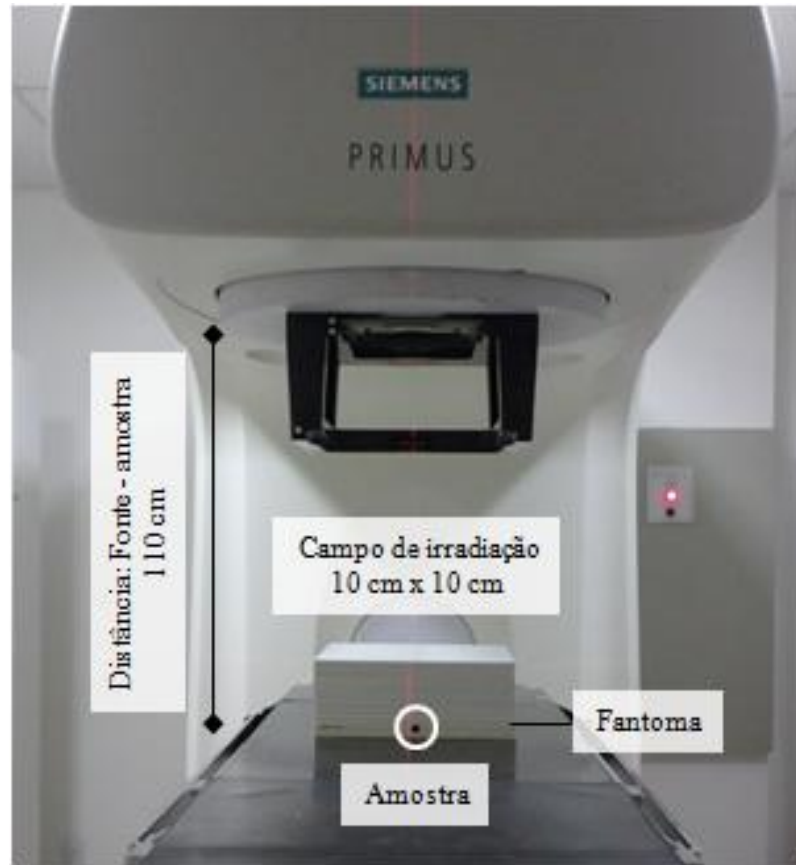
A irradiação foi procedida no acelerador linear (Siemens/ Modelo Primus) pertencente ao IMIP com raios-X de energia 6 MeV e taxa de dose de 2 Gy/min. O campo de irradiação foi de 10 x 10 cm, e a distância entre o acelerador e o fantoma de 1 metro (Figura 14).

Para avaliação do parâmetro “tempo de adição do Colcemid”, parte das alíquotas foi mantida como controle (não irradiadas) enquanto as demais foram irradiadas com dose de 2 Gy. Dessa forma, foi possível verificar a influência deste composto em células linfocitárias sob condições normais e após irradiação.

O cultivo celular foi realizado sob condições estéreis utilizando-se 4 mL de meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute, RPMI-1640) da Cultilab, suplementado com 20 % (1 mL) de soro fetal bovino (Cultilab) e 2 % (0,1 mL) de fitohemaglutinina (Gibco). Em seguida, foi adicionado 0,1 mL de Colcemid a 0,05 µg/ml em parte das amostras (controle e irradiadas), e 0,5 µg/ml (45 horas) nas demais. Após o acréscimo de 0,4 mL de sangue total, as culturas foram incubadas em estufa de CO₂ (5 %) a 37° C por 48 horas (IAEA, 2011).

⁷ Definição – aparelho emissor de raios-X comumente utilizado em tratamentos radioterápicos.

Figura 14 – Arranjo experimental utilizado na irradiação das amostras



Após o término do tempo de incubação, as culturas foram centrifugadas, com descarte do sobrenadante e ressuspensão do sedimento com solução hipotônica de KCl a 0,56 %, para o rompimento das membranas celulares e nucleares. O material em seguida foi mantido em banho-maria a 37 °C por 7 minutos. Decorrido este tempo, foi adicionado fixador – uma solução de metanol e ácido acético (3:1). O material foi novamente centrifugado, sendo o sobrenadante desprezado e o sedimento ressuspense em fixador. Este procedimento foi repetido até que a solução se tornasse límpida ou o que sedimento adquirisse uma coloração esbranquiçada (IAEA, 2011).

A suspensão celular foi gotejada sobre lâminas em posição horizontal, que secaram em placa metálica a 70 °C para facilitar o espalhamento dos cromossomos metafásicos (HENEGARIU et al., 2001). Os pormenores deste e de outros métodos de preparo de lâminas testados nesta pesquisa estão apresentados no tópico 3.5.

Para observação do material citológico, as lâminas foram coradas em solução de Giemsa a 5 % por 2 minutos. A análise citogenética foi realizada em microscópio óptico (LEICA DME). As imagens foram capturadas e armazenadas com o auxílio de uma câmera digital acoplada ao referido equipamento. Após sua análise, as lâminas foram armazenadas em ambiente seco à temperatura ambiente.

3.3.3 Etapa II – Construção das curvas de calibração

Para este experimento, foram coletados 27 mL de sangue periférico de um voluntário através de 3 tubos heparinizados. O sangue total foi aliquoteado em 6 seringas de 3 mL – uma seringa para cada dose de radiação (0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; e 3,0 Gy).

As amostras foram irradiadas no acelerador linear (Siemens/ Modelo Artiste) do Real Hospital Português com raios-X de energia 6 MeV, e taxa de dose de 0,54 Gy/min. O campo de irradiação foi de 15 x 15 cm e a distância entre o acelerador e o fantoma de 1 metro.

O cultivo celular foi realizado sob as mesmas condições da etapa I, exceto pelo tempo de adição e concentração do Colcemid. Nesta etapa, foi adicionado 0,1 mL de Colcemid a 0,05 µg/ml (0 hora) nas amostras controle e irradiadas. Após o término do tempo de incubação, o material biológico foi processado e corado conforme descrito na etapa I.

Para a construção das curvas foram empregados os programas CABAS, disponível gratuitamente no site <http://www.pu.kielce.pl/ibiol/cabas>, e Dose Estimate, gentilmente cedido pela *Health Protection Agency* (HPA, Inglaterra).

O teste-u e a relação da variância/média foram utilizados para verificar se a distribuição de cromossomos dicêntricos seguiu uma distribuição de Poisson. A qualidade do ajustamento das curvas geradas pelos programas CABAS e Dose estimate foi avaliada pelo teste do qui-quadrado (χ^2).

3.3.4 Etapa III – Avaliação da temperatura de armazenamento para diferentes tempos de estocagem

Para este experimento, foram coletados 9 mL de sangue periférico de cada um dos voluntários através de 3 tubos heparinizados, os quais foram aliquotados em 3 seringas de 3 mL. A irradiação foi realizada nas mesmas condições da etapa I (tópico 3.3.2).

Para análise do fator “temperatura de estocagem”, foram utilizadas apenas amostras de sangue irradiadas com 2 Gy, representando um cenário similar ao observado em emergências radiológicas. Estas foram subdividas em dois grupos, que foram armazenados por 48 e 96 horas após a coleta de sangue sob diferentes temperaturas de estocagem (4 e 25 °C).

As amostras estocadas a 25 °C foram mantidas em recipiente hermeticamente fechado com temperatura ambiente controlada. As amostras armazenadas a 4 °C foram conservadas em geladeira com temperatura média de 4 °C. O cultivo celular, processamento e coloração do material biológico foram realizados sob as mesmas condições da etapa II.

3.3.5 Etapa IV – Investigação de profissionais ocupacionalmente expostos às RIs

Para este experimento, foi coletado 1 tubo heparinizado (9 mL) de sangue periférico de cada um dos quatro profissionais investigados. As amostras desses indivíduos foram incubadas seguindo o melhor tempo de adição de Colcemid, determinado na etapa I.

O cultivo celular, processamento e coloração do material biológico foram realizados sob as mesmas condições da etapa II.

Para o cálculo da dose absorvida, utilizou-se a curva de calibração construída com o programa de referência definido na etapa II.

3.3.5.1 Descrição dos estudos de caso – Profissionais ocupacionalmente expostos

Foram analisados quatro estudos de caso envolvendo profissionais ocupacionalmente expostos às radiações ionizantes. Cada um dos casos está descrito a seguir:

❖ Casos 1 e 2

Dois profissionais (Indivíduos A e B), atuantes na área nuclear, informaram terem sido acidentalmente expostos às RIs ao transportarem material radioativo indevidamente acondicionado. No momento da exposição, os profissionais não portavam seus monitores individuais.

No dia subsequente ao incidente, o indivíduo A relatou ter sentido náuseas, vômitos e diarreia. Passados alguns meses, ambos os indivíduos foram submetidos a uma série de exames que indicaram uma anemia recorrente. Tais achados clínicos foram então associados a uma exposição excessiva às RIs, o que gerou a solicitação do exame de dosimetria citogenética pelo médico do trabalho responsável.

❖ Caso 3

Médico do trabalho de certo hospital solicitou o exame de dosimetria citogenética para um dos funcionários desse hospital (Indivíduo C), responsável pelo acompanhamento dos pacientes submetidos a tratamento radioterápico.

A solicitação do exame partiu da observação de que o dosímetro físico deste profissional havia recebido uma elevada dose de radiação. O profissional em questão relatou ter esquecido seu dosímetro na sala em que são realizadas as sessões de radioterapia. No intuito de assegurar a condição de isenção da empresa, o médico do trabalho solicitou o exame de dosimetria citogenética.

❖ Caso 4

O dosímetro físico de um profissional da área de saúde (Indivíduo D) registrou uma dose de radiação mensal acima dos valores permitidos (20 mSv). Este profissional mencionou que, por esquecimento, a substituição mensal de seu monitor individual não havia sido realizada no mês anterior.

A elevada dose do dosímetro foi então associada ao acúmulo de dose proveniente da contribuição de dois meses de exposição ocupacional. Como forma de investigar a real

natureza da dose registrada, o médico do trabalho fez a solicitação do exame de dosimetria citogenética.

3.5 Preparação das lâminas

As lâminas foram limpas e mantidas em etanol a 100 %, tendo sido limpas com lenço de papel no momento em que a suspensão celular foi dispensada sobre a superfície da lâmina (IAEA, 2011).

Foram testadas quatro metodologias para o preparo das lâminas, comumente utilizadas em laboratórios de citogenética, a saber:

a) Banho-maria a 70 °C com secagem em placa de Petri

- As lâminas foram dispostas em suporte vazado até que houve a formação de uma película de água na superfície da lâmina (~ 1 minuto);
- Cerca de 50 µL da suspensão celular foi dispensada na superfície de cada lâmina;
- As lâminas, então, foram retiradas do banho-maria e secas em placa de Petri a 60 °C, em estufa de secagem, até que secassem por completo.

b) Banho-maria a 70 °C com secagem em placa metálica

- As lâminas foram pré-aquecidas com o vapor d'água liberado pelo banho-maria, e só então 50 µL da suspensão celular foi dispensada na superfície da lâmina;
- Após a evaporação parcial do fixador e formação de grânulos esbranquiçados na lâmina, estas foram mantidas em contato direto com a placa metálica sobre o banho-maria até que secassem por completo.

c) Água gelada a 4 °C

- As lâminas foram imersas em recipiente (Becker) coberto com parafilme por cerca de 30 minutos, tempo necessário para que a água do Becker atingisse 4 °C;
- Com a retirada da lâmina, 50 µL da suspensão celular foi rapidamente dispensada na superfície da lâmina;
- As lâminas secaram a temperatura ambiente.

d) Lâminas estocadas em freezer a - 20 °C

- As lâminas foram mantidas por aproximadamente 5 minutos no freezer até que houvesse a formação de cristais de gelo na superfície da lâmina;
- Em seguida, as lâminas retornaram a temperatura ambiente (25 °C) por tempo suficiente para que houvesse o derretimento dos cristais de gelo;
- Aproximadamente 50 µL da suspensão celular foi rapidamente dispensada na superfície da lâmina, as quais secaram a temperatura ambiente.

3.6 Critérios para análise das lâminas e determinação do índice mitótico

3.6.1 Análise das lâminas

Em concordância com a IAEA (2011), foram contabilizadas metáfases contendo pelo menos 46 elementos, incluindo cromossomos normais, dicêntricos, anéis ou fragmentos acêntricos. Além destas, outras recomendações da IAEA (2011) foram seguidas na análise das lâminas dentre as quais se destacam:

- a) A orientação do escaneamento das lâminas: transversal;
- b) As lentes utilizadas para varredura e captura das metáfases: 20 e 100 X;
- c) A contabilização de metáfases que exibiram boa nitidez de imagem, com pouca ou nenhuma sobreposição, e sem cromátides sobrepostas;
- d) O registro das ACIs em folha de contagem apropriada (Apêndice D);
- e) A classificação das ACIs foi realizada de acordo com nomenclatura adaptada da IAEA (2011):
 - Metáfase normal → $2n=46$ (N)

- Dicêntrico + fragmento acêntrico $\rightarrow 2n=46$ (Dic)
- Tricêntricos + 2 fragmentos acêntricos $\rightarrow 2n=46$ (2* Dic)
- Tetracêntrico + 3 fragmentos acêntricos $\rightarrow 2n=46$ (3* Dic)
- Cromossomo em anel + fragmento acêntrico $\rightarrow 2n=47$ (CrA)
- Anel acêntrico (An)
- Fragmentos adicionais ou em excesso (Frag)
- Fragmentos pontuais (Min)

A contabilização do número de metáfases para obtenção da frequência de ACIs variou entre as etapas desta pesquisa, tendo sido igual a 200 nas etapas I e III, e igual ou superior a 500 metáfases nas etapas II e IV.

3.6.2 Determinação do índice mitótico

Tendo em vista a grande diversidade de tamanhos e formas que os núcleos interfásicos podem apresentar, um limite arbitrário foi determinado para diferenciar os núcleos considerados estimulados e não estimulados. Além disso, na contagem das células mitóticas foram contabilizadas tanto metáfases quanto prometáfases.

O índice mitótico (IM) foi calculado de acordo com a Equação 1 (IAEA, 2011):

$$\text{Índice mitótico} = \frac{(\text{metáfases}) \times 100}{\text{metáfases} + \text{blastos}} \quad (1)$$

A determinação deste parâmetro foi realizada nas amostras controle e irradiada das etapas II e III, e incluíram os critérios de exclusão e inclusão descritos pela IAEA (2011):

- Exclusão do núcleo de células polimorfonucleares, de células não estimuladas (núcleos diminutos), células mortas ou em apoptose e micronúcleos;

- Contagem do núcleo de células estimuladas (blastos com núcleo extenso) e de células mitóticas em metáfase.

Para que fosse obtida uma análise completa quanto ao IM, nas etapas I e III desta pesquisa foram contabilizadas 500 células, incluindo metáfases e blastos, nas amostras controle e irradiadas.

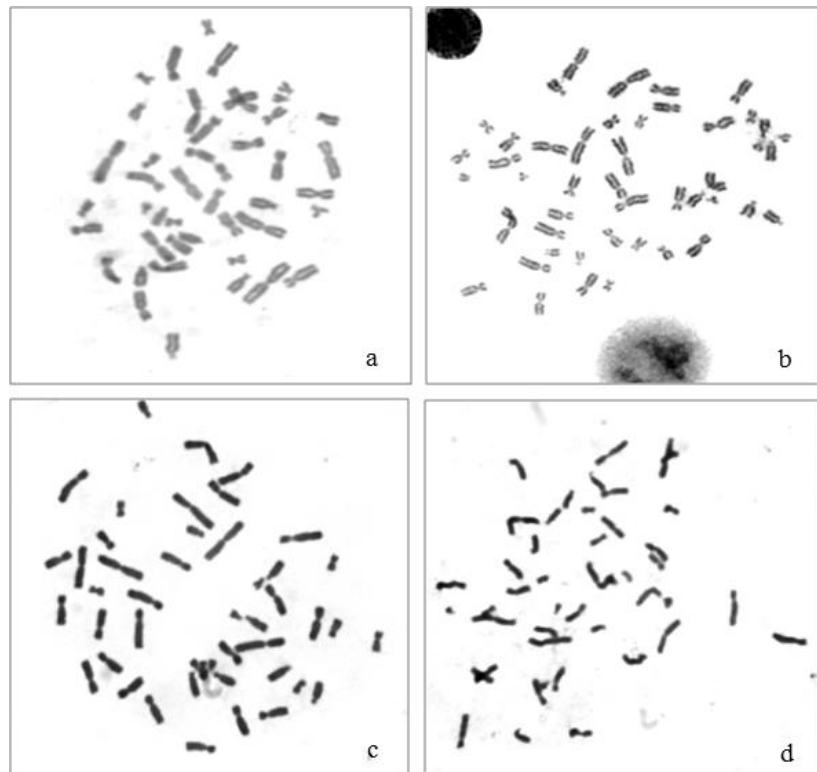
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Preparação das lâminas

O preparo das lâminas é uma etapa importante na aquisição de preparações cromossômicas de boa qualidade e na melhor visualização de alterações cromossômicas, a exemplo dicêntricos e fragmentos acêntricos. Por isso a escolha do método de preparação deve atender às necessidades e aos recursos de cada laboratório (HENEGARIU et al., 2001).

Dentre as metodologias testadas, a secagem das lâminas em placa metálica aquecida a 70 °C foi a que apresentou os melhores resultados, não somente em termos de espalhamento e visibilidade das metáfases, mas principalmente na remoção do citoplasma (Figura 15). Tal procedimento foi executado de acordo com o trabalho de Henegariu e cols. (2001), com algumas modificações.

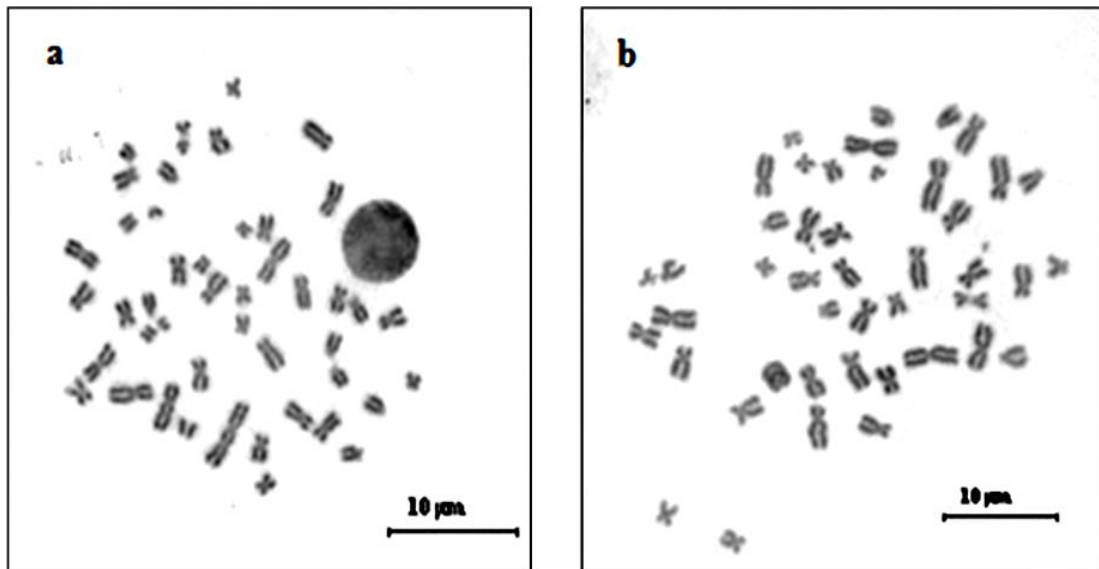
Figura 15 – Influência do método de preparação na qualidade das lâminas, utilizando banho-maria a 70 °C com secagem em placa de Petri (a), banho-maria a 70 °C com secagem em placa metálica (b), água gelada a 4 °C (c) e lâminas estocadas em freezer a -20 °C (d)



4.2 Determinação do protocolo ideal para adição de Colcemid às culturas celulares

Na determinação do protocolo ideal para adição de Colcemid, não foi verificado comprometimento na qualidade das preparações cromossômicas das amostras submetidas ao protocolo não convencional (0 hora - 0,05 $\mu\text{g/ml}$), pois a concentração de Colcemid utilizada foi 10 vezes menor do que aquela utilizada no protocolo convencional (45 horas - 0,5 $\mu\text{g/ml}$). Na figura 16 é apresentada uma visão geral das preparações cromossômicas obtidas em cada caso. De modo geral é possível notar que os cromossomos metafásicos apresentaram condensações semelhantes.

Figura 16 – Similaridade do grau de contração cromossômica induzido pelo protocolo não convencional (a) e convencional com Colcemid (b) em células linfocitárias irradiadas com 2 Gy



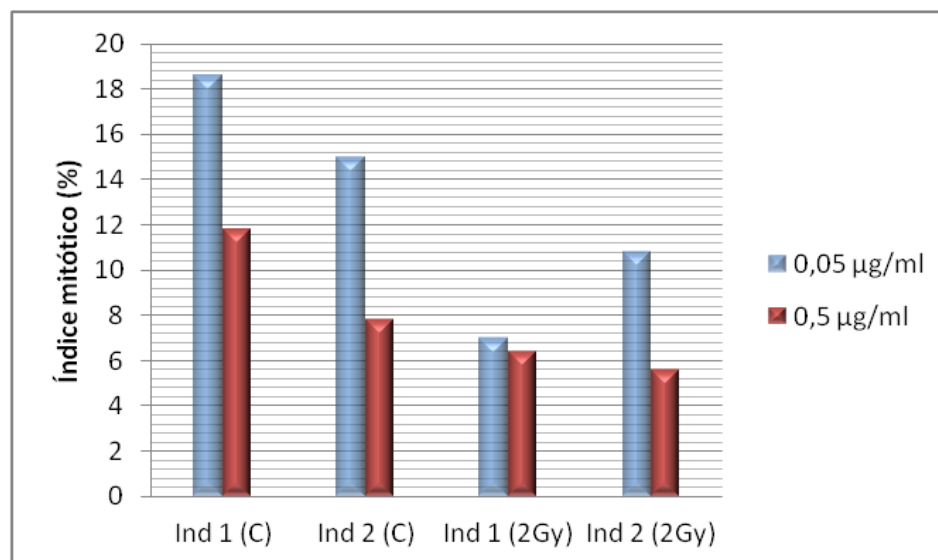
Nas Tabelas 7 e 8 estão discriminados os dados obtidos com relação ao índice mitótico e às frequências de dicêntricos das culturas submetidas aos dois protocolos.

Tabela 7 – Índice mitótico de células linfocitárias, controle e irradiadas, cultivadas com distintas concentrações de Colcemid

Identificação	Colcemid	Dose	Células	Metáfases	Índice mitótico
Indivíduo 1	0,05 µg/ml	Controle (0 Gy)	500	96	18,6 %
	0,5 µg/ml		500	59	11,8 %
	0,05 µg/ml	2 Gy	500	35	7 %
	0,5 µg/ml		500	32	6,4 %
Indivíduo 2	0,05 µg/ml	Controle (0 Gy)	500	75	15 %
	0,5 µg/ml		500	39	7,8 %
	0,05 µg/ml	2 Gy	500	54	10,8 %
	0,5 µg/ml		500	28	5,6 %

Os resultados apresentados na Tabela 7 mostram que o protocolo não convencional (0,05 µg/ml) promoveu um aumento significativo do número de metáfases em relação ao protocolo convencional (0,5 µg/ml), tanto para as células controle (15 e 18,6 % vs. 7,8 e 11,8 %) quanto para as irradiadas com 2 Gy (7 e 10,8 % vs. 5,6 e 6,4 %). Esse crescimento, contudo, variou entre os indivíduos estudados, tendo sido mais expressivo (~ 50 %) no indivíduo 2 (Figura 17).

Figura 17 – Efeito das diferentes concentrações de Colcemid no índice mitótico de células linfocitárias controle e irradiadas



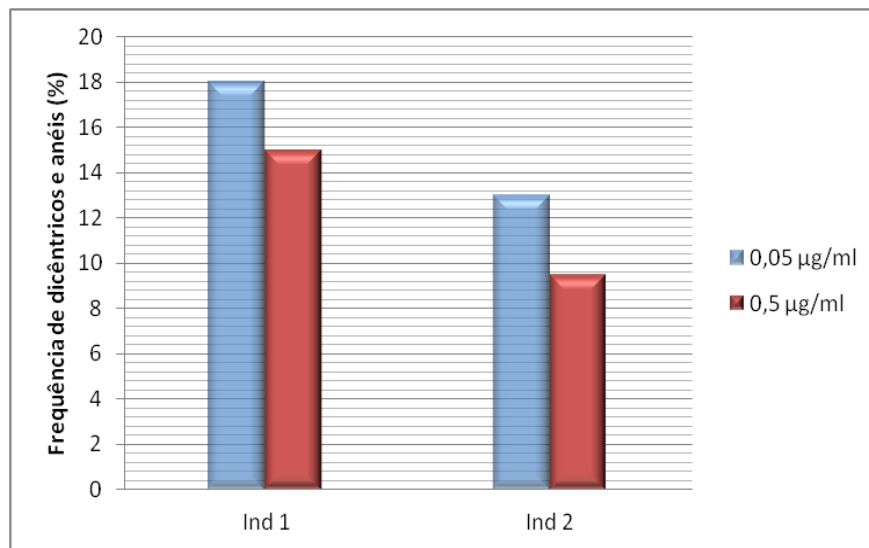
Nas amostras irradiadas de ambos os indivíduos, foi observado um maior número de cromossomos dicêntricos (23 e 33) quando o protocolo não convencional foi utilizado (Tabela 8).

Tabela 8 – Relação dose-efeito em células irradiadas para diferentes concentrações de Colcemid

Identificação	Dose	Colcemid	Metáfases	Dic	CrA	Min	Frag
Indivíduo 1	2 Gy	0,05 µg/ml	200	33	3	-	12
		0,5 µg/ml	200	24	6	-	21
Indivíduo 2	2 Gy	0,05 µg/ml	200	23	3	1	24
		0,5 µg/ml	200	19	-	-	24

Em contrapartida, a distribuição de anéis, “minutes” e fragmentos acêntricos não seguiu um padrão uniforme. Na Figura 18, é apresentado o somatório da frequência de dicêntricos e anéis de cada condição.

Figura 18 – Frequência de dicêntricos e anéis em células linfocitárias irradiadas com 2 Gy, cultivadas com diferentes concentrações de Colcemid



Na literatura podem ser encontrados trabalhos em que altas e baixas concentrações de Colcemid são acrescidas 0, 24 e até 45 horas após o início do cultivo celular (SAZAKI et al., 1989; HAYATA et al., 1992; KANDA et al., 1994; SCHMID et al., 1995; SENTHAMIZHCHELVAN et al., 2007; FERNANDES et al., 2008b). Em cada caso tem sido

ressaltado que a tomada de decisão sobre a escolha do protocolo a ser utilizado deve ser feita com base no conhecimento de que o uso prolongado de altas concentrações desse agente antimitótico pode gerar excessiva condensações cromossômica.

No trabalho de Fernandes e cols. (2008b), o Colcemid foi adicionado a uma concentração de 0,5 µg/ml às culturas no início do cultivo celular, como meio de melhorar as estimativas de dose em situações envolvendo exposição parcial às RIs. Apesar dos autores terem comprovado a eficácia desse método em termos de dose-resposta, os mesmos constataram que o uso dessa concentração provocou uma contração excessiva dos cromossomos metafásicos, tornando mais laboriosa a análise citogenética das ACIs.

Uma provável razão para o desencadeamento de tal fenômeno estaria relacionada ao mecanismo de ação dessa droga antimitótica. Primariamente, o Colcemid liga-se às proteínas (tubulinas) que compõem as fibras do fuso mitótico, impedindo sua polimerização e consequentemente suprimindo sua formação, ou ainda inativando os fusos já formados. Contudo, quando esse reagente permanece por um período prolongado no meio de cultivo celular ele aparentemente age como um cofator de condensação, que atua sobre as proteínas que formam os cromossomos, o que gera o excessivo empacotamento destes (GUERRA; SOUZA, 2002).

A ação do Colcemid também tem sido evidenciada com relação aos parâmetros índice mitótico e frequência de ACIs. Por exemplo, no trabalho de Kanda e cols. (1994), o efeito de baixas concentrações de Colcemid e colchicina (0,001 a 0,05 µg/ml) foi avaliado em células linfocitárias não irradiadas após cultivo de 48 horas. Esses autores obtiveram um valor máximo de índice mitótico de 15 % e bloqueio de até 99,6 % das metáfases em M1 ao adicionarem 0,05 µg/ml de Colcemid no início do cultivo celular.

Nesta pesquisa, os melhores resultados em termos de índice mitótico e frequência de ACIs também foram obtidos quando o Colcemid foi acrescido às culturas nessas condições (0,05 µg/ml a 0 h). A vantagem de se ter um bloqueio mais eficiente do processo de divisão celular em M1 é que a fração de células normais (controle) e aberrantes (irradiadas), capaz de atingir o segundo ciclo de divisão (M2), é reduzida.

Em dosimetria citogenética, é crucial que a análise dos linfócitos irradiados seja procedida em M1, pois a cada ciclo de divisão celular há 50 % de chance das células portadoras de ACIs transmitirem essas alterações para uma de suas células-filhas, e 50 % de chance de serem eliminadas. Com essa finalidade, tem sido recomendado o emprego da técnica de FPG na

distinção das metáfases linfocitárias de acordo com seu progresso no ciclo de divisão celular. Entretanto, o uso do FPG não apenas compromete a qualidade e resolução das preparações cromossômicas, como também induz retardo mitótico devido à adição de BrdU às culturas celulares (IAEA, 2001).

Atualmente, vários laboratórios vêm adotando e otimizando o protocolo não convencional por meio de ajustes na concentração (0,01 a 0,05 µg/ml) e no tempo de adição do Colcemid (0 ou 24 horas após o início do cultivo celular), em substituição ao protocolo convencional (SENTHAMIZHCHELVAN et al., 2007; IAEA, 2011). Em suma, as principais vantagens dessa mudança de protocolo estão relacionadas ao aumento do índice mitótico, à otimização do bloqueio das células em M1, à diminuição do efeito citotóxico associado ao Colcemid e à redução dos riscos de contaminação.

De maneira geral, os resultados obtidos neste trabalho reforçam outros dados da literatura com relação à aplicabilidade do protocolo não convencional com Colcemid nos ensaios biodosimétricos, inclusive como uma alternativa viável à técnica de FPG, na investigação e análise das ACIs em dosimetria citogenética.

4.3 Construção de Curvas de calibração com base nos métodos matemáticos dos Mínimos Quadrados e o de Máxima Verossimilhança

A Tabela 9 apresenta a frequência de cromossomos dicêntricos, anéis acêntricos, cromossomos em anel, “minutes” e fragmentos acêntricos observada nas amostras irradiadas com diferentes doses de radiação. No total foram analisadas 5.871 metáfases linfocitárias para obtenção da relação dose-resposta e frequência de distribuição dos dicêntricos, a qual foi empregada no cálculo da relação entre variância e a média (σ^2/y) e do Teste u.

Tabela 9 – Frequência de ACIs obtida após irradiação *in vitro* com diferentes doses. Destaque para o padrão de distribuição dos dicêntricos nas células analisadas

Dose (Gy)	Céls.	Dic	An	Cra	Min	Frag	N ° de dicêntricos por célula					σ^2/y	Teste u
							0	1	2	3	4		
0	1000	1	0	0	0	3	999	1	0	0	0	1,00	0*
0,25	1504	9	0	1	0	20	1495	9	0	0	0	0,99	- 0,17
0,5	1039	27	2	2	6	29	1013	25	1	0	0	1,05	1,12
1,0	768	51	0	2	2	47	719	47	2	0	0	1,08	1,55
1,5	500	64	1	5	5	40	440	56	4	0	0	1,00	- 0,05
2,0	560	163	5	7	3	93	429	105	21	4	1	1,19	3,14
3,0	500	258	1	14	7	173	306	138	49	6	1	1,05	0,79

*Valor que se aproxima do infinito Céls - células; Dic – dicêntricos; Na – anel acêntrico; Cra – cromossomo em anel; Min – minutos; Frag – fragmento acêntrico

A proximidade da relação σ^2/y em torno de 1, juntamente com valores de u dentro do intervalo $-1,96 \geq u \leq 1,96$, indicam que o índice de dispersão da quase totalidade dos dados seguiu uma distribuição de Poisson. Este tipo de distribuição expressa a probabilidade de ocorrência de eventos randômicos raros, e por isso é amplamente reconhecida e aplicada na análise da distribuição de dados citogenéticos (IAEA, 2011).

De acordo com Edwards e cols. (1979), a ocorrência de dicêntricos é tão rara que é mais realístico assumir que estes seguem uma distribuição de Poisson do que uma distribuição normal. As demais ACIs, todavia, exibem um padrão de distribuição significativamente mais disperso (Tabela 9), o que pode gerar desvios no ajuste e correlação entre os coeficientes α e β , e por isso sua frequência não é utilizada no ajuste dos dados (LLOYD et al., 1986).

Das informações apresentadas na Tabela 9, o único ponto que exibiu valor de “u” acima de 1,96 foi a dose de 2 Gy, o que indica uma maior dispersão dos dados para essa dose. Este tipo de desvio “para cima”, além de não ser incomum para altas doses, é corrigido pelos softwares que foram utilizados neste trabalho. Por outro lado, valores de “u” inferiores a -1,96 são biologicamente improváveis e podem indicar um problema na amostragem dos dados (STRICKLIN et al., 2005; IAEA, 2011).

Nas Figuras 19 e 20 são apresentadas as curvas dose-efeito geradas pelos programas CABAS e DOSE ESTIMATE. Em ambos os casos, as curvas foram do tipo linear-quadrática:

- a) $Y = (0,001 \pm 0,001) + (0,013 \pm 0,007)D + (0,056 \pm 0,005) D^2 - \text{CABAS}$
- b) $Y = (0,001 \pm 0,001) + (0,013 \pm 0,010)D + (0,056 \pm 0,006) D^2 - \text{DOSE ESTIMATE}$

Figura 19 – Curva de calibração gerada pelo programa CABAS

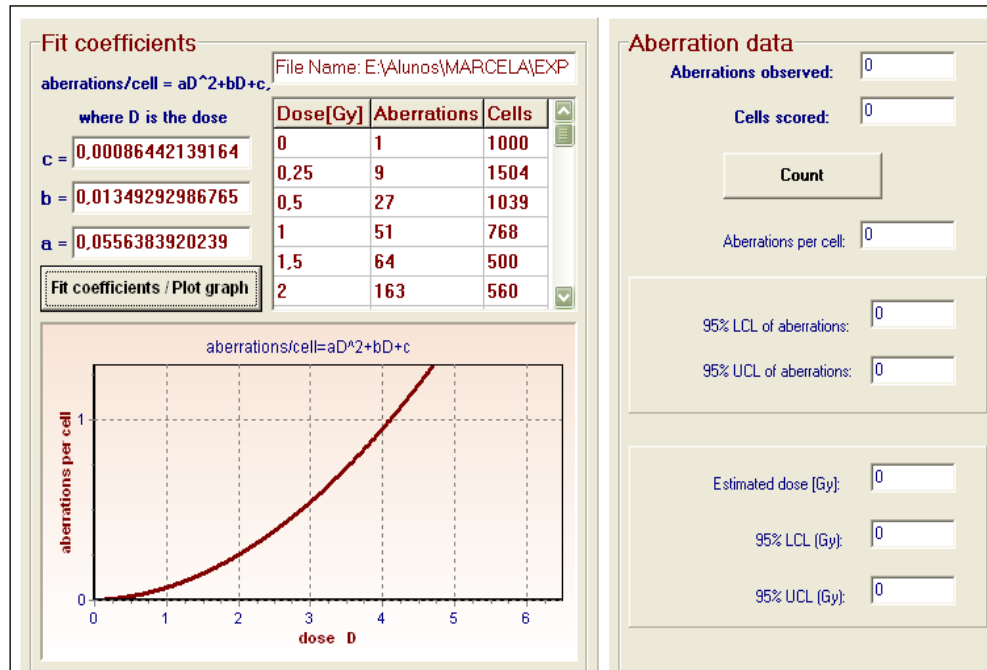
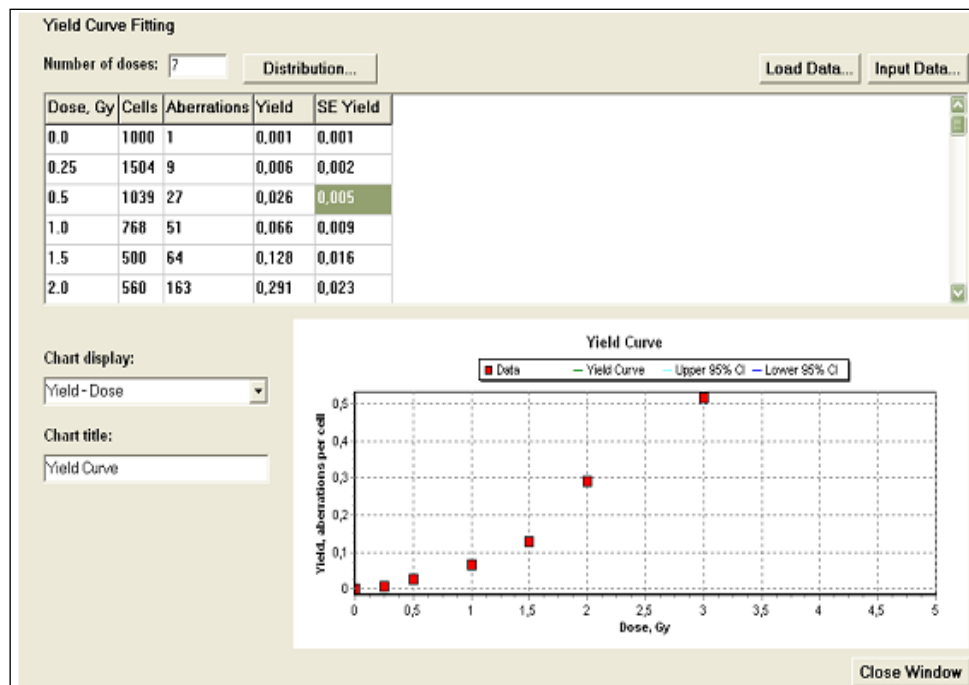


Figura 20 – Curva de calibração produzida com o software DOSE ESTIMATE



Na Tabela 10, a qualidade do ajuste de cada curva foi verificada através do teste do qui-quadrado (χ^2).

Tabela 10 – Coeficientes das curvas de calibração ajustadas com base nos métodos MMQ e MV

Programa	Método	$\alpha \pm DP$	$\beta \pm DP$	$C \pm DP$	χ^2	Gl	p = 0,05	r
Cabas	MV	0,013 $\pm$ 0,007	0,056 $\pm$ 0,005	0,001 $\pm$ 0,001	7,18	4	9,487	-
Dose estimate	MMQ	0,013 $\pm$ 0,010	0,056 $\pm$ 0,006	0,001 $\pm$ 0,001	7,18	4	9,487	0,99

Gl – Graus de liberdade; DP – Desvio padrão; Coeficiente de correlação r⁸

Os valores de “p” mostrados na Tabela 10 mostram que os dados ajustados são significativamente semelhantes àqueles observados, confirmando o bom ajuste das curvas de dose-efeito tanto com o método MV quanto com o MMQ. Além disso, a obtenção de um coeficiente de correlação “r” próximo a 1 ($0,7 \leq r < 1$) – informação fornecida apenas pelo programa DOSE ESTIMATE – sugere uma correlação fortemente positiva entre os dados (DANCEY; REIDY, 2006).

Com relação à adequação do método matemático, os resultados demonstram que houve uma extensa similaridade entre os ajustamentos do MMQ e de MV para os dados em questão, de forma que qualquer um dos dois programas satisfaria sua finalidade. Entretanto, Ainsbury e Lloyd (2010) ressaltaram que, embora o MMQ seja o método mais utilizado no ajuste dos termos da curva dose-efeito, seu desempenho geralmente é inferior ao MV quanto à adequação dos dados, especialmente no ajuste de baixas doses, e por isso o atual sistema computacional do DOSE ESTIMATE será atualizado, substituindo o MMQ para o MV nas próximas versões do programa. Na Tabela 10 verifica-se que realmente há um maior desvio padrão associado ao coeficiente “ α ” gerado pelo programa DOSE ESTIMATE ($\pm 0,010$), do que aquele produzido pelo CABAS ($\pm 0,007$).

Considerando o parâmetro ‘acessibilidade’, apenas o programa CABAS está disponível gratuitamente, uma vez que a aquisição do software do DOSE ESTIMATE depende de contato prévio com a Health Protection Agency (HPA). Sobre as ferramentas disponíveis, o software DOSE ESTIMATE é um programa dotado de mais recursos que o CABAS para análise dos ensaios biodosimétricos (p.ex. construção de curvas de dose-efeito lineares, análise e correção da

⁸O coeficiente de correlação r ou coeficiente de Pearson é definido como a medida de associação linear entre variáveis pela qual duas variáveis se associam pelo compartilhamento da variância.

distribuição dos dados, cálculo do valor de “p” com base no teste T de Student e qui-quadrado), entretanto o CABAS possui a vantagem de possibilitar o armazenamento dos dados gerados (AINSBURY; BARQUINERO, 2009).

A escolha do programa de referência para determinação da curva dose-efeito fundamentou-se, portanto, na adequação dos métodos matemáticos, na acessibilidade e nas ferramentas de cada programa, tendo sido o CABAS considerado o mais adequado para o fim proposto (Tabela 11). É importante ressaltar que, em um âmbito mais geral, ambos os softwares têm sido extensivamente testados e validados, ao nível internacional, em diversos laboratórios de dosimetria citogenética na estimativa da dose absorvida, em situações reais ou suspeitas de exposições excessivas às RIs.

Tabela 11 – Síntese da análise comparativa dos programas CABAS e DOSE ESTIMATE

Parâmetros	CABAS	DOSE ESTIMATE
Método matemático	MV	MMQ
Ajuste dos coeficientes	Bom	Bom
Disponibilidade	Gratuito	Depende de autorização
Ferramentas do sistema	Programa mais simples	Programa mais robusto
Registro dos dados	Sim	Não

4.3.1 Curvas de calibração dose-efeito - intercomparações

Na Tabela 12, os termos α e β das curvas dose-efeito gerados pelos softwares CABAS e DOSE ESTIMATE foram comparados com os de outros trabalhos publicados também para radiações de baixo LET.

Tabela 12 – Comparação entre os coeficientes lineares e quadráticos de radiações de baixo LET

Pesquisas	Fonte de radiação	Energia média	Gy/min	$\alpha \pm DP$	$\beta \pm DP$
Lloyd et al.(1986)		-		$0,036 \pm 0,005$	$0,067 \pm 0,002$
Prasanna et al. (2002)	Raios-X (250 kVp)	0,08 MeV	1,0	$0,059 \pm 0,014$	$0,029 \pm 0,005$
Beinke et al. (2010)		0,24 MeV		$0,043 \pm 0,006$	$0,063 \pm 0,004$
Nesta pesquisa	Acelerador Linear	6,0 MeV	0,5	$0,013 \pm 0,007$	$0,056 \pm 0,005$
				$0,013 \pm 0,010$	$0,056 \pm 0,006$
Bauchinger et al. (1983)			0,5	$0,011 \pm 0,004$	$0,056 \pm 0,003$
Lloyd et al. (1986)			0,5	$0,014 \pm 0,004$	$0,076 \pm 0,003$
Edwards et al. (1997)	Fonte de ^{60}Co	1,25 MeV	-	$0,018 \pm 0,003$	$0,060 \pm 0,006$
Lindholm et al. (1998)			-	$0,013 \pm 0,004$	$0,054 \pm 0,003$
Prasanna et al. (2002)			1,0	$0,098 \pm 0,021$	$0,044 \pm 0,009$
Stricklin et al. (2005)	Fonte de ^{137}Cs	0,66 MeV	0,4	$0,013 \pm 0,007$	$0,065 \pm 0,003$

DP – Desvio padrão

Tendo em vista que as condições de irradiação do presente estudo (exposição aguda aos raios-X), seria de se esperar que os termos ajustados, em particular os coeficientes α e β , fossem similares àqueles cuja fonte emissora de radiação é de mesma natureza. Todavia, estes coeficientes foram equivalentes aos termos α e β das curvas geradas a partir de fontes emissoras de radiação gama, cuja irradiação foi realizada com idêntica taxa de dose (0,5 Gy/min). A discrepância observada advém principalmente dos diferentes níveis de energia das fontes emissoras e das diferentes taxas de dose (Gy/min) utilizadas.

Com relação ao nível energético, é importante notar que enquanto Lloyd e cols. (1986), Prasanna e cols. (2002) e Beinke e cols. (2010) irradiaram suas amostras com equipamentos que geram raios-X de 100 a 300 kVp (energia média $\leq 0,25$ MeV), neste trabalho foi utilizado um acelerador linear que produz raios-X de 4 a 25 MeV (energia média = 6 MeV). Tal ordem de grandeza se aproxima mais daquela produzida por fontes de cobalto-60, por isso a relação dose-efeito radioinduzida (i.e. DSBs e alterações cromossômicas instáveis) também foi mais próxima.

Além disso, no processo de irradiação das amostras para construção das curvas de calibração, foram utilizadas distintas taxas de dose (0,5 Gy/min *versus* 1,0 Gy/min). Para radiações de baixo LET, a redução da taxa de dose altera a conformação da curva de calibração em termos de dose-resposta, pois o intervalo de tempo entre as doses viabiliza o reparo das SSBs

radioinduzidas pelo sistema de reparo celular antes que novas SSBs sejam formadas. Como resultado, a dupla-fita de DNA sofre menos dissociação por quebras duplas (DSBs) e menos dicêntricos são formados, o que por sua vez se reflete nos valores de α e β (ROZGAJ et al., 2002).

Sabendo-se que tais peculiaridades podem interferir nas estimativas de dose, a IAEA (2011) recomenda que os laboratórios de dosimetria citogenética construam curvas de calibração, para os tipos de exposição às RIs mais comuns – radiação gama, raios-X (200-250 kVp) e nêutrons. Nesse âmbito, é importante ressaltar que as atuais fontes de cobalto-60 vêm sendo gradativamente substituídas por aceleradores lineares de elétrons. Logo, é de grande interesse que curvas de calibração dose-efeito sejam construídas para este tipo de exposição, no intuito de assegurar uma maior exatidão nas estimativas de dose. Segundo dados da literatura, mundialmente, estão em funcionamento 1,6 aceleradores de elétrons e 0,4 fontes de cobalto-60 para cada 1 milhão de pessoa. Em países desenvolvidos, esta diferença é ainda maior - 5,4 aceleradores/milhão de pessoa (ZUBIZARRETA et al., 2004; UNSCEAR, 2008).

4.4 Avaliação sobre a temperatura de armazenamento para diferentes tempos de estocagem

Na Tabela 13 são mostrados os dados referentes à influência de diferentes temperaturas de estocagem (4 e 25 °C) sobre o índice mitótico (IM) em amostras irradiadas com 2 Gy, após um período de 48 e 96 horas.

Tabela 13 – Índice mitótico de células linfocitárias irradiadas e armazenadas por 48 e 96 horas sob temperaturas de estocagem de 4 e 25 °C

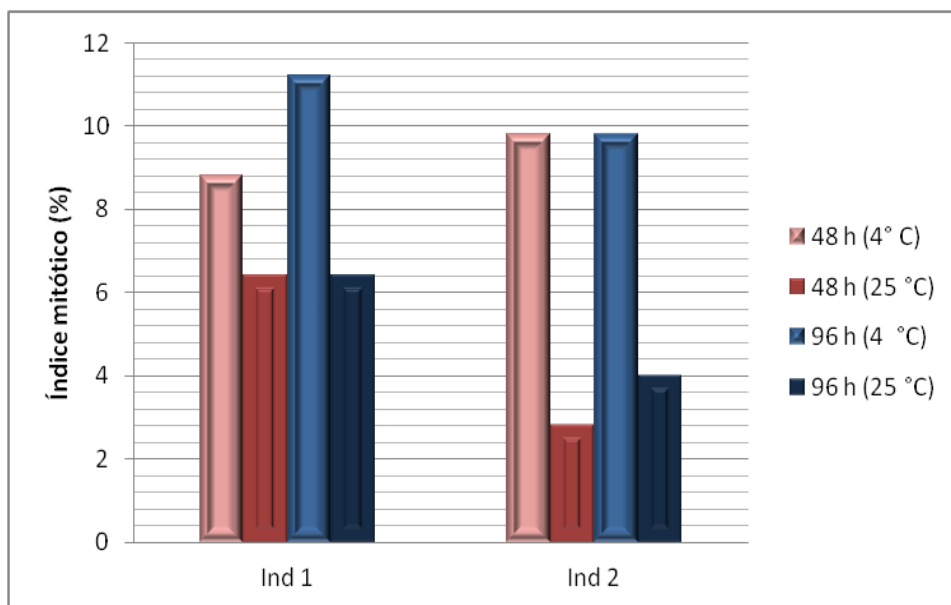
Identificação	Dose	Temperatura	Células	48 horas		96 horas	
				Metáfases	IM	Metáfases	IM
Indivíduo 1	2 Gy	4 °C	1000	44	8,8 %	56	11,2 %
		25 °C	1000	32	6,4 %	32	6,4 %
Indivíduo 2	2 Gy	4 °C	1000	49	9,8 %	49	9,8 %
		25 °C	1000	14	2,8 %	20	4 %

IM – Índice mitótico

Os maiores percentuais em termos de IM foram alcançados quando o acondicionamento das amostras, armazenadas por 48 e 96 horas, mantiveram-se a 4 °C (9,8 e 11,2 %,

respectivamente). Para as amostras mantidas a 25 °C, a flutuação do índice mitótico variou entre os indivíduos estudados (Figura 21).

Figura 21 – Análise comparativa do índice mitótico das amostras armazenadas a 4 e 25 °C e cultivadas por 48 e 96 horas



Tais resultados corroboram com aqueles descritos por Belloni e cols. (2008), em que a manutenção de amostras de sangue (não irradiadas) a baixas temperaturas não só elevou o IM, como também retardou o processo de apoptose celular e aumentou o percentual de células viáveis das amostras armazenadas por até uma semana. No trabalho de Belloni e cols. (2008), o sangue foi mantido em meio de cultivo enriquecido com e sem PHA. Nas culturas sem PHA, mantidas a 20 e 4 °C por um período de 96 horas, o IM foi de aproximadamente 4 e 13 % e o percentual de células apoptóticas de 34,5 e 20 %, respectivamente.

De fato, algumas pesquisas têm evidenciado que o controle da temperatura de estocagem em que as células linfocitárias são mantidas é fundamental para uma avaliação fidedigna dos efeitos genotóxicos gerados pelas RIs. De outro modo, poderá haver o comprometimento da viabilidade deste modelo biológico como consequência da aceleração do processo de apoptose, especialmente nos linfócitos que possuem dicêntricos (BELLONI et al., 2008; MORONI et al., 2008; BELLONI et al., 2010). A apoptose é um fenômeno que ocorre de forma fisiológica no

organismo para a manutenção da homeostase⁹ celular, mas que nesse caso foi desencadeado em virtude de danos celulares radioinduzidos (TAYLOR et al., 2008).

A perda da viabilidade celular é tida como a maior limitação dos ensaios biodosimétricos, devido ao desencadeamento do processo apoptótico. Com isso, as células portadoras de dicêntricos são preferencialmente eliminadas em relação às demais ACIs, resultando na subestimação da dose absorvida (VIRSIK-PEUCKERT; HARDER, 1986; BELLONI et al., 2008).

Em relação à variabilidade individual observada a 25 °C para os indivíduos 1 e 2, duas hipóteses são propostas:

- 1) A resposta apresentada pode ter origem nas características intrínsecas de cada indivíduo estudado. Esse fenômeno, conhecido como radiosensibilidade individual, depende de fatores biológicos relativos ao perfil genético de cada organismo, podendo contribuir para uma maior ou menor susceptibilidade aos efeitos danosos das RIs (SZUMIEL, 2008);
- 2) A variação interindividual pode ser reflexo da taxa de proliferação dos linfócitos em meio de cultivo celular. Alguns indivíduos possuem linfócitos que crescem rapidamente em cultura (“fast grower”), enquanto que para outros esse crescimento dá-se de forma mais lenta (“slow grower”). No primeiro caso, haverá um número maior de células em M2 e significativa perda de informação, associada a uma maior eliminação das células portadoras de ACIs (LLOYD; PURROTT, 1981).

Nas Tabelas 14 e 15 são apresentados os dados referentes à influência de diferentes temperaturas de estocagem (4 e 25 °C) na frequência das alterações cromossômicas instáveis, em amostras irradiadas com 2 Gy, após um período de 48 e 96 horas.

⁹ Homeostase: equilíbrio entre o número de células que formam o corpo humano.

Tabela 14 – Relação dose-efeito em células irradiadas, estocadas por 48 horas sob temperaturas de estocagem de 4 e 25 °C

Identificação	Dose	Temp.	Metáfases	Dic	An	CrA	Min	Frag	Dose estimada	LCS	LCI
Indivíduo 1	2 Gy	4 °C	200	24	0	4	0	29	1,34 Gy	1,67 Gy	1,05 Gy
		25 °C	200	31	1	2	0	22	1,55 Gy	1,87 Gy	1,25 Gy
Indivíduo 2	2 Gy	4 °C	200	23	0	1	0	16	1,32 Gy	1,64 Gy	1,02 Gy
		25 °C	200	31	0	5	0	22	1,55 Gy	1,87 Gy	1,25 Gy

LCS – Limite de confiança superior; LCI - Limite de confiança inferior

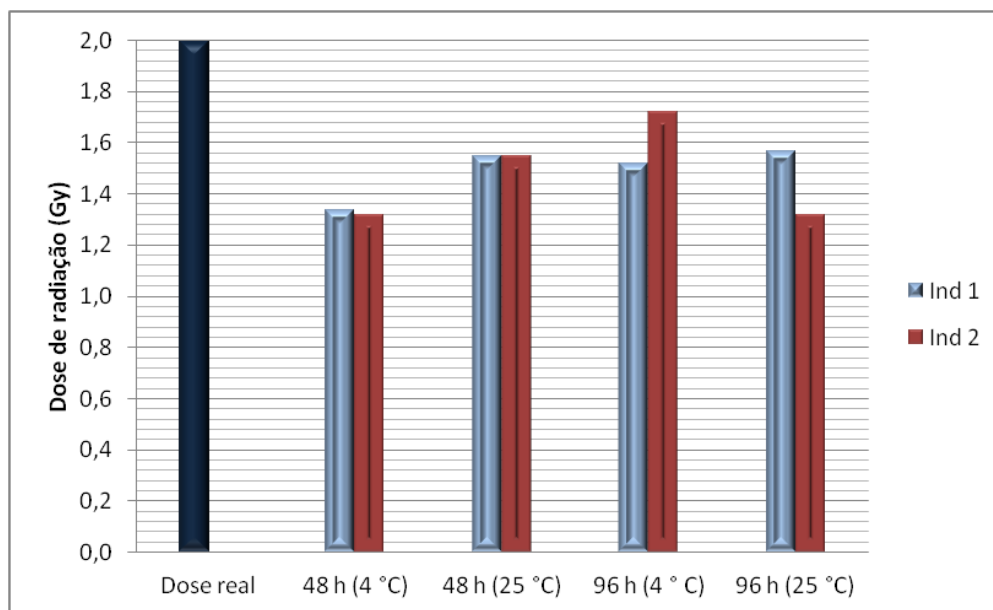
Tabela 15 – Relação dose-efeito em células irradiadas e armazenadas por 96 horas sob temperaturas de estocagem de 4 e 25 °C

Identificação	Dose	Temp.	Metáfases	Dic	An	CrA	Min	Frag	Dose estimada	LCS	LCI
Indivíduo 1	2 Gy	4 °C	200	30	0	1	1	27	1,52 Gy	1,84 Gy	1,23 Gy
		25 °C	200	32	0	3	0	24	1,57 Gy	1,89 Gy	1,28 Gy
Indivíduo 2	2 Gy	4 °C	200	38	0	2	1	15	1,72 Gy	2,04 Gy	1,43 Gy
		25 °C	200	23	0	3	1	17	1,32 Gy	1,64 Gy	1,02 Gy

LCS – Limite de confiança superior; LCI - Limite de confiança inferior

Para ambos os indivíduos estudados, praticamente não houve variação entre as doses estimadas a partir das amostras mantidas, por 48 horas, a temperaturas de 4 °C (1,32-1,34 Gy) e 25 °C (1,55 Gy). Em contrapartida, quando o tempo de estocagem foi prolongado para 96 horas, os resultados variaram entre si. Para o indivíduo 1, não houve diferença significativa entre os resultados das amostras armazenadas a 25 e 4 °C, sugerindo que a redução da temperatura não gerou perda de informação. Todavia, para o indivíduo 2 foi observada uma maior frequência de cromossomos dicêntricos nas amostras mantidas a 4 °C. Assim não houve uma uniformidade entre os dados obtidos para esse tempo de estocagem (Figura 22).

Figura 22 – Dose de radiação estimada das amostras mantidas a 4 e 25 °C e cultivadas por 48 e 96 horas



Sobre as condições de armazenamento, em sua maioria, os dados obtidos nesta etapa indicam que a manutenção do sangue periférico a temperatura ambiente (25 °C) gera uma frequência de dicêntricos mais próxima daquela esperada após exposição com dose de radiação de 2 Gy. Desse modo, sob essas condições, a dose estimada se aproxima mais da dose real de exposição, especialmente quando o período de armazenamento é de 48 horas.

De fato, algumas pesquisas têm verificado que o acondicionamento de sangue periférico a temperaturas próximas ou iguais a 37 °C está associado a uma maior frequência de ACIs, e que a redução da temperatura ambiente (10 a 0 °C) promove uma queda do número de alterações cromossômicas instáveis de até 50 % (BAJERSKA; LINIECKI, 1969; GUMRICH et al., 1986; VIRSIK-PEUCKERT; HARDER, 1986 apud BRZOZOWSKA et al., 2009). Porém, para outros trabalhos da literatura o armazenamento de amostras de sangue irradiadas a 25 °C, por um período de 24 e 48 horas, estaria associado a uma menor frequência de dicêntricos. A justificativa para esse fenômeno estaria na ação ineficiente do sistema de reparo celular em corrigir corretamente as DSBs radioinduzidas, a baixas temperaturas (MORONI et al., 2008; BELLONI et al., 2010).

A ativação e o desenvolvimento das principais vias de reparo das DSBs radioinduzidas – HRR e NHE – mostram uma forte dependência da temperatura do meio extracelular (MORONI

et al., 2008). Dessa forma, seria de se esperar que o acondicionamento de amostras de sangue a temperaturas mais próximas a do corpo humano provavelmente reflita mais fidedignamente as respostas que seriam naturalmente desencadeadas frente à ação de agentes mutagênicos, tais como as radiações ionizantes. Todavia, até o presente momento ainda não há uma definição clara sobre os mecanismos que induzem variações na formação e reparo das DSBs, frequência de ACIs, e que tornam a temperatura um “fator modificador da dose”.

Neste contexto, as hipóteses mais aceitas para justificar esse fenômeno foram propostas por Gumrich e cols. (1986), as quais serão apresentadas e discutidas a seguir:

- 1) A temperatura determinaria a eficiência com a qual lesões moleculares precursoras seriam convertidas em lesões mais estáveis (SSBs → DSBs), por meio de rearranjos modulados pela temperatura;
- 2) O efeito da temperatura inibiria o efeito indireto do oxigênio, ou seja, sua influência estaria atrelada a inibição da difusão do oxigênio até o núcleo da célula em decorrência de baixas temperaturas;
- 3) A temperatura de irradiação afetaria a atividade das enzimas de reparo de ação rápida que participam da conversão de lesões precursoras em lesões mais estáveis;
- 4) A cromatina sofreria uma alteração temperatura-dependente em sua conformação a 15 °C, conferindo um efeito radioprotetor contra os efeitos danosos da radiação e, com isso, diminuindo a frequência das lesões radioinduzidas.

Na hipótese 1, a conformação da cromatina a baixas temperaturas seria o componente determinante na produção de uma menor frequência de ACIs. Essa hipótese fundamenta-se na premissa de que a hipotermia poderia conferir um efeito radioprotetor à cromatina, protegendo-a dos danos provocados pela ação indireta das radiações ionizantes, similarmente ao que ocorre em regiões de heterocromatina¹⁰. Esses efeitos danosos seriam provocados pela ação indireta das RIs ao liberar radicais livres após a radiólise da água no meio intracelular (BRZOZOWSKA et al.,

¹⁰ Heterocromatina – Tipo de cromatina caracterizada por apresentar alto grau de condensação e compactação.

2009). Elmroth e cols. (2003) demonstraram que o efeito radioprotetor associado à condensação da cromatina a baixas temperaturas (2 °C) de fato existe e que este desaparece quando a irradiação é executada na presença de 0,5 M de DMSO (Dimetil sulfoxido) – agente capturador de radicais livres. A adição deste agente tornou equivalente a frequência de danos radioinduzidos e, portanto, ACIs a 37 °C e 2 °C, evidenciando a importância do efeito indireto da radiação na promoção de tais alterações cromossômicas.

Na hipótese 2, o efeito da temperatura inibiria o efeito indireto do oxigênio. A radiosensibilização causada pelo efeito do oxigênio (O₂) é geralmente atribuída à capacidade do O₂ de se ligar aos radicais formados pela ação indireta da radiação, resultando em subprodutos danosos que dificultam o reparo imediato do DNA (IAEA, 2010). Na pesquisa de Brzozowska e cols. (2009) é discutida a ação concomitante das duas hipóteses (1 e 2) na redução da frequência de micronúcleos em amostras mantidas a 0 °C.

Nas hipóteses 3 e 4, a temperatura teria influência tanto sobre a conversão de lesões (SSBs) em lesões mais complexas (DSBs), quanto sobre a atividade das enzimas de reparo de ação rápida. Embora Gumrich e cols. (1986) tenham apontado a hipótese 2 como sendo uma das mais promissoras, uma vez que o processo de conversão das SSBs em DSBs é tido como rápido e endotérmico, os próprios autores citaram em seu trabalho uma pesquisa na qual a formação de DSBs em células tumorais não foi afetada pela variação de temperatura. Sobre a atividade das enzimas de reparo a baixas temperaturas, na via de reparo NHEJ a principal enzima de ação rápida denominada DNA Ligase IV possui eficiência máxima a 4 °C (FERRETTI, 1981 apud MORONI et al., 2008).

Dentre as justificativas apresentadas e discutidas, as hipóteses 1 e 2 favorecem a observação de uma menor frequência de dicêntricos a 4 °C, similarmente aos resultados obtidos neste trabalho, enquanto que as hipóteses 3 e 4 favorecem um aumento na frequência de dicêntricos a 4 °C. Tendo em vista que ainda não há um consenso sobre a influência da temperatura na formação e reparo das DSBs e dicêntricos, é fundamental que novos experimentos sejam realizados no futuro para que esta interessante questão seja melhor esclarecida e fundamentada.

4.5 Aplicação dos parâmetros otimizados em profissionais sob suspeita de exposição individual excessiva às RIs

Na Tabela 16 estão sumarizados os dados citogenéticos dos quatro casos estudados. Em cada caso foram contabilizadas 1000 células de cada indivíduo, num total de 4.000 células ao todo. Para exposições agudas e de corpo inteiro, a contagem de 1000 células permite ao citogeneticista estimar a dose absorvida com um limite de detecção de 100 mSv a 5 Sv, com um nível de confiança de 95 % (AINSBURY; BARQUINERO, 2009).

Tabela 16 – Dados citogenéticos dos quatro casos investigados

Identificação	Dosímetro	Motivação	Céls.	Dic	Frag	Dose	LCS	LCI
Caso 1	Não	Suspeita de exposição acidental	1000	0	0	0	-	-
Caso 2	Não	Suspeita de exposição acidental	1000	0	2	0	-	-
Caso 3	Sim	Controle de qualidade	1000	0	2	0	-	-
Caso 4	Sim	Controle de qualidade	1000	4	6	145 mSv	307 mSv	15,7 mSv

Céls. – Células; Dic – dicêntricos; Frag - fragmento acêntrico; LCS e LCI – Limites de confiança superior e inferior

Os resultados apresentados na Tabela 16, com relação ao número de dicêntricos e fragmentos acêntricos (0-2), sugerem nos casos 1, 2 e 3 os profissionais não sofreram exposição aguda de corpo inteiro às RIs nos últimos três meses. A frequência basal de ACIs de um indivíduo não-exposto à radiação é de até 1 dicêntrico e 3 fragmentos em 1000 células (ROMM et al., 2009; ZAKERI; HIROBE, 2010).

Em contrapartida, a presença de 4 dicêntricos e 6 fragmentos nas células do indivíduo D foram um indicativo de que houve exposição recente a baixas doses de radiação. Considerando uma exposição de corpo inteiro, a dose média absorvida foi de 145 mSv. Esta dose pode variar de 15,7 a 307 mSv em virtude das incertezas estatísticas associados a este ensaio biodosimétrico. Tal nível de exposição ultrapassa em quase três vezes a dose máxima anual permitida para

trabalhadores da área nuclear, que é de 50 mSv (MS/PORTARIA/ /SVS Nº 453, 1998; CNEN-NN-3.01, 2005).

Esses resultados reforçam a importância da análise de ACIs em linfócitos do sangue periférico como método biológico de estimação da dose absorvida (BONASSI; AU, 2002). Diante da aplicabilidade desses bioindicadores no campo da dosimetria é imprescindível assegurar a uniformidade e otimização das técnicas e procedimentos aplicados nas várias etapas dos ensaios biodosimétricos, estejam eles relacionados ao cultivo e análise das amostras, ou ainda à construção de curvas de calibração.

Nesta etapa foram empregadas as otimizações concernentes ao protocolo para adição de Colcemid (0,05 µg/ml – 0h), para o cultivo das amostras de sangue periférico, e ao programa CABAS (Método de Máxima Verossimilhança), para o cálculo da dose absorvida em cada caso analisado.

5 CONCLUSÕES

1. O tratamento contínuo com 0,05 µg/ml de Colcemid a partir do início do cultivo celular gerou índices mitóticos mais elevados e estimativas de dose mais precisas nas amostras controle e irradiadas, sem prejuízo da qualidade das preparações cromossômicas;
2. Os métodos dos Mínimos Quadrados (MMQ) e de Máxima Verossimilhança (MV) possibilitaram um bom ajuste dos fatores da curva de calibração construída a partir da relação dose-efeito obtida experimentalmente *in vitro*, por isso a escolha do método matemático de referência fundamentou-se no desvio padrão associado aos coeficientes ajustados e à acessibilidade do programa CABAS (método MV);
3. Embora o acondicionamento a 25 °C tenha gerado índices mitóticos menores nas amostras irradiadas com 2 Gy, ele gerou uma maior aproximação entre a dose estimada e a dose de radiação utilizada na irradiação *in vitro*, indicando que essa temperatura de estocagem é a mais adequada para o armazenamento prolongado de amostras de sangue periférico;
4. Os parâmetros metodológicos otimizados em dosimetria citogenética – protocolo para adição de Colcemid e programa para cálculo da dose absorvida (CABAS – MV) - foram aplicados com sucesso na investigação da dose absorvida por profissionais ocupacionalmente expostos às radiações ionizantes.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, o emprego dos softwares CABAS e DOSE ESTIMATE para construção de curvas dose-efeito foi de suma importância dentro do cenário científico, no que diz respeito ao engajamento do LAMBDA dentro das recomendações da IAEA e da “*International Organization for Standardization*” (ISO). O documento mais recente da ISO sobre práticas relacionadas à biodosimetria (ISO 19238) preconiza que todo laboratório de dosimetria citogenética deve construir ao menos uma curva de calibração. Esta curva deve ser desenvolvida segundo os protocolos-padrões utilizados em todos os ensaios biodosimétricos voltados às estimativas de dose (IAEA, 2011).

A experiência adquirida irá contribuir para o fornecimento de uma resposta mais rápida em situações em que a dosimetria citogenética possa ser inserida, seja em casos ocorridos no país ou no mundo, visto que o LAMBDA foi convidado por membros da Organização Mundial de Saúde (OMS) a integrar uma rede global de laboratórios de dosimetria citogenética denominada de BioDoseNet.

Por outro lado, os quatro estudos de caso apresentados e discutidos demonstram que, na maior parte das exposições ocupacionais, o conhecimento isolado da dose registrada no dosímetro físico não é suficiente para validar uma possível exposição excessiva à radiação, e nem para determinar o risco real que esse tipo de incidente pode gerar a saúde do trabalhador (BALLARDIN et al., 2007). Em suma, foi possível evidenciar o papel da dosimetria citogenética em três aspectos principais:

- 1) No auxílio da equipe de Segurança Ocupacional com respeito à tomada de decisão pós-incidente, seja pelo remanejamento temporário do profissional de suas atividades ou por tranquilizá-los sob a ocorrência de uma possível exposição excessiva às RIs.

Exemplificando:

Nos casos 1 e 2 não foram encontrados cromossomos dicêntricos, o que reforçou a hipótese de que não houve de fato exposição aguda de corpo inteiro à radiação. Por outro lado, se os sintomas manifestados por estes profissionais estivessem associados

à fase prodrômica da SIA, a frequência de dicêntricos esperada seria de aproximadamente 6,64 para cada 100 células analisadas.

- 2) No controle de qualidade da dosimetria física.

Exemplificando:

No Caso 3 ficou comprovado que o profissional não havia sido exposto a altas doses de radiação.

- 3) Na inclusão da dosimetria citogenética como um dos exames a compor o Atestado de Saúde Ocupacional (ASO) de trabalhadores ocupacionalmente expostos às radiações ionizantes.

Exemplificando:

No Caso 4, a dose estimada (145 mSv) foi significativamente maior do que a dose registrada no dosímetro físico (20 mSv). Tal incidente ocorreu com um profissional que, apesar de haver sido contratado apenas a 6 meses na empresa, havia atuado a vários anos em outras empresas, exercendo semelhante função. De modo que não foi possível determinar se os dicêntricos encontrados foram produzidos em virtude das atividades desenvolvidas na empresa atual ou de atividades anteriores.

O ASO é um atestado emitido pelo médico do trabalho que define se o profissional está ou não apto a desenvolver suas atividades dentro da empresa. A certificação desse documento, na admissão ou demissão do trabalhador, depende da efetivação de alguns procedimentos, dentre os quais se destaca a realização de exames clínicos e avaliações médicas, solicitados em função dos riscos a que o trabalhador esteve, está ou estará exposto ao realizar suas atividades ocupacionais.

Segundo a Norma Regulamentadora 7 (NR 7) – Programa de Controle Médico e Saúde Ocupacional – das normas de Segurança e Medicina do Trabalho, na monitoração ocupacional dos riscos envolvendo exposição às radiações ionizantes é obrigatória a realização de hemograma completo e contagem de plaquetas na admissão do profissional, e periodicamente a cada 6 meses

(SEGURANÇA E MEDICINA DO TRABALHO, 2008). Contudo, alterações desses bioindicadores, além de não serem específicas de exposição às RIs, manifestam-se tão somente em decorrência de um incidente radiológico envolvendo elevadas doses de radiação (~1 e 2 Gy).

Acidentes dessa natureza, que envolvem exposição aguda de grande parte do corpo (> 50 %), são considerados raros e estão comumente associados a outros sinais clínicos, tais como febre, náuseas, vômitos e diarreia (WASELENKO et al., 2004). Adicionalmente, variações na contagem de plaquetas e hemograma são em sua maioria reversíveis, especialmente em casos de exposição crônica às RIs, o que inviabiliza a eficácia dessa metodologia em avaliações retrospectivas. Tais limitações são decisivas, sobretudo, em perícias médicas de atividades insalubres ou perigosas visto que o estabelecimento da relação causa-efeito, nessas circunstâncias, é muitas vezes complexa (AMARAL; MELO, 2010).

A dosimetria citogenética, diferentemente dos parâmetros biológicos citados anteriormente, possui indicadores biológicos específicos das radiações ionizantes e por isso é atualmente considerado o método de referência para estimar a dose absorvida por vários países da Europa e dos Estados Unidos. No Brasil, somente em 2005 com a NR 32, a dosimetria citogenética pôde ser incluída como um exame complementar na investigação de profissionais de saúde, em casos de suspeita ou ocorrência de exposição individual acidental às RIs (MT/PORTARIA/ /SST Nº 32.4.5; 32.4.6, 2005).

Embora o estabelecimento da NR 32 tenha revelado a preocupação e conscientização dos riscos inerente às RIs pelos órgãos de radioproteção responsáveis, ainda persistem algumas lacunas na legislação vigente. Dentre elas, alguns pontos merecem atenção especial:

- 1) Os demais profissionais do setor nuclear, sujeitos a exposição ocupacional às RIs, não foram legalmente contemplados nessa norma;
- 2) Há uma carência de informações quanto ao método biodosimétrico de referência, mais especificamente, o tipo de marcador biológico a ser utilizado em virtude das condições em que se processou a exposição (aguda ou crônica);
- 3) A indicação da dosimetria citogenética na avaliação do nível exposição ocupacional se restringe tão somente aos casos de exposição acidental, que contribuem em menor escala no âmbito das irradiações.

Ainda hoje esta norma é desconhecida por muitos profissionais da área nuclear, inclusive por profissionais de saúde, e sua consequência direta pode ser notada pela não prescrição da dosimetria citogenética, por médicos do trabalho, em diversos casos de suspeita de exposição acidental e ocupacional (LEMOS-PINTO; AMARAL, 2011).

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWALA, P.K.; ADHIKARI, J.S.; CHAUDHURY, N.K. Lymphocyte chromosomal aberration assay in radiation biodosimetry. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v.2, n.3, p. 197-201, 2010.

AINSBURY, E. A.; BARQUINERO, J. F. Biodosimetric tools for a fast triage of people accidentally exposed to ionizing radiation. Statistical and computacional aspects. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v. 45, n. 3, p. 307-312, 2009.

AINSBURY, E. A.; LLOYD, D. C. Dose estimation software for radiation dosimetry. **Health physics**, v. 98, n. 2, 2010.

ALEXANDER, G. A.; SWARTZ, H. M.; AMUNDSON, S. A.; BLAKELY, W. F.; BUDDEMEIER, B.; GALLEZ, B.; DAINIAK, N.; GOANS, R. E.; HAYES, R. B.; LOWRY, P. C.; NOSKA, M. A.; OKUNIEFF, P.; SALNER, A. L.; SCHAUER, D. A.; TROMPIER, F.; TURTELTAL, K. W.; VOISIN, P.; WILEY JR, A. L.; WILKINS, R. BiodosEPR-2006 Meeting: Acute dosimetry consensus committee recommendations on Biodosimetry applications in events involving uses of radiation by terrorists and radiation accidents. **Radiation Measurements**, v. 42, n. 6-7, p. 972-996, 2006.

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

AMARAL, A. Physical and biological dosimetry for risk perception in radioprotection. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 229-234, 2005.

AMARAL, A.; ITIÉ, C.; BOK, B. Dose absorbed by technologists in positron emission tomography procedures with FDG. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 129-134, 2007.

AMARAL, A.; FERNANDES, T. S.; CAVALCANTI, M. B. Bioindicators in radiation protection. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 91-96, 2008.

AMARAL, A.; MELO, B. **Tópicos de Biossegurança**. Pernambuco: Ed. Universitária, 2010.

BAJERSKA, A.; LINIECKI, J. The influence of temperature of irradiation in vitro on the yield of chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes, **International Journal of Radiation Biology**, v. 16, p.; 483-493, 1969.

BALLARDIN, M.; ANTONELLI, A.; CIPOLLINI, M.; FALLAHI, P.; SCARPATO, R.; TOMEI, A.; TRAINO, C.; BARALE, R. Induction of chromatid-type aberration in peripheral lymphocytes of hospital workers exposed to very low doses of radiation. **Mutation research**, v. 626, p. 61-68, 2007.

BANERJEE, A. C.; BHATTACHARYYA, B. Colcemid and colchicines binding to tubulin: similarity and dissimilarity. **FEBS Letters**, v. 99, n. 2, 1979.

BAUCHINGER M. Microdosimetric aspects of the induction of chromosome aberrations. **Radiation Induced Chromosome Damage in Man**. New York: Alan R. Liss, Inc., pp. 22, 1983.

BEINKE, C.; BRASELMANN, H.; MEINEKE, V. Establishment of an x-ray standard calibration curve by conventional dicentric analysis as prerequisite for accurate radiation dose assessment. **Health Physics**, v. 98, n. 2, p. 261-268, 2010.

BELLONI, P.; MESCHINI, R.; LEWINSKA, D.; PALITTI, F. Apoptosis preferentially eliminates irradiated G0 human lymphocytes bearing dicentrics chromosomes. **Radiation Research**, v. 169, p. 181-187, 2008.

BELLONI, P.; PEPE, G.; PALITTI, F. Effect of storage conditions of blood on radiation-induced chromosomal aberrations and apoptosis in human lymphocytes. **Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 695, 35-39, 2010.

BERGER, M. E.; CHRISTENSEN, D. M.; LOWRY, P. C.; JONES, O. W.; WILEY, A. L. Medical management of radiation injuries: Current approaches. **Occupational Medicine**, v. 56, p.162-172, 2006.

BOLUS, N. E. Basic review of radiation biology and terminology. **Journal of Nuclear Medicine Technology**, v. 29, n.2, 2001.

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

BONNER, W. M. Low-dose radiation: thresholds, bystander, effects, and adaptive responses. **National Academic Sciences**, v. 100, n.10, p. 4973-4975, 2003.

BRZOZOWSKA, K.; JOHANNES, C.; OBE, G.; HENTSCHEL, R.; MORAND, J.; MOSS, R.; WITTIG, A.; SAUERWEIN, W.; LINIECKI, J.; SZUMIEL, I.; WOJCIK, A. Effect of temperature during irradiation on the level of micronuclei in human peripheral blood lymphocytes exposed to X-rays and neutrons. **International Journal of Radiation Biology**, v. 85, n. 10, p. 891-899, 2009.

CARLONI, M.; MESCHINI, R.; OVIDI, L.; PALITTI, F. PHA-induced cell proliferation rescues human peripheral human blood lymphocytes from X-ray-induced apoptosis. **Mutagenesis**, v. 16, n. 2, p. 115-120, 2001.

CHAUHAN, V.; WILKINS, R. C. Report of the workshop on biological dosimetry: Increasing capacity for emergency response. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 142, n. 1, p. 2-7, 2010.

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR. Norma 3.01/05. **Diretrizes Básicas de Proteção Radiológica**. Diário Oficial da União. Brasília, 2005.

DAINIAK, N.; WASELENKO, J. K. ; ARMITAGE, J. O. ; MACVITTIE, T. J.; FARESE, A. M. The hematologist and radiation casualties. **Hematology**, p. 473-496, 2003.

DANCEY, C.; REIDY, J. **Estatística Sem Matemática para Psicologia: Usando SPSS para Windows**. Porto Alegre, Artmed, 2006.

DEPERAS, J.; SZLUINSKA, M.; DEPERAS-KAMINSKA, M.; EDWARDS, A.; LLOYD, D.; LINDHOLM, C.; ROMM, H.; ROY, L.; MOSS, R.; MORAND, J.; WOJCIK, A. CABAS: a freely available PC program for fitting calibration curves in chromosome aberration dosimetry. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 124, n. 2, p. 115-123, 2007.

EDWARDS, A.A., LLOYD, D.C., PURROT, R.J. Radiation induced 6744 chromosome aberrations and the Poisson distribution. **Radiation and Environmental Biophysics**, n. 16, p. 89-100, 1979.

EDWARDS, A. A. The use of chromosomal aberrations in human lymphocytes for biological dosimetry. **Radiation Research**, v. 148, p. S39-S44, 1997.

EDWARDS, A. A.; LINDHOLM, C.; DARROUDI, F.; STEPHAN, G.; ROMM, H.; BARQUINERO, J.; BARRIOS, L. Review of translocations detected by FISH for retrospective biological dosimetry applications. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 113, n. 4, p. 396-402, 2005.

ELMROTH, K.; NYGREN, J.; STENERLOW, B.; HULTBORN, R. Chromatin- and temperature-dependent modulation of radiation-induced double-strand breaks. **International Journal of Radiation Biology**, v. 79, p. 809-816, 2003.

FERETTI, L.; SGARAMELLA, V. Temperature dependence of the joining by T4 DNA ligase of termini produced by type II restriction endonucleases. **Nucleic Acids Research**, v. 9, p. 85-93, 1981.

FERNANDES, T.S. Emprego das aberrações cromossômicas instáveis e micronúcleos no Biomonitoramento individual: estudo Comparativo, 2005. Dissertação (**Mestrado em Tecnologias Energéticas Nucleares**) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Ademir de Jesus Amaral.

FERNANDES, T. S.; AMARAL, A.; CAVALCANTI, M. B.; BRAGA, L. R. P.; MELO, R. A. M. Unstable chromosome aberrations and micronuclei analyses in the biomonitoring of workers occupationally exposed to ionizing radiation. **International Journal of Low Radiation**, v. 3, n. 4, p. 299-309, 2006.

FERNANDES, T. S.; LLOYD, D.; AMARAL, A. A comparison of different cytological stains for biological dosimetry. **International Journal of Low Radiation**, v. 84, n. 8, p. 703-711, 2008a.

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

FERNANDES, T. S. Adequação da biodosimetria citogenética em caso de irradiação parcial e de corpo inteiro. 2009. Tese (**Doutorado em Tecnologias Energéticas e Nucleares**) - Universidade Federal de Pernambuco, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Ademir de Jesus Amaral.

FRINGER, J; GRINNELL, F. Fibroblast quiescence in floating collagen matrices. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 23, p. 20612–20617, 2003.

GARCIA-SAGREDO, J. M. Fifty years of cytogenetics: A parallel view of the evolution of cytogenetics and genotoxicology. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1779, p. 363-375, 2008.

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

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

HALL, E. J; GIACCIA, A. J. Radiobiology for the Radiologist. 6. ed. Philadelphia: Ed. **Lippincott Company**, 521 p., 2006.

HANDE, M. P.; AZIZOVA, T. V.; BURAK, L. E.; KHOKHRYAKOV, V. F.; GEARD, C. R.; BRENNER, D. J. Complex chromosome aberrations persist in individuals many years after occupational exposure to densely ionizing radiation: an mFISH study. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v. 44, p.1-9, 2005.

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

HENEGARIU, O.; HEEREMA, N. A.; WRIGHT, L. L.; BRAY-WARD, P.; WARD, D. C.; VANCE, G. H. Improvements in cytogenetic slide preparation: Controlled chromosome spreading, chemical aging and gradual denaturing. **Cytometry**, v. 43, p. 101-109, 2001.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY; WORLD HEALTH ORGANIZATION (IAEA). **Diagnosis and treatment of radiation injuries**. Vienna,v. 49, 1998 (Safety Reports Series: 2).

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY; WORLD HEALTH ORGANIZATION (IAEA) **How to recognize and initially respond to an accidental radiation injury**. Vienna, 2000.

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

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA). Radiation biology: A handbook for teachers and students. **Training course series**. Vienna, n. 42, 2010.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA). Cytogenetic dosimetry: Applications in preparedness for and response to radiation emergencies. **Scientific and Technical Publications**. Vienna, 2011.

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 RADIOLOGICAL PROTECTION (ICRP). Annals of the ICRP - **Recommendations of the International Commission on Radiological Protection**. ICRP, v.37, n. 2-4, p. 332, 2007.

JOKSIC, G.; PAJOVIC, S. B.; STANKOVIC, M.; PEJIC, S.; KASAPOVIC, J.; CUTTONE, G.; CALONGHI, N.; MASOTTI, L.; KANAZIR, D. Chromosome aberrations, micronuclei, and activity of superoxide dismutases in human lymphocytes after irradiation in vitro. **CMLS, Cellular Molecular Life Science**, v. 57, p. 842-850, 2000.

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

KANDA, R. Improvement of accuracy of chromosome aberration analysis for biological radiation dosimetry. **Journal of Radiation Research**, v. 41, n. 1-8, 2000.

KAWATA, T.; ITO, H.; GEORGE, K.; WU, H.; CUCINOTTA, F. A. Chromosome aberrations induced by high-LET radiations. **Biological Science in Space**, v. 18, n. 4, p. 216-223, 2004.

KOENIG, K. L.; GOANS, R. E.; HATCHETT, R. J.; METTLER JR, F. A.; SCHUMACHER, T. A.; NOJI, E. K.; JARRET, D. G. Medical treatment of radiological casualties: Current concepts. **Annals of Emergency Medicine**, v. 45, n. 6, p. 643- 652, 2005.

KANAAR, R.; HOEIJMAKERS, J. H. J.; VAN GENT, D. C. Molecular mechanisms of DNA double-strand break repair. **Trends in Cell Biology**, v. 8, p. 483-489, 1998.

LEMOS-PINTO, M. M. P.; SANTOS, N. F. G.; AMARAL, A. Current status of biodosimetry based on cytogenetic methods. **Radiation and Environmental Biophysics**, v. 49, p. 567-581, 2010.

LEMOS-PINTO, M. M. P.; AMARAL, A. Análise citogenética de incidentes radiológicos. **Newslab**, v. 105, p. 76-86, 2011.

LÉONARD, A.; RUEFF, J.; GERBER, G. B.; LÉONARD, E. D. Usefulness and limits of biological dosimetry based on cytogenetic methods. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 115, n.1-4, p. 448-454, 2005.

LINDHOLM, C.; LUOMAHARA, S.; KOIVISTOINEN, A.; et al. Comparison of dose-response curves for chromosomal aberrations established by chromosome painting and conventional analysis. **International Journal of Radiation Biology**, v. 75, n. 1, p. 27-34, 1998.

LINET M.S.; KIM K.P.; MILLER D.L.; KLEINERMAN R.A.; SIMON S.L.; GONZALEZ A.B. Historical review of occupational exposures and cancer risks in medical radiation workers. **Radiation Research**, v. 174, p. 793-808, 2010.

LLOYD, D.; PURROTT, R. J. Chromosome aberration analysis in radiological protection dosimetry. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 1, n. 1, 1981.

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

LLOYD, D. C. New developments in chromosomal analysis for biological dosimetry. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 77, p. 33-36, 1998.

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

LLOYD, D. C. Cytogenetics studies of populations exposed to Chernobyl fallout. **International Congress Series**, v. 1276, p. 33-36, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) MS/SVS-453. **Diretrizes de Proteção Radiológica em Radiodiagnóstico Médico e Odontológico**. Diário Oficial da União. Brasília: 02 de junho de 1998.

MINISTÉRIO DO TRABALHO E EMPREGO. Portaria GM nº 485. Norma Regulamentadora Nº 32. **Segurança e Saúde no Trabalho em Estabelecimentos de Saúde**. Diário Oficial da União. Brasília: 11 de novembro de 2005.

MONTORO; ALMONACID, M.; VILLAESCUSA, J. I.; VERDU, G. Unexplained overexposures on physical dosimetry reported by biological dosimetry. 31st Annual International Conference of the IEEE EMBS, Minnesota, USA, p. 2-6, 2009.

MOQUET, J. E.; EDWARDS, A. A.; LLOYD, D. C.; HONE, P. The use of FISH chromosome painting for assessment of old doses of ionizing radiation. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 88, n. 1, p. 27-33, 2000.

MORONI, M. M.; KRASNOPOLSKY, K.; SUBRAMANIAN, U.; MARTIN, P. R.; DOHERTY, K. M.; PRASANNA, P. G. S. Does cell culture type and blood transport temperature affect dicentric yield and radiation dose assessment. **Journal of Medical Chemical, Biological and Radiological Defense**, v. 6, 2008.

MÜLLER, I.; GEINITZ, H.; BRASELMANN, H.; BAUMGARTNER, A.; FASAN, A.; THAMM, R.; MOLLS, M.; MEINEKE, V.; ZITZELSBERGER, H. Time-course of radiation-induced chromosomal aberrations in tumor patients after radiotherapy. **International Journal of Radiation Oncology**, v. 63, n. 4, p. 1214-1220, 2005.

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

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

NORMAN, A.; SASAKI, M. S. Chromosome-exchange aberrations in human lymphocytes, **International Journal of Radiation Biology**, v. 66, p. 321–328, 1966.

NORPPA, H.; BONASSI, S.; HANSTEEN, I.-L.; HAGMAR, L.; STRÖMBERG, U.; RÖSSNER, P.; BOFFETTA, P.; LINDHOLM, C.; GUNDY, S.; LAZUTKA, J.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; FABIÁNOVÁ, E.; SRÁM, R. J.; KNUDSEN, L. E.; BARALE, R.; FUCIC, A. Chromosomal aberrations and SCEs as biomarker of cancer risk. **Mutation Research**, v. 600, p. 37-45, 2006.

NOUAILHETAS, Y. **Radiações ionizantes e a vida**. Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), pp. 42, 2008. www.cnen.gov.br.

OBE, G.; PFEIFFER, P.; SAVAGE, J. R. K.; JOHANNES, C.; GOEDECKE, W.; JEPPESEN, P.; NATARAJAN, A. T.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, W.; FOLLE, G. A.; DRETS, M. E. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. **Mutation Research**, v. 504, p. 17-36, 2002.

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.

POUGET, J.-P.; MATHER, S. J. General aspects of the cellular response to low- and high-LET radiation. **European Journal of Nuclear Medicine**, v. 28, n. 4, 2001.

PRASANNA, P. G. S.; LOATS, H.; GERSTENBERG, H. M.; TORRES, B. N.; SHEHATA, C. W.; DUFFY, K. L.; FLOURA, R. S.; KHUSEN, A. W.; JACKSON, W. E.; BLAKELY, W. F. AFRRI's gamma-ray, X-ray, and Fission-neutron calibration curves for the lymphocyte dicentric assay: Application of a metaphase finder system. **Armed Forces Radiobiology Research Institute**, pp. 17, 2002.

PRISE, K. M.; PINTO, M.; NEWMAN, H. C.; MICHAEL, B. D. A review of studies of ionizing radiation-induced double-strand break clustering. **Radiation Research**, v. 156, p. 572-576, 2001.

REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ETAPAS DO CICLO CELULAR MITÓTICO. EM DESTAQUE ESTÃO AS PRINCIPAIS VIAS DE FORMAÇÃO DAS ACIS. Disponível em www.dartmouth.edu

RODRÍGUEZ, P.; MONTORO, A.; BARQUINERO, J. F.; CABALLÍN, M. R.; VILLAESCUSA, I.; BARRIOS, L. Analysis of translocations in stable cells and their implications in retrospective biological dosimetry. **Radiation Research**, v. 162, n. 31-38, 2004.

ROMM, H.; OESTREICHER, U.; KULKA, U. Cytogenetic damage analysed by the dicentric assay. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v. 45, n. 3, p. 251-259, 2009.

ROZGAJ, R.; KASUBA, V.; SIMIC, D. The frequency of dicentrics and acentrics and the incidence of rogue cells in radiation workers. **Mutagenesis**, v. 12, n. 2, p. 135-139, 2002.

ROY, L.; SOROKINE-DURM, I.; VOISIN, P. Comparison between fluorescence in situ cytogenetics for dicentric scoring: a first-step validation for the use of FISH in biological dosimetry. **International Journal of Radiation Biology**, v. 70, n. 6, p. 665-669, 1996.

ROY, L.; GRÉGOIRE, E.; GRUEL, G.; ROCH-LEFEVRE, S.; VOISIN, PA.; BUSSET, A.; MARTIN, C.; VOISIN, PH. Effect of lymphocytes culture variations on the mitotic index and on the dicentric yield Following gamma radiation exposure. **Radiation Protection Dosimetry**, p. 1-9, 2012.

SACHS, R. K.; HLATKY, L. R.; TRASK, B. J. Radiation-produced chromosome aberrations: colourful clues. **Trends in Genetics**, v. 16, n. 4, p. 143-146, 2000.

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

SAVAGE, J.R.K. Sites of radiation induced chromosome exchanges. **Current Topics on Radiation Research**, v. 6, p. 129-194, 1970.

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

SEGURANÇA E MEDICINA DO TRABALHO – Normas Regulamentadoras. PP. 798, Ed. Atlas, 2008.

SEMELHANÇA ENTRE A ESTRUTURA MOLECULAR DO COLCEMID E DA COLCHICINA. EM VERMELHO ESTÁ EVIDENCIADO O RADICAL (R) QUE É PARTICULAR DE CADA MOLÉCULA. Disponível em: [www. fx.damasgate.com](http://www.fx.damasgate.com)

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

SOROKINE-DURM, I.; DURAND, V.; DELBOS, M.; LE BARON, L.; ROY, L.; VOISIN, P. A french view on FISH painting as a biodosimeter. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 88, n.1, p. 35-44, 2000.

STANKEOVÁ, S.; CROMPTON, N. E.; BLATTMANN, H.; THEILER, P.; EMERY, G. C.; ROOS, M.; KASER-HOTZ, B. Apoptotic response of irradiated T-lymphocytes. **Strahlentherapie und Onkologie**, v. 11, p. 779-786, 2003.

STREFFER, C. The ICRP 2007 recommendations. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 127, n. 1 – 4, p. 2–7, 2007.

STRICKLIN, D.; ARVIDSSON, E.; ULVSAND, T. Establishment of Biodosimetry at FOI: Dicentric assay protocol development and ¹³⁷Cs dose response curve. **Swedish Defence Research – Scientific report**, pp. 26, 2005.

STRICKLIN, D.; JAWORSKA, A.; ARVIDSSON, E. Method for efficient establishment of technical Biodosimetry competence. **Radiation Measurements**, v. 42, p. 1114–1118, 2007.

SZUMIEL, I. Intrinsic radiation sensitivity: cellular signaling is the key. **Radiation Research**, v. 169, p. 249 – 258, 2008.

TAUHATA, L.; SALATI, I. P. A.; DI PRINZIO, R.; DI PRINZIO, A. R. Radioproteção e Dosimetria: Fundamentos. **IRD/CNEN**, 5^aed, pp. 242, 2003.

TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, p. 231 – 241, 2008.

TUCKER, J. D. Low-dose ionizing radiation and chromosome translocations: a review of the major considerations for human biological dosimetry. **Mutation Research**, v. 659, p. 211-220, 2008.

UNITED NATIONS SCIENTIFIC COMMITTEE ON THE EFFECTS OF ATOMIC RADIATION. **Sources, effects and risks of ionizing radiation**. New York, 2008.

VINNIKOV V.A.; AINSBURY E.A.; MAZNYK N.A.; LLOYD, D.C.; ROTHKAMM K. Limitations associated with analysis of cytogenetic data for biological dosimetry. **Radiation Research**, v. 174, n.1-10, 2010.

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

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.

VOISIN, P.; ROY, L.; HONE, P. A.; EDWARDS, A. A. ; LLOYD, D.; STEPHAN, G.; ROMM, H.; GROER, P. G.; BRAME, R. Criticality accidental dosimetry by chromosomal analysis. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 110, n. 1-4, p. 443-447, 2004.

WASELENKO, J. K.; MACVITTIE, T. J.; BLAKELY, W. F.; PESIK, N.; WILEY, A. L.; DICKERSON, W. E.; TSU, H.; CONFER, D. L.; COLEMAN, C. N.; SEED, T.; LOWRY, P.; ARMITAGE, J. O.; DAINIAK, N. Medical management of the Acute Radiation Syndrome: Recommendations of the strategic national Stockpile radiation working group. **Annals of Internal Medicine**, v.140, n. 12, p. 1037-1051, 2004.

WHITEHOUSE, C. A.; EDWARDS, A. A.; TAWN, E. J.; STEPHAN, G.; OESTREICHER, U.; MOQUET, J. E.; LLOYD, D. C.; ROY, L.; VOISIN, P.; LINDHOLM, C.; BARQUINERO, J.; BARRIOS, L.; CABALLIN, M. R.; DARROUDI, F.; FOMINA, J. Translocation yields in peripheral blood lymphocytes from control populations. **International Journal of Radiation Biology**, v. 81, n. 2, p. 139-145, 2005.

WILKINS, R. C.; ROMM, H.; KAO, T.-C.; AWA, A. A.; YOSHIDA, M. A.; LIVINGSTON, G. K.; JENKINS, M. S.; OESTREICHER, U.; PELLMAR, T. C.; PRASANNA, P. G. S. Interlaboratory comparison of the dicentric chromosome assay for radiation biodosimetry in mass casualty events. **Radiation Research**, v. 169, p. 551–560, 2008.

YOKOYA, A.; SHIKAZONO, N.; FUJII, K.; URUSHIBARA, A.; AKAMATSU, K.; WATANABE, R. DNA damage induced by the direct effect of radiation. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 77, p. 1280-1285, 2008.

YUSUF, I; FRUMAN, D. A. Regulation of quiescence in lymphocytes. **Trends in Immunology**, v. 24, n. 7, p. 380–386, 2003.

ZAKERI F.; HIROBE T. A cytogenetic approach to the effects of low levels of ionizing radiations on occupationally exposed individuals. **European Journal of Radiology**, v. 73, p. 191-195, 2010.

ZUBIZARRETA, E. H.; POITEVIN, A.; LEVIN, C. V. Overview of radiotherapy resources in Latin America: a survey by the International Atomic Energy Agency (IAEA). **Radiotherapy and Oncology**, v. 73, p. 97-100, 2004.

APÊNDICE A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N.º 079/2009-CEP/CCS

Recife, 02 de abril de 2009.

Registro do SISNEP FR - 244867

CAAE - 0030.0.172.000-09

Registro CEP/CCS/UFPE N.º 031/09

Título: "Estabelecimento de protocolo de análise para dosimetria citogenética de profissionais ocupacionalmente expostos às radiações ionizantes".

Pesquisador Responsável: Ademir de Jesus Amaral

Senhora Pesquisadora:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco CEP/CCS/UFPE registrou e analisou, de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, aprovando-o e liberando-o para início da coleta de dados em 01 de abril de 2009 com a seguinte recomendação: **especificar a quantidade de sangue a ser retirada no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.**

Ressaltamos que o pesquisador responsável deverá apresentar relatório anual da pesquisa.

Atenciosamente,

Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/CCS / UFPE

Ao
Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral
Dep. de Energia Nuclear – CTG/UFPE

APÊNDICE B – TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, abaixo-assinado, dou meu consentimento livre e esclarecido para realização da dosimetria citogenética, sob responsabilidade do Laboratório de Modelagem e Biodosimetria Aplicada – LAMBDA, vinculado ao Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco.

Assinando este Termo de Consentimento, estou ciente que:

1. Obtive todas as informações necessárias para poder decidir conscientemente sobre a realização do exame.
2. As amostras que serão coletadas, enviadas e analisadas pertencem a mim e que as mesmas consistem apenas de sangue periférico.
3. Havendo necessidade em se repetir o exame, irei disponibilizar mais amostras.
4. Todas as medidas serão tomadas para assegurar a confidencialidade e a privacidade de meus dados pessoais.

Local e Data

Assinatura

Identidade e Órgão expedidor

Assinatura da Testemunha (I)

Identidade e Órgão expedidor

APÊNDICE C– QUESTIONÁRIO



QUESTIONÁRIO

IDENTIFICAÇÃO

- Nome completo: _____
- Sexo: ☐ Feminino ☐ Masculino
- Telefones de contato: (____) _____ Celular: (____) _____
- Data de Nascimento: ____/____/____
- E-mail: _____

INFORMAÇÕES IMPORTANTES

- Fumante?
 - ☐ NÃO
 - ☐ SIM; Há quanto tempo? _____ Quantos cigarros por dia? _____
 - ☐ Ex-fumante; Há quanto tempo deixou? _____
- Faz uso de medicamentos regularmente?
 - ☐ NÃO
 - ☐ SIM; Quais? _____ Dose: _____ Duração: _____
- Teve contato com Agrotóxicos e/ou veneno?
 - ☐ NÃO
 - ☐ NÃO SEI
 - ☐ SIM; Quais? _____ Há quanto tempo? _____
- Precisou realizar Quimioterapia?
 - ☐ NÃO
 - ☐ SIM; Quando? _____
- Precisou realizar Radioterapia e/ou exame de Medicina nuclear?
 - ☐ NÃO
 - ☐ SIM; Qual? _____ Quando? _____ Parte do corpo: _____

- Preciso realizar algum exame com Raios - x?
☐ NÃO
☐ SIM; Qual?_____Quando?_____Parte do corpo:_____
- Preciso realizar exame com Tomografia computadorizada?
☐ NÃO
☐ SIM; Qual?_____Quando?_____Parte do corpo:_____
- Preciso realizar Transfusão sanguínea?
☐ NÃO
☐ SIM; Quando?_____
- Trabalha exposto à radiação ionizante
☐ NÃO
☐ SIM; Em que situação?_____
- Consumo recente de álcool nas últimas 48 horas?
☐ NÃO
☐ SIM

OBSERVAÇÕES

APÊNDICE E – PRODUÇÃO CIENTÍFICA

➤ Resumos publicados em anais de congresso nacionais

- 1) XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental FeSBE, Águas de Lindóia - São Paulo, de 19 a 22 de agosto de 2009.
 - a. **LEMOS-PINTO, M.M.P.**; Fernandes, T.S.; Amaral, A. Influence of different temperatures on preparation of slides for Cytogenetic dosimetry.
- 2) VII Congresso da Sociedade Brasileira de Biociências Nucleares, SBBN, Recife - PE, 27 a 30 de outubro de 2010
 - a. **LEMOS-PINTO, M.M.P.** ; LIMA, S.C. ; FELICIANO DE SOUZA, T ; FERNANDES, T. S. E. ; AMARAL, A. Cytogenetic dosimetry: an outstanding methodology for radioprotection management. 2010.
 - b. LIMA, S.C.; FERNANDES, T.S.E.; **LEMOS -PINTO, M.M.P.**; FELICIANO DE SOUZA, T ; AMARAL, A. Uso do bandejamento C para aumento de especificidade da análise de micronúcleos em Biodosimetria. 2010.
 - c. DA MATTA, M.C.; **LEMOS-PINTO, M.M.P.**; AMARAL, A. Métodos numéricos na construção de curvas de calibração em laboratórios de Dosimetria citogenética. 2010.

➤ Artigos completos publicados em periódicos

- 3) **LEMOS-PINTO, M.M.P.**; AMARAL, A. Análise citogenética na investigação de incidentes radiológicos. Newslab, v. 105, p. 76-86, 2011.
- 4) **LEMOS-PINTO, M.M.P.**; Santos, N.; Amaral, A. Current status of biodosimetry based on standard cytogenetic methods. Radiation and Environmental Biophysics, v. 49, p. 567-581, 2010.

Current status of biodosimetry based on standard cytogenetic methods

Marcela Maria Pereira de Lemos Pinto ·
 Neyliane Frassinetti Gonçalves Santos ·
 Ademir Amaral

Received: 12 November 2009 / Accepted: 19 June 2010 / Published online: 9 July 2010
 © Springer-Verlag 2010

Abstract Knowledge about dose levels in radiation protection is an important step for risk assessment. However, in most cases of real or suspected accidental exposures to ionizing radiation (IR), physical dosimetry cannot be performed for retrospective estimates. In such situations, biological dosimetry has been proposed as an alternative for investigation. Briefly, biodosimetry can be defined as individual dose evaluation based on biological endpoints induced by IR (so-called biomarkers). The relationship between biological endpoints and absorbed dose is not always straightforward: nausea, vomiting and diarrhoea, for example, are the most well-known biological effects of individual irradiation, but a precise correlation between those symptoms and absorbed dose is hardly achieved. The scoring of unstable chromosomal-type aberrations (such as dicentric and rings) and micronuclei in mitogen-stimulated peripheral blood, up till today, has been the most extensively biodosimetry assay employed for such purposes. Dicentric assay is the gold standard in biodosimetry, since its presence is generally considered to be specific to radiation exposure; scoring of micronuclei (a kind of by-product of chromosomal damages) is easier and faster than that of dicentric for dose assessment. In this context, the aim of this work is to present an overview on biodosimetry based on standard cytogenetic methods, highlighting its advantages and limitations as tool in monitoring of radiation workers' doses or investigation into accidental exposures. Recent advances and perspectives are also briefly presented.

Introduction

Since its discovery, ionizing radiation (IR) has provided great benefit to mankind through its applications in agriculture, industry, medicine and research. The continuous improvement in radiation protection (radioprotection), the science in charge of protecting people (radiation workers and the general public), is based on knowledge about the interactions of IR with living tissues (UNSCEAR 2000).

The importance of radioprotection programmes has grown due to increasing of IR application and to the public interest on potential risks associated with the usage of radiation sources. Still today, radioprotection management is based on evaluation of specific dosimetric quantities. Among them, absorbed dose, defined as the amount of energy delivered by IR to matter per unit of mass, is the fundamental physical quantity to evaluate potential biological response resulting from exposure to radiation. In the international system of units, the unit of absorbed dose is J kg^{-1} , and its specific name is Gray (ICRP 1991).

To regulate the exposure of workers and the public at large, two derived dose quantities are suggested by the International Commission on Radiological Protection (ICRP): equivalent and effective doses, both expressed in Sievert (Sv) to distinguish them from absorbed dose in Gray (Gy) (ICRP 1991). The effective dose takes into account radiosensitivity of organs and tissues of the human body (Streffer 2007) and was introduced to represent the long-term risk of harm from radiation exposure, in particular radiation-induced cancer (ICRP 1991; Amaral 2005).

Usually, physical dosimeters (film badges, thermoluminescent crystals and semiconductors) have been used for monitoring of personnel absorbed dose in all facilities that use regulated radiation sources, in order to maintain the exposure as low as reasonably achievable (ALARA

M. M. P. de Lemos Pinto (✉) · N. F. G. Santos · A. Amaral
 Grupo de Estudos em Radioproteção e Radioecologia (GERAR),
 Departamento de Energia Nuclear, Universidade Federal de
 Pernambuco, Avenida Professor Luiz Freire, 1000, Cidade
 Universitária, Recife, Pernambuco, PE 50740-540, Brazil
 e-mail: marcelazoo@yahoo.com.br

principle), following the recommendations of the major organizations of radioprotection, ICRP and International Atomic Energy Agency (IAEA).

Nevertheless, in the majority of incidents involving radiation exposure, the affected individual does not wear such dosimeters. In these situations, physical dosimetry is not an easy task. For example, in case of emergency responses to a large-scale accident, medical treatment of most seriously affected persons might be delayed or even prejudiced due to lack of sound dosimetric data (Lloyd 2005). In an attempt to overcome this drawback, alternative methods for dose assessment using biological endpoints (or biomarkers) have been purposed. Dosimetric evaluations based on biomarkers studies are referred to as biodosimetry (Prasanna et al. 2005).

This paper presents an overview on biodosimetry, pointing out advantages and limitations, based on standard cytogenetic methods, as important tool either in monitoring of radiation workers' doses or in the investigation into accidental exposures. Recent advances and perspectives are briefly presented as well.

Clinical signals and haematological alterations

The first method employed to correlate human biological parameters with absorbed dose was based on the observation of intensity, frequency and duration of some symptoms displayed after radiation overexposure (IAEA and WHO 2000). Those symptoms characterize the so-called prodromal phase

of the acute radiation syndrome (ARS), which involve hematopoietic, gastrointestinal and neurovascular systems. Table 1 summarizes clinical symptoms with absorbed dose levels. From this table, health disturbances of ARS only appear after whole-body acute exposures greater than 1 Gy. Screening and more accurate classification of irradiated population with doses above 2 Gy are carried out by haematological counts of lymphocytes, polymorphonuclear leucocyte and platelets levels. These data are supported by a well-known relationship between a large exposure levels and ARS's hematopoietic disturbances, by which the production of one or more blood components is stopped or intensely reduced (so-called cytopenia) (Waselenko et al. 2004).

Lymphopenia occurs before the manifestation of other cytopenias (granulocytopenia and thrombocytopenia) within the first 6–24 h after a moderate- to high-dose exposure (Dainiak et al. 2003). Based on the level of lymphocyte count, the degrees of ARS have been described as shown in Table 2. This rapid and common laboratory test enables a rapid screening of injured victims in case of radiological emergency (Stepanova et al. 2008).

The application of those clinical and laboratory assays is limited principally by two reasons: First, severity of these manifestations also depends on dose rate, radiosensitivity of tissues involved, body area exposed and damage level suffered by organic systems. Other factors are adverse environmental conditions and pathologic agents (virus and bacterium), which can enhance ARS-related disturbs or promote health alterations similar to those induced by ionizing radiations (Dainiak et al. 2003); Second, the

Table 1 Early symptoms of the acute radiation syndrome (extracted from Table VIII—Prodromal phase of acute radiation syndrome (IAEA and WHO 1998); WBE: Whole-body exposure)

Symptoms	ARS degree and approximate dose of acute WBE (Gy)				
	Mild (1–2 Gy)	Moderate (2–4 Gy)	Severe (4–6 Gy)	Very severe (6–8 Gy)	Lethal (>8 Gy)
Vomiting	Present	Present	Present	Present	Present
Onset	~2 h	1–2 h	Earlier than 1 h	Earlier than 30 min	Earlier than 10 min
Incidence	10–50%	70–90%	100%	100%	100%
Diarrhoea	–	–	Mild	Heavy	Heavy
Onset	None	None	3–8 h	1–3 h	Within minutes or 1 h
Incidence	–	–	<10%	>10%	~100%
Headache	Slight	Mild	Moderate	Severe	Severe
Onset	–	–	4–24 h	3–4 h	1–2 h
Incidence	–	–	50%	80%	80–90%
Consciousness	Unaffected	Unaffected	Unaffected	May be altered	Unconsciousness
Onset	–	–	–	–	Seconds/minutes
Incidence	–	–	–	–	100% (at >50 Gy)
Body temperature	Normal	Increased	Fever	High fever	High fever
Onset	–	1–3 h	1–2 h	<1 h	<1 h
Incidence	–	10–80%	80–100%	100%	100%

Table 2 Relationship between absolute lymphocyte count and absorbed dose after 6 days since first exposure (IAEA and WHO 1998)

Degrees of ARS	Dose (Gy)	Lymphocyte count (per L)
Pre-clinical phase	0.1–1.0	$1.5\text{--}2.5 \times 10^9$
Mild	1.0–2.0	$0.7\text{--}1.5 \times 10^9$
Moderate	2.0–4.0	$0.5\text{--}0.8 \times 10^9$
Severe	4.0–6.0	$0.3\text{--}0.5 \times 10^9$
Very severe	6.0–8.0	$0.1\text{--}0.3 \times 10^9$
Lethal	>8.0	$0.0\text{--}0.05 \times 10^9$

minimum radiation dose for observation of such events (~ 1 Gy) is many times higher than that usually involved in occupational exposures. Indeed, nuclear workers are generally under low-level radiation at low-dose rate (<20 mSv per year) that is considered an acceptable level of radiation exposure (Prise et al. 2001; Koenig et al. 2005). Thus, dose estimation by clinical and laboratory assays is not precise, but they can be used for initial screening of exposed individuals and fast deciding upon proper medical care in radiological accidents involving tens or hundreds of individuals (Berger et al. 2006). For a more precise evaluation, it has been proposed the use of cytogenetic dosimetry that is based on investigation into radiation-induced changes in chromatin structure.

Cytogenetic dosimetry

Genomic instability is directly related to rearrangements of chromatin structure, resulting in chromosome aberrations (CAs) that are classified in accordance with their mechanism of formation. Chromatid-type aberrations are usually related to chemical stress, whereas chromosome-type aberrations are more specific to IR (Bonassi and Au 2002).

The most commonly used cell models for the study of CAs are fibroblasts and lymphocytes. When IR interacts with these cells, which are in the quiescence phase, radiation-induced DNA lesions can remain latent and persist through the DNA replication process (Fringer and Grinnell 2003; Yusuf and Fruman 2003). The analysis of radiation-induced CAs requires artificial induction of cell proliferation, subsequent processing of DNA lesions by DNA synthesis occurring in S phase, and then arresting of cells in mitosis.

Lymphocyte cultures require a shorter culture time and involve a lower risk of contamination than fibroblast cultures. Lymphocytes also can be obtained by procedures that are simpler (venous puncture) than those for fibroblasts (biopsy). Additionally, lymphocytes circulate throughout the body, being a better model for biodosimetric assays (Stankeová et al. 2003; Garcia-Sagredo 2008).

In vitro culture, a lymphocyte population is stimulated to divide by addition of a mitogen, generally

phytohaemagglutinin (PHA) (Carloni et al. 2001). Highly condensed and better defined chromosomes are observed in the metaphase stage after blocking of mitosis with an arresting agent, usually colcemid. This prevents formation of the mitotic spindle, due to inhibition of microtubule polymerization during chromosome segregation at anaphase (Kanda et al. 1994).

After culture, it is possible to identify CAs in metaphase chromosomes. Depending on life-time/viability of bearing cells, CAs are classified as unstable or stable aberrations. Dicentric, acentric rings and fragments are types of unstable aberrations, whereas insertions, reciprocal and non-reciprocal translocations are referred to as stable aberrations (Obe et al. 2002).

Unstable aberrations are usually associated with loss of genomic material that can occur in two pathways: (1) acentric fragments fail to wrap on the mitotic spindle during anaphase; (2) anaphase bridges are formed from dicentrics resulting in ruptures of affected chromosomes. Both events contribute to dose underestimation if IR exposure occurred thereafter 3 months (Lloyd 1998). On the other hand, stable aberrations are transmissible through successive divisions, providing important information to assess absorbed dose over long periods of time (Léonard et al. 2005; Rodrigues et al. 2005).

These different features are employed on distinct situations in personal monitoring, depending on the period of time between irradiation and development of the biodosimetric assays. More details are presented below.

Dicentric scoring: dose–effect curves and absorbed dose

The first studies proposing the employment of CAs to detect previous exposures to radiation and quantify absorbed dose were published by Bender and Gooch in 1962 (see Hoffmann and Schmitz-Feuerhake 1999). In those researches, the frequency of CAs was scored in 1,000 metaphases from eight individuals who were exposed to radiation in a nuclear accident in Idaho Falls, United States, in 1961. Quantitative dose–effect information could not be measured because the bioassay was performed several years after irradiation, but CAs were still present in most of the cases (Kawata et al. 2004). Later in the 1960s, the scoring of CAs was successfully tested in a number of cases of accidental exposure to IR, and good correlation between the number of dicentric chromosomes and absorbed dose predicted by physical models was obtained.

Today, as a general rule, it has been proposed that the analysis of CAs should be performed using 500 cells, if an incident involving low doses (≤ 1 Gy) might have happened. On the other hand, for an incident involving higher doses (> 1 Gy), it is recommended to count 100 dicentrics (IAEA 2001). However, for a preliminary estimation of

dose in a radiological accident, only 50 metaphases or 30 dicentric per subject need to be scored (Lloyd et al. 2000).

The dose–effect relationship obtained after *in vitro* irradiation of blood can be used as a calibration curve to estimate effects from an irradiation *in vivo* (Doloy et al. 1991; IAEA 2001). Generally, frequencies of dicentric are related to known radiation doses, depending on radiation quality (or LET–Linear Energy Transfer) and relative biological effectiveness (RBE). This makes possible the estimation of absorbed dose in uniformly irradiated persons (accidental or occupational exposure), because in this case lymphocytes should have been also exposed (Amaral 2002; Voisin et al. 2002).

Dose–effect curves have shapes and slopes that vary as a function of the LET and RBE, as illustrated in Fig. 1.

For low-LET radiation (e.g. gamma and X rays), the dose–effect curve for dicentric fits better as linear-quadratic model: $Y = A + \alpha D + \beta D^2$. Here, Y is the dicentric yield, A is the frequency of dicentric at dose zero, α and β are fitted parameters and D is the dose. On the other hand, for high-LET radiations (e.g. neutrons and alpha particles), the shape of the calibration curve fits better to a linear dose response ($Y = A + \alpha D$). The reason for that is related to differences in the quantity of energy deposited per micrometre of an ionization track, leading to a different biological effectiveness as a function of different types of radiation (IAEA 2001). Thus, for an accurate assessment of absorbed dose involving individual exposure to mixed fields, such as gamma and fission neutrons, it is essential to estimate separately the contribution of each component (Ballarini et al. 2003; Voisin et al. 2004a).

It was not before the year 2004 when dicentric scoring was recognized as an international standard by the International Organization for Standardization (ISO) that published a guideline for performing laboratory services (ISO

2004; Stricklin et al. 2007). Principal parameters of ISO 2004 regulations are cited below:

1. Incorporation of good laboratory practices;
2. Appropriate documentation of protocols;
3. Development of an own dose–response curve at each laboratory, excluding inter-laboratorial differences;
4. Set-up of dicentric scoring only by trained technicians;
5. Demonstration of scoring experience by intra- and inter-laboratory comparisons, using standard scoring criteria (Roy et al. 2004; Yoshida et al. 2007; Wilkins et al. 2008).

The principal advantages of the dicentric assay in biodosimetry are as follows:

- High specificity to IR—only a few genotoxic mutagens may produce a similar effect (bleomycin, neocarzinostatin and mitomycin C). Nevertheless, these radiomimetic agents are employed mainly to chemotherapy treatments, presenting high toxicity;
- Low background in non-exposed populations—about 1–2 in 1,000 cells;
- High occurrence among unstable aberrations—in the order of 60%;
- Considerable range of dose detection—lower detection limit is about 0.1 and 0.01 Gy for low- and high-LET radiation, respectively;
- Low cost method for chromosome staining—conventional staining with Giemsa (Fig. 2).

Nevertheless, dicentric have a limited applicability in procedures that involve fractionated irradiation as well as

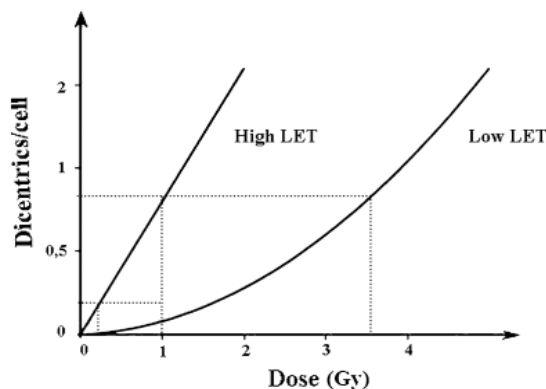


Fig. 1 Dose–effect curves for different quality radiations (IAEA 2001)



Fig. 2 Unstable aberrations in irradiated lymphocytes, visualized by conventional staining with Giemsa. The dicentric chromosome and its respective fragment are marked by an arrow and a circle, respectively

late exposures, which may result in a lower dicentric yield than if the same dose is received acutely.

In fractionated exposures, primary breaks in adjacent chromosomes induced during the first irradiation can be corrected by repair mechanisms before induction of additional breaks by a subsequent dose fraction. If the time interval between two consecutive irradiations is greater than about 2 h (which corresponds to the mean lifetime of the breaks), then the mis-rejoining of damaged chromatin and dicentrics is minimized or even avoided (IAEA 2001).

In the case of late exposures, cells bearing dicentrics and other unstable aberrations are naturally eliminated (about 50% at each mitosis) from the circulating lymphocyte pool by a mechanism called apoptosis (programmed cell death), which may cause underestimation of the absorbed dose if the bioassay was performed more than 3 months after exposure. Probably, this selective removal is a strategy of the immune system to prevent or minimize late biological effects, as cancer and leukaemia (Pala et al. 2001; Belloni et al. 2008). Thus, cells bearing dicentrics have to be scored only after first post-irradiation division (M1), in order to maintain the quantitative response.

This is particularly important after partial-body irradiation, because a fraction of the affected cells may not have enough time to reach the M1 stage within 48-h cell culture (conventional time). These cells present a delayed cell cycle, especially at check points, in comparison with non-irradiated lymphocytes, as a result of their abnormalities (Suzuki et al. 2006). One experimental option to mathematical extrapolations (Dolphin and Qdr models) has been to extend cell culture time and add colcemid at the beginning of the culture, reaching better dose estimations (Fernandes et al. 2008b).

Other laboratorial factors that could influence cell progression rate and yield of radiation-induced CAs in culture must be fit appropriately, such as temperature, culture time and culture medium (Purrot et al. 1981; Gumrich et al. 1985; Virsik-Peuckert and Harder 1985; Hone et al. 2005).

Alternative staining methods, such as fluorescence plus Giemsa (FPG) using bromodeoxyuridine, have enabled to restrict the analyses to M1 cells, but some practical limitations have been detected. The main drawback of the FPG method is the final optical resolution of chromosomes, which is very poor and blurred (Hayata et al. 1992; Roy et al. 1996).

Dicentric assay is a time-consuming method, demanding skilled technicians for accurate identification of this type of CAs. For this reason, several studies have indicated that fluorescent in situ hybridization (FISH) and C-banding methods to highlight centromeric regions may allow faster scoring with same accuracy (Fernandes et al. 2006; Fernandes et al. 2008a; Mestres et al. 2008).

Stable aberrations: relationship with absorbed dose

The introduction of stable chromosome aberrations as IR biomarker has been essential to overcome some limitations of dicentric scoring that can lead to an underestimation of dose after late exposure or long-term irradiation (Bauchinger 1998; Moquet et al. 2000).

Unlike cells bearing dicentrics and other types of unstable CAs, those with stable aberrations usually do not undergo negative selection during mitoses, given that the presence of stable CAs is not necessarily lethal for cells and the loss of genetic content is considerably limited during successive mitosis. For this reason, this biomarker has been more reliable for retrospective evaluations (Tucker 2001; Rodríguez et al. 2004).

Symmetrical (or reciprocal) translocations and insertions exhibit higher persistence than other stable CAs in the peripheral blood lymphocytes pool, as cell renewal occurs. Identification of such abnormalities requires the cell culture of irradiated lymphocytes, similarly as done to dicentrics (Edwards et al. 2005). However, staining methods other than Giemsa staining are carried out to detect translocations, as later described in this paper.

Dose–effect curves based on translocations are also obtained in a similar way as those for dicentrics, with the dose–effect relationship being a function of the same equations (linear-quadratic for low-LET radiation, and linear for high-LET radiation) (Bothwell et al. 2000; Darroudi 2000; Rodríguez et al. 2004; Hande et al. 2005). The yield of translocations shows distinct dose–effect responses depending on conditions of exposure (early or long-term irradiations). At low doses (≤ 1 Gy), most translocations are of simple nature for both acute and chronic exposures, while at higher doses (> 2 Gy) complex aberrations predominate. The latter arise from multiple double-strand breaks (DSBs) followed by a multi-way exchange involving more than three chromosomes (Anderson et al. 2003; Camparoto et al. 2003).

Up to today, many studies have been conducted to validate the accuracy of translocations as a retrospective biomarker. Some issues have been cleared appropriately, while others still remain ambiguous. The use of stable CAs in cytogenetic dosimetry has some limitations:

- High background frequency of translocations (2–10 per 1,000 cells);
- Significant inter-individual variations, especially with age (> 40 years);
- Lower range of dose detection than with dicentric assay (0.25–2 Gy);
- Influence of environmental and lifestyle factors;
- Lack of standardization in the choice of chromosome pairs to be studied, as well as of the staining method

and nomenclature system to analyse and classify translocations, respectively.

Staining methods and nomenclature systems of stable aberrations

Initially, cytogenetic identification of translocations was carried out by banding techniques either using proteolytic enzymes (trypsin) in G-banding or denaturation/renaturation of chromatin techniques (Moquet et al. 2000).

As for dicentric studies, these methodologies are time-consuming, and data analyses require skilled personnel for recognizing both normal and modified longitudinal patterns of each chromosome pair (Tawn and Whitehouse 2005). Besides, banding analyses also present limitations when rearrangements involving small amounts of material or multi-way exchanges appear. Such events can hardly be detected, especially when banding and spreading of chromosomes are not adequate. As a result, the G-banding and denaturation/renaturation of chromatin techniques are not suitable for large-scale screening of populations (Tucker 1998).

However, an improvement in translocation analyses for cytogenetic dosimetry has been reached with the introduction of molecular cytogenetic methodologies, particularly fluorescent *in situ* hybridization (FISH). This staining technique is based on the use of DNA-specific fluorescent probes that bind to target chromosomes by complementary base pairing. Scoring of highlighted translocations is straightforward, less subjective and faster than with G-banding (Sorokine-Durm et al. 2000; Müller et al. 2005).

Most common laboratory practice is painting three of the larger chromosomes, representing about 20% of the genome. The total genomic translocation frequencies can be estimated according to a formula proposed by Lucas et al. (1992), which considers simple pair-wise exchanges (see Lucas and Deng 2000), as follows:

$$F_G = F_p / 2.05 f_p (1 - f_p) \quad (1)$$

where F_G is the full genome aberration frequency, F_p is the translocation yield detected by FISH and f_p is the fraction of the genome hybridized, taking into account the gender of the investigated subject.

Equation 1 is based on the hypothesis that the frequency of translocations observed for each chromosome is proportional to its DNA content. Thus, larger chromosomes would show a higher probability to undergo interaction with IR. A number of studies have shown contradictory results, either confirming Lucas' hypothesis or suggesting that specific chromosomes are more radiation sensitive than others. In this context, a recent methodology, the so-called spectral karyotype (or SKY), appears as an

additional operational tool, providing specific fluorescent painting of all chromosome pairs. SKY permits detection of minimum damages and multiple chromosomal rearrangements, which could be useful for understanding of early biological effects associated with irradiation. As a result, "hidden aberrations" produced after high-level exposure may be detected (Brasemann et al. 2005; Zeljezic and Garaj-Vrhovac 2006).

Using fluorescence techniques, two methods allow a better description of events involved in chromosome exchanges than conventional terminology of routine cytogenetic scoring, including some unexpected and anomalous patterns, namely: PAINT (Protocol for Aberration Identification and Nomenclature Terminology), created by Tucker et al. (1995a, b), and the S&S System, performed by Savage and Simpson (1994).

Table 3 contrasts these two methods. Actually, these two systems are not mutually exclusive but they are complementary. The option for one or the other system depends on research purpose. For dose estimation, both methods have shown similar results, so that the choice of one of them is not crucial to biodosimetric measurements (Tucker 2008).

On the other hand, although translocations and dicentrics are widely studied for radiation protection purposes, a kind of by-product of chromosome damage has been proposed as an alternative tool for such investigation, namely the micronucleus.

Cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay

Unrepaired (or misrepaired) DNA lesions and chromosome malsegregation produced from mitotic malfunction (damaged kinetochores and spindle fibre defects) lead to loss of entire chromosomes or to acentric fragments. At the end of cell division, this "lost" genomic material appears as small nucleus-like particles, so-called micronuclei (MN) (Fenech et al. 1999).

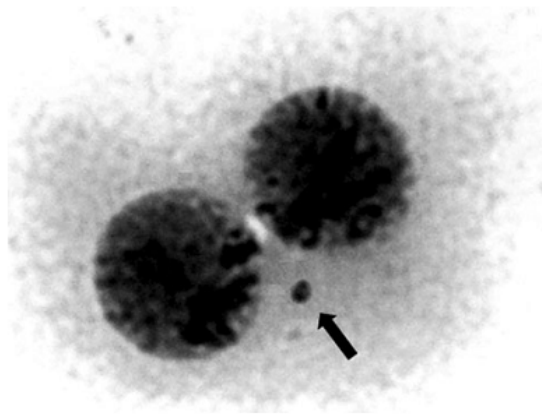
The preferred method for assessing MN in lymphocyte cultures is to block cytokinesis using cytochalasin B. In the cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay, cells that have completed one or more nuclear divisions are blocked on cytokinesis phase, being visualized as bi- or trinucleated units (M1 and M2 cells, respectively), as illustrated in Fig. 3 (Fenech 2000).

The addition of cytochalasin B guarantees the control of lymphocyte cell division, avoiding non-homogenous response of these cells to a mitogenic stimulus. This method is important for dose estimations because the scoring can focus on binucleated cells only, excluding cells that passed successive divisions (e.g. M2, M3, M4) (Müller et al. 1996).

In order to establish standard laboratory procedures in MN analyses, the HUMN Project (The International

Table 3 Comparison of PAINT and S&S systems (modified from Savage and Tucker 1996; Knher and Bauchinger 2000)

Paint	S&S
Provides a descriptive analysis of aberrant chromosome patterns	Allows critical quantitative work, by investigation into exchange origins and their mechanisms of formation
Considers and classifies, individually, each abnormal painted chromosome or fragment, independent of any relationship with other painted signals in the cell	Considers and classifies each exchange as a whole, taking into account all abnormal painted signals in the cell, given a unique designation
Appropriate to any number of chromosome-specific probes	Is only applicable to single probes
Applicable with chromosome cocktails of same colour or multiple colours (the latter providing a sound classification)	Applicable with chromosome cocktails multi-coloured, only
Despite importance of centromeric identification, it is not indispensable for quantification studies	Centromeric identification is essential to reach accurate classification

**Fig. 3** Binucleated cell with a micronucleus marked by an arrow

- Nucleoplasmic bridges wider than one-fourth of the nuclear diameter are not acceptable;
- A cell with two overlapping nuclei can be scored only if the nuclear boundaries of each nucleus are distinguishable;
- Cellular membrane of a binucleated cell should be intact and clearly distinguishable from the cytoplasmic boundary of adjacent cells;
- MN in human lymphocytes usually vary between one-sixteenth and one-third of the mean diameter of the main nuclei;
- MN can not be refractive or linked to the main nuclei;
- MN usually have the same staining intensity as the main nuclei, but occasionally staining may be more intense.

Collaborative Project on Micronucleus Frequency in Human Populations) was initiated by Fenech et al. (1999). As part of this project, data were collected on:

- MN baseline frequencies in different populations and cell types;
- Influence of environmental and life-style factors on dose reconstruction;
- Suitability of MN as a biomarker of risk for cancer and other diseases.

In this project, a suggestive correlation between the genotoxicity of some agents, particularly IR, and the increase in MN frequencies in humans was found, which has been supported by further studies (Ramírez et al. 1999; Bonassi et al. 2007).

The standard criteria for selecting binucleated cells and for scoring micronuclei were described by Fenech (2000):

- Main nuclei should have intact nuclear membranes, be situated within the same cytoplasmic boundary and share similar features (e. g. size, staining pattern and staining intensity);

MN show considerable advantages compared to classical cytogenetic biomarkers (dicentric and translocations) in terms of victims screening following high radiation exposure, because it is an easy and fast method of scoring of irradiated cells. However, unlike dicentric, MN are not a radiation-specific biomarker (Silva-Barbosa et al. 2005; Fernandes et al. 2006) and can be induced, for example, by age and gender.

Still compared with dicentric, the MN frequency is substantially lower, especially at high doses. As a consequence, it is necessary to increase the number of analysed cells in order to achieve a statistically significant dose-effect relationship. In this case, an experimental alternative to improve the mitotic index of first cycle metaphase was obtained by Paul et al. (1997) through synchronized culture method with addition of methotrexate. This approach induces a 2–3 times higher mitotic growth than obtained with conventional method.

Other critical points are the high spontaneous frequency of MN in non-irradiated population and the inter-individual variability, which results in a low specificity of this biomarker at low radiation doses (Thierens et al. 2000). As mentioned, the baseline frequency of MN in human lymphocytes (mean 7.8 MN per 1,000 cells) is strongly

influenced by factors as age (associated with loss of whole chromosomes), gender (women exhibit a higher MN frequency, due to excess micronucleation of sex chromosomes) and also by the effect of smoking habits and genotoxic agents (Norppa and Falck 2003; Joksic et al. 2004).

It is possible to distinguish spontaneous from radiation-induced MN using FISH with pancentromeric and pantelomeric probes. Predominantly, spontaneous MN contain whole chromosomes (centromeric-positive: C⁺) with single chromatid, whereas radiation-induced MN contain acentric fragments (centromeric-negative: C⁻) harbouring chromatid-type terminal fragments (Fig. 4) (Wojcik et al. 2000; Lindberg et al. 2008).

For high doses of radiation, the dose–response curve starts to level off at about 5–7 Gy and 3–4 Gy, for low- and high-LET radiation, respectively. This phenomenon is well known also for other cytogenetic endpoints, as for dicentric, and it is interpreted as selection against heavily damaged cells which cannot enter mitosis, due to very severe damage resulting in apoptosis (Müller and Rode 2002).

Up to today, validation of MN assays as a triage tool in biological dosimetry has been quite successful at high doses (≥ 1 Gy) by scoring at least 200 binucleated cells (McNamee et al. 2009). However, it is not suited for assessing either partial-body exposure or whole-body exposures at low doses (< 1 Gy), given its low sensitivity to IR (Wojcik et al. 2009).

In this context, the importance of scoring nucleoplasmic bridges (NPBs) should not be underestimated because it provides direct evidence of genome instability. Probably, NPBs result from non-disjunction of one or more dicentric chromosomes whose centromeres were pulled to opposite poles of the binucleated cells (Thomas et al. 2003; Fenech 2006).

A great advance of the CBMN assay as a “cytome” assay of chromosomal instability is the inclusion of cell

parameters, such as viability, mitotic status and chromosomal instability, in evaluation exposure to cytotoxic and genotoxic agents. This new concept employs the use of centromeric probes and kinetochore antibodies for measuring chromosome breakage, chromosome loss, non-disjunction, necrosis, apoptosis and cytostasis. Furthermore, molecular tools also enable the cytological scoring of target cells in terms of their viability status, mitotic status and chromosomal instability or damage status (Fenech 2006; Duan et al. 2009).

Premature chromosome condensation (PCC) assay

Analyses of current biomarkers in cytogenetic dosimetry (dicentric, translocations and micronuclei) are generally performed from metaphase chromosome preparations obtained through mitogenic stimuli in vitro. Traditionally, after lymphocyte cell culture (~ 48 – 72 h), the yield of chromosome-type aberrations or related by-products are scored for dose assessment (Prasanna et al. 1997). Those assays are characterized by a high detection limit of approximately 4 Gy. For higher doses, radiation-induced mitotic delay and cell death of irradiated cells overcome the yield of mitotic cells, causing underestimation of the deduced radiation dose (Prasanna et al. 1997).

By contrast, the PCC assay allows an accurate evaluation of damage at high doses after acute exposures. Analysis of radiation-induced lesions is performed on interphase cells, within a few hours (3–4 h) after blood sampling. This method also permits an accurate discrimination between total- and partial-body exposures to low- and high-LET radiation, and can be carried out in very low mitotic indices, such as in pathologic situations (IAEA 2001).

The induction of PCC occurs by fusion of isolated human lymphocytes with mitotic cells (e.g. Chinese hamster ovary–CHO) in the presence of a fusing agent (e.g.

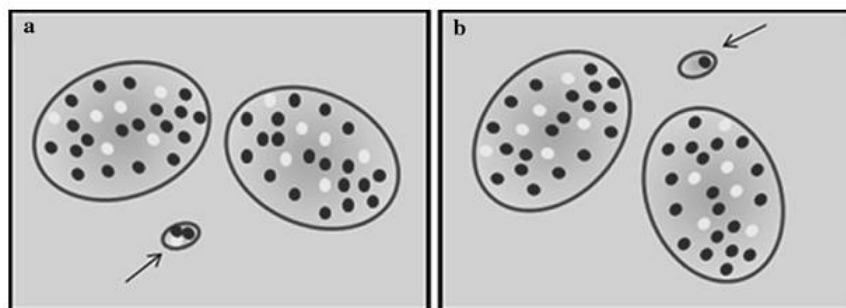


Fig. 4 Scheme of human lymphocytes painted with FISH using pancentromeric (white) and pantelomeric (black) probes. Arrows indicate labelled micronucleus: **a** radiation-induced MN (one centromere signal and two telomere signals) and **b** spontaneous MN (one telomere signal)

polyethylene glycol, okadaic acid, calyculin A, virus). Both fusion and chromosome condensation process depend on the chosen fusing agent: for example, in the presence of polyethylene glycol, mitotic CHO cells release a mitotic factor that acts on lymphocyte interphase cells promoting an early condensation (Gotoh and Durante 2006).

The morphology of chromosomes, in PCC assay, varies according to cell cycle position of the investigated lymphocyte at time of fusion: (1) G1-phase cells show a single chromatid; (2) S-phase cells include chromosomes with fragmented and pulverized appearance (3) G2-phase cells show double chromatids that are greatly extended and generally much longer than prometaphase elements (Ravi et al. 2007).

Similarly to dicentrics, choice of the staining chromosome technique applied for translocations and micronuclei depends on the purpose of research and, for the PCC assay, the biomarker to be analysed: radiation-induced chromosome breaks can be stained with the Giemsa or FPG techniques, while dicentrics can be visualized after pretreatment with C-banding.

A recent work performed by Lindholm et al. (2010) compared the dicentric (gold standard) with the PCC assay, in terms of cytogenetic dosimetry. This study showed that PCC rings are a better radiation-induced biomarker to evaluate high-dose individual exposure (>6 Gy), whereas dicentric assay is better suited for assessing whole-body low-dose estimates (0–6 Gy). Hence, the PCC assay is a suitable tool in cases of a massive radiological emergency when people may be exposed to high doses (5–50 Gy) and is crucial to identify those who will require medical care as early as possible (Emamchai et al. 2009; Wanga et al. 2009).

The principal features about biological dosimetry are summarized in the Table 4.

Molecular biomarkers: emerging tools for biodosimetry

With the advent of new technologies, a better comprehension of cellular mechanisms involved in the biological response to physico-chemical stresses has been achieved. As a result, several researches have been able to identify molecular markers that may reflect radiation-induced DNA damages, correlating them with inhibition, reduction and/or over-expression of an ever-expanding number of genes. Those early transcriptional responses may be useful to predict consequences for the cell that occur later after irradiation (surveillance, cell cycle arrest, apoptosis or necrosis) (Coleman et al. 2003; Dainiak et al. 2005). Below, some cell parameters suggested for estimating exposure to IR are briefly discussed, namely: glycophorin A (GPA), hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) and p53 protein.

Glycophorin A (GPA)

The autosomal *gpa* locus, mapped to chromosome 4q28-31, codes for the major abundant cell-surface sialoglycoprotein in human erythrocytes, named glycophorin A (GPA). This protein is present at about 5×10^5 copies per cell (Bigbee et al. 1998; Ha et al. 2002). The GPA gene occurs in two co-dominantly expressed allelic forms, *gpa*^M and *gpa*^N, which differ by two of 131 amino acid residues. The codified glycophorin A can be labelled with fluorescent monoclonal antibodies specific for the M and N allelic forms and analysed by flow cytometry (Bigbee et al. 1998). The GPA assay allows to identify the most common genotype, the *gpa*^{M/N}, which is present in 50% of all individuals, and to measure variant frequencies in cell types (N0, M0, NN and MM). Hemizygous N0 and M0 variants indicate the occurrence of point mutations and deletions, whereas the homozygous NN and MM variants indicate events such as chromosome mis-segregation, somatic recombination or gene conversion (Saenko et al. 2000; Ha et al. 2002).

The presence of a GPA mutant, especially of the N0 and NN variants, is a persistent indicator of past radiation exposure to high doses (≥ 1 Gy). Once these variants are released from damaged bone marrow stem cells to the circulating blood, *gpa* mutants are found after exposure even when the blood cells are replaced, unlike dicentrics and complex translocations (Ha et al. 2002).

Furthermore, the GPA assay exhibits several practical advantages: (1) it represents a cheap method, (2) only 1 ml of blood per subject is required, (3) the blood collected can be stored at refrigerator temperature (4°C) up to 1 week prior to analysis, (4) the employment of flow cytometry reduces time of analysis, allowing to study large populations and (5) it is not influenced by environmental parameters and life-style factors.

On the other hand, this biomarker shows a linear dose dependence, and a detailed mutation spectrum cannot be obtained, due to absence of nucleic acids in erythrocytes. Besides, GPA mutations have not been observed in low radiation exposures (Jones et al. 2001). Further limitations are as follows: (1) there is no in vitro system to calibrate GPA assays, (2) less than 50% of the population is M/N heterozygous and, therefore, is eligible for the assay, (3) it is not suitable to quantify low doses (<1 Gy) and (4) it shows a high inter-individual variation.

Considering the advantages and limitations of the GPA assay as a retrospective biomarker to radiation exposure, the International Commission on Radiation Units and Measurements (ICRU) concluded that the use of the GPA assay is more adequate in association with other biological indicators, to determine average doses in a large population exposed to a high radiation dose (Kleinerman et al. 2006).

Table 4 Principal features of biological dosimetry; ARS: acute radiation syndrome; IR: ionizing radiation

Procedure	Observed endpoint	Readout/Time of onset	Lower limit	Application	Advantages	Limitations
Clinical signals ^a	Vomiting Fever Headache	48 h	1–3 Gy	Triage of injured persons after radiological incident	Serve as a basis for sorting persons exposed to IR and deciding upon proper medical care	Manifestation of symptoms only arise at high doses Severity of injury depends on irradiation condition and radiosensitivity of involved tissues Strong influence of pathologic factors Significant inter-individual variability
Blood count ^b	Decreasing absolute lymphocyte count	24–72 h	0.5 Gy	Determination of radiation exposure in prodromal phase of ARS	Quickness of obtaining data Methodological simplicity	Limited applicability in protracted and late exposures Selective removal of dicentric chromosomes along cell division Necessity of technician with good experience
Cytogenetic dosimetry	Dicentric, rings and fragments ^c	48–51 h	0.1 Gy	Estimation of dose after weeks or few months	High specificity to IR Low background in non-exposed populations Low limit of dose in biodosimetry	High background frequency Not recommended for persons older than 40 years Significant inter-individual variations Lack of dependence on lifestyle factors
	Translocations ^d	72–75 h	0.25 Gy	Estimation of dose after long period of time	Do not undergo negative selection during mitoses; can be used in cases of old or long-term irradiation	High background frequency Not recommended for persons older than 40 years Significant inter-individual variations Lack of dependence on lifestyle factors
	Micronucleus ^e	72 h	0.32 Gy	As a genetic toxicology testing and in biomonitoring of individuals exposed to genotoxic agents	Easy identification of micronucleus Does not require technician with long-lasting experience	High background frequency Dependence on genotoxic compounds and lifestyle factors Significant inter-individual variability
	Pernature condensed chromosome ^f	3–4 h	4 Gy	Triage of injured persons after high level exposure to IR	Quickness of obtaining data Does not require mitogen stimuli in vitro Allows accurate discrimination between total- and partial-body exposures	Not suitable at low-dose range Cell analysis is more complicated than conventional lymphocyte cell culture

^a IAEA and WHO 1998^b Waseleko et al. 2004^c Lloyd et al. 2006^d Tucker 2008^e Voisin et al. 2004b^f Lindholm et al. 2010

Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HPRT)

The gene encoding HPRT is located on the Xq26 chromosome of mammalian cells and exhibits hemizygous features. This gene codes for a constitutive enzyme associated with purine metabolism that is not essential to survival of a cell (Bigbee et al. 1998). Mutant peripheral blood T lymphocytes do not express an active *hprt* gene product. These mutant clones can be scored and clonally expanded by selective growth (with or without 6-thioguanine) and have been used in studies of radiation-induced alterations, because genetic changes at this locus are tolerated (Bigbee et al. 1998).

For analyses of deletions and other molecular alterations, the multiplex polymerase chain reaction technique (multiplex-PCR) has been employed. In general, gene changes result in gene inactivation by mutations (~85%), while the remaining changes (15%) show larger structural modifications. By molecular analysis, the dose–response curves can be obtained in vitro for high- and low-dose rates and then used, for example, to estimate the radiation dose of persons exposed accidentally (Bigbee et al. 1998; Kumar et al. 2006).

Currently, it appears that the *hprt* locus frequently involves large-scale genomic rearrangements from rejoining of double-strand breaks (DSB). Considering that the presence of DSBs is associated with a negative selection of dicentric-bearing cells, this biomarker may be only indicated to evaluate an exposure that occurred a short time before analysis (Rothkamm et al. 2008).

In spite of the limited usefulness of the HPRT assay for detecting exposures involving high acute doses, the effectiveness of this biomarker is well documented for biodosimetric purposes (Jianlin et al. 2004; Rothkamm et al. 2008). Furthermore, the sensitivity of this assay can be

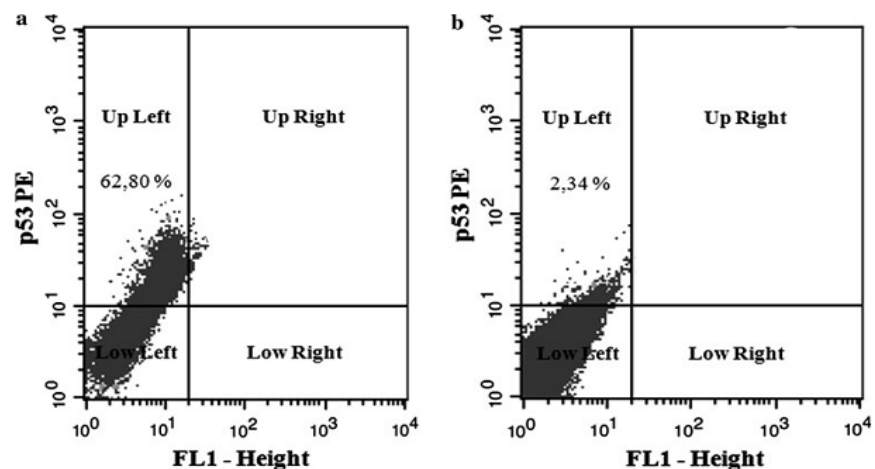
improved by correcting for confounding factors that may influence the mutant frequency, as age and smoking habits (Kumar et al. 2006).

p53 protein expression level

The p53 gene is a tumour suppressor gene mapped to chromosome 17. The protein encoded by this gene binds to the DNA and acts as a transcription factor for several genes participating in the control of cell survival. After DNA damage, p53 activation can lead to cell cycle arrest and DNA repair or cell death. For this reason, this protein is essential for maintaining genome integrity (Lamb and Crawford 1986; Okorokov and Orlova 2009). In contrast, mutant p53 can no longer bind to the DNA in an effective way and, consequently, does not regulate suitably expression of its target genes. Cells bearing these changes cannot promote a correct repair or induce apoptosis, starting an anomalous process of cell division that may result in tumour formation (Bahl et al. 2000).

Under normal conditions, p53 is present in the cytoplasm in a low concentration and shows a short half-life (~6–20 min). By contrast, in response to stress signals produced by genotoxic agents, the p53 half-life increases from minutes to hours (~6 h). This immediately leads to a higher p53 concentration permitting its detection and correlation with biological and physico-chemical stress (Novellino et al. 2003; Rössner et al. 2004; Riley et al. 2008). Several studies have proposed the evaluation of changes in p53 levels as biomarker of individual exposure to IR (Lu-Hesselmann et al. 2006; Cavalcanti et al. 2008). As an example of the potential of this method in biodosimetry, Fig. 5 presents flow cytometry results of p53 protein expression levels of irradiated (a) and non-irradiated (b) blood samples from a healthy donor. The method of

Fig. 5 Flow cytometry analysis of (a) samples irradiated with 4 Gy and (b) non-irradiated samples. Lymphocyte cells were marked with monoclonal anti-p53 antibody conjugated with phycoerythrin (PE), and the results are presented in a dot plot format. Cells positively marked for p53 are observed in the up left region. As dot plot is a graphic of bidimensional representation, FL1 channel was open but no fluorescence was read



analysis was performed according to Cavalcanti et al. (2008). The Figure 5 demonstrates that it is possible to verify the increase of this protein level with radiation dose, for a time period between blood sampling and data acquisition of about 6 h, for the data presented. Considering that, in general, cytogenetic dosimetry is time-consuming, requiring days or even weeks to provide accurate data, the methodology proposed by Cavalcanti and co-workers has high potential as a rapid screening method in case of a large-scale nuclear incident. However, further studies must be carried out to evaluate the usefulness of the method considering inter-individual differences (Amaral et al. 2008).

Final considerations

Cytogenetic dosimetry is a powerful tool for evaluating individual radiation-induced risks, complementary or alternative to physical dosimetry, having dicentric assays as the gold standard. Several emerging technologies, such as flow cytometry and multiplex-PCR, have motivated the investigation into new molecular biomarkers for rapid dose assessment. These new approaches may allow to better predicting health consequences after individual overexposure by taking into account individual radio-sensitivity and thus are very promising for biodosimetric purposes. Obviously, these new methods demand further studies including a large number of subjects in terms of in vivo response, inter-individual variability and radiation specificity. Besides, as those biological indicators belong to a recent branch in the biodosimetry field, it is essential to investigate their usefulness as biological signatures of radiation exposures in terms of radiation quality (low and high-LET), dose rate, irradiation conditions (whole- and partial-body) and environmental and individual life-style parameters.

Acknowledgments The authors would like to thank Thiago de Salazar e Fernandes (UFRPE-Recife-Brazil) for the discussion of this text, Mariana Cavalcanti (LAMBDA-UFPE-Brazil) for the image of p53 expression level by flow cytometry and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support.

References

- Amaral A (2002) Trends in biological dosimetry: an overview. *Braz Arch Biol Tech* 45:119–124
- Amaral A (2005) Physical and biological dosimetry for risk perception in radioprotection. *Braz Arch Biol Tech* 48:229–234
- Amaral A, Fernandes TS, Cavalcanti MB (2008) Bioindicators in radiation protection. *Braz Arch Biol Tech* 51:91–96
- Anderson RM, Marsden SJ, Paice SJ, Bristow AE, Kadhim MA, Griffin CS, Goodhead DT (2003) Transmissible and nontransmissible complex chromosome aberrations characterized by three-color and mFISH define a biomarker of exposure to high-LET particles. *Rad Res* 159:40–48
- Bahl R, Arora S, Nath N, Mathur M, Shukla NK, Ralhan R (2000) Novel polymorphism in p²¹waf1/cip1 cyclin dependent kinase inhibitor gene: association with human esophageal cancer. *Oncog* 19:323–328
- Ballarini F, Biaggi M, Edwards A, Ferrari A, Ottolenghi A, Pelliccioni M, Scannicchio D (2003) Estimating mixed field effects: an application supporting the lack of a non-linear component for chromosome aberration induction by Neutrons. *Rad Prot Dosim* 103(1):19–28
- Bauchinger M (1998) Retrospective dose reconstruction of human radiation exposure by FISH/chromosome painting. *Mutat Res* 404:89–96
- Belloni P, Meschini R, Lewinska D, Palitti F (2008) Apoptosis preferentially eliminates irradiated G0 human lymphocytes bearing dicentric chromosomes. *Rad Res* 169:181–187
- Berger ME, Christensen DM, Lowry PC, Jones OW, Wiley AL (2006) Medical management of radiation injuries: current approaches. *Occup Med* 56:162–172
- Bigbee WL, Fuscoe JC, Grant SG, Jones IM, Gorvad AE, Harrington-Brock K, Strout CL, Thomas CB, Moore MM (1998) Human in vivo somatic mutation measured at two loci: individuals with stably elevated background erythrocyte glycophorin A (*gpa*) variant frequencies exhibit normal T-lymphocyte *hprt* mutant frequencies. *Mutat Res* 397:119–136
- Bonassi S, Au WW (2002) Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. *Mutat Res* 511:73–86
- Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Ban S, Barale R, Bigatti MP, Bolognesi C, Cebulka-Wasilewska A, Fabianova E, Fucic A, Hagmar L, Joksic G, Martelli A, Migliore L, Mirkova E, Scarfi MR, Zijno A, Norppa A, Fenech M (2007) An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinog* 28(3):625–631
- Bothwell AM, Whitehouse CA, Tawn EJ (2000) The application of FISH for chromosome aberration analysis in relation to radiation exposure. *Rad Prot Dosim* 88(1):7–14
- Braselmann H, Kulka U, Baumgartner A, Eder C, Müller I, Figel M, Zitzelsberger H (2005) SKY and FISH analysis of radiation-induced chromosome aberrations: a comparison of whole and partial genome analysis. *Mutat Res* 578:124–133
- Camparoto ML, Ramalho AT, Natarajan AT, Curado MP, Sakamoto-Hojo ET (2003) Translocation analysis by the FISH-painting method for retrospective dose reconstruction in individuals exposed to ionizing radiation 10 years after exposure. *Mutat Res* 530:1–7
- Carloni M, Meschini R, Ovidi L, Palitti F (2001) PHA-induced cell proliferation rescues human peripheral human blood lymphocytes from X-ray-induced apoptosis. *Mutagen* 16(2):115–120
- Cavalcanti MB, Amaral AJ, Fernandes TS, Melo JA, Machado CGF (2008) p53 protein expression levels as bioindicator of individual exposure to ionizing radiation by flow cytometry. *Moll Cell Biochem* 308:127–131
- Coleman CN, Blakely WF, Fike JR, Macvittie TJ, Metting NF, Mitchell JB, Moulder JE, Preston RJ, Seed TM, Stone HB, Tofilon PJ, Wong RSL (2003) Molecular and cellular biology of moderate-dose (1–10 Gy) radiation and potential mechanisms of radiation protection: report of a workshop at Bethesda, Maryland. *Rad Res* 159:812–834
- Dainiak N, Waselenko JK, Armitage JO, Macvittie TJ, Farese AM (2003) The hematologist and radiation casualties. *Hematol* 473–496
- Dainiak N, Schreyer SK, Albanese J (2005) The search for mRNA biomarkers: global quantification of transcriptional and translational responses to ionising radiation. *Br Inst Rad* 27:114–122

- Darroudi F (2000) Use of FISH translocations analyses for retrospective biological dosimetry: how stable are stable chromosome aberrations? *Radiat Prot Dosim* 88(1):101–109
- Doloy MT, Malarbet JL, Guadeney G, Bourguignon M, Leroy A, Reillaudou M, Masse R (1991) Use of unstable chromosome aberrations for retrospective biological dosimetry after the first post irradiation mitosis. *Radiat Res* 125:141–151
- Duan H, Leng S, Pan Z, Dai Y, Niu Y, Huang C, Bin P, Wang Y, Liu Q, Chen W, Zheng Y (2009) Biomarkers measured by cytokinesis-block micronucleus cytome assay for evaluating genetic damages induced by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat Res* 677:93–99
- Edwards AA, Lindholm C, Darroudi F, Stephan G, Romm H, Barquinero J, Barrios L (2005) Review of translocations detected by FISH for retrospective biological dosimetry applications. *Radiat Prot Dosim* 113(4):396–402
- Enamchai AM, Mozdarani H, Mohammadifard S (2009) Construction of a dose-response curve by induction of premature chromosome condensation for biological dosimetry. *Iran J Radiat Res* 6(4):213–218
- Fenech M (2000) The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* 455:81–95
- Fenech M (2006) Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat Res* 600:58–66
- Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E, Bonassi S (1999) The Human MicroNucleus Project—An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat Res* 428:271–283
- Fernandes TS, Amaral A, Cavalcanti MB, Braga LRP, Melo RAM (2006) Unstable chromosome aberrations and micronuclei analyses in the biomonitoring of workers occupationally exposed to ionizing radiation. *Int J Low Rad* 3(4):299–309
- Fernandes TS, Lloyd D, Amaral A (2008a) A comparison of different cytological stains for biological dosimetry. *Int J Low Rad* 8(8):703–711
- Fernandes TS, Lloyd D, Amaral A (2008b) Biodosimetry for dose assessment of partial-body exposure: a methodological improvement. *Braz Arch Biol Technol* 51:97–102
- Fringer J, Grinnell F (2003) Fibroblast quiescence in floating collagen matrices. *J Biol Chem* 278(23):20612–20617
- Garcia-Sagredo JM (2008) Fifty years of cytogenetics: a parallel view of the evolution of cytogenetics and genotoxicology. *Biochim Biophys Acta* 363:375
- Gotoh E, Durante M (2006) Chromosome condensation outside of mitosis: mechanisms and new tools. *J Cell Physiol* 209:297–304
- Gumrich K, Virsik-Peuckert RP, Harder D (1985) Temperature and formation of radiation-induced chromosome aberrations. I. The effect of irradiation temperature. *Int J Rad Biol* 49(4):665–672
- Ha M, Yoo K-Y, Cho S-H (2002) Glycophorin A mutant frequency in radiation workers at the nuclear power plants and a hospital. *Mutat Res* 501:45–56
- Hande MP, Azizova TV, Burak LE, Khokhryakov VF, Geard CR, Brenner DJ (2005) Complex chromosome aberrations persist in individuals many years after occupational exposure to densely ionizing radiation: an mFISH study. *Genes Chromosomes Cancer* 44:1–9
- Hayata I, Kajima J, Okabe N (1992) Distinction of metaphases in the first cell cycle for automated system in radiation dosimetry. *Int J Rad Appl Instrum* 32(6):517–520
- Hoffmann W, Schmitz-Feuerhake I (1999) How radiation-specific is the dicentric assay? *J Expo Anal Environ Epidemiol* 2:113–133
- Hone PA, Edwards AA, Lloyd DC, Moquet JE (2005) The yield of radio-induced chromosomal aberrations in first division human lymphocytes depends on the culture time. *Int J Rad Biol* 81(7):523–529
- International Atomic Energy Agency (2001) Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment. Vienna. (IAEA Technical Report Series; 405)
- International Atomic Energy Agency and World Health Organization (1998) Diagnosis and treatment of radiation injuries. Vienna: IAEA 1998/49 (Safety Reports Series; 2)
- International Atomic Energy Agency and World Health Organization (2000) How to recognize and initially respond to an accidental radiation injury. Vienna: IAEA 2000
- International Commission on Radiological Protection-ICRP (1991) Recommendations of the international commission on radiological protection, ICRP-60. Pergamon Press, Oxford
- International Standards Organization (2004) Radiation protection—Performance criteria for service laboratories performing biological dosimetry by cytogenetics. ISO 19238:2004 (E), ISO, Geneva, 21 pp
- Jianlin L, Jiliang H, Lifan J, Wei Z, Baohong W, Hongping D (2004) Measuring the genetic damage in cancer patients during radiotherapy with three genetic endpoints. *Mutagen* 19(6):457–464
- Joksis G, Petrovic S, Ilic Z (2004) Age-related changes in radiation-induced micronuclei among healthy adults. *Braz J Med Biol* 37:1111–1117
- Jones IM, Tucker JD, Langlois RG, Mendelsohn ML, Pleshanov P, Nelson DO (2001) Evaluation of three somatic genetic biomarkers as indicators of low dose radiation effects in clean-up workers of the Chernobyl nuclear reactor accident. *Radiat Prot Dosim* 97(1):61–67
- Kanda R, Jiang T, Hayata I, Kobayashi S (1994) Effects of colcemid concentration on chromosome aberration analysis in human lymphocytes. *J Rad Res* 35:41–47
- Kawata T, Ito H, George K, Wu H, Cucinotta FA (2004) Chromosome aberrations induced by high-LET radiations. *Biol Sci Space* 18(4):216–223
- Kleinerman RA, Romanyukha AA, Schauer DA, Tucker JD (2006) Retrospective assessment of radiation exposure using biological dosimetry: chromosome painting, electron paramagnetic resonance and the glycophorin A mutation assay. *Radiat Res* 166:287–302
- Krher S, Bauchinger M (2000) Application of FISH painting for dose reconstruction: current status and views of the GSF cytogenetics group. *Radiat Prot Dosim* 88(1):15–20
- Koenig KL, Goans RE, Hatchett RJ, Mettler FA Jr, Schumacher TA, Noji EK, Jarrett DG (2005) Medical treatment of radiological casualties: current concepts. *Ann Emerg Med* 45(6):643–652
- Kumar PRV, Mohankumar MN, Hamza VZ, Jeevanram RK (2006) Dose-rate effect on the induction of HPRT mutants in human G0 lymphocytes exposed in vitro to gamma radiation. *Radiat Res* 165:43–50
- Lamb P, Crawford L (1986) Characterization of the human p53 gene. *Mol Cell Biol* 6(5):1379–1385
- Léonard A, Rueff J, Gerber GB, Léonard ED (2005) Usefulness and limits of biological dosimetry based on cytogenetic methods. *Radiat Prot Dosim* 115(1–4):448–454
- Lindberg HK, Falck GC-M, Järventaus H, Norppa H (2008) Characterization of chromosomes and chromosomal fragments in human lymphocyte micronuclei by telomeric and centromeric FISH. *Mutagen* 23(5):371–376
- Lindholm C, Stricklin D, Jaworska A, Koivistoinen A, Paile W, Arvidsson E, Deperas-Standylo J, Wojcik A (2010) Premature chromosome condensation (PCC) assay for dose assessment in mass casualty accidents. *Radiat Res* 173:71–78
- Lloyd DC (1998) New developments in chromosomal analysis for biological dosimetry. *Radiat Prot Dosim* 77(1–2):33–36
- Lloyd DC (2005) Cytogenetics studies of populations exposed to Chernobyl fallout. *Int Congr Ser* 1276:33–36

- Lloyd DC, Edwards AA, Moquet JE, Guerrero-Carballo YC (2000) The role of cytogenetics in early triage of radiation casualties. *Appl Rad Isot* 52:1107–1112
- Lloyd DC, Edwards AA, Szluiska M (2006) The minimum detectable dose by biodosimetry in a radiation overexposure. In: Springer Netherlands (ed) *Radiation risk estimates in normal and emergency situations*. Chilton, UK, pp 253–258
- Lucas JN, Deng W (2000) Views on issue in radiation biodosimetry based on chromosome translocations measured by FISH. *Radiat Prot Dosim* 88(1):77–86
- Lu-Hesselmann J, van Beuningen D, Meineke V, Franke E (2006) Influences of TP53 expression on cellular radiation response and its relevance to diagnostic biodosimetry for mission environmental monitoring. *Radiat Prot Dosimetry* 122(1–4):237–243
- McNamee JP, Flegal FN, Greene HB, Marro L, Wilkins RC (2009) Validation of the cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay for use as a triage biological dosimetry tool. *Radiat Prot Dosim* 135(4):232–242
- Mestres M, Caballín MR, Barrios L, Ribas M, Barquinero JF (2008) RBE of X rays of different energies: a cytogenetic evaluation by FISH. *Radiat Res* 170:93–100
- Moquet JE, Edwards AA, Lloyd DC, Hone P (2000) The use of FISH chromosome painting for assessment of old doses of ionizing radiation. *Radiat Prot Dosim* 88(1):27–33
- Müller W-U, Rode A (2002) The micronucleus assay in human lymphocytes after high radiation doses (5–15 Gy). *Mutat Res* 502:47–51
- Müller W-U, Nüsse M, Müller BM, Slavotinek A, Viaggi S, Streffer C (1996) Micronuclei: a biological indicator of radiation damage. *Mutat Res* 366:163–169
- Müller I, Geinitz H, Braselmann H, Baumgartner A, Fasan A, Thamm R, Molls M, Meineke V, Zitzelsberger H (2005) Time-course of radiation-induced chromosomal aberrations in tumor patients after radiotherapy. *Int J Rad Oncol Biol Phys* 63(4):1214–1220
- Norppa H, Falck GC (2003) What do human micronuclei contain? *Mutagen* 18:221–233
- Novellino ATN, Amorim RFB, Queiroz LMG, Freitas RA (2003) Análise da imunopressão do PCNA e p53 em carcinoma de células escamosas oral. Correlação com a graduação histológica de malignidade e características clínicas. *Acta Cir Bras* 18(5):458–464
- Ohe G, Pfeiffer P, Savage JRK, Johannes C, Goedecke W, Jeppesen P, Natarajan AT, Martínez-López W, Folle GA, Drets ME (2002) Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutat Res* 504:17–36
- Okorokov AL, Orlova EV (2009) Structural biology of the p53 tumor suppressor. *Curr Opin Struct Biol* 19:197–202
- Pala FS, Moquet JE, Edwards AA, Lloyd DC (2001) In vitro transmission of chromosomal aberrations through mitosis in human lymphocytes. *Mutat Res* 474:139–146
- Paul SFD, Venkatachalam P, Jeevanram RK (1997) A comparative study of synchronized and conventional culture methods on the micronucleus dose-response curve. *Mutat Res* 391:91–98
- Prasanna PGS, Kolanko CJ, Rippeon TL, Loats H, Reeves GI, Blakely WF (1997) Use of the premature chromosome condensation assay for biodosimetry applications. In: Court LA, Lallemand J (eds) *L'Homme Blessé, The Proceedings, Radiological Accident: The Injured Victim. Logistic, Diagnostic, and Therapeutic Approaches in Case of Accidental Irradiation and Contamination*. Le Centre de Recherche du Service de Santé des Armées, l'Institut de Protection et de Sécurité Nucléaire, l'Électricité de France, pp 157–169
- Prasanna PGS, Martin PR, Subramanian U, Berdychevskii R, Krasnopolsky K, Duffy KL, Manglapas GL, Landauer MR, Srinivasan V, Boreham D, Hagan MP, Jinaratana V, Blakely WF (2005) Cytogenetic Biodosimetry for radiation disasters: recent advances. Published in the proceedings of the NATO Human Factors and Medicine (HFM) Panel Research Task Group (RTG) 099 Meeting, "Radiation Bioeffects and Countermeasures". Bethesda, USA
- Prise KM, Pinto M, Newman HC, Michael BD (2001) A review of studies of ionizing radiation-induced double-strand break clustering. *Radiat Res* 156:572–576
- Purrott RJ, Vulpis N, Lloyd DC (1981) Chromosome dosimetry: the influence of culture media on the proliferation of irradiated and unirradiated human lymphocytes. *Radiat Prot Dosim* 1(3):203–208
- Ramírez MJ, Surrallés J, Puerto S, Creus A, Marcos A (1999) Low persistence of radiation-induced centromere positive and negative micronuclei in cultured human cells. *Mutat Res* 440:163–169
- Ravi M, Preetha B, Govind PM, Deepa PV, Sulagna G, Paul SFD (2007) Optimizing premature chromosome condensation (PCC) of human lymphocytes by somatic cell hybridization to study primary DNA damages. *Int J Hum Genet* 7(4):319–323
- Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A (2008) Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat* 9:402–412
- Rodrigues AS, Oliveira NG, Gil OM, Léonard A, Rueff J (2005) Use of cytogenetic indicators in radiobiology. *Radiat Prot Dosim* 115(1–4):455–460
- Rodríguez P, Montoro A, Barquinero JF, Caballín MR, Villaseca I, Barrios L (2004) Analysis of translocations in stable cells and their implications in retrospective biological dosimetry. *Radiat Res* 162:31–38
- Rössner P Jr, Chvátalová I, Schmuczerova J, Milcova A, Rössner P, Sram RJ (2004) Comparison of p53 levels in lymphocytes and in blood plasma of nuclear power plant workers. *Mutat Res* 556:55–63
- Rothkamm K, Gunasekara K, Warda SA, Krempel A, Löbrich M (2008) Radiation-induced *HPRT* mutations resulting from mis-rejoined DNA double-strand breaks. *Radiat Res* 169:639–648
- Roy L, Sorokine-Durm I, Voisin P (1996) Comparison between fluorescence in situ cytogenetics for dicentric scoring: a first-step validation for the use of FISH in biological dosimetry. *Int J Rad Biol* 70(6):665–669
- Roy L, Buard V, Delbos M, Durand V, Paillote N, Grégoire E, Voisin P (2004) International intercomparison for criticality dosimetry: the case of biological dosimetry. *Radiat Prot Dosim* 110(1–4):471–476
- Saenko AS, Zamulaeva IA, Smirnova SG, Orlova NV, Selivanova EI, Matveeva NP, Kaplan MA, Nugis VY, Nadezhina NM, Tsyb A (2000) Determination of somatic mutant frequencies at glycophorin A and T-cell receptor loci for biodosimetry of acute and prolonged irradiation. *Appl Rad Isot* 52:1145–1148
- Savage JRK, Simpson PJ (1994) On the scoring of FISH-"painted" chromosome exchange aberrations. *Mutat Res* 307:345–353
- Savage JRK, Tucker JD (1996) Nomenclature systems for FISH-painted chromosome aberrations. *Mutat Res* 366:153–161
- Silva-Barbosa I, Pereira-Magnata S, Amaral A, Sotero G, Melo HC (2005) Dose assessment by quantification of chromosome aberrations and micronuclei in peripheral blood lymphocytes from patients exposed to gamma radiation. *Genet Mol Biol* 28(3):452–457
- Sorokine-Durm I, Durand V, Delbos M, Le Baron L, Roy L, Voisin P (2000) A French view on FISH painting as a biodosimeter. *Radiat Prot Dosim* 88(1):35–44
- Stankeová S, Crompton NE, Blattmann H, Theiler P, Emery GC, Roos M, Kaser-Hotz B (2003) Apoptotic response of irradiated T-lymphocytes. *Strahlenther Onkol* 11:779–786
- Stepanova E, Karmaus W, Naboka M, Vdovenko V, Mousseau T, Shestopalov VM, Vena J, Svendsen E, Underhill D, Pastides H (2008) Exposure from the Chernobyl accident had adverse effects on erythrocytes, leukocytes, and, platelets in children in

- the Narodichesky region, Ukraine: A 6-year follow-up study. *Environ Health* 7(21):1–13
- Steffler C (2007) The ICRP 2007 recommendations. *Rad Prot Dosim* 127(1–4):2–7
- Stricklin D, Jaworska A, Arvidsson E (2007) Method for efficient establishment of technical Biodosimetry competence. *Rad Meas* 42:1114–1118
- Suzuki K, Ojima M, Kodama S, Watanabe M (2006) Delayed activation of DNA damage checkpoint and radiation-induced genomic instability. *Mutat Res* 597:73–77
- Tawn EJ, Whitehouse CA (2005) Chromosome intra- and inter-changes determined by G-banding in radiation workers with in vitro exposure to plutonium. *J Rad Prot* 25:83–88
- Thierens H, Vral A, Morthier R, Aoual B, De Ridder L (2000) Cytogenetic monitoring of hospital workers occupationally exposed to ionizing radiation using the micronucleus centromere assay. *Mutagen* 15(3):245–249
- Thomas P, Umegaki K, Fenech M (2003) Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagen* 18(2):187–194
- Tucker JD (1998) Use of chromosome translocations for measuring prior environmental exposures in humans. *Biomark: Med Workplace Appl* 117–132
- Tucker JD (2001) FISH cytogenetics and the future of radiation Biodosimetry. *Rad Prot Dosim* 97(1):55–60
- Tucker JD (2008) Low-dose ionizing radiation and chromosome translocations: a review of the major considerations for human biological dosimetry. *Mutat Res* 659:211–220
- Tucker JD, Morgan WF, Awa AA, Bauchinger M, Blakey D, Cornforth MN, Littlefield LG, Natarajan AT, Shasserre C (1995a) A proposed system for scoring structural aberrations detected by chromosome painting. *Cytogenet Cell Genet* 68:211–221
- Tucker JD, Morgan WF, Awa AA, Bauchinger M, Blakey D, Cornforth MN, Littlefield LG, Natarajan AT, Shasserre C (1995b) PAINT: a proposed nomenclature for structural aberrations detected by whole chromosome painting. *Mutat Res* 347:21–24
- UNSCEAR (United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation) (2000) Sources, effects and risks of ionizing radiation: UNSCEAR 2000 report to the general assembly, with scientific annexes, vol 1. United Nations, New York, pp 499–654
- Virsik-Peuckert RP, Harder D (1985) Temperature and formation of radiation-induced chromosome aberrations. II. The temperature dependence of lesion repair and lesion interaction. *Int J Rad Biol* 49(4):673–681
- Voisin P, Barquinero F, Blakely B, Lindholm C, Lloyd D, Luccioni C, Miller S, Palitti E, Prasanna PGS, Stephan G, Thierens H, Turai I, Waselenko JK, Macvittie TJ, Blakely WF, Pesik N, Wiley AL, Dickerson WE, Tsu H, Confer DL, Coleman CN, Seed T, Lowry P, Armitage JO, Dainiak N (2002) Medical management of the acute radiation syndrome: recommendations of the strategic national stockpile radiation working group. *Ann Intern Med* 140:1037–1051
- Voisin P, Roy L, Hone PA, Edwards AA, Lloyd D, Stephan G, Romm H, Groer PG, Brame R (2004a) Criticality accidental dosimetry by chromosomal analysis. *Rad Prot Dosim* 110(1–4):443–447
- Voisin P, Roy L, Benderitter M (2004b) Why can't we find a better biological indicator of dose? *Rad Prot Dosim* 112(4):465–469
- Wanga ZZ, Li WJ, Zhi DJ, Gao QX, Qu Y, Wang BQ (2009) Prematurely condensed chromosome fragments in human lymphocytes induced by high doses of high-linear-energy-transfer irradiation. *Mutat Res* 679:9–12
- Waselenko JK, Macvittie TJ, Blakely WF, Pesik N, Wiley AL, Dickerson WE, Tsu H, Confer DL, Coleman CN, Seed T, Lowry P, Armitage JO, Dainiak N (2004) Medical management of the Acute Radiation Syndrome: Recommendations of the strategic national Stockpile radiation working group. *Ann Intern Med* 140(12):1037–1051
- Wilkins RC, Romm H, Kao CT, Awa AA, Yoshida MA, Livingston GK, Jenkins MS, Oestreicher U, Pellmar TC, Prasanna PGS (2008) Interlaboratory comparison of the dicentric chromosome assay for radiation biodosimetry in mass casualty events. *Rad Res* 169:551–560
- Wojcik A, Kowalska M, Bouzyk E, Buraczewska I, Kobialko G, Jarociewicz N, Szumiel I (2000) Validation of the micronucleus-centromere assay for biological dosimetry. *Genet Mol Biol* 23(4):1083–1085
- Wojcik A, Lloyd D, Romm H, Roy L (2009) Biological dosimetry for triage of casualties in a large-scale radiological emergency: capacity of the EU member states. *Rad Prot Dosim* 1–5
- Yoshida MA, Hayata I, Tateno H, Tanaka K, Sonta S, Kodama S, Kodama Y, Sasaki MS (2007) The Chromosome network for biodosimetry in Japan. *Rad Meas* 42:1125–1127
- Yusuf I, Fruman DA (2003) Regulation of quiescence in lymphocytes. *Trends Immunol* 24(7):380–386
- Zeljezic D, Garaj-Vrhovac V (2006) Fluorescence in situ hybridization in detecting chromosome aberrations caused by occupational exposure to ionizing radiation. *Arh Hig Rada Toksikol* 57:65–68

Análise Citogenética na Investigação de Incidentes Radiológicos

Marcela Maria Pereira de Lemos Pinto, Ademir de Jesus Amaral

Laboratório de Modelagem e Biodosimetria Aplicada, Recife, PE
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Resumo

Análise citogenética na investigação de incidentes radiológicos

Em 2005, a NR 32 – Segurança e Saúde no Trabalho de Serviço de Saúde – regulamentou a análise de marcadores citogenéticos modificados pela ação das radiações ionizantes, como método de monitoração do nível de exposição individual. Todavia, a carência de informações acerca do tema tem gerado a subutilização dessa técnica, sobretudo, em termos de investigação de exposições excessivas às radiações ionizantes. Nesse contexto, o objetivo deste artigo foi discutir questões de interesse acerca da dosimetria citogenética, tais como relação dose-efeito, critérios de análise para contagem das alterações cromossômicas, métodos de coloração, custos operacionais associados aos ensaios biodosimétricos e suas aplicações.

Palavras-chave: NR 32, dosimetria citogenética, dicêntricos, translocações e micronúcleos

Summary

Cytogenetic analyses in the investigation of radiological incidents

In 2005, the NR-32 Regulatory Standard – Safety and health at work in health service – regulated the use of cytogenetic biomarkers related to ionizing radiation, as method to access radiation levels for individual monitoring. However, the lack of information about this subject has been responsible to underutilization of this technique, particularly in terms of investigation of radiation individual overexposures. In this context, the aim of this work was to present issues of interest related to cytogenetic dosimetry, such as dose-effect relationship, set up for chromosomal aberrations scoring, staining methods, evaluation of costs and applications.

Keywords: NR-32, cytogenetic dosimetry, dicentric, translocations and micronuclei

Introdução

O Ministério do Trabalho e Emprego aprovou em 2005 a Norma Regulamentadora 32 (NR 32) – Segurança e Saúde no Trabalho de Serviço de Saúde – que estabelece procedimentos a serem seguidos no sentido de garantir a integridade física e mental do trabalhador da área de saúde.

Dentre os vários aspectos abordados, esta norma inclui a dosimetria citogenética como ferramenta de monitoração individual em caso de suspeita ou ocorrência de exposição individual acidental às radiações ionizantes, a critério médico (1).

Entretanto, tem-se verificado que o tema é ainda pouco difundido entre os profissionais de saúde, sendo esta a principal razão para que a dosimetria citogenética não seja, por exemplo, prescrita por médicos do trabalho em casos de suspeita de exposição acidental. Em paralelo, raros são os laboratórios que dispõem de infraestrutura e mão-de-obra capacitada para a realização de análises citogenéticas para fins de investigação de acidentes radiológicos.

Nesse contexto, o objetivo deste artigo é abordar os principais aspectos relacionados à dosimetria citogenética, suas metodologias de análise e importância médico-legal, no auxílio

de avaliações de exposição individual às radiações ionizantes.

Efeitos biológicos das radiações ionizantes

As radiações ionizantes (RIs) são um fator de risco real à saúde, capazes de induzir uma série de modificações orgânicas por meio da quebra de ligações físico-químicas dos componentes primários da célula, como resultado de ionizações dos átomos intracelulares (2).

Na célula, o sítio-alvo de ação das RIs é a molécula do DNA, cuja interação promove uma série de modificações estruturais em sua cadeia polipeptídica. Dentre estas, a formação

de quebras duplas ou DSBs ("Double Strand Breaks") é considerada o tipo de dano mais severo, responsável pela produção de grande parte dos efeitos biológicos radioinduzidos (3).

Falhas no reparo das DSBs podem levar ao aparecimento de modificações na estrutura da cromatina e, consequentemente, de anomalias ao nível cromossômico, como por exemplo, cromossomos dicêntricos, fragmentos acêntricos e translocações (4).

O estudo das alterações cromossômicas (ACs) e de seus subprodutos tem sido extensivamente utilizado e validado na dosimetria citogenética para detecção de exposições excessivas às RIs e estimativa da dose absorvida em células linfocitárias (5).

A dose absorvida é a grandeza física básica utilizada nos programas de radioproteção na avaliação e gerenciamento dos riscos relacionados à interação das RIs com a matéria viva, sendo definida como a energia média depositada num certo volume irradiado. No Sistema Internacional (SI), a unidade da dose absorvida é o gray (1 Gy = 1 J/kg) (6).

Alterações cromossômicas e micronúcleos em células linfocitárias

A escolha dos linfócitos como modelo biológico do nível de exposição individual baseia-se no fato de que são células de fácil obtenção (punção venosa), sensíveis à radiação, que retêm as lesões produzidas pela ação das RIs em seu DNA, por estarem predominantemente na fase quiescente do ciclo celular (G0) (7, 8).

Ao nível cromossômico, o acesso aos danos radioinduzidos é obtido através do cultivo *in vitro* das células linfocitárias, cujas alterações são classificadas em instáveis e estáveis, de acordo com o tempo médio de vida e a viabilidade da célula portadora (9, 10).

Os tipos mais comuns de alterações cromossômicas instáveis (ACIs) são dicêntricos (~60 %), cromossomos em anel (10 %) e fragmentos acêntricos (Figura 1). Destas, os cromossomos dicêntricos são considerados a assinatura biológica das RIs devido à sua elevada radioespecificidade e baixa incidência na população (1-2 dicêntricos/1.000 células).

As ACIs exibem um caráter transitório em virtude do grau de rearranjos e do tipo de deleção ocorrido na conformação original dos cromossomos (11, 12).

Em geral, cerca de 50% das células portadoras são naturalmente eliminadas a cada ciclo mitótico (M1, M2, M3 etc.), por meio de um processo denominado de apoptose ou morte celular programada (13).

A apoptose é acionada pela redução do número diploide das células-filhas ao final da mitose, resultado da dispersão de fragmentos acêntricos no meio extracelular e da ruptura de pontes nucleoplásmicas, geralmente formadas por problemas na segregação dos cromossomos dicêntricos ao final da telófase (citocinese).

Dessa forma, o intervalo de tempo entre a irradiação e o início dos ensaios biodosimétricos não deve exceder um período superior a três meses, para que não haja perda de

informação e subestimação da dose absorvida (14).

Em contrapartida, a presença de alterações cromossômicas estáveis (ACEs) não é necessariamente letal à célula, de modo que os elementos resultantes de eventos de inserção e de rearranjos recíprocos e não recíprocos são continuamente transmitidos às células-filhas, a partir das células-tronco hematopoiéticas (15, 16).

Dentre as ACEs, as translocações recíprocas persistem por um tempo maior nos linfócitos irradiados, ao longo do processo de renovação celular, o que as torna biomarcadores de exposição mais apropriados que os dicêntricos em investigações retrospectivas (17).

A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) é comumente utilizada na detecção de segmentos translocados, através do emprego de sondas cromossômicas específicas (18, 19).

A Figura 2 é um exemplo de aplicação do FISH em uma metáfase linfocitária normal, onde a estrutura dos pares cromossômicos marcados está preservada.

Na figura anterior, caso fosse observada permuta entre os segmentos dos pares marcados, os cromossomos investigados teriam suas estruturas alteradas, caracterizando o fenômeno de translocação recíproca.

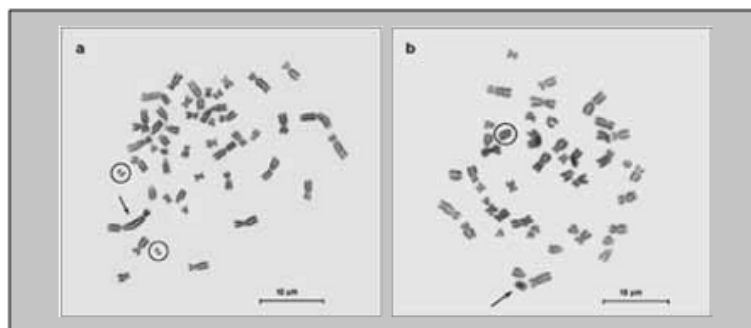


Figura 1. Cromossomo dicêntrico (a) e em anel (b) em metáfases linfocitárias irradiadas. Os fragmentos acêntricos aparecem em destaque

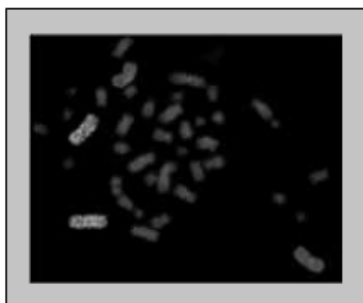


Figura 2. Metáfase linfocitária hibridizada com sondas para os pares 2 (verde) e 3 (vermelho)

Micronúcleos

Os micronúcleos (MN) são um subproduto da perda ou fragmentação cromossômica, formados por falhas no mecanismo de reparo do DNA e pela não disjunção das cromátides-irmãs (defeitos nas fibras do fuso mitótico e cinetócoros danificados), respectivamente (20).

Ao final da divisão celular, o material genético perdido ou fragmentado volta a descondensar-se e adquire morfologia ovoide semelhante à do núcleo principal da célula, que pode ser visualizada através da adição da citocalasina-B ao meio de cultura (21).

A citocalasina-B atua no bloqueio da citocinese, impedindo a separação das células-filhas e assim gerando unidades bi, tri ou polinucleadas (Figura 3).

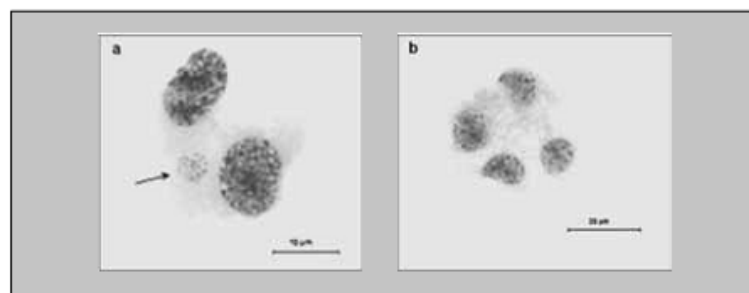


Figura 3. Células linfocitárias bi (a) e polinucleadas (b) geradas após a adição de citocalasina-B em meio de cultivo. A presença de micronúcleo está indicada pela seta na célula binucleada (a)

Assim como os dicêntricos, os MNs são eliminados ao longo das divisões celulares e por isso sua aplicação é restrita a exposições recentes. Contudo, é importante destacar que os MNs podem ser gerados tanto pela ação de agentes genotóxicos clastogênicos (e.g. radiações ionizantes) quanto aneugênicos (e.g. agrotóxicos e pesticidas) e, portanto, não são tão radioespecíficos (22).

Estabelecimento da relação dose-efeito

A correlação existente entre o número de aberrações produzida *in vivo* e a frequência obtida *in vitro* em amostras de sangue uniformemente irradiadas foi inicialmente observada em estudos experimentais, realizados em indivíduos acidentalmente expostos às RIs (11, 23).

A partir daí, curvas dose-efeito foram construídas em função das características físicas da radiação incidente (alcance e poder de ionização), das condições de exposição (aguda ou crônica) e do tipo de irradiação (parcial ou de corpo inteiro).

Isto porque, para uma mesma dose, radiações com diferentes LET (transferência linear de energia) apresentam distintas eficiências biológicas na produção de quebras cromossômicas e na distribuição dessas alterações

nas células afetadas (Figura 4).

Para radiações de baixo LET (e.g. radiação gama e raios-X), que possuem alto poder de penetração e cuja ionização se dá de forma espaçada, a curva dose-efeito descreve uma equação polinomial do 2º grau denominada linear-quadrática:

$$Y = A + \alpha D + \beta D^2$$

Onde: "Y" é a frequência do biomarcador (dicêntricos, translocações ou MNs) nas células analisadas

"A" é a frequência de aberrações devido à radiação natural

" α " e " β " são os coeficientes linear e quadrático, respectivamente

"D" é a dose de radiação

Para radiações de alto LET (e.g. nêutrons, partículas alfa e elementos de fissão), que possuem alto poder de ionização e cuja deposição de energia ocorre de forma densa ou localizada, o componente quadrático desaparece e a curva passa a apresentar uma resposta linear ($Y = A + \alpha D$).

Além do LET, o intervalo de tempo entre cada exposição precisa ser considerado na obtenção da relação dose-efeito, visto que altas taxas de dose (dose/unidade de tempo) implicam em maior probabilidade de ocorrência de danos biológicos, como resultado de uma menor eficiência do sistema de reparo (24).

Na prática, observa-se que para as radiações de baixo LET a diminuição da taxa de dose ou fracionamento da dose total acarreta na gradativa redução do número de ACs e MNs por célula, de tal forma que a curva dose-efeito passa a ser linear. Este raciocínio não é, todavia, aplicável às radiações de alto LET, que naturalmente já exibem esse tipo de resposta.

Preferencialmente, cada laboratório deve proceder com as etapas necessárias ao processo de construção

da curva de calibração, através da contagem de um número suficiente de células, a fim de que a estimativa da dose de radiação absorvida alcance um limite de confiança de 95%.

Como regra geral, tem sido proposta a contagem de até 1.000 células linfocitárias na investigação de incidentes radiológicos que envolvam baixas doses (≤ 1 Gy). Esse número, entretanto, pode ser significativamente reduzido caso a dose de radiação recebida seja superior a 1 Gy (25).

É importante lembrar que na execução dos ensaios biodosimétricos devem ser seguidas as boas práticas laboratoriais, além de que, é fundamental que sejam realizadas periódicas intercomparações dos resultados obtidos, com base nos critérios de contagem adotados por cada laboratório (26, 27).

Técnicas citogenéticas clássicas e moleculares utilizadas na dosimetria citogenética

Na dosimetria citogenética, o método de rotina empregado na análise das ACIs e MN é a coloração convencional com Giemsa, que cora uniformemente toda a extensão dos cromossomos e o interior dos núcleos interfásicos.

Embora a coloração Giemsa seja

simples, de rápida execução e de baixo custo associado, a identificação de dicêntricos é por vezes laboriosa, principalmente quando há sobreposição das cromátides-irmãs dos cromossomos metafásicos. Por outro lado, este tipo de coloração não permite a distinção dos MNs quanto à sua origem de formação (aneugênica ou clastogênica) (28).

Com a utilização do Bandeamento Ce da Hibridização *in situ* fluorescente (FISH), a identificação da região centromérica dos dicêntricos, bem como a exclusão dos MNs aneugênicos, pôde ser realizada de forma mais rápida e precisa, contribuindo assim para uma maior precisão das análises dosimétricas (29, 30).

Adicionalmente, a técnica de FPG (*Fluorescence plus Giemsa*) tem permitido restringir a contagem de células somente para aquelas que estão no primeiro ciclo de divisão (M1), através da adição da 5-Bromo-2-desoxiuridina ou BrdU ao cultivo celular (31).

Na análise das ACEs, a técnica de bandeamento G foi inicialmente introduzida no intuito de se avaliar as modificações estruturais sofridas no DNA das células irradiadas, com base no padrão de bandas longitudinais de cada par cromossômico (32). Essa metodologia, entretanto, revelou-se

demasiadamente subjetiva e laboriosa, o que inviabilizou sua aplicação na triagem de grandes populações (33, 34).

Atualmente, as ACEs são analisadas por FISH, um procedimento mais simples e direto, que utiliza sondas específicas para os cromossomos do grupo A (pares 1, 2 e 3) e B (4 e 5). Os cromossomos-alvo são escolhidos com base na hipótese de que a frequência de translocações está diretamente relacionada ao conteúdo de DNA de cada cromossomo (35).

Considerando que ainda não há consenso a respeito dessa teoria, o emprego do FISH multicolor ou SKY (*Spectral Karyotyping*) tem ganhado força no campo dosimétrico, pois possibilita a marcação de todos os pares cromossômicos, a detecção de rearranjos múltiplos, envolvendo dois ou mais cromossomos, e de alterações mínimas, produzidas normalmente após altas doses de radiação (36, 37).

A Tabela 1, adaptada de Léonard et al. (2005) e Fernandes et al. (2008), resume as vantagens e limitações de cada técnica com relação ao tempo, custo e precisão apresentados nos ensaios biodosimétricos.

Uso da dosimetria citogenética em incidentes radiológicos

Exposições acidentais

Acidentes que envolvem exposição aguda de grande parte do corpo (> 50 %), a altos níveis de radiação, estão comumente associados a uma série de manifestações clínicas adversas, tais como febre, náuseas, vômitos e diarreia. Por essa razão, os indivíduos afetados precisam ser rapidamente diagnosticados e tratados conforme a dose de radiação absorvida (38).

Quando a coleta de sangue ocorre até três meses após o incidente, o

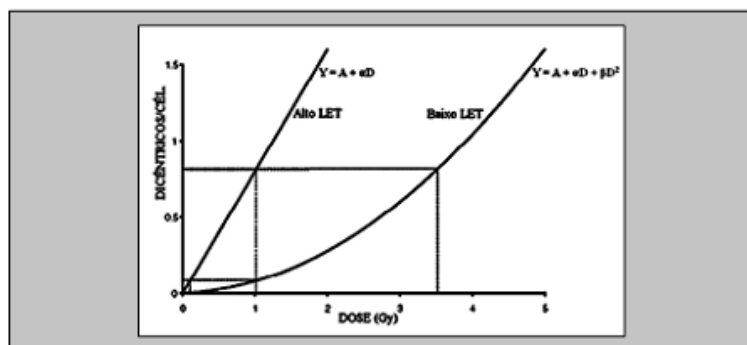


Figura 4. Curva dose-efeito com relação à qualidade da radiação (24)

Tabela 1. Relação custo-benefício relativa às técnicas citogenéticas avaliadas (11, 29)

Método	Biomarcador	Tempo de execução	Tempo de análise	Custos	Precisão
Coloração convencional	Dicêntricos Micronúcleos	+	+++	+	++
Bandeamento C	Dicêntricos Micronúcleos	++	+	++	+++
FPG	Dicêntricos	++	++	++	+++
Bandeamento G	Translocações	+	++++	++	++
FISH	Dicêntricos Micronúcleos Translocações	++++	++	+++	++++
SKY	Translocações	++++	+	++++	++++

+ Baixo; ++ Médio; +++ Alto; ++++ Elevado

Tabela 2. Características dos ensaios biodosimétricos (40, 41, 42)

Biomarcador	Nível basal	Cultivo celular	Contagem de células	Tempo de análise	Limite de detecção de dose	Técnicas de análise citogenética
Dicêntricos	1-2 em 1.000 céls	48-51 h	500 – 1.000 céls.	4-5 dias	0,1-5 Gy	Coloração convencional Bandeamento C Fish
Micronúcleos	~ 8 em 1.000 céls	48 h	1.000 céls.	4 dias	0,3-5 Gy	Coloração convencional Bandeamento C Fish
Translocações	2-0 em 1.000 céls	72 h	100 - 500 céls.	2-3 dias	0,25-2 Gy	Bandeamento C Fish Sky

método de referência, amplamente validado como biomarcador do nível de exposição individual, é a contagem do número de dicêntricos (13, 14).

No entanto, se o incidente tiver envolvido centenas ou milhares de pessoas, a frequência de micronúcleos pode ser utilizada primeiramente como um método de triagem, visto que é um biomarcador de análise mais simples e rápida que os dicêntricos (28, 39).

Após períodos prolongados (>3 meses), o uso de translocações na dosimetria retrospectiva representa mais fidedignamente a dose absorvida (32). Esta metodologia, entretanto, não é recomendada para indivíduos com idade avançada, pois a produção de

translocações também é afetada por fatores como senescência, tabagismo e pela ação de agentes químicos, como por exemplo, agrotóxicos (42).

Exposições ocupacionais

A maior parte dos incidentes ocupacionais está associada a exposições crônicas não uniformes com baixas doses de radiação, que resultam na diminuição do número de ACs nas células analisadas em relação à frequência esperada após uma exposição aguda, para a mesma dose (11). Nesses casos, para que a dose absorvida não seja subestimada, extrapolações matemáticas são necessárias.

Em geral, os métodos propostos por Dolphin (Qdr) e por Lea e Ca-

tcheside (Função G[x]) são utilizados para corrigir a heterogeneidade da irradiação e a influência da taxa de dose, respectivamente (24).

Por outro lado, se as radiações ionizantes atingirem apenas uma pequena fração do corpo (< 10 %), a dosimetria citogenética será ineficaz na avaliação dosimétrica, uma vez que o número de células irradiadas é desprezível.

Na Tabela 2, são apresentadas as particularidades de cada ensaio biodosimétrico, incluindo o limite de detecção de dose para radiações de baixo LET.

Como discutido, o emprego da dosimetria citogenética como ferramenta de investigação em saúde

ocupacional é particularmente importante em questões médico-legais (perícias trabalhistas) e no controle de qualidade da dosimetria física, onde a monitoração individual é realizada com auxílio de dispositivos sensíveis à radiação, genericamente denominados de dosímetros (43).

Isto porque, enquanto os dosímetros físicos medem grandezas operacionais que são utilizadas para o estabelecimento de níveis de referência, a fim de limitar a probabilidade de ocorrência de efeitos biológicos; os dosímetros biológicos são o produto da interação das RIs e por isso refletem com maior precisão os efeitos resultantes da exposição a esse agente genotóxico (44).

Laboratórios de dosimetria citogenética

No Brasil, o Instituto de Radioproteção e Dosimetria (IRD) é o instituto de referência nacional em termos de aplicação da dosimetria citogenética para fins de proteção do trabalhador.

Em contrapartida, o Laboratório de

Modelagem e Biodosimetria Aplicada (LAMBDA), situado no Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco, desenvolve atividades de pesquisa e inovação em dosimetria citogenética, objetivando a otimização do monitoramento de indivíduos expostos às RIs, em condições normais – como em aplicações médicas e exposições ocupacionais – ou em situações acidentais.

Nesse sentido, resultados promissores vêm sendo obtidos em complementaridade às técnicas biodosimétricas convencionais através de técnicas moleculares, tais como citometria de fluxo e PCR - *Polymerase Chain Reaction* (45, 46, 47, 48).

Conclusão

A dosimetria citogenética é uma importante ferramenta na avaliação de exposição individual às radiações ionizantes, tendo se tornado uma exigência normativa conforme estabelece a NR 32 – Segurança e

Saúde no Trabalho de Serviço de Saúde na monitoração individual. Todavia, o pouco conhecimento de seus aspectos metodológicos e aplicações tem resultado na subutilização dos biomarcadores citogenéticos na investigação de incidentes radiológicos.

Atividades de difusão de conhecimento e de pesquisas associados à dosimetria citogenética em muito auxiliarão os profissionais de Segurança e Saúde Ocupacional, em uma das etapas-chave do gerenciamento das práticas que envolvem exposição individual às radiações ionizantes: o controle de exposições a níveis considerados seguros e a tomada de decisão em casos de acidentes radiológicos.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Correspondências para:

Marcela Maria P. L. Pinto

Referências Bibliográficas

1. Ministério do Trabalho e Emprego. Portaria GM nº 485. Norma Regulamentadora N° 32. Segurança e Saúde no Trabalho em Estabelecimentos de Saúde. Diário Oficial da União. Brasília: 11 de novembro de 2005.
2. Hande MP, Azizova TV, Burak IE, Khokhryakov VF, Geard CR, Brenner DJ. Complex chromosome aberrations persist in individuals many years after occupational exposure to densely ionizing radiation: an mFISH study. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 44:1-9, 2005.
3. Prise KM, Pinto M, Newman HC, Michael BD. A review of studies of ionizing radiation-induced double-strand break clustering. *Radiation Research*, 156: 572-576, 2001.
4. Bonner WM. Low-dose radiation: thresholds, bystander, effects, and adaptive responses. *National Academic Sciences*, 100 (10):4973-4975, 2003.
5. Bonassi S, Au WW. Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. *Mutation Research*, 511: 73-86, 2002.
6. International Commission on Radiological Protection – ICRP Recommendations of the International Commission on Radiological Protection, ICRP-60, Pergamon Press, Oxford, UK, 1991.
7. Stankeová S, Crompton NE, Blattmann H, Theiler P, Emery GC, Roos M, Kaser-Hotz B. Apoptotic response of irradiated lymphocytes. *Strahlentherapie und Onkologie*, 11: 779-786, 2003.
8. Yusuf I, Fruman DA. Regulation of quiescence in lymphocytes. *Trends in Immunology*, 24 (7):380-386, 2003.

9. Obe G, Pfeiffer P, Savage JR, Johannes C, Goedecke W, Jeppesen P, Natarajan AT, Martínez-López W, Folle GA, Drets ME. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutation Research*, 504:17-36, 2002.
10. Garce-Sagredo JM. Fifty years of cytogenetics: a parallel view of the evolution of cytogenetics and genotoxicology. *Biochimica Et Biophysica Acta*: 363-375, 2008.
11. Léonard A, Rueff J, Gerber GB, Léonard ED. Usefulness and limits of biological dosimetry based on cytogenetic methods. *Radiation Protection Dosimetry*, 115 (1-4): 449-454, 2005.
12. Rodrigues AS, Oliveira NG, Gil OM, Léonard A, Rueff J. Use of cytogenetic indicators in radiobiology. *Radiation Protection Dosimetry*, 115 (1-4): 455-460, 2005.
13. Polo FS, Maquet JE, Edwards AA, Lloyd DC. In vitro transmission of chromosomal aberrations through mitosis in human lymphocytes. *Mutation Research*, 474: 139-146, 2001.
14. Belloni P, Meschini R, Lewinska D, Riboldi E. Apoptosis preferentially eliminates irradiated G0 human lymphocytes bearing dicentric chromosomes. *Radiation Research*, 169: 181-187, 2008.
15. Tucker JD. RISH cytogenetics and the future of radiation biodosimetry. *Radiation Protection Dosimetry*, 97 (1): 55-60, 2001.
16. Rodríguez P, Montoro A, Barquinero JF, Caballín MR, Millaesusa I, Barrios L. Analysis of translocations in stable cells and their implications in retrospective biological dosimetry. *Radiation Research*, 162: 31-38, 2004.
17. Edwards AA, Lindholm C, Darraudi F, Stephan G, Ramm H, Barquinero J, Barrios L. Review of translocations detected by RISH for retrospective biological dosimetry applications. *Radiation Protection Dosimetry*, 113 (4): 396-402, 2005.
18. Sorakine-Durm I, Durand V, Delbos M, Le Baron L, Roy L, Vétain P. A French view on RISH painting as a biodosimeter. *Radiation Protection Dosimetry*, 88 (1): 35-44, 2000.
19. Müller I, Gelnitz H, Braselmann H, Baumgartner A, Fasan A, Thomm R, Mölls M, Meineke V, Zitzelsberger H. Time-course of radiation-induced chromosomal aberrations in tumor patients after Radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 63 (4): 1214-1220, 2005.
20. Rench M, Holland N, Chang WP, Zeiger E, Bonassi S. The Human Micronucleus Project – An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research*, 428: 271-283, 1999.
21. Rench M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, 455: 81-95, 2000.
22. Bonassi S, Zhaor A, Ceppl M, Lando C, Chang WP, Holland N, Kirsh-Volders M, Zeiger E, Bon S, Barale R, Bigatti MR, Bolognesi C, Cebulski-Wasilewska A, Fabianova E, Fucic A, Hagmar L, Jakšic G, Martelli A, Migliore L, Mirkova E, Scarfi MR, Zjina A, Norppa A, Rench M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, 28 (3): 625-631, 2007.
23. Kawato T, Ito H, George K, Wu H, Culinotto FA. Chromosome aberrations induced by high-LET radiations. *Biological Sciences in Space*, 18 (4): 216-223, 2004.
24. International Atomic Energy Agency Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment. Vienna. (IAEA Technical Report Series; 405), 2001.
25. Lloyd DC, Edwards AA, Maquet JE, Guerrero-Carballo YC. The role of cytogenetics in early triage of radiation casualties. *Applied Radiation and Isotopes*, 52: 1107-1112, 2000.
26. International Standards Organization Radiation protection – Performance criteria for service laboratories performing biological dosimetry by cytogenetics. ISO 19238:2004 (E), ISO, Geneva, 21 pp, 2004.
27. Stricklin D, Jaworska A, Arvidsson E. Method for efficient establishment of technical biodosimetry competence. *Radiation Measurements*, 42: 1114-1118, 2007.
28. Fernandes TS, Amaral A, Cavalcanti MB, Braga LRP, Melo RAM. Unstable chromosome aberrations and micronuclei analyses in the biomonitoring of workers occupationally exposed to ionizing radiation. *International Journal of Low Radiation*, 3 (4): 299-309, 2006.
29. Fernandes TS, Lloyd D, Amaral A. A comparison of different cytological stains for biological dosimetry. *International Journal of Low Radiation*, 84 (8): 703-711, 2008.
30. Mestres M, Caballín MR, Barrios L, Ribas M and Barquinero JF. RBE of X rays of different energies: A cytogenetic evaluation by RISH. *Radiation Research*, 170: 93-100, 2008.
31. Roy L, Sorakine-Durm I, Vétain P. Comparison between fluorescence in situ cytogenetics for dicentric scoring: a first-step validation for the use of FISH in biological dosimetry. *International Journal of Radiation Biology*, 70 (6): 665-669, 1996.
32. Maquet JE, Edwards AA, Lloyd DC, Hane R. The use of RISH chromosome painting for assessment of old doses of ionizing radiation. *Radiation Protection Dosimetry*, 88 (1): 27-33, 2000.
33. Tucker JD. Use of chromosome translocations for measuring prior environmental exposures in humans. *Biomarkers: Medical and Workplace Applications*: 117-132, 1998.

34. Town EJ, Whitehouse CA. Chromosome intra- and inter-changes determined by G-banding in radiation workers with in vitro exposure to plutonium. *Journal of Radiation Protection*, 25: 83-88, 2003.
35. Lucas JN, Deng W. Views on issue in radiation biodosimetry based on chromosome translocations measured by FISH. *Radiation Protection Dosimetry*, 89 (1): 77-86, 2000.
36. Braselmann H, Kulka U, Baumgartner A, Eder C, Müller I, Rigel M, Zitzelsberger H. SKY and FISH analysis of radiation-induced chromosome aberrations: a comparison of whole and partial genome analysis. *Mutation Research*, 579: 124-133, 2005.
37. Zeljic D, Garaj-Vrhovac V. Fluorescence in situ hybridization in detecting chromosome aberrations caused by occupational exposure to ionizing radiation. *Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju*, 57: 65-68, 2006.
38. Woslenko JK, Macvittie TJ, Blakely WF, Pesik N, Wiley AL, Dickerson WE, Tsu H, Confer DL, Coleman CN, Seed T, Lowry R, Armitage JO, Dolnick N. Medical management of the Acute Radiation Syndrome: Recommendations of the strategic national Stockpile radiation working group. *Annals of Internal Medicine*, 140 (12): 1037-1051, 2004.
39. Silva-Barbosa I, Pereira-Magnata S, Amaral A, Sotero G, Melo HC. Dose assessment by quantification of chromosome aberrations and micronuclei in peripheral blood lymphocytes from patients exposed to gamma radiation. *Genetics and Molecular Biology*, 28 (3): 452-457, 2005.
40. Vaisin P, Roy L, Benderitter M. Why can't we find a better biological indicator of dose? *Radiation Protection Dosimetry*, 112 (4): 465-469, 2004.
41. Lloyd DC, Edwards AA, Szilinska M. The minimum detectable dose by biodosimetry in a radiation overexposure. In: Springer Netherlands (ed) *Radiation risk estimates in normal and emergency situations*. Chilton, UK, pp 253-258, 2006.
42. Tucker JD. Low-dose ionizing radiation and chromosome translocations: a review of the major considerations for human biological dosimetry. *Mutation Research*, 659: 211-220, 2008.
43. Amaral A. Trends in biological dosimetry: an overview. *Brazilian Achieves of Biology and Technology*, 45: 119-124, 2002.
44. Amaral A. Physical and biological dosimetry for risk perception in radioprotection. *Brazilian Achieves of Biology and Technology*, 48: 229-234, 2005.
45. Cavalcanti MB, Amaral AJ, Fernandes TS, Melo JA, Machado CGF. p53 protein expression levels as bioindicator of individual exposure to ionizing radiation by flow cytometry. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 309: 127-131, 2008.
46. Melo FCBC. Protocolo para Avaliação da Expressão do Gene ABL Sob Estresse Radiativo. 2008. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Energéticas Nucleares) - Universidade Federal de Pernambuco. Orientador: Ademir de Jesus Amaral.
47. Santos NRG. Protocolo para Avaliação do Efeito da Radiação Ionizante na Atividade da Glicoproteína-P. 2008. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Energéticas Nucleares) - Universidade Federal de Pernambuco, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Ademir de Jesus Amaral.
48. Freitas Silva R. Avaliação das populações de linfócitos T após exposição aguda à radiação ionizante. 2009. Monografia (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco. Orientadores: Ademir de Jesus Amaral e Mariana Brayner Cavalcanti.