



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

MARIANA ESPOSITO MENDES

**APLICAÇÃO DE TÉCNICAS CITOGENÉTICAS EM CENÁRIOS COMPLEXOS DE
EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO IONIZANTE**

Recife
2019

MARIANA ESPOSITO MENDES

**APLICAÇÃO DE TÉCNICAS CITOGENÉTICAS EM CENÁRIOS COMPLEXOS DE
EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO IONIZANTE**

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

Área de concentração: Genética

Orientador: Dra. Profa. Neide Santos

Coorientador: Dra. Fabiana Farias de Lima

Recife

2019

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso (CRB4/1728)

Mendes, Mariana Esposito

Aplicação de técnicas citogenéticas em cenários complexos de exposição à radiação ionizante / Mariana Esposito Mendes- 2019.

155 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Neide Santos

Coorientadora: Fabiana Farias de Lima

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Genética. Recife, 2019.

Inclui referências e anexos

1. Citogenética 2. Dosimetria biológica 3. Radiação ionizante I. Santos, Neide (orient.) II. Lima, Fabiana Farias de (coorient.) III. Título

572.8

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-175

MARIANA ESPOSITO MENDES

Aplicação de técnicas citogenéticas em cenários complexos de exposição à radiação ionizante

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Área de Concentração Genética, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Genética.

Aprovado em: 27/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dr. Neide Santos
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Ederson Akio Kido
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior
Universidade Federal de Pernambuco

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

Profa. Dra. Mônica Lúcia Adam
Universidade Federal de Pernambuco

Aos meus pais Alexandre (*in memoriam*) e Rosane.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Rosane e Alexandre (*in memoriam*), por todo o esforço feito durante minha vida escolar, acadêmica e pessoal, ensinando-me os valores morais e éticos. Eles me ensinaram a importância da educação.

Aos meus avôs, Maria do Socorro e Romildo (*in memoriam*) que, além de avós, foram meus exemplos de vida. Com eles conheci o sentido de família e o sentimento de querer muito bem o próximo.

A minha avó, Lúcia (*in memoriam*), que me fazia a criança mais feliz e especial do mundo.

A minha irmã, Catarina, que me acompanha desde antes do nascimento. Você é e sempre será minha inspiração, minha cópia circulante e ao meu cunhado Leonardo, por todo o apoio neste trabalho.

Ao, meu querido Rodolfo, pelo verdadeiro amor, crescido em meio de conversa, de respeito e de carinho. Obrigada por ser paciente e entender os períodos mais conturbados. Sem seu apoio nada disso seria possível também.

Aos meus familiares que me proporcionaram inúmeros momentos de alegria e, em especial, meus primos. Sempre farei de tudo para estar junto de vocês.

A todos os meus amigos que, ao longo desses anos, estiveram presentes. Obrigada por me fazer rir e também por enxugar minhas lágrimas. Já dizia Yoko Ono “Um sonho sonhado sozinho é um sonho. Um sonho sonhado junto é realidade”. Então, muito obrigada por me deixar sonhar junto com vocês.

A minhas orientadoras Prof.^a Dr.^a Neide Santos e Dr.^a Fabiana Farias de Lima pela confiança e pelo apoio ao meu trabalho. Muito obrigada por acreditarem na minha capacidade e por me darem forças para seguir em frente.

Aos meus queridos amigos do CRCN-NE, Alyne, Laís, Julianne e Júlio por todo apoio acadêmico e, em especial a Julianne e a Aida, pessoas maravilhosas que estavam sempre dispostas a resolver os meus problemas, vocês foram fundamentais no desenvolvimento deste estudo.

Ao Centro Regional de Ciências Nucleares, pela disponibilidade técnica na execução desse trabalho e ao corpo técnico, sempre prestativos e aptos a solucionar os problemas intrínsecos das atividades científicas. Preciso agradecer em especial a servidora Suy Hwang que foi uma parceira imprescindível para a execução deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética por me inspirarem a ser uma pessoa em eterna transformação e crescimento.

A CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

A dosimetria biológica tem o propósito de estimar a dose absorvida através de biomarcadores. Nestes biomarcadores são preferencialmente utilizados na estimativa de dose em casos de exposição de corpo inteiro uniforme. No entanto, as exposições acidentais geralmente ocorrem como corpo parcial ou exposição prolongada com baixa taxa de dose. Este estudo utilizou uma abordagem com foco no efeito biológico da baixa radiação LET por ensaios citogenéticos para aplicar em cenários complexos de exposição à radiação ionizante. As metodologias de alterações instáveis e micronúcleos foram utilizadas seguindo o manual da AIEA. Os testes u, D, L, Z, CR, Qdr, Dolphin e Bayesian foram utilizados para a estimativa da dose em casos de exposição parcial do corpo; e os testes ANOVA e Tukey serviram para estudar as baixas taxas de dose. O cromossomo dicêntrico revelou-se ser o biomarcador mais específico para a estimativa de dose em cenários complexos e de exposição de corpo inteiro. Os micronúcleos também apresentaram comportamento positivo para estes cenários, embora este tipo de biomarcador tenda a apresentar maior variação interindividual. Os achados reafirmam a necessidade de se estabelecer a taxa de dose envolvida no cenário de exposição, pois este fator é importante para a correta estimativa de dose. Portanto, a determinação de qual ensaio deve ser usado e a taxa de dose envolvida são imprescritíveis para qualquer estudo de dosimetria biológica.

Palavras-chave: Dosimetria biológica. Dicêntricos. Micronúcleos. Exposição parcial. Baixa taxa de dose.

ABSTRACT

Biological dosimetry is used to estimate the absorbed dose through biomarkers. These markers were developed primarily to estimate uniform whole-body exposure. However, accidental exposures usually occur as partial-body or prolonged exposure with low dose rate. This study used an approach focusing on biological effect of low LET radiation by cytogenetic assays to apply in complex scenarios of ionizing radiation exposure. The methodologies of unstable alterations and micronuclei were used following the manual of IAEA. The u, D, L, Z, CR, Qdr, Dolphin and Bayesian tests were used for dose estimation in cases of partial-body exposure; and the ANOVA and Tukey test for prolonged exposure with low dose rate. The dicentric's chromosome proves to be the most specific biomarker for dose estimation in both whole-body and complex exposure scenarios. The micronuclei also presented positive behavior for these scenarios, although this type of biomarker tends to have a greater interindividual variation. The findings reaffirm the necessity of establishing the dose rate involved in exposure scenario, because this factor is important for the correct dose estimation. Therefore, the determination of which assay to be used and the dose rate involved are imprescriptible for any biological dosimetry study.

Keywords: Biological dosimetry. Dicentrics. Micronucleus. Partial-body exposure. Low dose rate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Distribuição espacial média de eventos ionizantes para diferentes valores de LET em relação à estrutura de dupla hélice do DNA.....	19
Figura 2 –	A radiação ionizante causa a morte celular por múltiplos mecanismos	23
Figura 3 –	Excesso de ROS derivadas de fontes múltiplas dentro da célula.....	24
Figura 4 –	Alterações morfológicas e bioquímicas durante apoptose e necrose	26
Figura 5 –	Dose de radiação ionizante correspondente ao risco de morte por cuidados mínimos, de suporte e intensivos.....	28
Figura 6 –	Ilustração esquemática da distribuição espacial de DSBs.....	30
Figura 7 –	Resposta celular ao dano de DNA.....	31
Figura 8 –	Lesões de DNA induzido por radiação ionizante.....	32
Figura 9 –	Esquema simplificado para a principal via de BER.....	34
Figura 10 –	Mecanismo de reparo de NER em mamíferos.....	35
Figura 11 –	A exposição das células à radiação ionizante gera DSBs, SSBs e modificações de base.....	36
Figura 12 –	Localização no ciclo celular das diferentes técnicas de mutagênese.	41
Figura 13 –	Detecção dos biomarcadores com o tempo.....	42
Figura 14 –	Fotografia de célula metafásica com alterações cromossômicas instáveis.....	44
Figura 15 –	Formação dos MNs.....	45
Figura 16 –	Frequência de MNs espontâneos em linfócitos bloqueados por citocinese de 224 australianos saudáveis traçados em relação à idade do doador.....	46
Figura 17 –	Curvas de calibração construídas in vitro com diferentes qualidades de radiação.....	48
Figura 18 –	Curvas de efeito dose dos laboratórios participantes usadas para avaliação de dose com base em dicêntricos, dicêntricos e anéis ou nenhuma informação.....	125
Figura 19 –	Resultados da 2ª intercomparação para dose de 0,85 Gy.....	126
Figura 20 –	Resultados da 2ª intercomparação para dose de 2,7 Gy.....	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Os diversos tipos de interações e de consequências de acordo com o tipo de radiação ionizante.....	18
Tabela 2 –	Apresentações clássicas das sub-síndromes de ARS em vários limites de dose.....	27
Tabela 3 –	Correlação entre efeitos determinísticos após irradiação e a classificação de critérios comuns de terminologia para eventos adversos - Common Terminology Criteria for Adverse Events, CTCAE.....	29
Tabela 4 –	Relação entre a contagem absoluta de linfócitos e a dose absorvida após a exposição.....	40
Tabela 5 –	Coeficientes e características das curvas dose-respostas para MN	49
Tabela 6 –	Tipos de exposições a radiações ionizantes envolvendo seres humanos.....	51
Tabela 7 –	Acidentes com superexposição relatados em todo o mundo entre 1980 a 2013 com por setor e tipo de exposição.....	52
Tabela 8 –	Curvas de calibração dose-resposta relatadas na literatura para ^{60}Co com baixa taxa de dose.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP	<i>Apurinic/apyrimidinic sites</i> – Sítios Apurínicos ou Apirimidínicos
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i> – Proteína serina-treonina quinase
BER	<i>Base Excision Repair</i> – Reparo por Excisão de Base
CBMN	<i>Cytokinesis-Block Micronucleus</i> – Bloqueio de Micronúcleos por citocinese
CRCN-NE	Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste
D	Dose absorvida
DSB	<i>Double-strand Break</i> – Quebras de Fita Dupla
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> – Ácido Desoxirribonucleico
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridation</i> – Hibridização <i>in situ</i> Fluorescência
GGR	<i>Global Genome Repair</i> – Reparação Genômica Global
Gy	Gray - Unidade de Dose Absorvida
HR	<i>Homologous Recombination</i> – Recombinação Homóloga
IAEA	<i>International Atomic Energy Agency</i> – Agência Internacional de Energia Atômica
ICRP	<i>International Commission on Radiological Protection</i> – Comissão Internacional em Proteção Radiológica
LET	<i>Linear Energy Transfer</i> – Transferência Linear de Energia
MN	Micronúcleo(s)
MRN	Complexo formado pelas proteínas MRE11/RAD50/NBS1
NER	<i>Nucleotide Excision Repair</i> – Reparo por Excisão de Nucleotídeos
NHEJ	<i>Non-homologous end-Joining</i> – União de Extremidades Não-Homólogas
PBI	<i>Partial-body irradiation</i> – Irradiação parcial do corpo
RENEB	<i>Running the European Network of Biological and retrospective Physical dosimetry</i> – Gestão da Rede Europeia de Dosimetria Biológica e Física Retrospectiva
RBE	<i>Relative Biological Effectiveness</i> – Efetividade Biológica Relativa
RNS	<i>Reactive nitrogen species</i> – espécies de nitrogênio reativo

ROS	<i>Reactive oxygen species</i> – espécies de oxigênio reativo
SBS	<i>Single-strand Break</i> – Quebras de Fita Simples
SSA	<i>Single-strand Annealing</i> – Anelamento de Fita Simples
TCR	<i>Transcription-couple Repair</i> – Reparação de Transcrição Acoplada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1	RADIAÇÃO IONIZANTE.....	17
2.1.1	Interação da radiação ionizante com a matéria.....	17
2.1.2	Transferência linear de energia.....	19
2.1.3	Radiação e suas aplicações.....	19
2.1.4	Diferença de interação entre as radiações.....	21
2.1.5	Efetividade biológica relativa.....	22
2.2	PROCESSOS BIOLÓGICOS INDUZIDOS PELA RADIAÇÃO IONIZANTE.....	22
2.2.1	Estresse oxidativo.....	23
2.2.2	Consequências fisiológicas da radiação.....	25
2.2.3	Lesões radioinduzidas e efeitos genômicos.....	29
2.2.4	Mecanismos de reparo celular.....	32
2.2.5	Radiossensibilidade celular.....	37
2.4	DOSIMETRIA BIOLÓGICA.....	38
2.4.1	Linfócitos humanos: células-alvo da dosimetria biológica.....	39
2.4.2	Biomarcadores.....	41
2.4.3	Curvas de calibração dose-resposta.....	46
2.4.4	Cenários de exposição.....	50
2.4.5	Estimativa de dose em cenários complexos.....	53
3	OBJETIVOS.....	57
3.1	OBJETIVO GERAL.....	57
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	57
4	COMPARATIVE STUDY OF MICRONUCLEUS ASSAYS AND DICENTRIC PLUS RING CHROMOSOMES FOR DOSE ASSESSMENT IN PARTICULAR CASES OF PARTIAL-BODY EXPOSURE.....	58
5	CALIBRATION CURVES WITH LOW DOSE RATE ARE DIFFERENT IN TERMS OF DOSE ESTIMATION – A COMPARATIVE STUDY.....	90
6	DISCUSSÃO GERAL.....	118
7	CONCLUSÕES.....	130
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131

ANEXO A – CURRÍCULO LATTES.....	142
ANEXO B - CARTA DE ACEITE DO CAPÍTULO 1.....	151
ANEXO C - CARTA DE ENCAMINHAMENTO DO CAPÍTULO 2.....	152
ANEXO D – COMITÊ DE ÉTICA.....	153
ANEXO E – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	154

1 INTRODUÇÃO

A dosimetria biológica surgiu a partir da necessidade de quantificar a dose absorvida pelo organismo humano após incidentes envolvendo a radiação ionizante. Este tipo de dosimetria é utilizado em situações em que a dose absorvida de corpo inteiro é desconhecida ou incerta, como em caso de exposições acidentais ou ocupacionais. A dosimetria biológica também pode ser empregada nos casos em que a estimativa de dose por meio de dosimetria física não possa determinada ou, até mesmo, covalidar os dados obtidos por outros métodos dosimétricos.

A quantificação da dose absorvida é desenvolvida através de marcadores biológicos. Os biomarcadores que oferecem uma medida de dano mais sensível em relação à dose absorvida são as alterações cromossômicas. Dentre as técnicas desenvolvidas para este fim, estão a análise citogenética convencional de cromossomos dicêntricos e a técnica de micronúcleos.

Os estudos para estabelecer as frequências dos dicêntricos, igualmente dos micronúcleos, são feitos em linfócitos circulantes. Cada nível de dose absorvida se relaciona com uma determinada frequência média das alterações cromossômicas. Esta relação dose-resposta é conhecida como curva de calibração, que é simplesmente um modelo matemático de representação dose-resposta. As curvas devem ser previamente estabelecidas em cada laboratório de dosimetria biológica, tornando-se, assim, possível estimativa da dose absorvida pelo organismo exposto à radiação ionizante.

O uso das radiações ionizantes na área médica vem crescendo tanto no Estado de Pernambuco quanto na Região Nordeste, haja vista a implantação de centros de produção de radiofármaco (Pernambuco e Bahia) e serviços de radioterapia em pleno

funcionamento, totalizando 26 serviços registrados na Comissão Nacional de Energia Nuclear – CNEN distribuídos nos Estados da Região Nordeste. Nesta região também há uso de fontes de radiação ionizante em esterilização de materiais e alimentos e em serviços de prospecção de petróleo, entre outras atividades.

A Agência Internacional de Energia Atômica enfatiza que há variabilidades inter e intralaboratoriais que são relacionadas às diferenças entre os protocolos adotados pelos laboratórios biodosimétricos, além do estilo de vida da população. Por isso, qualquer região que tenha interesse no monitoramento radiológico necessita definir suas próprias curvas de calibração. Além disso, a Comissão Internacional de Proteção Radiológica recomenda a implementação de sistemas de proteção radiológica, que devem ser monitoradas e avaliadas periodicamente. As revisões periódicas são importantes para o aprendizado e a identificação de quaisquer áreas de melhoria pelos laboratórios.

Na dosimetria biológica, os estudos estão concentrados na análise de acidente ou incidentes envolvendo exposição à radiação de corpo inteiro, no entanto, a maior parte dos acidentes relatados envolveram indivíduos expostos em cenários complexos, ou seja o indivíduo foram exposto à radiação de modo não homogêneo. Os exemplos de cenários complexos de exposição são as irradiações parciais do corpo e irradiações prolongadas ou fracionadas. Portanto, este presente trabalho tem como objetivo estudar biomarcadores citogenéticos para a aplicação nos cenários complexos de exposição parcial do corpo e exposição prolongada.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 RADIAÇÃO IONIZANTE

A radiação é definida como energia que se propaga através do espaço. Os materiais radioativos são elementos que emitem radiação ionizante na tentativa de alcançar sua estabilidade nuclear. A estabilidade é resultado do balanceamento entre o número de nêutrons e de prótons presentes no núcleo atômico. Há inúmeros tipos de radiações ionizantes, as mais conhecidas são as partículas alfas, betas, pósitrons e nêutrons, e as com características de ondas eletromagnéticas, como os raios gama (γ) e Raios X (IAEA, 2001; CHRISTENSEN *et al.*, 2014a).

Na natureza, a radiação ionizante aparece em radionuclídeos naturais ou produzidos pelo próprio homem quando partículas atômicas (elétrons e partículas atômicas pesadas) são aceleradas. A radiação ionizante também existe no espaço, que se originam de fora do sistema solar na forma de raios cósmicos galácticos ou podem surgir a partir do Sol, as chamadas partículas solares. A radiação para fins médicos era uma área de atividade exclusiva de domínio da física e dos físicos, mas no século XXI, tornou-se inevitável os estudos para compreender as propriedades da interação da radiação no contexto da biologia da radiação e medicina (NIKJOO *et al.*, 2016).

2.1.1 Interação da radiação ionizante com a matéria

As radiações ionizantes têm energia suficiente para criar partículas carregadas (íons) através da remoção de elétron carregado negativamente em outro elemento químico. Essa capacidade de ionização das radiações pode ser visualizada em qualquer tipo de molécula. Dependendo do nível de ionização, as moléculas podem perder suas funções, inclusive nas moléculas biológicas como exemplo a cadeia de DNA (CHRISTENSEN *et al.*, 2014a).

A classificação das radiações é importante, pois cada tipo interage de modo específico com a matéria. Os fótons de Raios X ou γ podem interagir por deposição de toda sua energia em interações elétricas-fotoelétricas (absorção fotoelétrica), por processo de espalhamento Compton, onde há depósito de apenas uma porção da energia ou por produção de par (Tabela 1). Quando a energia de um fóton é absorvida

por um elétron, este deposita sua energia cinética na matéria circundante à medida que se move através do material (BAKER-JARVIS; KIM, 2012).

Tabela 1. Os diversos tipos de interações e de consequências de acordo com o tipo de radiação ionizante (Fonte: Adaptado de YOSHIMURA, 2009).

Raios X e γ

Interação – símbolo da seção de choque	O que muda no meio	O que muda na radiação incidente	Radiação ionizante produzida
Espalhamento coerente (espalhamento da radiação pelo átomo)	-	Direção de propagação, (mantém energia)	REM espalhada de mesma energia.
Fotoelétrico (ejeção de elétron ligado)	Ionização e excitação do átomo, recuo do núcleo	Fóton é absorvido	Elétron rápido, Raios X característicos, elétrons Auger.
Compton (espalhamento do fóton por um elétron)	Ionização do átomo	Fóton perde energia e muda de direção	Elétron rápido, fóton com menor energia, espalhado.
Produção de par (energia do fóton é consumida na criação do par (e- e+))	Recuo do núcleo; aniquilação do pósitron	Fóton é absorvido	Elétron e pósitron rápidos, Raios X de aniquilação.
Reação fotonuclear (ejeção de nucleon ligado)	Núcleo modificado (Z ou A) e excitado	Fóton é absorvido	Partículas subnucleares, em geral nêutrons.

REM. radiação eletromagnética.

Como as radiações ionizantes são apresentadas de diversas formas, elas podem ser classificadas de acordo com sua densidade de ionização em termos de transferência linear de energia (LOUCAS *et al.*, 2013). Os núcleos acelerados (íons) representam radiação densamente ionizante com alta transferência de energia linear (LET) e são caracterizados por uma maior eficácia biológica relativa (RBE) em comparação com radiação escassamente ionizante como fótons ou prótons de alta energia (BURIGO *et al.*, 2016).

2.1.2 Transferência linear de energia

A transferência linear de energia (LET, *Linear Energy Transfer*) é definida como a quantidade média de energia depositada por unidade de comprimento de trajetória (IAEA, 2001). Definir a LET de cada tipo de radiação é importante para entender a forma como as ionizações ocorrerem na matéria (Figura 1), pois radiações de baixa LET resultam em uma distribuição aleatória de ionizações dentro de um volume alvo, enquanto as radiações de alta LET produzem ionizações espaçadas que são distribuídas densamente (IAEA, 2011). Em termos biológicos, as radiações de alta LET provocam mais danos do que a de baixa LET (KAWATA *et al.*, 2004; IAEA, 2011).

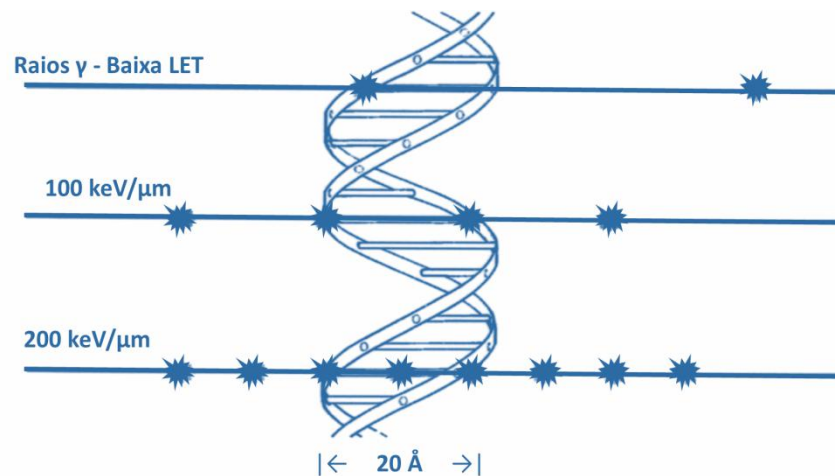


Figura 1. Distribuição espacial média de eventos ionizantes para diferentes valores de LET em relação à estrutura de dupla hélice do DNA (Fonte: HALL; GIACCIA, 2005 *apud* BEUKES, 2012).

2.1.3 Radiação e suas aplicações

Os Raios X foram descobertos por Roentgen, em 1895, enquanto estudava raios catódicos (fluxo de elétrons) em um tubo de descarga de gás. Nesse momento, ele observou que outro tipo de radiação foi produzida (presumivelmente pela interação de elétrons com as paredes de vidro do tubo) que poderia ser detectada fora do tubo. Esta radiação poderia penetrar substâncias opacas, produzir fluorescência, enegrecer filme fotográfico e ionizar gases. Após esta descoberta histórica, a natureza dos Raios X foi amplamente estudada e suas propriedades foram desvendadas. A compreensão de sua

natureza foi melhorada quando eles foram classificados como uma forma de radiação eletromagnética (KHAN; GIBBONS, 2003).

Os Raios X tem uma série de aplicações tanto na medicina como na indústria. A última década tem visto um enorme progresso na tomografia com Raios X e técnicas de imagem fornecendo novos meios para analisar uma infinidade de problemas de pesquisa. No âmbito da investigação de recursos hídricos, as aplicações vão desde as interações solo-água-raiz e propriedades mecânicas e hidráulicas das rochas até a modelação em escala de poros de fluxo multifásico. A radiação também é bem utilizada como método de esterilização, há mais de cinco décadas, esta aplicação tornou-se possível quando as grandes fontes de radiação foram produzidas, como fontes de ^{60}Co ou ^{137}Cs , com isso a radiação foi introduzida para esterilizar produtos de saúde em escala comercial e depois passaram a esterilizar também os aloenxertos teciduais (SCHLÜTER *et al.*, 2014; SINGH *et al.*, 2016).

A dose de esterilização por radiação γ é medida em unidades de kilogray (kGy). A escolha de 25 kGy para a esterilização de produtos médicos foi proposta com base na dose mínima de morte para cerca de 150 espécies microbianas, uma vez que é 40% acima da dose mínima necessária para matar os microrganismos resistentes (SINGH *et al.*, 2016).

Com isso, a produção mundial de refinados do cobalto aumentou de forma constante ao longo da última década. Estas fontes estão presentes em diversos setores da indústria, com isso os trabalhadores podem ser expostos ao cobalto durante a produção dos sais de cobalto, na produção de ligas e metal duro, agentes de secagem, pigmentos e catalisadores, e durante o polimento de diamantes (SAUNI *et al.*, 2017).

Até cerca de 1950, a maior parte da radioterapia¹ com feixe externo foi realizada com Raios X gerados a tensões de até 300 kVp². O subsequente desenvolvimento de máquinas de alta energia e a crescente popularidade das unidades de cobalto-60 nas

¹ O tratamento radioterápico envolve o planejamento da dose total de radiação, dose/fração, número de frações e volume a ser irradiado (Shahid *et al.*, 2015).

² A tensão do tubo (kVp) é importante para otimizar o contraste das imagens radiológicas e reduzir a dose do paciente. Pequenas variações no valor do kVp podem produzir significativas elevações da dose absorvida pelo paciente, em razão da dependência aproximadamente quadrática entre kerma no ar e kVp. A relação entre variação no potencial do tubo e variação na dose absorvida dependerá da parte do corpo sob irradiação e da faixa de kVp utilizado (Ramirez-Jimenez *et al.*, 2004; Terini *et al.*, 2009).

décadas de 1950 e 1960, resultou em um desaparecimento gradual das máquinas convencionais de quilovoltagem. No entanto, essas máquinas não desapareceram completamente. Atualmente, os feixes de megavoltagem são encontrados especialmente no tratamento de lesões superficiais da pele (KHAN; GIBBONS, 2003).

Na radioterapia, busca-se eliminar as células tumorais sem causar o surgimento do câncer secundário, pois a ionização causada pela radiação é utilizada como agente de cura e, ao mesmo tempo, é imprescindível proteger os tecidos saudáveis dos seus efeitos nocivos. Há mais de um século, as pesquisas sobre radiação se esforçam para aumentar o conhecimento das propriedades físicas e os efeitos biológicos que acompanham a exposição de células, tecidos, órgãos e todo o corpo humano, com a finalidade de aumentar seu uso na medicina e no mercado (NIKJOO *et al.*, 2016).

2.1.4 Diferença de interação entre as radiações

Os diferentes tipos de radiação emitidas durante as desintegrações radioativas, tais como partículas α , β e raios γ , depositam sua energia na interação com a matéria e, essa quantidade de energia, é denominada de dose absorvida³ (KAMIYA *et al.*, 2015). Mesmo com doses absorvidas iguais, os diferentes tipos de radiação no mesmo intervalo de tempo, resultam em efeitos biológicos distintos (PANAGOPOULOS *et al.*, 2013).

Os efeitos biológicos da radiação dependem de diversos fatores físicos e biológicos, dentre os biológicos estão o nível de oxigenação tecidual e volume de tecido irradiado, incluindo o tipo celular irradiado como suas características genéticas e taxa de proliferação celular, e entre os físicos estão o fracionamento de dose absorvida, a dose total e a LET, além da taxa de dose absorvida (POUGET *et al.*, 2015).

A taxa de dose absorvida é a energia das partículas ionizantes a qual é transferida para um alvo de interesse em um determinado intervalo de tempo, ou seja, é

³ A dose absorvida (D) é definida como a energia depositada na matéria pelas partículas ionizantes por unidade de massa do material irradiado no espaço de interesse, como demonstrado pela equação 1.

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

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

a dose absorvida por unidade de tempo (IAEA, 2011). A taxa de dose é outro fator muito importante no efeito biológico produzido, pois sua variação para mais ou menos leva a mecanismos de respostas significativamente diferente. Se uma dose absorvida alta for depositada no tecido com uma baixa taxa de dose o tecido tem uma maior capacidade de ser regenerado, mas, se a mesma dose absorvida for depositada com uma taxa maior, os danos celulares podem ser irrecuperáveis (BARCELLOS-HOFF; NGUYEN, 2009; IAEA, 2011). A taxa de dose é um fator de grande importância na radioterapia de tumores (WARREN, 1980).

2.1.5 Efetividade biológica relativa

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

O conceito de RBE é simples, mas a sua aplicação clínica é difícil, pois inúmeros fatores estão envolvidos. Estes fatores incluem os físicos, como dose, taxa de dose e perda de energia linear, e os fatores biológicos, tais como sensibilidade à radiação e a capacidade de regeneração e de compensação (IAEA, 2008; DENG *et al.*, 2015). A RBE de diferentes tipos de radiações pode ser aproximadamente expressa pela relação com a LET, logo quanto maior for o valor da LET, os efeitos biológicos no tecido irradiado serão mais concentrados. Logo, comparando-se a radiação de baixa LET, como os Raios X, com as radiações de alta LET, como os nêutrons, os efeitos da radiação de alta LET serão maiores (IAEA, 2011; DENG *et al.*, 2015).

2.2 PROCESSOS BIOLÓGICOS INDUZIDOS PELA RADIAÇÃO IONIZANTE

A absorção de radiação ionizante pelas células pode interromper diretamente a estrutura atômica de moléculas biológicas. Entretanto, pode haver a interação indireta por meio da radiólise da água, produzindo outras espécies químicas reativas, os chamados radicais livres, que podem danificar os ácidos nucleicos, proteínas e lipídios (AZZAM *et al.*, 2012). Presume-se que os danos causados no genoma humano por

radiação de alta energia são cerca de um terço diretos e dois terços indiretos (ALIZADEH *et al.*, 2015).

Em ambos os efeitos diretos e indiretos, a energia conferida aos meios biológicos ocorre principalmente via ionização, gerando grandes quantidades de espécies secundárias ao longo da faixa de radiação, como por exemplo: íons, radicais e elétrons secundários (ALIZADEH *et al.*, 2015). Essa ação em conjunto dos efeitos diretos e indiretos iniciam uma série de eventos de sinalização bioquímica e molecular que podem reparar os danos, desenvolver alterações fisiológicas permanentes ou, até mesmo, resultar na morte celular como esquematizada pela Figura 2 (AZZAM *et al.*, 2012).

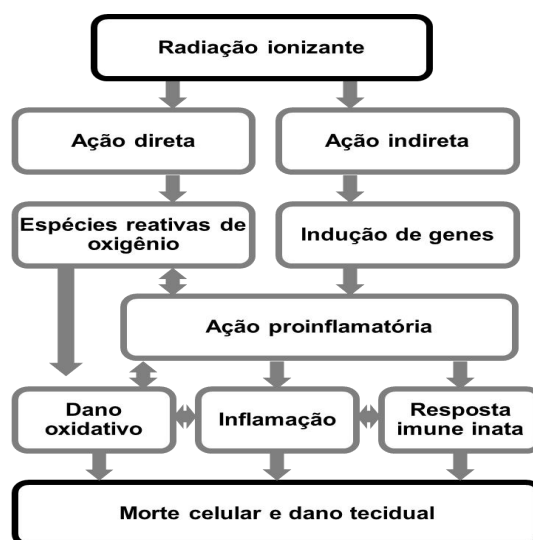


Figura 2. A radiação ionizante causa a morte celular por múltiplos mecanismos (Fonte adaptada: KIM *et al.*, 2014).

2.2.1 Estresse oxidativo

As células humanas interagem com o oxigênio nos processos de respiração e produção de energia de forma constante. Com isso, moléculas altamente reativas são produzidas resultantes deste estresse oxidativo celular, formando, assim, os chamados radicais livres. O estresse oxidativo é considerado um desequilíbrio entre a produção de

espécies reativas de oxigênio (ROS) e a capacidade biológica de eliminar a toxicidade desses reativos intermediários (YIN *et al.*, 2013).

O desequilíbrio pode levar a lesões oxidativas irreparáveis e, até mesmo, à morte celular quando ultrapassa o nível de controle. A elevada concentração e longa exposição à ROS pode levar a oxidação de resíduos de aminoácidos, modificação da estrutura em proteínas, rupturas de cadeias de DNA, mutações pontuais, formação de alterações cromossômicas e mutações em proto-oncogenes ou genes supressores de tumores, promovendo, assim, a transformação neoplásica (YIN *et al.*, 2013).

Estudos recentes têm demonstrado que a geração de ROS tem duas fontes, uma endógena, como a fuga de oxigênio ativado de mitocôndrias durante a fosforilação oxidativa, peroxissomos e células inflamatórias ativadas; e a outra de origem exógena, incluindo xenobióticos, compostos clorados, patógenos, citocinas inflamatórias, metal e radiação (Figura 3).

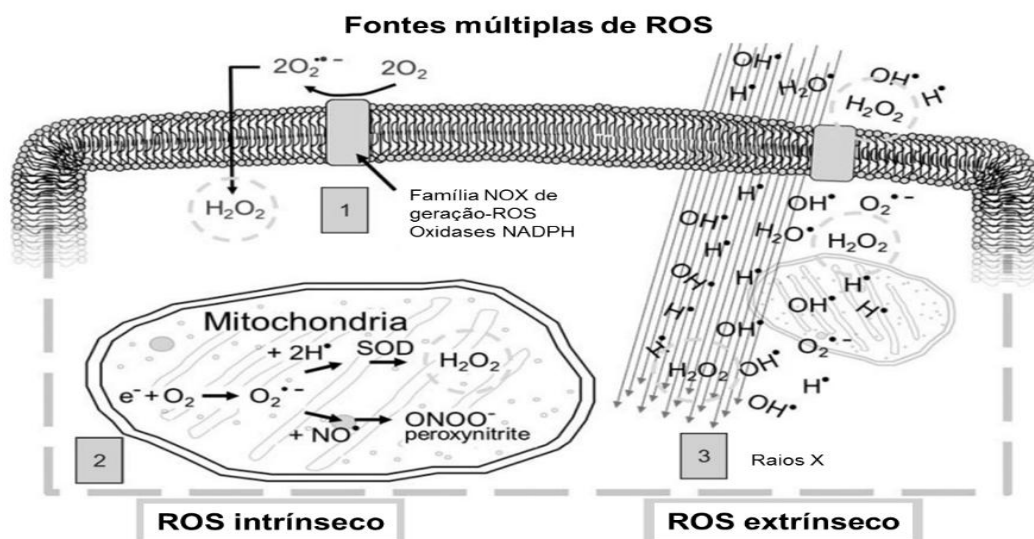


Figura 3. Excesso de ROS derivadas de fontes múltiplas dentro da célula. (1) passagem de ROS na membrana celular predominantemente através de NADPH oxidase, (2) formação de ROS mitocondrial e espécies de nitrogênio reativo através da via do citocromo C e (3) interação dos Raios X na célula com água e outras moléculas celulares para produzir ROS. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é particularmente prejudicial às células (círculo tracejado) e é produzido por todos os três mecanismos (Fonte: KIM *et al.*, 2014).

Em humanos, entende-se que o estresse oxidativo está envolvido no desenvolvimento de muitas doenças, além de ter a capacidade de exacerbar seus sintomas, incluindo as doenças, como o câncer, o Parkinson, o Alzheimer, a aterosclerose, a insuficiência cardíaca, o infarto do miocárdio, a esquizofrenia, a desordem bipolar, a síndrome do X frágil, a anemia falciforme e a síndrome de fadiga crônica (YIN *et al.*, 2013).

Curiosamente, as modificações bioquímicas iniciais, que ocorrem durante ou pouco depois a exposição à radiação, foram considerados responsáveis pela maioria dos efeitos da radiação em células de mamíferos. No entanto, as alterações oxidativas podem continuar meses após a exposição inicial presumivelmente por causa da geração contínua de ROS e de nitrogênio (RNS, *reactive nitrogen species*). Notavelmente, esses processos ocorrem não só nas células irradiadas, mas também nas suas progênes. Além disso, a radiação induz o estresse oxidativo podendo se espalhar de células direcionadas para células espectadoras não direcionadas através de mecanismos de comunicação intercelular. A persistência de tais efeitos estressantes nas células da progênie tem implicações de riscos para a saúde a longo prazo, incluindo o aparecimento de uma segunda malignidade após a radioterapia (AZZAM *et al.*, 2012).

2.2.2 Consequências fisiológicas da radiação

A célula sob estresse oxidativo aumentado perde a sua capacidade de equilíbrio através dos mecanismos antioxidantes de defesa, gerando um acúmulo maior de dano intracelular não reparado que pode induzir à morte celular programada (apoptose) ou à desintegração completa de componentes celulares que conduzem a lise celular total (necrose) (ANURANJANI, 2014). A apoptose é um colapso ativo, mesmo sendo uma via de morte celular, ainda é necessário o consumo de energia (ATP - adenosina trifosfato) do grupo de células. As células apoptóticas danificadas são fagocitadas pelos macrófagos e, portanto, não causam o processo de inflamação tecidual. Por outro lado, as células gravemente danificadas que são incapazes de formar fagossomos, principalmente devido à falta de energia (ATP), sofrem necrose e passivamente

desintegram os componentes intracelulares, que por sua vez aumentam o processo de inflamação (Figura 4) (ANURANJANI, 2014; CHRISTENSEN *et al.*, 2014b).

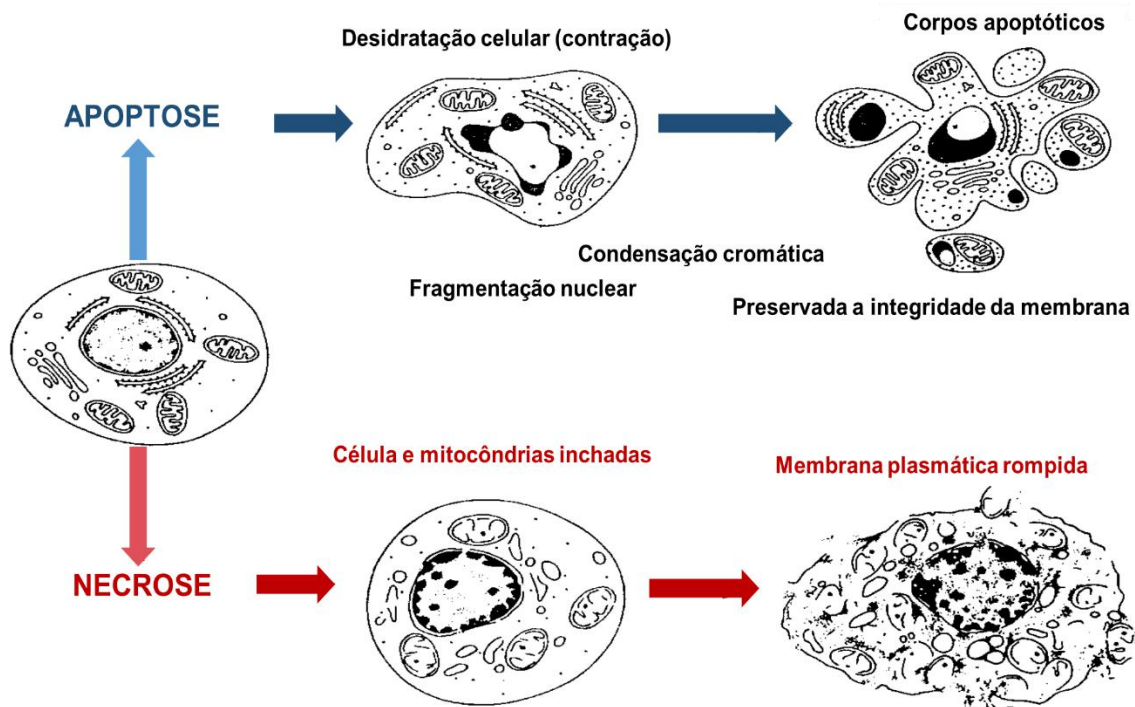


Figura 4. Alterações morfológicas e bioquímicas durante apoptose e necrose (Fonte: DARZYNKIEWICZ *et al.*, 1997).

A susceptibilidade das células individuais à morte celular necrótica depende de uma série de fatores, tais como a razão entre o nível de ROS e o nível de antioxidante, a perda de energia, a falha no processo de reparação de lesões de DNA (ANURANJANI, 2014).

Várias linhas de evidência indicam que a inflamação desempenha um papel fundamental na modulação da resposta à radiação dos tumores. Por um lado, doses subletais de radiação ionizante induz uma resposta de dano no DNA nuclear, mas por outro, eles acionam uma resposta ao dano nos tumores induzindo vias pró-inflamatórias, predominantemente mediadas via ativação de NF- κ B, o elemento de ligação central entre a inflamação, carcinogênese e radiorresistência (MULTHOFF *et al.*, 2012).

Exposições agudas de todo o corpo (ou de forma parcial) levam a sinais e sintomas típicos da síndrome de radiação aguda (ARS, *acute radiation syndrome*)

(Tabela 2). A resposta inflamatória sistêmica pode resultar em insuficiência multiorgânica em todos os sistemas irradiados. Os danos podem ser permanentes a todos os sistemas de órgãos afetados, levando ao desenvolvimento de sub-síndromes de ARS - hematopoiéticos, gastrointestinal (GI), neurovascular e cutânea. Além disso, superexposições locais e totais do corpo se traduzem em diferentes riscos à saúde e, portanto, há necessidade de diferentes tratamentos (CHRISTENSEN *et al.*, 2014b; COEYTAUX *et al.*, 2015).

Tabela 2. Apresentações clássicas das sub-síndromes de ARS em vários limites de dose (Fonte: Adaptado de CHRISTENSEN *et al.*, 2014b).

Dose de radiação	Sinais e sintomas	Da exposição à apresentação em tempo
0,05 Sv (5 rem)	Alterações cromossômicas	30 min
0,12 Sv (12 rem)	Redução na contagem de esperma	42 dias
0,75 Gy (75 rad)	Depleção de linfócitos	6 h
1 Gy (100 rad)	Náuseas, vômitos	6 h, até 5-7 dias
1-6 Gy (100-600 rad)	Síndrome Hematopoiética	1-6 h
3 Gy (300 rad)	Queda temporária de pelos	14 dias
6 Gy (600 rad)	Eritema	6-48 h, até 2-3 dias
	Pneumonias	4-6 semanas
	Síndrome pulmonares (Fibrose pulmonar, ARDS)	1-6 meses
6-8 Gy (600-800 rad)	Síndrome gastrointestinal	3-4 dias
9-10 Gy (900-1000 rad)	Morte	Dias a semanas
>10 Gy (>1000 rad)	Síndrome neurovascular	Horas a dias

A dose letal mediana em 50% de uma população não tratada dentro de 60 dias, é de aproximadamente 4 Gy (400 rad). Os cuidados médicos mais intensivos, incluindo

o uso de antibióticos profiláticos, antibióticos para focos específicos de infecção e citocinas, podem aumentar a dose letal mediana, empurrando a curva de sobrevivência para a direita. Em alguns casos de exposição de doses ou doses de radiação para grandes porções do corpo de 8 a 9 Gy (800-900 rad) podem ser letais, mas tratamentos agressivos podem permitir a sobrevivência do paciente. Enquanto as doses de corpo inteiro maior que 10 Gy (1000 rad) são quase que universalmente fatais (Figura 5) (CHRISTENSEN *et al.*, 2014b).

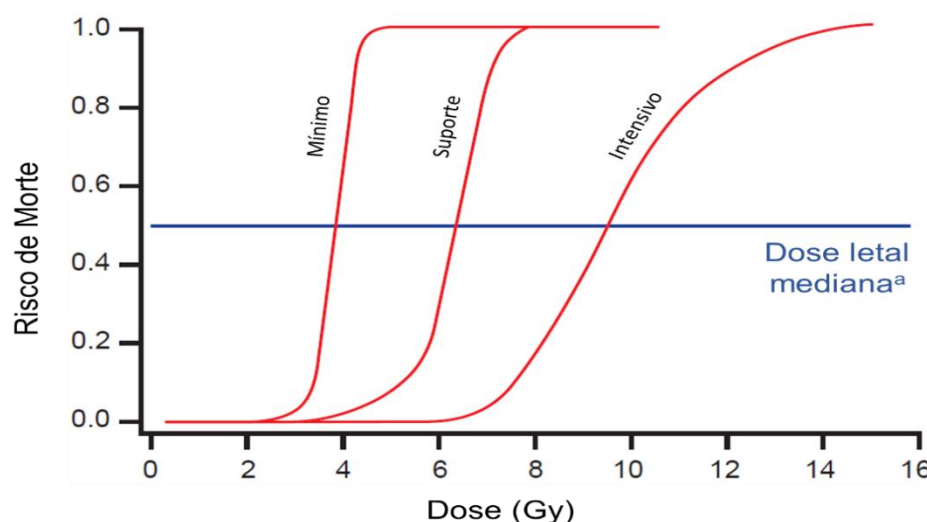


Figura 5. Dose de radiação ionizante correspondente ao risco de morte por cuidados mínimos, de suporte e intensivos (Fonte: CHRISTENSEN *et al.*, 2014b).

A síndrome de radiação aguda local (LARS) é causada pela irradiação externa de uma parte do corpo com uma dose elevada (Tabela 3). Henri Becquerel descreveu pela primeira vez a lesão da radioepidermite, em 1896, em sua própria pele, depois de ter perdido uma fonte radioativa no bolso do casaco. A lesão típica é chamada radioepidermites ou queimadura por radiação que afeta principalmente a pele, mas também atinge os tecidos subcutâneos, como músculos e ossos. Esta lesão localizada é uma condição rara e muitas vezes desconsiderada, consequentemente tem sua incidência provavelmente subestimada (WEBER-DONAT *et al.*, 2012).

Tabela 3. Correlação entre efeitos determinísticos após irradiação e a classificação de critérios comuns de terminologia para eventos adversos - *Common Terminology Criteria for Adverse Events*, CTCAE (Fonte: WEBER-DONAT *et al.*, 2012).

Efeitos determinísticos		CTCAE	
Dose absorvida (Gy)	Lesões	Estágio	Lesões
<2	-	0	Sem toxicidade
3 a 10	Eritema	1	Eritema indolor ou descamação seca limitada
>3	Queda de pelos	2	Eritema moderado, descamação úmida irregular, edema moderado
8 a 12	Descamação seca		
12 a 20	Descamação úmida	3	Descamação úmida, com exceção das dobras e vincos da pele, hemorragias induzidas por traumatismos menores ou abrasão
20-25	Ulceração	4	Necrose da pele ou ulceração da derme da espessura cheia, sangramento espontâneo do local envolvido
>25	Necroses		

2.2.3 Lesões radioinduzidas e efeitos genômicos

De acordo com a literatura há diversos tipos de lesões induzidas pela radiação ionizante ao DNA, dentre elas estão a quebra de fita única (SSB, *single-strand break*), a quebra de fita dupla (DSB, *double-strand Break*), a modificação de bases via oxidação, a alquilação e a desaminação. Há inclusive perda de resíduos de base na produção de sítios apurínico ou apirimidínico (AP), ligações cruzadas envolvendo DNA-DNA e interações DNA-proteína (BUDWORTH *et al.*, 2012; Kavanagh *et al.*, 2013).

Algumas lesões podem ser consideradas mais graves, como por exemplo, a DSB de DNA (Lara *et al.*, 2013). Todas as radiações ionizantes podem gerar a DSB, no entanto, as radiações de alta LET em comparação com baixa radiação LET, induzem DSBs que não são reparadas ou que são mais difíceis de reparar (OKUMURA *et al.*, 2013).

O mecanismo para a geração de rearranjos cromossômicos envolve a interação de duas lesões, logo pode-se esperar que a probabilidade de uma DSB seja mal recombinada dependa do número de quebras próximas e do nível de dose de radiação absorvida pela célula. Os resultados obtidos para a radiação ionizante (baixa LET) como Raios X ou γ ilustram que uma separação de DSBs no espaço e no tempo reduz consideravelmente a probabilidade de erro na ligação com outras DSBs (Figura 6). Portanto, é razoável postular que as quebras de diferentes DSBs têm que coincidir no tempo, para existir a interação e a formação de rearranjos genômicos (ROTHKAMM; LÖBRICH, 2002).

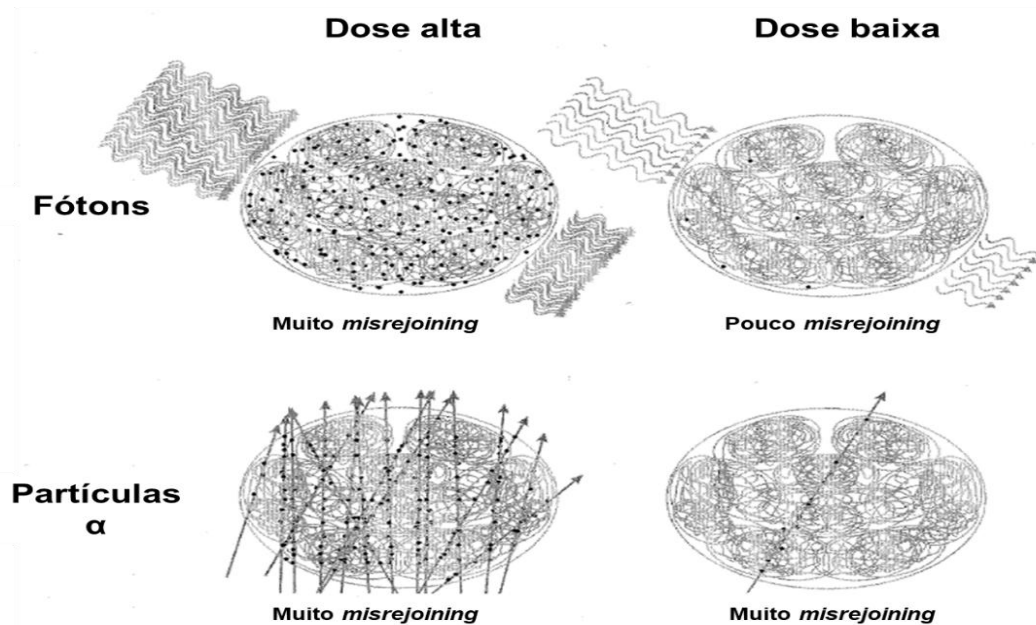


Figura 6. Ilustração esquemática da distribuição espacial de DSBs (*Double-strand Break*). A distribuição espacial de DSBs (pontos pretos) dentro de uma área seccional do núcleo da célula após altas e baixas doses de radiações espacialmente (fótons) e densamente ionizantes (partículas). O DSB *misrejoining*⁴ é observado quando a formação de DSBs coincidir no tempo e no espaço. Esta situação é encontrada após doses de radiação elevadas ou após a passagem de uma única partícula que gera DSB correlacionados ao longo da trajetória (Fonte: ROTHKAMM; LÖBRICH, 2002).

⁴ Erro de junção.

O genoma não está somente ameaçado pelos agentes carcinogênicos, podem ocorrer também erros de replicação e bloqueio, que levam a alteração de suas propriedades físicas e de suas estruturas químicas, interrompendo, assim, sua mensagem codificada. A estabilidade do DNA é importante de tal forma que as células evoluíram toda uma estratégia em resposta ao dano no DNA (Figura 7) (BELLONI *et al.*, 2008).

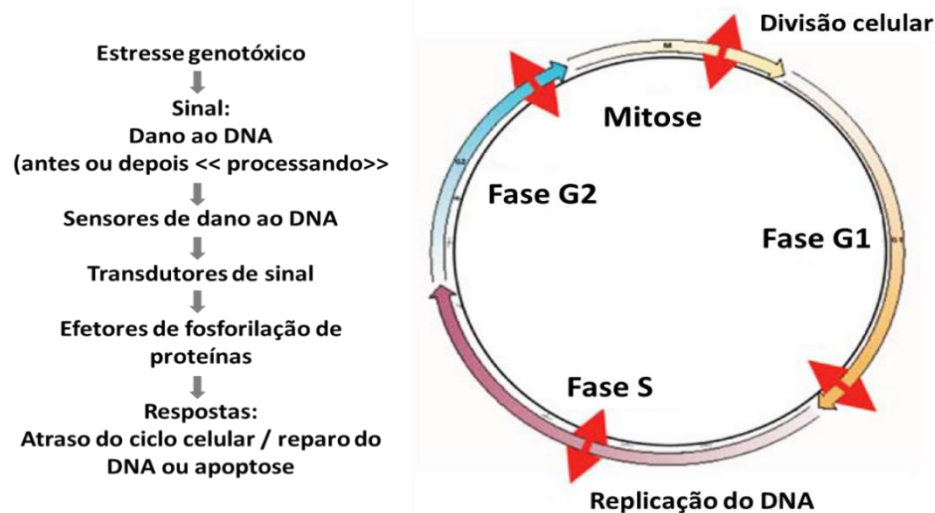


Figura 7. Resposta celular ao dano de DNA. Pontos de verificação de integridade de DNA (seta cinza). A replicação do DNA não deve ocorrer em DNA danificado por causa de possíveis erros ao copiar bases modificadas, de modo que o ponto de verificação interfase G1/S impede que a célula entre na fase S. O ponto de verificação G2 verifica o DNA quanto à presença de DSBs e replicação incompleta, de modo que uma cópia alterada de DNA não é transmitida para a célula filha (Fonte: BELLONI *et al.*, 2008).

O dano no DNA constitui o início da sinalização da cascata de transdução (fosforilação de proteínas), incluindo a atuação de moléculas efetoras que ativam várias vias de proteção ao genoma, ou seja, vias ligadas aos reparos de DNA, ao controle do ciclo celular (tempo de checagem do erro), à apoptose, à transcrição e à remodelação da cromatina (BELLONI *et al.*, 2008; LAGERWERF *et al.*, 2011). Um cuidadoso equilíbrio deve ser mantido entre a reparação eficaz dos danos de DNA, que conduzem a estabilidade genética e a sobrevivência da célula. A incapacidade de enfrentar

adequadamente uma ameaça genotóxica acarreta a instabilidade genômica e, eventualmente, a transformação tumoral ou até a doenças hereditárias. Em organismos multicelulares, uma célula que está muito danificada induz a sua própria morte por apoptose (BELLONI *et al.*, 2008; KANAVAGH *et al.*, 2013).

2.2.4 Mecanismos de reparo celular

As lesões de DNA estimulam o maquinário de reparação celular e a ativação dos pontos de controle do ciclo celular. As rupturas de SSB, das bases oxidadas e dos sítio abásico são processados pela via de reparação de excisão de base (BER), enquanto as rupturas de DSB são processadas pela união das extremidades não-homólogas (NHEJ, *non-homologous end joining*) e pela recombinação homóloga (HR, *homologous recombination*). Em se tratando do *crosslink* DNA-proteína, o reparo é feito pela via de excisão de nucleotídeos (NER) (Figura 8) (BELLONI *et al.*, 2008; BUDWORTH *et al.*, 2012).

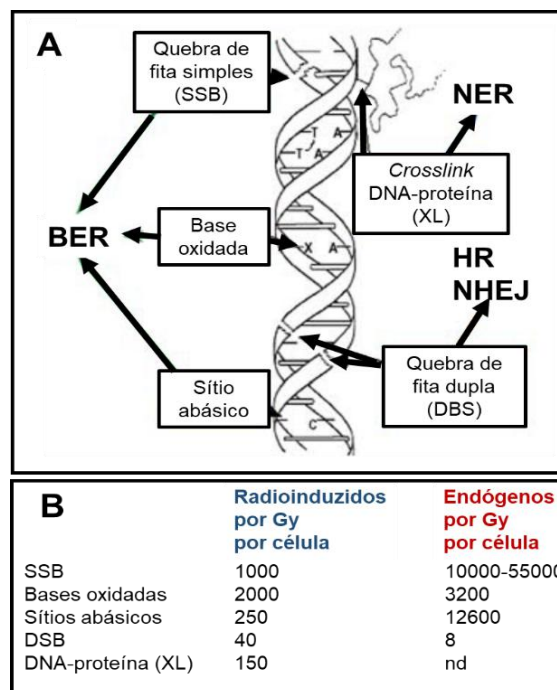


Figura 8. Lesões de DNA induzido por radiação ionizante. A) Danos e reparos de DNA.

Todos os elementos constitutivos do DNA são possivelmente modificados por radiação ionizante. B) Medição quantitativa de danos no DNA induzidos por radiação e espontâneas (Fonte: BELLONI *et al.*, 2008).

As diferenças nas taxas de reintegração de ruptura encontradas entre as células de fase G0 e G2 podem ainda indicar que diferentes vias de reparação enzimática de DSB estão operando nas fases G0-G1 e G2 do ciclo celular. Foi demonstrado que o reparo NHEJ pelas enzimas DNA-PK (DNA-PK, Ku70/80, Xrcc4 e liga IV) é responsável pelo reparo DSB em G1, enquanto que os produtos da RAD (RAD51, RAD52, RAD54) estão envolvidos na HR e são mais ativos em G2. Em vista do modelo de sinal, as enzimas que participam na recombinação homóloga também podem preferencialmente estar envolvidas nos processos de rearranjo intracromossômicos resultando em quebras de cromátides (TAKATA *et al.* 1998 *apud* VRAL *et al.*, 2002).

2.3.4.1 Reparo por excisão de base

O reparo de excisão de base (BER, *base excision repair*) é uma via altamente conservada presente desde bactérias a seres humanos, sendo responsável pela reparação da grande maioria dos danos endógenos do DNA, incluindo alquilações, oxidações, desaminações e depurinadizações, bem como quebra de fita simples do DNA (SSB). Assim, a função primária do BER é remover essas lesões produzidas com frequência e manter a integridade do genoma (WALLACE, 2014).

O passo inicial na BER é a busca das lesões de DNA pelas glicosilases de DNA. Nos seres humanos existem 11 destas enzimas, quatro dedicadas à remoção de Uracila, Timina desajustadas, seis ao reparo de dano oxidativo e uma à remoção de bases alquiladas. As glicosilases que reconhecem Uracila, Timina e base alquilada são monofuncionais e removem a base danificada por clivagem da ligação N-glicosila entre a base e o açúcar. O sítio abásico resultante é reconhecido por uma endonuclease apurínica (AP) (APE1), que cliva o sítio abásico deixando um açúcar ligado ao lado 5' da fita. A 3' hidroxila resultante é um substrato para a polimerase de reparação, polimerase de DNA (Pol), que também tem uma atividade de lise que remove o açúcar ligado ao fosfato 5' (Figura 9). O intervalo é preenchido e selado por uma ligase de DNA (WALLACE, 2014).

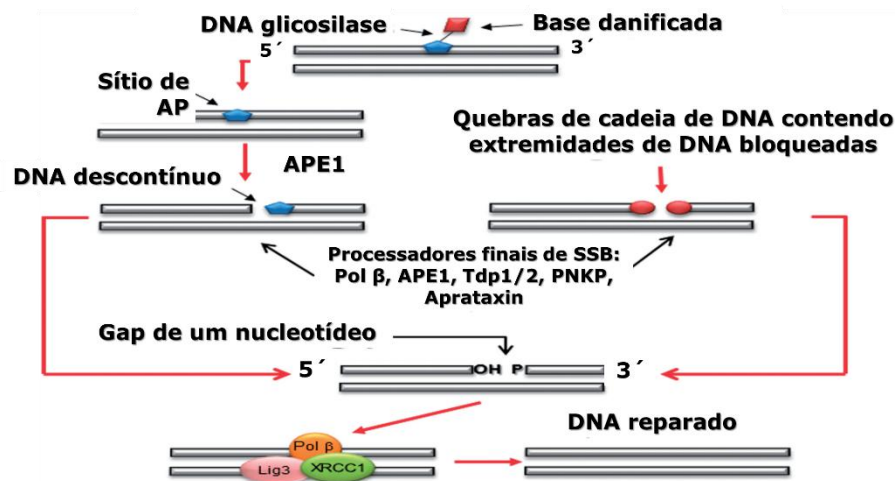


Figura 9. Esquema simplificado para a principal via de BER (Fonte: DIANOV; HÜBSCHER, 2013).

2.3.4.2 Reparo por excisão de nucleotídeos

O reparo de excisão de nucleotídeo (NER, *nucleotide excision repair*) é a principal via para o reparo de danos volumosos ao DNA que causam distorção helicoidal. As proteínas desse sistema também estão envolvidas no reparo de danos oxidativos através da estimulação de BER, incluindo XPC⁵ e XPG⁶, indicando *cross-talk* entre estas duas vias de reparação. Vários genes da via NER são *up-regulated* (regulados para cima) no nível de expressão gênica por radiação ionizante, incluindo XPC e DDB2⁷ (KAMILERI *et al.*, 2012, BUDWORTH *et al.*, 2012).

Em eucariotos, a resposta pela NER reconhece e remove as distorções helicoidais de duas formas: reparação genômica global (GGR, *global genome repair*) e reparação acoplada de transcrição (TCR, *transcription-coupled repair*) (Figura 10). Essencialmente, as subvias GGR e TCR diferem apenas em como as lesões de DNA que distorcem a hélice são reconhecidas (KAMILERI *et al.*, 2012).

⁵ XPC complex subunit, DNA damage recognition and repair factor.

⁶ ERCC excision repair 5, endonuclease.

⁷ Damage specific DNA binding protein 2.

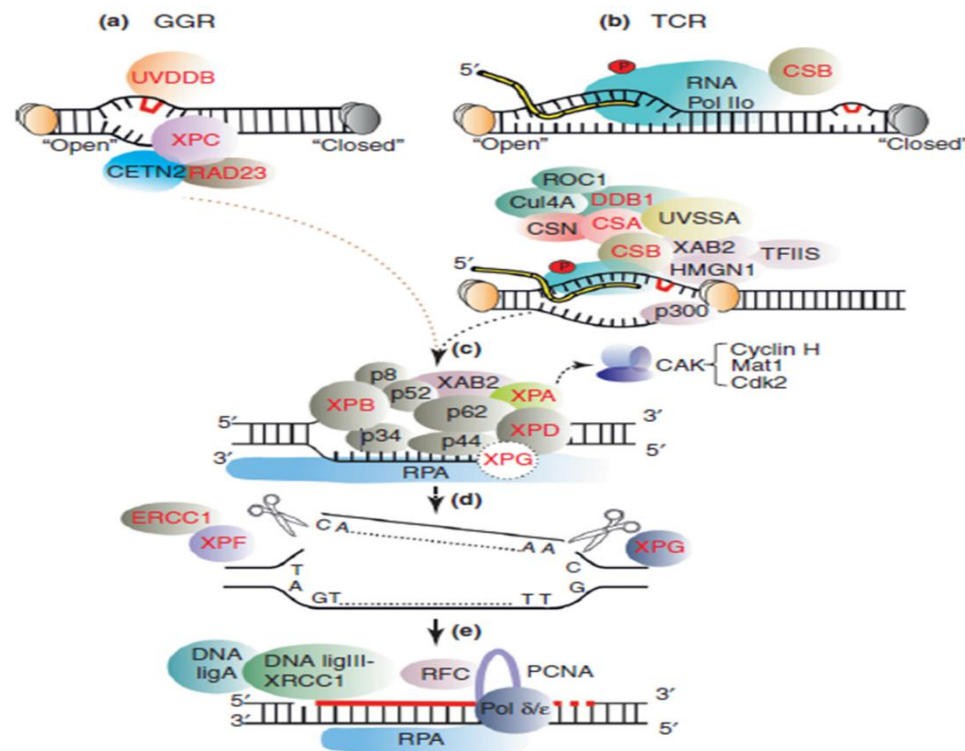


Figura 10. Mecanismo de reparo de NER em mamíferos. (a) A reparação genômica global (GGR) reconhece e remove distorções helicoidais em todo o genoma, (b) A reparação de transcrição acoplada (TCR) reconhece seletivamente e remove distorções helicoidais a partir de genes ativos da cadeia transcrita. Após a detecção de danos, as duas vias se fundem em um mecanismo comum para desenrolar o DNA ao redor da lesão (c), para estabilizar e excisar o fragmento de DNA contendo o dano (d), e preencher e ligar o espaço de uma única cadeia (e) (Fonte: KAMILERI et al., 2012).

Em mamíferos, defeitos congênitos nas subvias GGR e TCR levam a um aumento da sensibilidade em relação aos agentes que danificam o DNA, como a radiação UV. As mutações herdadas nos genes GGR causam Xeroderma Pigmentar, que é caracterizado pela extrema sensibilidade aos raios UV e a predisposição ao câncer de pele. Enquanto, a deficiência hereditária de TCR causa a síndrome de Cockayne, que leva a características tais como sintomas graves e variáveis do neurodesenvolvimento e envelhecimento prematuro (LANS *et al.*, 2010).

2.3.4.3 Reparação de DSBs

Existem três vias principais de reparo das DSBs: a NHEJ, a HR (Figura 11) e anelamento de fita simples (SSA, *single-strand annealing*) (TALEEI; NIKJOO, 2013).

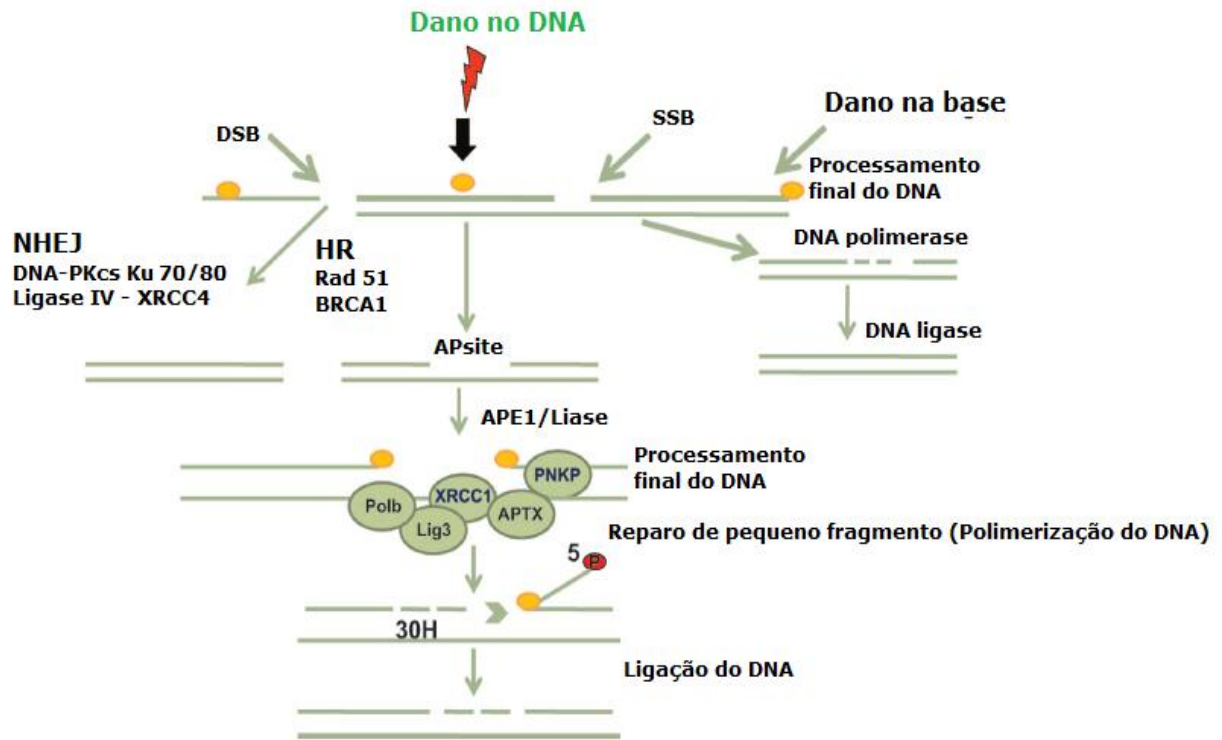


Figura 11. A exposição das células à radiação ionizante gera DSBs, SSBs e modificações de base. As DSBs são reparadas por NHEJ na fase G1 ou HR em fases S/G2 final. As SSBs são reparadas pela ligação do DNA se as extremidades 3'OH adjacente e o grupos 5'-fosfato forem geradas. Os sítios apurínico/apirimidínico são clivados por endonuclease (Ape1/lyase). Dano em cada extremidade requer processamento final e diferença de enchimento pela DNA polimerase β (Fonte: JEGGO; LAVIN, 2009).

As vias NHEJ e HR têm as primeiras etapas semelhantes ao iniciar o reparo do DNA, envolvendo a ligação do complexo MRN (**MRE11/RAD50/NBS1**) ao sítio do DSB, seguido da ativação da proteína serina-treonina quinase (ATM⁸). A proteína ATM, então, passa a fosforilar outras proteínas que atuarão no reparo da DSB, modificando a

⁸ Ataxia Telangiectasia Mutated.

estrutura da cromatina no local da DSB para o acesso à proteína de reparo e para a ativar os pontos de controle do ciclo celular com o objetivo de atrasar a progressão do ciclo celular até que o reparo esteja completo (SHIM *et al.*, 2015).

Como as cromátides dos cromossomos são duplicados durante a fase S do ciclo celular, as DSBs formadas durante as fases S/G2 podem ser reparadas sem qualquer perda de informação, por recombinação entre a fita danificada e a homóloga não danificada. Este processo é conhecido como recombinação homóloga (HR), e requer a atividade de um número de proteínas, incluindo BRCA1, BRCA2, XRCC2, XRCC3 e RAD51. A recombinação homóloga utiliza uma cromátide irmã nas fases S e G2 como molde; enquanto a via NHEJ, envolvendo a Ku70/80, o DNA-PK, e a DNA ligase IV, é um método propenso a erros por ligar diretamente as extremidades das DSBs nas fases G0 e G1 (ISBIR *et al.*, 2015).

2.2.5 Radiossensibilidade celular

A radiossensibilidade dos diversos tipos celulares e seus ciclos de vida ajudam a determinar a apresentação clínica das lesões radioinduzidas e os sintomas típicos da síndrome de radiação aguda (*acute radiation syndrome*, ARS) (CHRISTENSEN *et al.*, 2014b).

A Lei Bergonié-Tribondeau é a base da radiossensibilidade e radiação oncológica. Esta Lei afirma que as características que determinam a radiossensibilidade das células incluem rápida divisão celular ou atividade mitótica, indiferenciação celular e proliferação ativa por longos períodos. Exemplos dessas células radiossensíveis são as progenitoras hematopoiéticas, as células epidérmicas, as células epiteliais germinais, as células epiteliais do trato gastrointestinal e as células endoteliais. Os linfócitos são exceção à Lei de Bergonié-Tribondeau, sendo um dos tipos celulares mais sensíveis do corpo humano e, por isso após a exposição à radiação, há uma diminuição do volume de linfócitos rapidamente. Essa característica é um excelente indicador de dose, quanto maior a dose, mais rápida e severa será essa diminuição (CHRISTENSEN *et al.*, 2014b).

A radiossensibilidade é considerada um traço multifatorial, dependente da interação de diversos genes. Logo, a variação genética provavelmente contribui para as diferenças interindividuais no desenvolvimento de efeitos secundários da radioterapia.

Muito dos eventos envolvidos na radiosensibilidade intrínseca são desconhecidos, mas se sugere que 80% da variabilidade pode estar associada à base genética (BORRÀS-FRESNEDA *et al.*, 2016).

Na literatura especializada não foi encontrado um teste que relacione o nível de dose de radiação absorvida (dosimetria biológica) com o risco de exposição à radiação no desenvolvimento de câncer (MEADOWS *et al.*, 2010). Mesmo após décadas de experiência lidando com os efeitos da radiação sobre a saúde, ainda se depende principalmente da incidência de câncer em sobreviventes de bombas atômicas para projetar o risco de câncer induzido pela radiação (MOISEENKO *et al.*, 2016).

Entretanto, há indícios do aumento dos riscos de câncer associados à radioterapia em indivíduos com síndromes hereditárias de câncer, incluindo Retinoblastoma (Rb), Neurofibromatose tipo 1 (NF1), Síndrome de Li-Fraumeni (LFS) e Síndrome de Carcinoma Basocelular Nevóide (NBCCS). A predisposição genética tem um impacto substancial sobre o risco de câncer nessas populações, podendo ser aumentado pelo uso da radioterapia, por isso o mais indicado são exames de ressonância magnética ao invés de estudos por imagem que produzem exposição à radiação ionizante (LINET *et al.*, 2012).

Os pacientes com essas síndromes correm o risco de desenvolver novos cânceres e, geralmente, fazem periodicamente exames de imagem para detectar os novos tumores. Embora a associação de radiação diagnóstica e risco de câncer não tenha sido avaliada nessas populações, as imagens de varreduras por ressonância magnética foram recomendadas no lugar de estudos de imagem que produzam exposição à radiação ionizante, para acompanhar sintomas, avaliar achados físicos anormais ou monitoramento dos efeitos do tratamento de câncer, particularmente em sobreviventes de Rb (DE GRAAF *et al.*, 2011 *apud* LINET *et al.*, 2012) e crianças com NBCCS, especialmente aqueles que foram diagnosticados com meduloblastoma (STAVROU *et al.*, 2001 *apud* LINET *et al.*, 2012).

2.4 DOSIMETRIA BIOLÓGICA

A determinação da dose absorvida utilizando um método biológico é essencial para se obter informações críticas que auxiliarão os médicos na predição das prováveis

consequências para a saúde do indivíduo exposto e, com isso, eles determinarão qual o melhor tratamento médico a ser adotado. Esse prognóstico pode ser feito tanto para os efeitos biológicos precoces, como as lesões de pele ou depleção hematopoiética, quanto para os efeitos biológicos tardios, tais como ulcerações, fibrose, necrose, dentre outros (DI GIORGIO *et al.*, 2011; GRUEL *et al.*, 2013).

Idealmente, os métodos de dosimetria biológica precisam dos seguintes requisitos: (i) baixo limiar de detecção; (ii) baixa variação de pessoa para pessoa na dose-resposta para indivíduos; (iii) capacidade de obtenção de curvas de calibração em condições laboratoriais e *in vitro*; (iv) estabilidade do efeito biológico para que a dose possa ser reconstruída em longos períodos de tempo, anos ou décadas, após a exposição (MOISEENKO *et al.*, 2016).

Em 1960, Moorhead *et al.* publicaram um método que estimulava a divisão celular dos linfócitos periféricos em cultivo celular e, por meio desse método, tornou-se possível a visualização dos cromossomos humanos. Aliado ao fato de que este tipo celular é de fácil cultivo *in vitro* e de confecção simples em lâminas, estas células se tornaram o principal alvo na avaliação das alterações no número e na estrutura dos cromossomos humanos. Com isso, as alterações cromossômicas observadas em cultivo de linfócitos passaram a ser indicadoras de dano genético após exposição à radiação, tanto *in vitro* como *in vivo* (LLOYD *et al.*, 1977; GARCIA-SAGREDO, 2008).

2.4.1 Linfócitos humanos: células-alvo da dosimetria biológica

Os linfócitos fazem parte do sistema imunológico, sendo uma organização de células e moléculas com papéis especializados na defesa contra a infecção. Existem dois tipos fundamentalmente diferentes de respostas para os invasores. A primeira inclui a resposta inata (natural) que ocorre muitas vezes quando o agente infeccioso é encontrado, enquanto a segunda inclui a resposta adquirida (adaptativa), que melhora a resposta imune quando há exposição repetida a uma determinada infecção (DELVES; ROITT, 2000).

Todas as linhagens de células hematopoiéticas sofrem redução em seus níveis a depender do valor de dose absorvida (Tabela 4). Em geral, os declínios das contagens de linfócitos, de granulócitos e de eritrócitos ocorrem ao longo de horas, dias e

semanas, respectivamente. As plaquetas também diminuem ao longo dos dias, de forma consistente com sua meia-vida (DAINIÁK, 2002).

Tabela 4. Relação entre a contagem absoluta de linfócitos e a dose absorvida após a exposição (Fonte: DAINIÁK, 2002).

Síndrome da Radiação Aguda (ARS)	Dose absorvida (Gy)	Contagem de linfócitos (por 10 ⁹ células por litro)
Suave	1,0 – 2,0	0,7 – 1,5
Moderado	2,0 – 4,0	0,5 – 0,8
Severo	4,0 – 6,0	0,3 – 0,5
Muito severo	6,0 – 8,0	0,1 – 0,3
Letal	> 8,0	0 – 0,1

A radioterapia é conhecida por induzir linfopenia e alterações na distribuição dos linfócitos T e B, isto pode resultar em comprometimento da imunidade dos pacientes, consequentemente gerar algum impedimento no tratamento radioterápico. Foi observado que a imunossupressão produzida nos pacientes com câncer de mama irradiados localmente estava em níveis mais elevados do que em pacientes pós-mastectomia que não receberam a radioterapia (SHAHID *et al.*, 2015).

Marcadores biológicos de exposição às radiações ionizantes em populações humanas são de grande interesse para avaliar a lesão em tecido pós radioterapia e exposição acidentais (BUDWORTH *et al.*, 2012). Dessa forma, os linfócitos são os alvos da dosimetria citogenética por serem as células mais radiosensíveis dentre as células sanguíneas, representando uma população celular na fase de pré-síntese de DNA do ciclo celular (fase G0) e, em indivíduo saudável, raramente essas células estão em mitose no sangue periférico. Esse tipo celular tem uma vida média de 3 anos, entretanto, a sua circulação e sua substituição podem ser afetados em ocorrência de apoptose de células linfáticas após exposição à radiação ionizante (LÉONARD *et al.*, 2005).

Além da importância dos linfócitos como biomarcadores, este tipo celular é aplicado em diversas técnicas de mutagêneses, principalmente por serem de fácil cultivo e por serem exceção à Regra de Bergonié-Tribondeau (IAEA, 2011). A figura 12 demonstra, ao longo do ciclo celular do linfócito, as possibilidades de análise e

mensuração dos danos provocados pela radiação de acordo com as técnicas de mutagênese.

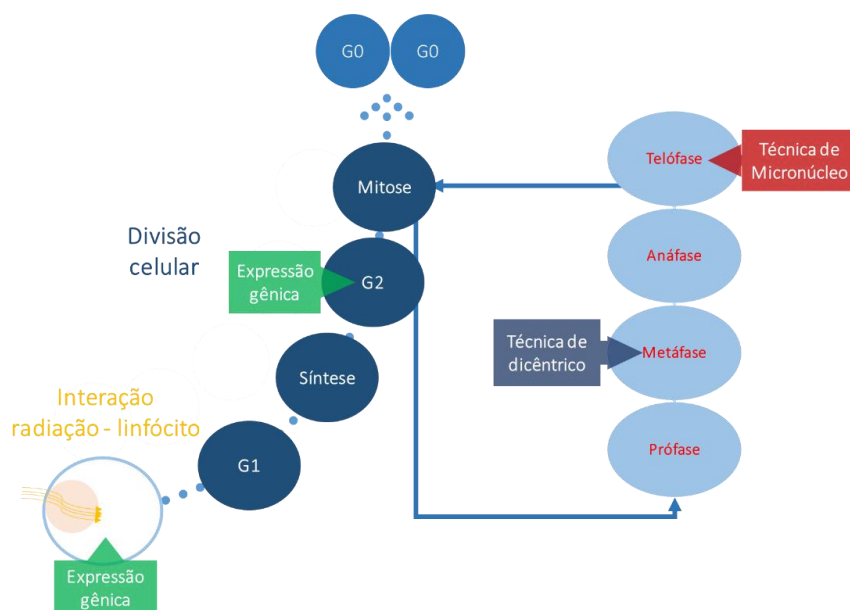


Figura 12. Localização no ciclo celular das diferentes técnicas de mutagênese (Fonte: própria).

2.4.2 Biomarcadores

Segundo a Organização Mundial da Saúde - WHO, *World Health Organization* - (1993), o biomarcador é definido como "qualquer medida que reflete uma interação entre um sistema biológico e um agente ambiental, podendo ser químico, físico ou biológico". Os biomarcadores podem ser utilizados para vários fins em estudos epidemiológicos envolvendo a radiação, como (i) estimativa ou validação de dose recebida, melhorando assim a validade de uma correlação entre exposição e respostas biológicas; (ii) investigação de suscetibilidade individual e (iii) detecção precoce de um estado de saúde induzido pela radiação (PERNOT et al., 2012).

Hall *et al.* (2017) desenvolveram um mapa (Figura 13) que permite a seleção de um biomarcador adequado em relação ao tempo após a exposição. Os biomarcadores foram classificados como facilmente detectáveis ou potencialmente detectáveis com tecnologia moderna e assumindo a apropriada disponibilidade das amostras biológicas.

Entretanto, nenhum biomarcador foi suficientemente validado para uso, em grandes estudos epidemiológicos de radiação.

A primeira evidência epidemiológica das alterações cromossômicas como um biomarcador de risco aumentado de câncer foi publicada na década de 1990, nos países Nórdicos e na Itália. Em um estudo populacional, feito com 22.358 indivíduos, em 11 países, expostos a diferentes agentes químicos e à radiação ionizante. Foi visto que as alterações cromossômicas são confiáveis em predizer o risco de câncer em indivíduos saudáveis (BONASSI *et al.*, 2008 apud FUCIC *et al.*, 2016).

Espaço de tempo	Horas	Dias	Semanas	Meses	Anos	Décadas
Biomarcadores citogenéticos (dicêntricos/alterações cromossômicas)						
Rearranjos cromossômicos						
Reticulócitos micronucleados						
Lesões de DNA induzidas por radiação						
Gama H2AX						
DNA circulante						
Perfil de mutação induzida por radiação						
Alterações nos perfis de RNA						
<i>Splicing</i> alternativo induzido por radiação						
Alterações nos perfis proteicos						
Modificações pós-translacionais induzidas por radiação						
Perfis de expressão de miRNA e RNA não-codificantes						
Marcadores epigenéticos						
Desequilíbrio de RedOx						
Metabolômica						
Marcadores biofísicos						
Biomarcadores Mitocondriais (Oxidação/Fosforilação)						
Biomarcadores Mitocondriais (Deleções comuns)						
Biomarcadores de exposição interna (radioisótopos)						

Legenda	
Detectável	
Possivelmente detectável	
Sem relatos	

Figura 13. Detecção dos biomarcadores com o tempo (Fonte: HALL *et al.*, 2017).

A alteração cromossômica surge do resultado de um DNA mal reparado ou a partir de DSB. Para a dosimetria biológica, a alteração cromossômica fornece uma medida do dano e, com isso, torna-se uma resposta biológica muito sensível à dose absorvida de radiação. As alterações cromossômicas são mais comumente identificadas através de duas técnicas: a análise citogenética convencional de cromossomos dicêntrico (POHL-RÜLING, 1992, IAEA, 2011) e a técnica de micronúcleos (MN) com bloqueio da citocinese celular (CBMN, *Cytokinesis-Block Micronucleus*) (THIERENS; VRAL, 2009).

A exposição à radiação ionizante pode provocar quebras de DNA em células vivas. Durante a reparação de quebras nas cadeias de DNA, a reparação incorreta (*misrepair*) de dois cromossomos e replicação do cromossomo anormal podem levar à formação de um cromossomo dicêntrico⁹. Este tipo de alteração cromossômica pode ser considerados estável dentro de células que não estejam em divisão celular, como os linfócitos, mas como a meia-vida de linfócitos no sangue é da ordem de meses/anos dependendo da subpopulação, os dicêntricos são os biomarcadores de escolha para investigar a exposição recente a radiação ionizante (IAEA, 2011; PERNOT *et al.*, 2012).

Embora a radiação seja capaz de induzir diversos tipos de alterações cromossômicas além dos dicêntricos, este biomarcador é considerado o mais sensível e específico para a avaliação da radiação em dose absorvida, mesmo em doses baixas (~100 mGy), porque apresenta baixo *background*¹⁰, uma alta comparabilidade entre a resposta à dose *in vivo* e *in vitro* e uma baixa intervariabilidade individual (LEE *et al.*, 2012; WONG *et al.*, 2013; HALL *et al.*, 2017).

As mais típicas alterações cromossômicas instáveis radioinduzidas (Figura 14), além dos dicêntricos, são: o cromossomo em anel, formado por duas quebras em cada um dos braços de um mesmo cromossomo, com a posterior ligação entre as duas extremidades formadas e acompanhadas por um fragmento associado; e os fragmentos acêntricos isolados, que podem ser deleções cromossômicas terminais ou intersticiais de tamanhos variados (LLOYD; DOLPHIN, 1977; IAEA, 2011; ROY *et al.*, 2012). Dados usando sondas telomérica e centromérica, mostraram que 76% dos fragmentos são

⁹ Cromossomo com dois centrômeros.

¹⁰ Frequência espontânea da alteração. Equivale ao grupo controle.

originados por trocas completas (deleções intersticiais) e apenas 24% são de trocas incompletas ou deleções terminais (BOEI *et al.*, 2000 apud VRAL *et al.*, 2002).

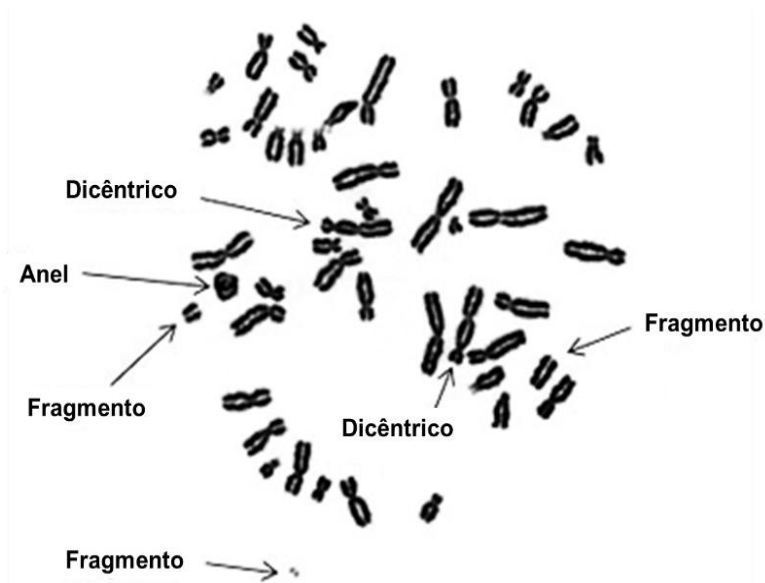


Figura 14. Fotografia de célula metafásica com alterações cromossômicas instáveis (Fonte: *National Institute of Radiological Sciences - NIRS*).

A incidência espontânea de dicêntricos na população geral varia entre os estudos. Entretanto, a IAEA chegou ao consenso de que esta incidência varia entre 1 a 2 dicêntricos em 1.000 células, enquanto a frequência de fragmentos acêntricos varia de 2 a 6 por 1.000 células, mas ainda não há um consenso formal (Fucic *et al.*, 2016). Apesar disso, os fragmentos são importantes na estimativa de dose quando se há indícios de uma exposição parcial do corpo humano (IAEA, 2011). De acordo com dados experimentais com radiação de baixa LET (Raios X ou radiação γ), a frequência de fragmentos é de cerca de 60% do número de cromossomos dicêntricos. A utilização de fragmentos como biomarcador foi negligenciada e seu potencial para prever o risco de câncer nunca foi avaliado corretamente (FUCIC *et al.*, 2016).

A técnica de MN em linfócitos do sangue periférico com bloqueio da citocinese celular foi desenvolvida por Fenech e Morley, em 1985, sendo um método confiável para quantificar quebras cromossômicas (Figura 15). Os MNs surgem durante a exposição à vários agentes clastogênicos e resultam também do DNA mal reparado ou de DSB. Os MNs podem resultar de pequenos fragmentos acêntricos ou conter

cromossomos inteiros, como dicêntricos, que não estão incorporados aos núcleos das células filhas durante a divisão celular. Eles estão presentes no envoltório nuclear, por essa razão, eles aparecem como pequenos núcleos - micronúcleos - no citoplasma de forma separada dos núcleos das células filhas (FENECH, 2000; THIERENS; VRAL, 2009).

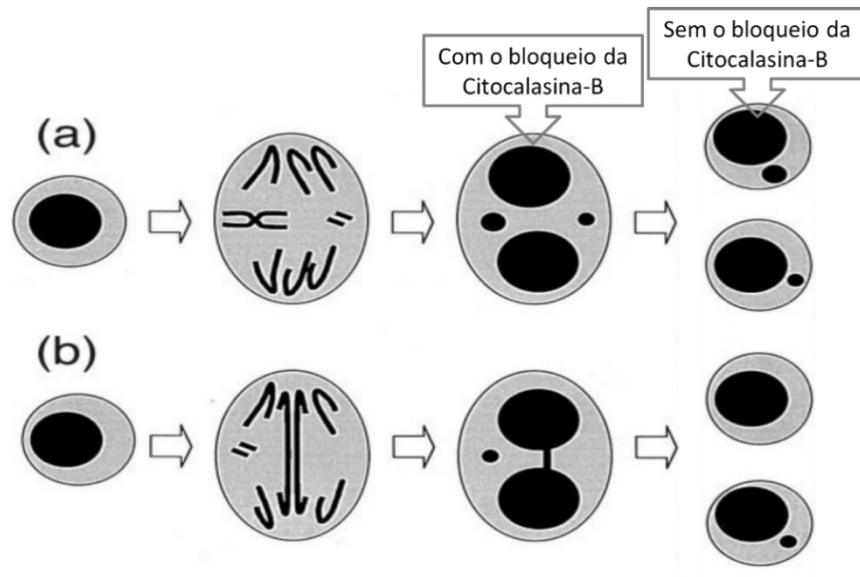


Figura 15. Formação dos MNs. (a) A origem dos MNs de cromossomos inteiros atrasados e de fragmentos acêntricos na anáfase. (b) A formação de uma ponte nucleoplasmática de um cromossomo dicêntrico (Fonte: Adaptado de FENECH, 2000).

Fenech (1993) realizou um estudo com 225 indivíduos e observou claramente uma correlação positiva significativa da frequência de MN com a idade (Figura 16). Uma comparação das linhas de regressão para homens e mulheres sugeriram inicialmente que a inclinação e interceptação para a relação da frequência de MN com idade foi maior no sexo feminino. O ensaio CBMN para monitoramento da população também relataram aumentos significativos na frequência de MN relacionados ao tabagismo e ao envelhecimento. Nestes casos, também pode haver relação com a instabilidade dos telômeros que aumentam com a idade e variam entre os indivíduos (PERNOT *et al.*, 2012).

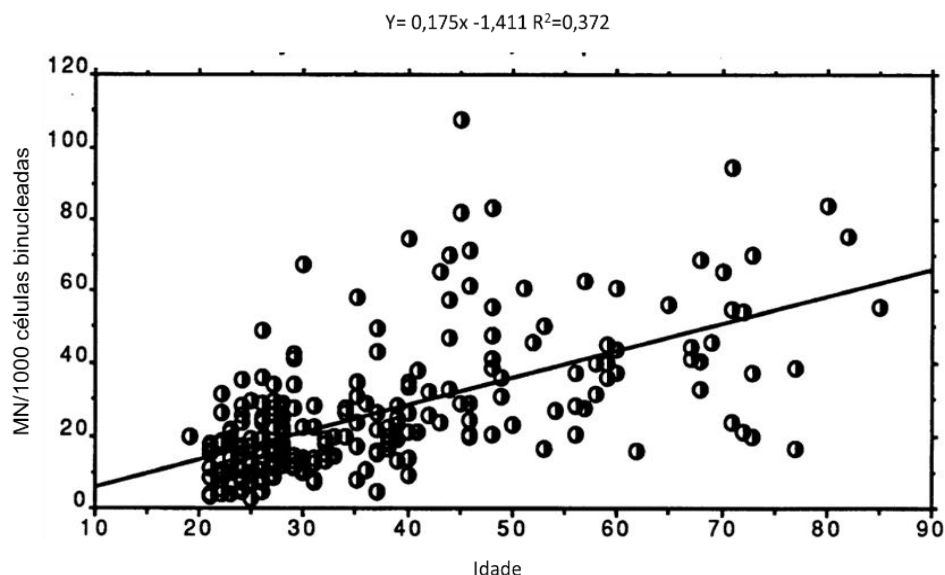


Figura 16. Frequência de MNs espontâneos em linfócitos bloqueados por citocinese de 224 australianos saudáveis traçados em relação à idade do doador. A correlação entre frequência de MNs e idade é estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) (Fonte: FENECH, 1993).

Devido à boa confiabilidade e reprodutibilidade, o ensaio de MN tornou-se um padrão para testes de toxicologia genética em células humanas e de mamíferos em geral (Fenech, 2007). No domínio da proteção radiológica, o ensaio de MN em linfócitos do sangue periférico é uma ferramenta apropriada de dosimetria biológica para avaliar exposição *in vivo* à radiação, em acidentes em grande escala, servindo para a triagem dos indivíduos mais severamente expostos (THIERENS; VRAL, 2009; IAEA, 2011). Além disso, é apropriado para avaliar indivíduos ocupacionalmente expostos em serviços de medicina nuclear e de indivíduos expostos acidentalmente, podendo também ser utilizado para avaliar *in vitro* a radiosensibilidade e suscetibilidade ao câncer (THIERENS; VRAL, 2009).

2.4.3 Curvas de calibração dose-resposta

As análises das alterações cromossômicas são feitas em linfócitos circulantes e os resultados são convertidos em dose absorvida usando curvas de calibração dose-resposta previamente estabelecidas. Cada ponto da curva de calibração representa

uma média da dose absorvida pelos linfócitos irradiados. Isso é aproximado para uma média de dose de corpo inteiro considerando que os linfócitos são amplamente móveis e distribuídos pelo corpo. Com a curva de calibração gerada e estabelecida, torna-se possível estimar a dose absorvida pelo organismo do indivíduo exposto à radiação ionizante (IAEA, 2001; ROY *et al.*, 2012).

A produção das alterações (Y) são representadas através da função matemática: $Y = C + \alpha D + \beta D^2$ para radiação de baixa LET, como os Raios X e radiação γ , onde Y é a frequência da alteração, C determina frequência espontânea (*background*) das alterações, D corresponde à dose absorvida de radiação, além de α e β serem os coeficientes linear e quadrático, respectivamente, e são eles que determinam a forma e inclinação da curva. Para a radiação de alta LET, como os nêutrons, o coeficiente α torna-se maior e o coeficiente β torna-se biologicamente menos relevante, logo a curva é aproximada para a função linear $Y = C + \alpha D$ (LLOYD; DOLPHIN, 1977; IAEA, 2011).

As primeiras curvas construídas *in vitro* com a finalidade de proteção radiológica foram estabelecidas no laboratório NRPB (*National Radiological Protection Board*, Reino Unido) para Raios X (250 kV), radiação γ de fonte de cobalto-60 e nêutrons (Figura 17) (LLOYD *et al.*, 1975, 1976, 1977).

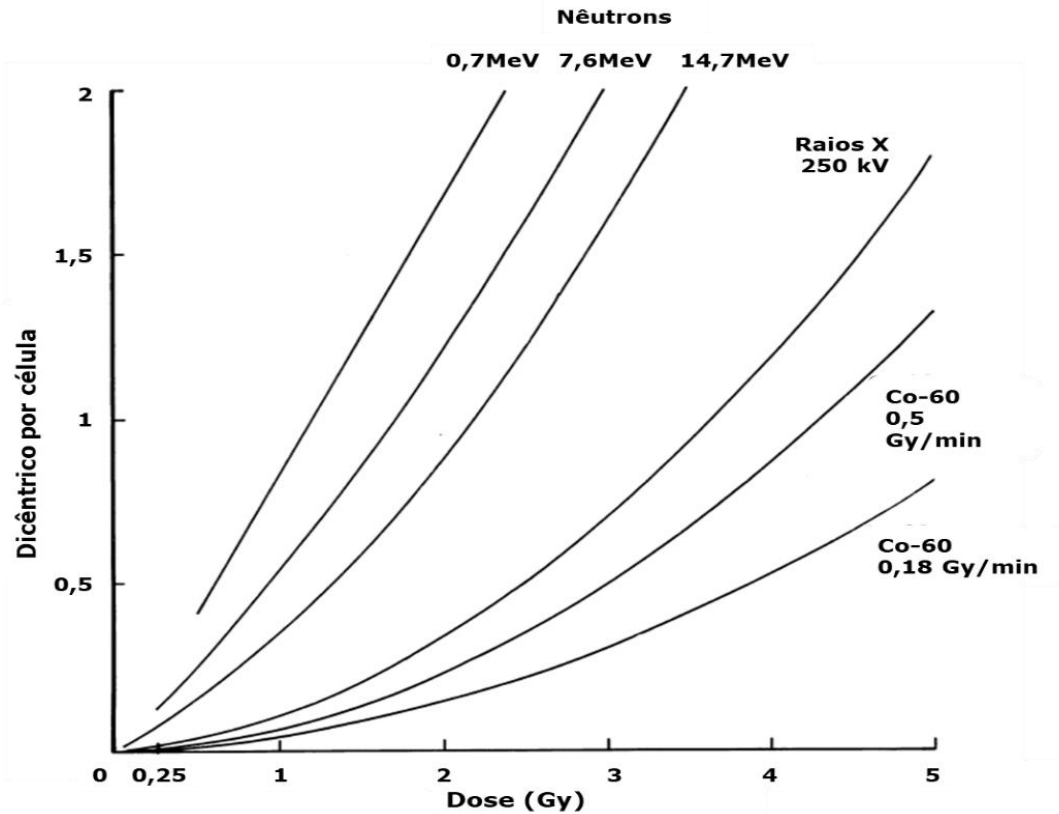


Figura 17. Curvas de calibração construídas *in vitro* com diferentes qualidades de radiação (Fonte: LLOYD; DOLPHIN, 1977).

A distribuição das alterações cromossômicas nos linfócitos, após exposição aos Raios X ou γ , se ajusta a uma distribuição de Poisson. Esta distribuição é verificada através do teste u de *Papworth* (1970). Esse teste utiliza a unidade normalizada do índice de dispersão σ^2/y (σ^2 , variância e y , média) e os valores de u devem ser calculados conforme as equações 1, 2 e 3 (IAEA, 2011).

$$y = \frac{X}{N} \quad (1)$$

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

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

onde, $N_0, N_1, N_2, \dots, N_i$ referem-se ao número de células com 0, 1, 2, ..., i alterações (ex. dicêntricos), N significa número total de células analisadas e X o número total de alterações (ex. dicêntricos). A distribuição celular é considerada Poissoniana quando o valor de u variar entre $\pm 1,96$ com nível de confiança de 95%. Valores acima de 1,96 são considerados sobredispersos e valores abaixo de 1,96 são subdispersos (ACHARYA *et al.*, 2009; IAEA, 2011).

No estudo de Romm *et al.* (2013) foi observado que para as curvas de calibração dose-resposta de MN os coeficientes lineares (α) (Tabela 5) têm um valor maior, ou seja, mais significativo na estimativa de dose, do que os coeficientes quadráticos (β).

Tabela 5. Coeficientes e características das curvas dose-respostas para MN (Fonte: ROMM *et al.*, 2013).

Instituição	C ($\pm$ DP)	α ($\pm$ DP)	β ($\pm$ DP)	Tipo de radiação, modelo de análise, total de células binucleadas
Laboratório1	0,0318 ($\pm 0,0043$)	0,0370 ($\pm 0,0114$)	0,0360 ($\pm 0,0044$)	240 kVp Raios X, automático, 38675 células binucleadas
Laboratório1	0,0274 ($\pm 0,0020$)	0,0614 ($\pm 0,0111$)	0,0163 ($\pm 0,0042$)	^{60}Co Raios γ , automático, 94858 células binucleadas
Laboratório1	0,0133 ($\pm 0,0012$)	0,0456 ($\pm 0,0090$)	0,0322 ($\pm 0,0037$)	^{60}Co Raios γ , semiautomático, 94820 células binucleadas
Laboratório1	0,0275 ($\pm 0,0027$)	0,0767 ($\pm 0,0180$)	0,0418 ($\pm 0,0073$)	^{60}Co Raios γ , manual, 94346 células binucleadas
Laboratório2	0,0095 ($\pm 0,0076$)	0,0547 ($\pm 0,0096$)	0,0166 ($\pm 0,0002$)	240 kVp Raios X, semiautomático, 184937 células binucleadas
Laboratório2	0,0394 ($\pm 0,0239$)	0,0535 ($\pm 0,0066$)	0,0154 ($\pm 0,0012$)	240 kVp Raios X, automático, 188436 células binucleadas
Laboratório3	0,0277 ($\pm 0,0170$)	0,0718 ($\pm 0,0407$)	0,0473 ($\pm 0,0963$)	^{137}Cs Raios γ , manual, 80000 células binucleadas
Laboratório4	0,0255 ($\pm 0,0084$)	0,0589 ($\pm 0,0116$)	-	240 kVp Raios X, automático, 22381 células binucleadas
Laboratório5	0,0039 ($\pm 0,0031$)	0,0923 ($\pm 0,0159$)	0,0601 ($\pm 0,0058$)	240 kVp Raios X, manual, 32000 células binucleadas
Laboratório6	0,0202 ($\pm 0,0003$)	0,01842 ($\pm 0,0013$)	0,0267 ($\pm 0,0007$)	^{60}Co Raios γ , automático, 90000 células binucleadas

Dessa forma, os MNs são mais provocados pela interação única da radiação, mesmo mudando a qualidade da radiação eletromagnética, a forma de análise (manual ou automática) e o total de células analisadas. O MN também foi testado para a distribuição de Poisson, utilizando o teste u , mas o comportamento desse tipo de alteração em linfócitos indicou uma sobredispersão significativa em todas ou na maioria

das doses (KÖKSAL *et al.*, 1996; VRAL *Et al.*, 1998; VENKATACHALAM *et al.* 1999; VRAL *et al.*, 2011; ANTUNES *et al.*, 2014).

Os ensaios citogenéticos múltiplos são úteis para a dosimetria biológica, uma vez que nenhum ensaio individual é suficientemente robusto para todos os cenários potenciais de irradiação, incluindo exposições agudas de fase inicial, exposição parcial do corpo, exposição retrospectiva ou prévia, bem como triagem de eventos de irradiação (IAEA, 2011).

2.4.4 Cenários de exposição

A Comissão Internacional em Proteção Radiológica (ICRP, 2007) distingue três categorias de exposições: exposições profissionais, exposições públicas e exposições médicas de pacientes. Além disso, existem as exposições acidentais e intencionais (IAEA, 2011). Todos esses tipos de exposição são alvos potenciais para estudo biodosimétricos (Tabela 6).

Na literatura há vários estudos sobre o uso do ensaio citogenéticos para a estimativa de dose absorvida após exposição acidental de trabalhadores, como técnicos em radiologia (SEVAN'KAEV *et al.*, 2002) e técnico de manutenção de Raios X (THIERENS *et al.*, 2005). Há também sobre acidentes de proporções maiores como: o acidente georgiano, onde os soldados carregavam nos bolsos pequenas fontes de ^{137}Cs , levando a exposições corporais parciais e prolongadas; o acidente de Tokai-mura, onde três funcionários envolvidos no processo de enriquecimento de ^{235}U foram expostos a doses muito altas de raios γ e nêutrons; e o acidente de Bialystok, onde cinco pacientes com câncer de mama submetidos à radioterapia foram expostos a uma dose única de elétrons que atingiu cerca de 100 Gy (WOJCIK *et al.*, 2004). Além de estudos sobre os grandes acidentes como de Chernobyl, Ucrânia, em 1986 (HATCH *et al.*, 2005; BERESFORD; COPPLESTONE, 2011); Goiânia, Brasil, em 1987 (RAMALHO *et al.*, 1988, RAMALHO *et al.*, 1991); Fukushima, Japão, em 2011 (YASUNARI *et al.*, 2011, BERESFORD; COPPLESTONE, 2011, GERING *et al.*, 2013).

Tabela 6. Tipos de exposições a radiações ionizantes envolvendo seres humanos (Fonte: ALEXANDER *et al.*, 2007; ICRP, 2007; IAEA, 2011; DÖRR *et al.*, 2014).

Tipo de exposição	Conceito
Profissional	A exposição profissional é definida pela ICRP como toda a exposição à radiação de trabalhadores ocorridos em resultado do seu trabalho. A ICRP tomou nota da definição convencional de exposição ocupacional a qualquer agente perigoso, todas as exposições no trabalho, independentemente da sua origem (ICRP, 2007).
Pública	A exposição pública abrange todas as exposições do público, com exceção das exposições profissionais e exposições médicas dos pacientes. É incorrido como resultado de uma variedade de fontes de radiação. O componente de exposição pública devido a fontes naturais é de longe o maior, mas isso não fornece justificativa para reduzir a atenção dada às exposições menores, mas mais prontamente controláveis, a fontes criadas pelo homem. As exposições do embrião e do feto de trabalhadoras grávidas são consideradas e reguladas como exposições públicas (ICRP, 2007).
Médica de pacientes	As exposições à radiação dos pacientes ocorrem em exames diagnósticos, intervencionais e procedimentos terapêuticos. Existem várias características das práticas radiológicas na medicina que exigem uma abordagem que difere da proteção radiológica em outras situações de exposição planejadas. A exposição é intencional e para benefício direto do paciente. Particularmente na radioterapia, os efeitos biológicos da radiação de alta dose, por exemplo, matar células, são usadas para o benefício do paciente para tratar o câncer e outras doenças (ICRP, 2007).
Acidental	Os acidentes de radiação são consideravelmente raros, no entanto, as consequências potenciais de acidentes em larga escala podem ser muito graves, como nos acidentes de radiação de Chernobyl e Fukushima ou no acidente de Goiânia no Brasil. Assim, o tratamento médico de indivíduos expostos acidentalmente é de grande importância para reduzir e mitigar o dano potencial. Nesse caso é necessário a imediata reconstrução no cenário de exposição para ajudar na decisão do tratamento médico (Dörr <i>et al.</i>, 2014). As exposições à radiação podem resultar de vários cenários incluindo (IAEA, 2011): (i) Emergências de reatores com uma quebra de elementos de combustível irradiados durante a perda de refrigeração. Essas emergências podem resultar em doses elevadas para os trabalhadores e o público em geral perto do local e contaminação que conduz a baixas doses para o público em geral na vizinhança (ex. Chernobyl). (ii) Acidentes de criticidade podem ocorrer quando quantidades suficientes de material nuclear especial são inadvertidamente autorizados a sofrer a fissão. Isso resulta em altos níveis de exposição a pessoas próximas (ex. Tokai-mura). (iii) As situações de emergência que envolvam fontes "órfãs" perdidas ou roubadas podem resultar em cenários de exposição severos, pois variam de acordo com a atividade, a duração da exposição e a distribuição da fonte. Tais emergências podem resultar em doses elevadas para todo o corpo ou de forma parcial, bem como a contaminação interna ou externa (ex. Goiânia).
Intencional	Desde o ataque terrorista de 11/09/2001, os cenários de exposição potencial à radiação agora incluem a detonação de armas nucleares, ataques terroristas contra reatores nucleares, colocação de grandes fontes em locais públicos e dispersão de substâncias radioativas com o uso de explosivos convencionais (Mettler e Voelz, 2002 apud Alexander <i>et al.</i>, 2007). Há uma série de cenários possíveis para a exposição mal-intencionada à radiação que estão listados em três grandes categorias (IAEA, 2011): (i) Os Dispositivos de Exposição Radiológica (Radiological Exposure Devices, RED) envolvem fontes seladas distribuídas no ambiente, mas não apresentam ser uma ameaça de contaminação. Os indivíduos que se aproximam destas fontes podem receber doses localizadas significativas, mas números de pessoas altamente expostas é baixo. (ii) Os Dispositivos de Dispersão Radiológica (Radiological Dispersal Devices, RDD) utilizam dispositivos explosivos ou mecânicos para distribuir material radiológico resultando em contaminação radioativa. Pequena área é relativamente afetada e as exposições à radiação poderiam assumir a forma de contaminação interna e externa, no entanto as exposições são menores e medicamente menos significativas. (iii) Os Dispositivos Nucleares Improvisados (Improvised Nuclear Devices, IND) incorporam materiais nucleares que podem produzir explosões nucleares. Isto pode causar extensa radiação e lesões térmicas com alto número de mortes e feridos com elevadas doses de radiação. O resultado de tal evento seria catastrófico.

COEYTAUX *et al.* (2015) realizaram um levantamento dos acidentes relatados, por exemplos em publicações acadêmicas e em relatórios da IAEA e da ICRP no período de 1980 a 2013. Eles recuperaram sistematicamente os casos de superexposição, extraindo informações e realizando uma análise descritiva. Foram relatados 634 acidentes, sendo a maioria deles no setor da indústria voltada para a saúde (27%) e no setor médico através do uso de radioterapia (32%) ou fluoroscopia (31%) (Tabela 7). Os acidentes relatados na radioterapia foram maiores em termos de número de pessoas superexpostas (47%), seguidas de acidentes no setor industrial (22%), fluoroscopia (17%) e fontes órfãs (9%).

Tabela 7. Acidentes com superexposição relatados em todo o mundo entre 1980 a 2013 com por setor e tipo de exposição (Fonte: Adaptado de COEYTAUX *et al.*, (2015).

Características da superexposição	Nº de acidentes reportados (%)	Nº de pessoas superexpostas (%)	Nº de mortes (%)
Industrial	169 (27)	513 (22)	45 (24)
Órgão local	1	1	0
Pele local	120	158	1
Pele local e de corpo inteiro	34	323	35
Corpo inteiro	14	31	9
Radioterapia	202 (32)	1127 (47)	96 (51)
Órgão local	129	407	3
Pele local	61	523	28
Pele local e órgão local	9	182	58
Pele local e de corpo inteiro	2	13	0
Órgão local e de corpo inteiro	1	2	7
Fluoroscopia	194 (31)	400 (17)	0 (0)
Órgão local	41	41	0
Pele local	152	358	0
Pele local e de corpo inteiro	1	1	0
Fonte órfã	32 (5)	225 (9)	37 (19)
Pele local	7	9	0
Pele local e de corpo inteiro	20	171	31
Corpo inteiro	5	45	6
Militar	4 (1)	64 (3)	12 (6)
Pele local	1	1	0
Pele local e de corpo inteiro	1	59	10
Corpo inteiro	2	4	2
Outros	33 (5)	61 (3)	0 (0)
Órgão local	2	2	0
Pele local	29	57	0
Pele local e de corpo inteiro	1	1	0
Corpo inteiro	1	1	0
Total	634 (100)	2390 (100)	190 (100)

2.4.5 Estimativa de dose em cenários complexos

Na prática é mais comum que a exposição accidental não seja uniforme, talvez envolvendo apenas parte do corpo, até mesmo exposição fracionada ou prolongada. Esses fatores interferem no padrão de linfócitos observados, havendo na amostra uma população não homogênea. Com isso, a frequência de dicêntrico resultante, quando comparado com uma curva padrão dose-resposta, produzirá uma estimativa irreal da dose (IAEA, 2011).

2.5.4.1 Exposição parcial do corpo humano

Outra questão na dosimetria é o estudo do impacto clínico de uma exposição parcial do corpo que varia de acordo com a área de exposição e pode ser substancialmente diferente de uma exposição total do corpo com uma dose idêntica. Experimentos clássicos de Jacobson e Simmons confirmaram essa distribuição, demonstrando que ratos podem sobreviver à irradiação letal por blindagem de um único membro (JACOBSON; SIMMONS, 1950 *apud* PRASANNA *et al.*, 2010a).

Há estudos que simularam uma exposição parcial do corpo, em que amostras de sangue irradiadas foram misturadas em várias proporções com amostras de sangue não irradiadas (PRASANNA *et al.*, 2010b). No tecido sanguíneo, após a exposição parcial haverá uma mistura de linfócitos com ou sem alterações. As células sem alterações fazem parte da região não irradiada do corpo, esses tipos de células contribuem para um número extra de células com zero alterações, levando à chamada de distribuição de Poisson Zero Inflacionado (ZIP, *Zero Inflated Poisson*) (PRASANNA *et al.*, 2010b; AIEA, 2011; VAURIJOUX *et al.*, 2011; HIGUERAS *et al.*, 2015a; FERNÁNDEZ-FONTELO *et al.*, 2018).

A indicação da exposição parcial é feita mais comumente através do teste u, então exposições parciais são assumidas quando os valores de u são superiores a 1,96 (AIEA, 2011). Além deste teste, há outros com o mesmo objetivo de avaliar se uma amostra segue ou não a distribuição de Poisson, como o exato teste D e o teste L (FISHER, 1950; RAO E CHAKRAVARTI, 1956; HIGUERAS *et al.*, 2018).

Recentemente, Fernández-Fontelo *et al.* (2018) sugeriram que, por meio do teste CR¹¹, é possível rejeitar a hipótese de irradiação de corpo inteiro, mesmo quando o teste u apoia essa exposição (valor de $u < 1,96$). Além desses testes, há o Fator Bayes, que é utilizado para comparar as probabilidades de dois modelos diferentes, neste caso ZIP versus Poisson (HIGUERAS *et al.*, 2015a). Estes testes oferecem maior precisão na avaliação de alguns casos de exposição parcial do corpo (FERNÁNDEZ-FONTELO *et al.* 2018).

Caso os dados não obedeçam a distribuição de Poisson, dois métodos são propostos para que se derive uma dose absorvida relacionada à exposição parcial do corpo, em vez de simplesmente citar o valor médio do corpo inteiro. Os modelos matemáticos propostos para esse fim foram: Poisson contaminado (ou Dolphin) e Qdr (IAEA, 2011; VAURIJOUX *et al.*, 2012). Entretanto, recentemente foi desenvolvido através da metodologia Bayesiana outro método para avaliação de dose parcial do corpo (HIGUERAS *et al.* 2015).

Há poucos estudos na literatura sobre exposição parcial utilizando a técnica de MN, principalmente devido à distribuição de MN ser ligeiramente sobredispersa (VRAL *et al.*, 2011), sendo essa uma das características fundamentais da investigação de exposição parcial do corpo.

Senthamizhchelvan *et al.* (2009) desenvolveram um estudo para detectar a frequência de MN em pacientes tratados com radioterapia com exposição parcial do corpo. Os sete pacientes estudados tinham metástase óssea, eles fizeram uso da radioterapia como tratamento paliativo para a dor óssea. A irradiação foi hemi-pélvica variando entre 15 a 20% do volume corporal e com uma dose de 8 Gy. De fato, foi observado que houve uma sobredispersão dos valores de u , indicando a exposição parcial, entretanto, as estimativas de dose ficaram em torno de 6 Gy. Segundo os autores, os valores de dose reduzidos podem estar relacionado à dose de 8 Gy, por ser considerada elevada, os danos celulares provocados por ela pode retardar a divisão celular ou, até mesmo, induzir à morte em interfase, ou seja, a chance de encontrar os linfócitos que apresentam os MN é reduzida. Além disso, como a região pélvica foi a irradiada, a frequência do MN pode sofrer a influência dos gânglios linfáticos que

¹¹ É um teste exato de inflação de zero (ou deflação de zero) para a distribuição de Poisson.

recolhem os linfócitos alterados nessa região. Resultado semelhante também foi visto em um grupo de pacientes com câncer de mama (D'ALESIO *et al.*, 2003 *apud* SENTHAMIZHCHELVAN *et al.*, 2009).

2.5.4.2 Exposição à baixa taxa de dose

Os efeitos de altas doses de radiação ionizante no corpo humano, como os efeitos estocásticos (tumores malignos sólidos e leucemia), são altamente conhecidos, principalmente através dos estudos com os sobreviventes das bombas atômicas em Hiroshima e Nagasaki (LITTLE *et al.*, 2009; RÜHM *et al.*, 2018). No entanto, a inferência sobre o risco da radiação de baixas doses e de baixas taxas de dose continua sendo um desafio. As estimativas nessas condições são importantes, principalmente para populações em áreas contaminadas após acidentes nucleares ou em áreas de alta radiação natural, e, inclusive, para proteção radiológica de indivíduos ocupacionalmente expostos à radiação ionizante (RÜHM *et al.*, 2018).

Exposição prologadas ou fracionadas, a taxa de dose é um fator extremamente importante para a estimativa de dose. A exposição com tempo de irradiação mais prolongado gera um numero menor de alterações cromossômicas do que a exposição aguda, para o mesmo valor de dose absorvida, logo quanto menor a taxa de dose, menor será o valor do coeficiente β das curvas de calibração (Tabela 8), principalmente para radiação de baixa LET (ACHARYA *et al.*, 2009; VINNIKOV *et al.*, 2010; IAEA, 2011).

Tabela 8. Curvas de calibração dose-resposta relatadas na literatura para ^{60}Co com baixa taxa de dose.

Referências	Taxa de Dose (Gy/min)	C	$\pm$ DP	α (Gy $^{-1}$)	$\pm$ DP	β (Gy $^{-2}$)	$\pm$ DP
Lloyd; Purrott (1981)	0,003	NI	NI	0,0180	0,0080	0,0290	0,0050
Bauchinger <i>et al.</i> (1983)	0,017	0,0003	0,0014	0,0234	0,0066	0,0308	0,0027
Schmid <i>et al.</i> (2002)	0,033	0,0003	0,0002	0,0138	0,0044	0,0300	0,0020
Martins <i>et al.</i> (2013)	0,18 a 0,13	0,0011	0,0006	0,0105	0,0035	0,0480	0,0019
Lindholm <i>et al.</i> (1998)	0,24	0,0006	0,0002	0,0135	0,0043	0,0544	0,0034
Crespo <i>et al.</i> (2011)	0,24	0,0013	NI	0,0101	NI	0,0720	NI
Köksal <i>et al.</i> (1995)	0,4573	0,0005	0,0002	0,0209	0,0057	0,0711	0,0025

C. frequência espontânea (*background*) da alteração; α . Coeficiente linear; β . Coeficiente quadrático; NI. Não informado; DP. Desvio padrão.

A formação dos dicêntricos é um dos principais fatores para a redução do coeficiente β . Para os dicêntricos serem formados é necessário que ocorra duas lesões em dois cromossomos distintos, estas lesões podem ser produzidas por interação única ou por duas interações independentes. No caso de radiação de baixa LET, é mais comum o segundo tipo de interação. Portanto, se a taxa de dose absorvida for reduzida, ou seja, há um maior tempo de exposição, a probabilidade da primeira lesão ser reparada é maior, logo mesmo que o segundo cromossomo seja atingido pela segunda interação a formação do dicêntrico é evitada (ACHARYA *et al.*, 2009; VINNIKOV *et al.*, 2010; IAEA, 2011).

Uma forma de estimar a dose, aproveitando uma curva de calibração já desenvolvida, para os acidentes que envolvem uma taxa de dose menor é fazendo o uso do fator dependente do tempo conhecido como função G (Lea; Catchside, 1942 *apud* IAEA, 2011). Esta função permite modificar o coeficiente β para a estimativa de dose em situação de exposição prolongada, mas para isso é necessário conhecer o tempo real de exposição (IAEA, 2011). No entanto, a curva de calibração previamente estabelecida precisava ter sido desenvolvida com uma taxa de dose média, considerada pelo manual da AIEA (2011) como 0,5 Gy/min. No entanto, alguns laboratórios já estabeleceram suas curvas de calibração com taxas de doses abaixo deste valor de referência, então esta função precisa ser utilizada com cautela.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito biológico da radiação de baixa LET, utilizando-se de técnicas citogenéticas na estimativa de dose absorvida em cenários complexos de exposição à radiação ionizante.

3.2 Objetivos específicos

1. Foram estabelecidas as curvas dose-resposta para Raios X por meio da análise das alterações cromossômicas não balanceadas e dos micronúcleos e foram correlacionadas às curvas das alterações cromossômicas não balanceadas com as curvas de micronúcleos;
2. Foi estudado a distribuição das alterações cromossômicas não balanceadas e dos micronúcleos em diferentes doses absorvidas e em diferentes proporções de sangue irradiado;
3. Foi estabelecida a curva dose-resposta para radiação γ a baixa taxa de dose através da análise das alterações cromossômicas não balanceadas.

4 COMPARATIVE STUDY OF MICRONUCLEUS ASSAYS AND DICENTRIC PLUS RING CHROMOSOMES FOR DOSE ASSESSMENT IN PARTICULAR CASES OF PARTIAL-BODY EXPOSURE

Mariana E. Mendes^{1,2}, Julyanne C. G. Mendonça¹, Joan F. Barquinero³, Manuel Higuera⁴, Jorge E. Gonzalez⁵, Aida M. G. Andrade², Laís M. Silva¹, Alynne M. S. Nascimento¹, Julianne C. F. Lima¹, Júlio C. G. Silva¹, Suy Hwang¹, Ana M. M. A.⁶, Neide Santos² and Fabiana F. Lima¹

¹Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN-NE), 50740-545, Recife, Brazil; ²Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Av. da Engenharia, 50670-901, Recife, Brazil; ³Departamento de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia, Unitat d'Antropologia Biològica, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra, Spain; ⁴Departamento de Matemáticas, Universidad de La Rioja, Logroño, La Rioja 26006; ⁵Centro de Protección e Higiene de las Radiaciones (CPHR), 11300, La Habana, Cuba; ⁶Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, Brazil.

*Corresponding author: tel.: +55 81 3797-8024 and e-mail addresses: fflima@cnen.gov.br.

Revista aprovada

International Journal of Radiation Biology

Qualis:

B2

Comparative study of micronucleus assays and dicentric plus ring chromosomes for dose assessment in particular cases of partial-body exposure

ABSTRACT

Purpose: The goal was to compare the micronucleus (MN) and dicentric plus ring chromosomes (D+R) assays for dose assessment in cases of partial body irradiations (PBI).

Materials and methods: We constructed calibration curves for each assay at doses ranging from 0 to 5 Gy of X-rays at dose rate of 0.275 Gy/min. To simulate partial-body exposures, blood samples from two donors were irradiated with 0.5, 1, 2 and 4 Gy and the ratios of irradiated to unirradiated blood were 25, 50, and 100%. Different tests were used to confirm if all samples were overdispersed or zero-inflated and for partial-body dose assessment we used the Qdr, Dolphin and Bayesian model.

Results: In our samples for D+R calibration curve, practically all doses agreed with Poisson assumption, but MN exhibited overdispersed and zero-inflated cellular distributions. The exact Poisson tests and zero-inflated tests demonstrate that virtually all samples of D+R from PBI simulation fit the Poisson distribution and were not zero-inflated, but the MN samples were also overdispersed and zero-inflated. In the partial-body estimation, when Qdr and Dolphin methods were used the D+R results were better than MN, but the doses estimation defined by the Bayesian methodology were more accurate than the classical methods.

Conclusions: Dicentric chromosomes continue to prove to be the best biological marker for dose assessment. However exposure scenarios of partial-body estimation, overdispersion and zero-inflation may not occur, it being a critical point not only for dose assessment, but also to confirm partial-body exposure. MN could be used as alternative assays for partial-body dose estimation, but in

1 case of an accident without any information, the MN assay could not define
2 whether the accident was a whole-body irradiation (WBI) or a PBI.

3 Key words: Dicentrics; Micronucleus; Partial-body estimation, Zero-inflation

1. Introduction

The purpose of biological dosimetry is to estimate individual absorbed doses due to an ionizing radiation exposure. In an emergency situation, the assessment of an absorbed dose is of great importance, because it brings information, assisting in the planning of therapy and in alerting physicians to probable deterministic (tissue injury) health consequences that could arise in the following weeks and months. There are many sorts of biomarkers but the most widely used are the dicentric chromosomes. It is possible to relate the frequency of dicentrics with a certain absorbed dose using a pre-defined dose-response calibration curve as reference (IAEA 2011).

In a calibration curve, each yield of chromosome aberrations represents an averaged whole-body absorbed dose. It is accepted that after a whole-body exposure to X or gamma irradiation the cellular distribution of dicentrics fit a Poisson distribution. Whole-body irradiation (WBI) is a perfect scenario for dose assessment by biodosimetry markers, although a great majority of accidental exposures with external sources are non-uniform (Tucker 2008; IAEA 2011; Vaurijoux et al. 2011; Lee 2011).

Accidents involving PBI (Partial-body irradiations) occur more frequently than uniform WBI (Whole-body irradiations), so it is important to study biomarkers that can estimate absorbed doses with greater precision for this sort of scenario. The requirement for accurate dose estimation may be lower in exposure scenarios involving doses from 0.5 to 1 Gy, but this dose range (<1 Gy) comprises the vast majority of exposures. For doses above 2 Gy, dose-assessment is crucial, due to the high risk of deterministic effects that threaten the health (Prasanna et al. 2010; Lee 2011). Furthermore, the clinical impact of partial-body exposures vary with the area of body

exposed and can be expected to be substantially different from a total-body exposure at the identical dose (Prasanna et al. 2010; IAEA 2011).

In case of a partial body exposure to a dose lower than 1 Gy, biological dosimetry is confronted with two problems. First, after a partial irradiation there is a mix of damaged and undamaged lymphocytes in blood tissue, and the non-irradiated cells contribute to an extra number of zeros which is called Zero-Inflated Poisson (ZIP) distribution (Prasanna et al. 2010b; IAEA 2011; Vaurijoux et al. 2011; Higuera et al. 2015; Fernández-Fontelo et al. 2018). The second problem is that in routine analysis the numbers of cells analyzed are 500 for dicentrics and low doses are less efficient in producing cells with two or more dicentrics, and partial irradiations are wrongly classed as whole body irradiations.

Usually, u -test is used to assess whether the sample fits Poisson distribution or not. This test is just focused on the dispersion of the data, detecting PBI when the data are overdispersed (dispersion index > 1), then partial exposures are assumed when u values are higher than 1.96 (with a two-sided significance level, $\alpha = 0.025$) (IAEA 2011). Besides u -test, there are others goodness-of-fit tests to assess whether a count sample follows a Poisson distribution, as exacts D -test and L -test (Fisher 1950; Rao and Chakravarti 1956; Higuera et al. 2018).

As previously mentioned in cases of PBI the non-irradiated cells contribute to an extra amount of zeros, so it is possible to use the Z -test to assess whether the number of zeros is too large for a Poisson distribution (Van den Broek 1995). Recently, Fernández-Fontelo et al. (2018) suggested it is possible to reject the hypothesis of whole-body irradiation (WBI) even when the u -test supports WBI (u value < 1.96) through CR -test. Beside these tests, there is the Bayes Factor, which can compare the

probabilities of two different models, in this case ZIP and Poisson (Higuera et al. 2015). These tests serve to demonstrate that in some cases of PBI to provide greater accuracy, u -test must be used in combination with other tests (Fernández-Fontelo et al. 2018).

If u -test confirms a PBI, two methods are proposed for partial-body dose assessment: the contaminated Poisson also named Dolphin's method, and the Qdr method (IAEA 2011; Vaurijoux et al. 2011). Recently, another method of PBI dose assessment has been developed using Bayesian methodology. Similar to Qdr and Dolphin, Bayes factor has to be used to confirm a PBI (Higuera et al. 2015).

Dicentric chromosomes have been the gold standard technique of biological dosimetry; then all these tests and methods to dose assessment were developed for this biomarker, but the biodosimetry community has interest in other biomarkers for PBI dose assessment such as Cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay (Lloyd et al. 1991; Le Roux et al. 1998; Senthamizhchelvan et al. 2008; Senthamizhchelvan et al. 2009; Liu et al. 2010; Beinke et al. 2015; Purnami et al. 2017), because the scoring of micronuclei (MN) is easier and faster than dicentrics (IAEA 2011). However, since the cellular distribution of MN is slightly naturally overdispersed for WBI (Vral et al. 2011), we tried understanding whether MN can be used as an alternative assay for PBI dose assessment. Consequently, the goal was to compare the dose assessment using MN and dicentric chromosomes plus rings (D+R) in simulated accidents involving low doses with PBI.

2. Materials and methods

2.1 Irradiation conditions

Blood was drawn into heparinized vacutainers from healthy volunteers with informed consent (ethics approval no. 269.483 – CB/UFPE-Brazil). To develop calibration curves, samples from one woman were irradiated at doses from 0.15 to 5 Gy of X-rays (CRCN-NE/CNEN-Brazil) at dose rate of 0.275 Gy/min.

The irradiation of the 5 ml blood sampler was performed in an X-rays beam with the following characteristics: 250 kV (tube potential), 10 mA, 2.5 mm Al filter with at less 99.9% atomic purity. The filter was positioned between the X-rays tube and the blood sampler, 40.0 cm far from the X-rays focal spot. The blood sampler was wrapped in 4 mm of dense material (following IAEA manual 2011), positioned 1 m far from the X-rays focal spot, centered on a 7.0 cm X-rays field section, achieved by using a 2.5 mm collimator, and irradiated in free air kerma. The beam dosimetry was established by using a Farmer NE 2670 electrometer associated to a Farmer NE 2575C ionization chamber, in the dose rate mode. The beam uniformity is performed by using of radiographic film and the Model 07-443 Densitometer (Victoreen). The field variation is less than 5% to the several test points.

To simulate partial-body exposures, the blood samples from a male and a female were irradiated with 0, 0.5, 1, 2 and 4 Gy, after these samples were mixed with unirradiated blood. The ratios of irradiated to unirradiated blood were 25, 50, and 100%. After irradiation blood samples were incubated for 2 hours at 37°C, and the mixed with non-irradiated one.

2.2 Dicentric plus ring and Excess Acentric fragments analysis

Lymphocytes (0.5 ml blood) were cultured for 48 hours in 4 ml of RPMI-1640 medium (Gibco) supplemented with 25% of heat inactivated fetal calf serum (Gibco) and 2.5% of phytohaemagglutinin (Gibco). Colcemid with final concentration of 0.15 µg/ml (Sigma) was added 2 h before harvesting. After, the supernatants were removed and the cell pellet was resuspended in 7 ml of 0.075M potassium chloride solution and left to stand at room temperature for 15 to 20 min. Then supernatants were removed and resuspend the cells in 6 mL of freshly prepared 3:1 methanol/acetic acid fixative. Finally, chromosomal preparations were stained with a Giemsa solution (5%). The FPG technique was applied in previous culture and the proportions of second division mitotic index was lower < 2%.

For the construction of calibration curve, at least 1000 complete metaphases or until 100 dicentrics plus ring chromosomes (D+R) in each sample were counted. For partial-body estimations 500 cells or 100 D+R were counted to give a reasonably accurate estimate of dose (IAEA 2011). Following IAEA recommendations dicentrics or rings were only considered if an accompanying acentric fragment was present, acentric fragments not related to dicentrics or rings were considered as excess acentrics fragments (Ace).

2.3 Micronucleus assay

All samples were cultivated with 4 ml of RPMI 1640 medium (Gibco), 0.5 ml of blood supplemented with 25% heat inactivated fetal calf serum (Gibco) and phytohaemagglutinin (Gibco) and incubated at 37 °C. After 24 hours post PHA stimulation, 20 µl cytochalasin-B (Cyt-B - Sigma) was added to the culture, a final

concentration of 6 $\mu\text{g/ml}$. The lymphocytes were harvested between 68–72 hours post PHA stimulation. The cells were hypotonically treated with 7 ml of cold (4°C) 0.075M KCl to lyse red blood cells, and centrifuged immediately at 180 g for 10 min. The supernatant was removed and replaced with 5 ml freshly made fixative consisting of methanol: acetic acid (10:1) diluted 1:1 with Ringer's solution (4.5 g NaCl, 0.21 g KCl, 0.12 g CaCl_2 in 500 ml H_2O). The fixative was added whilst agitating the cells to prevent clumps forming. The cells are then centrifuged again at 180 g for 10 min.

For identification of MN the cells should be binucleated (BN), and the two nuclei in a BN cell should have intact nuclear membranes and be situated within the same size and cytoplasmic boundary. Moreover MN needs to be morphologically identical but smaller than the main nuclei (Fenech et al. 2003). To build the calibration curve, 1000 to 6000 binucleated cells were counted and for partial-body estimation, it was used at least 1000 binucleated cells or 200 MN.

2.4 Statistical analysis

For construction of linear-quadratic calibrations curves of D+R, Ace and MN, we used the R-based tool (R Core Team 2017) applying the routine presented in IAEA manual (IAEA 2011). Thus, for all calibration curves we insert our data observed from each sort of aberration in the described routine i.e., doses, numbers of aberrations, number of cells scored, the individual distribution index and we considered the sigma correlation coefficient equal to 1. As we know if the distribution of aberrations cell presents overdispersion, the compound Poisson distributions are preferred, as the Neyman A, the negative binomial (NB) and recently the family of r th-order univariate

Hermite distributions (Virsik and Harder 1981; Brame and Groer 2002; Puig et al. 2011; Higuera et al. 2015). Then, we constructed new calibration curves of Ace and MN using the NB model through maximum-likelihood estimation (details and routines in Higuera et al. 2015).

All samples were tested for conformity with Poisson distribution through a Shiny R Studio application, named GOF Poisson, based on R language published by Fernández-Fontelo et al. (2018) and Higuera et al. (2018). This is a user-friendly application which allows the user to compute the exact tests for Poisson distribution, as a classical u , D and L tests. Also, include zero inflation tests as Z and CR tests, besides Bayes factor to test Poisson versus ZIP distributions. This application is free available at <http://asapps.bcamaath.org:5053/> and http://manu2h.shinyapps.io/gof_poisson/. It was considered reject Poisson assumption when p-values were lower than 0.05 for u , D , L , Z and CR tests. Then for Bayes factor ($2 \log BF$) > 0, 2, 6 and 10 gives 'weak positive', 'positive', 'strong' and 'very strong' evidence in support of the ZIP model, respectively (Higuera et al. 2015).

The zero-inflated Poisson methods (Dolphin 1969; Duran et al. 2002; Higuera et al. 2015) were used to estimate the dose received by frequency of aberrations in the irradiated fraction (λ). Dolphin's method was applied to estimate the yield of aberrations in the irradiated cells by equation $(\lambda/1 - e^{-\lambda}) = (X/N - N_0)$. This equation was solved by iteration. The λ is the maximum likelihood estimator of the mean yield of the aberration considered in the irradiated fraction, X is the number of aberrations observed, N is the

number of cells scored, N_0 is the number of cells free of aberrations, and $e^{-\lambda}$ represents the fraction of undamaged cells among irradiated cells.

The second method used was Qdr. This method considers the yield of dicentric and rings only from those cells that contain unstable aberrations and assumes that these cells were present at the time of the accident. Qdr is the expected yield of dicentric and rings among the damaged cells, N_U , and is given by equation $(X/N_U) = (y^1 / (1 - e^{y^1 - y^2}))$. Where X is the number of dicentric and rings, and y^1 and y^2 are yields of dicentric plus rings and of excess acentrics, respectively (IAEA 2011). Qdr was only used to calculate PBI joining D+R and Ace, because doing dose estimation from each aberration separately D+R, Ace and MN will produce estimated doses identical to those obtained by Dolphin's method.

For the Zero-inflated Bayesian method for PBI estimation we also used the R codes provided by Higuera et al. (2015). This method estimates the absorbed dose and the fraction of body irradiated (FBI) by derivation. To use this methodology the estimates of the parameters and covariance matrix of the dose–response curve are required. The number of simulations for all samples was $m = 100.000$. It was necessary to use such a large number of simulations to plot accurate bivariate histograms of the posterior distributions of all samples.

3. Results

Calibration curves

Table 1 shows the frequencies of all chromosome aberrations (D+R, Ace, and MN) that we examined for creating the calibration curves. Ace and MN were present at higher aberration frequencies, relative to D+R, at almost all doses, including control samples (0 Gy). Assuming a Poisson distribution in calculating the dose-effect curves, we found that D+R had larger quadratic components (β) than Ace and MN (Figure 1). We observed that the fitted coefficients from calibration curves for MN and Ace in the Poisson model were close to those in the NB model (Figure 1); the primary difference was in the dispersion indexes, 2.575 (SE 0.391), in the NB model, and 1 (fixed), in the Poisson model.

In our samples for the D+R calibration curve, at practically all doses, the u -, Z -, D -, L -, and CR -tests (see Fisher 1950) showed p-values that agreed with the Poisson assumption, with a 5% significance level. Moreover, the strength of evidence that argued for the ZIP distribution and against the Poisson distribution was negative or weakly positive, based on Bayes factor. The Z and L are always defined as right-tailed, but the u and D are left-tailed, when the dispersion index is lower than 1 (and vice versa). In addition, the CR is left-tailed, when the zero-inflation index is lower than 0 (and vice versa). Although at the dose of 3 Gy, the Poisson assumption was rejected, based on all tests, the 2 and 4 Gy doses were underdispersed and also zero-deflated (Table 1). Nevertheless, in many absorbed doses, Ace and MN exhibited cellular distributions that inclined to significant overdispersion ($u > 1.96$, two-tailed). Moreover, the u , Z , D , L , and CR p-values indicated that the data were overdispersed and zero-inflated, with positive evidence for ZIP, based on Bayes factors (Table 1).

Simulation of PBI

We performed an exact test to compare Poisson means at all frequencies of chromosomal aberrations between donors. We found no significant differences (results not shown). As expected, it was difficult to detect an overdispersion, when we analyzed the D+R results from a simulated PBI at the lower doses. Similarly, the exact Poisson tests and zero-inflated tests demonstrated that virtually all samples from D+R fit the Poisson distribution and were not zero-inflated. In addition for 25 and 50% exposures, only the 4 Gy dose showed significant overdispersion and zero-inflation, confirmed by all tests. These findings were also in agreement with Bayes factor analysis (Table 2).

Significant overdispersions were found more frequently in the MN analysis (Table 1 and 3). In almost cases, the Poisson goodness-of-fit and Zero-inflations tests rejected the Poisson assumption and Bayes factors supported the ZIP model. However, the MN analysis showed some interesting results at doses of 0.5 and 1 Gy, because overdispersion and zero-inflation were only observed with the 100% exposures (Table 3).

Dose assessment

Our results from whole-body estimations with the D+R calibration curve demonstrated the robustness of this marker (Table 4). However, in the partial-body estimation, with D+R as a marker, it was not possible to estimate the doses received for all simulations. Only 10 samples demonstrated overdispersion, and only seven samples showed significant overdispersion. However, only four doses were zero-inflated and achieved support for ZIP distributions. Nevertheless, a few doses presented good

results, sufficient for estimating doses with all three methods (i.e., Qdr, Dolphin, and Bayesian; Table 4). The Bayesian method estimated the mean absorbed doses better than the other two methods, and the estimations improved when the exposure fraction approached a WBI. The 95% credible limits were larger at the lower doses (0.5 and 1 Gy), due to the small number of dicentric's observations (Table 4).

These results suggested that it was possible to observe good whole-body estimations from the MN calibration curve with the Poisson model (Tables 3 and 5). When estimating PBIs based on MNs at 0.5 and 4 Gy doses, the real doses were not included in 95% confidence limits with the Dolphin method. However, with the Bayesian model, the credible intervals for doses more often included the real absorbed doses, and it gave the fraction of the body intervals always between 0 and 100%. Importantly, these intervals were also wide for the 0.5 and 1 Gy samples, because the Poisson errors were larger with low numbers of observations (Table 5). A more accurate dose estimation could be expected with a model based on the zero-inflated compound Poisson distribution (e.g. zero-inflated NB), but to the best of our knowledge, there is no well-defined, established cytogenetic dose estimation method for this kind of model assumption, and this study did not aim to present a new statistical method.

4. Discussion

Calibration curves

As a first step, biological laboratories must make their own calibration curves for each type of chromosome aberration that might contribute to the dose estimation (IAEA

2011; Higuera et al. 2015). As expected, our calibration curve of D+R from low linear energy transfer (LET) radiation agreed with the Poisson distribution; only 1 sample exhibited overdispersion and zero-inflation, according to all tests.

It was reported that MNs are overdispersed and their incidence with radiation varies among individuals and being principally affected by age, gender, and multiple dietary and lifestyle factors (Vral et al. 1992; Fenech 1993; Bonassi et al. 2001; Fenech and Bonassi 2011; Room et al. 2013). Consequently, this inter-individual variability might affect the construction of calibration curves, as described by Antunes et al. (2014) and Rastkhah et al. (2016).

Despite all the dose-response studies based on MN, there is no consensus on how calibration curves should be constructed. Consequently, it remains unknown how many individuals of different ages and genders are required to construct a robust calibration curve. Thus, for MN, the biodosimetry community applies knowledge previously described for dicentric (IAEA 2011). We also noted that MN presents zero-inflation in many absorbed doses from the preparation of a dose-response curve. The overdispersion and zero-inflation observed with MN appeared to be related to Ace, because some MNs are formed when Ace formations are not incorporated into the daughter cell nuclei during cell division (IAEA 2011).

To date, Ace has been neglected as a biomarker, probably due to its variable background levels and its overdispersion. According to experimental data with low LET, Ace frequency is about 60% of the dicentric frequency (Fucic et al. 2016). In our samples, we observed a tendency toward a greater Ace's frequency compared to dicentric, up to the 3 Gy dose. This finding was consistent with observations by Lloyd et al. (1973). Other studies that have compared Ace and MN frequencies observed that, at

the same doses, the MN's frequencies were lower than Ace's frequencies (Ramalho et al. 1988; Littlefield et al. 1989; Paul et al. 1997), possibly because MNs can harbor more than one chromosomal aberration.

Unlike the D+R formation, Ace formation is not specific to radiation. Ace can occur due to an interaction with other clastogenic agents. Consequently, Ace detection is not typically used in radiation dose estimations. Furthermore, it is more common to use Ace in partial-body dose estimations when the Qdr method is applied. However, there are several limitations to this method; one is the assumption that excess Ace will also follow a Poisson distribution (Barquinero et al. 1997; IAEA 2011). Without the calibration curve for Ace, all results from Dolphin and Qdr methods will be practically identical (Brewen and Luippold 1971; Fong et al. 1995; Wuttke et al. 1998; IAEA 2011).

Simulation of PBI

Few studies have described a partial-body dose (< 4 Gy) estimation that used dicentrics as a marker (Barquinero et al. 1997; Senthamizhchelvan et al. 2006; Fernandes et al. 2008; Tucker 2008; Prasanna et al. 2010). At low doses, it is difficult to find overdispersion ($u > 0$) (Higuera et al. 2018), and significant overdispersion ($u > 1.96$) is even more difficult to find, particularly when small fractions of the body are irradiated (Prasanna et al. 2010).

It was expected that PBI data would always present significant overdispersion and zero-inflation for dicentrics. However, Fernández-Fontelo et al. (2018) showed that some scenarios of exposure (e.g., *in vitro* experiments and real accidents) could give

rise to different interpretations, where the dispersion might be only slightly or not significant, and the number of zeros might be irregular.

Consequently, we re-analyzed some PBI data of dicentrics from literature (Barquinero et al. 1997; Senthamizhchelvan et al. 2006; Tucker 2008; Prasanna et al. 2010; Vaurijoux et al. 2011) with the GOF Poisson applet (Higueras et al. 2018). For most data, the u -, Z -, D -, L - and CR -test p-values were in agreement about rejecting or supporting the Poisson assumption (at a 5% significance level), and that result was also supported by Bayes factors. However, five samples attracted our attention, because they did not show agreement among all tests about overdispersion and zero-inflation (Table 6).

Hence, all these tests might be seen as complementary to u -test. Then, the hypothesis for assessing a PBI might be just to accept when all tests indicate p-values < 0.05 (Fernández-Fontelo et al. 2018). For a correct estimation of dose it is recommended the analysis of 500 cells or at least 100 dicentrics (IAEA 2011), but even counting 500 cells we have seen different interpretations of significant overdispersions and zero-inflations related to u values around ± 1.96 . Increasing the number of cells analyzed might confirm the determination of overdispersion and zero-inflation. However, after a mass accident this increase of scored cells would slow down the analysis.

Regarding the MN, as expected, for most data, all tests agreed that this biomarker was overdispersed and zero-inflated (Lloyd et al. 1991, Senthamizhchelvan et al. 2008, 2009). Therefore, for this marker, increasing the number of cells analyzed probably would not change the determination of overdispersion and zero-inflation, but calculating the p-values of the exact test would be very intensive with a GOF Poisson applet.

Dose assessment

When the data suggest a partial-body exposure, it is possible to calculate the absorbed doses based on the irradiated fraction of the body with the methods previously described (Qdr, Dolphin, and Bayesian methods). Barquinero et al. (1997) analyzed simulated PBI doses of 2, 3, 4, and 5 Gy with irradiated fractions of 87.5 to 12.5%. The estimated doses obtained with Dolphin's method were mostly in agreement with the delivered doses. Similar results were observed by Vaurijoux et al. (2011), who only studied a dose of 2 Gy in *ex vivo* experiments. Those agreements occurred because the reported data had u values above 1.96; however, in our samples, the u -test did not indicate significant overdispersion, and this was corroborated by the results from the u , Z , D , L , and CR p-values and by the negative or weak positive evidence in support of the ZIP distribution for almost all samples (Table 2).

The Qdr is an alternative method because just considers yield of dicentric and rings from cells that contain unstable aberrations and assumes that these cells were present at the time of the accident and not requires presence of heavily damaged cells containing two or more aberrations (IAEA 2011). However, it is necessary to have a calibration curve for Ace that assumes the Poisson distribution (IAEA 2011), but generally, that is not the case. This assumption is a potential drawback to our results, because our calibration curve for Ace did not assume the Poisson distribution so the received dose have not been correctly assessed with the Qdr method. When the constructed calibration curves follow the Poisson distribution, the dose assessment can

be in agreement with the delivered doses, as observed by Barquinero et al. (1997) and Senthamizhchelvan et al. (2008).

Few accident studies have used MN for assessing partial-body exposure to low dose radiation. Beinke et al. (2015) reported an accidental exposure to gamma radiation in an industrial radiography worker. Cytogenetic biodosimetry was carried out four months after the incident and dicentric and MN assays were applied. The results from dicentrics indicated a whole-body dose of 0.07 Gy, near the value indicated by the thermoluminescent dosimeter. However, the sample showed significant overdispersion ($u = 9.78$), and the partial-body dose indicated an exposure of 2 Gy in 21% of the irradiated fraction of the body. But the MN frequency was not different from the laboratory's frequency relative non-exposed individuals consequently no dose assessment was made.

Other studies in patients and *in vitro* have shown imprecise results from partial-body estimations when MN was used with the Dolphin method (Lloyd et al. 1991, Senthamizhchelvan et al. 2008, 2009, Vral et al. 2011). The estimated doses were far above or below the real doses, probably because the MN does not follow a Poisson distribution. Therefore, it is challenging to use the Dolphin method for dose assessments using MN as a marker.

In our MN data from a PBI at 0.5 Gy, and for both donors, the 95% confidence intervals obtained with the Dolphin method did not cover the delivered dose. This type of imprecision in some absorbed doses and irradiated fractions were also observed in other studies that used the conventional dicentric or FISH assays (Vral et al. 1992; Duran et al. 2002; Vaurijoux et al. 2011). In general, for partial-body exposures, when the Qdr and Dolphin methods were applied, the results estimated based on dicentrics

1 were better than the results estimated based on MN, because the statistical uncertainty
2 intervals covered the real absorbed doses, as shown by Lloyd et al. (1991) and
3 Senthamizhchelvan et al. (2008, 2009).

4 In our study for both D+R and MN, when different methods for partial dose
5 assessment were compared, the doses estimated with the Bayesian methodology were
6 more accurate than the Qdr and Dolphin methods, which are classically used in
7 biodosimetry. The Bayesian model was more accurate, because the results were
8 expressed in the form of probability densities, which intrinsically contain both the modal
9 dose and uncertainty information, and the cell survival dose was considered a random
10 variable. In contrast, in the classical method, the cell survival dose is considered a point
11 value, fixed before the estimation. Moreover, the Bayesian model gives the fraction of
12 the body intervals always in the support of this measure, i.e. between 0 and 1.

13 Hence, we found that the D+R was an accurate biomarker for estimating the
14 mean dose of a partial-body exposure. However, in the absence of significant
15 overdispersion, the D+R becomes more complicated to perform. When MN is used as a
16 biomarker, the fact that the data tends to be overdispersed does not imply that the
17 Poisson (equidispersed assumption) model cannot be used and give sensible results.
18 However, in the case of an accident without any information, the MN assay could not
19 define whether the accident was a WBI or a PBI, because information about the
20 absorbed dose could be generated without certainty. For example, with a 1 Gy dose
21 delivered at 100% exposure to the sample from donor 1, the dose assessment for WBI
22 was 1.127 Gy, but for PBI, it was assessed at 1.798, based on the Dolphin method, and
23 2.495 Gy, based on the Bayesian model.

1 Estimations of partial-body doses are complex. Compared to WBIs, PBIs require
2 greater certainties about the exposure event, because a lack of knowledge about the
3 accident scenario may cause the partial-body dose to be estimated as though it were a
4 whole-body dose. This could result in erroneous dose estimation, and might even
5 erroneously define the level of risk to the patient. However, clinical decisions require
6 multiple, integrated endpoints (Prasanna et al. 2010, Riecke et al. 2010). Thus, to
7 increase reliability, it is necessary to use biodosimetry together with the different tests, in
8 addition to all the clinical and physical parameters. When all the approaches are used
9 together, we might overcome the gaps inherent in each technique.

11 **5. Conclusion**

12 Dicentric chromosomes continue to prove to be the best biological marker for
13 dose assessment. However in exposure scenarios of partial-body estimation,
14 overdispersion and zero-inflation may not occur, it being a critical point not only for dose
15 assessment, but also to confirm partial-body exposure. MN could be used as alternative
16 assays for partial-body dose estimation, but in case of an accident without any
17 information, the MN assay could not define whether the accident was a WBI or a PBI.
18 However in the future it is interesting to develop a new zero-inflated Negative Binominal
19 model for MN PBI dose estimations.

21 **Conflicts of interest**

22 The author declares that there are no conflicts of interest.

1 **Acknowledgements**

2 Authors would like to acknowledge CNPq, CAPES and Centro Regional de Ciências
3 Nucleares do Nordeste (CRCN-NE) for the financial support.

4

References

- Antunes AC, Martins V, Cardoso J, Santos L, Gil OM. 2014. The cytokinesis-blocked micronucleus assay: dose estimation and inter-individual differences in the response to γ -radiation. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 760:17-22.
- Barquinero JF, Barrios L, Caballín MR, Miro R, Ribas M, Egozcue J. 1997. Biological dosimetry in simulated in vitro partial irradiations. *International Journal of Radiation Biology*. 71(4):435-440.
- Beinke C, Ben-Shlomo A, Abend M, Port M. 2015. A case report: cytogenetic dosimetry after accidental radiation exposure during ^{192}Ir industrial radiography testing. *Radiation Research*. 184(1):66-72.
- Bonassi S, Fenech M, Lando C, Lin YP, Ceppi M, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Ban S, et al. 2001. HUMAN MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 37(1):31-45.
- Brame RS, Groer PG. 2002. Bayesian analysis of overdispersed chromosome aberration data with the negative binomial model. *Radiation Protection Dosimetry*. 102(2):115-119.
- Brewen JG, Luippold HE. 1971. Radiation-induced human chromosome aberrations: in vitro dose rate studies. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 12(3):305-314.
- Dolphin GW. (1969). Biological dosimetry with particular reference to chromosome aberration analysis. A review of methods. *Handling of Radiation Accidents*. 215-224.
- Duran A, Barquinero JF, Caballín MR, Ribas M, Puig P, Egozcue J, Barrios L. 2002. Suitability of FISH painting techniques for the detection of partial-body irradiations for biological dosimetry. *Radiation Research*. 157(4):461-468.
- Fenech M. 1993. The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environmental Health Perspectives*. 101(suppl 3):101-107.
- Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E. 2003. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 534(1-2):65-75.

- Fenech M, Bonassi S. 2011. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*. 26(1): 43-49.
- Fernandes TS, Lloyd DC, Amaral A. 2008. Biodosimetry for dose assessment of partial-body exposure: a methodological improvement. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 51(SPE):97-102.
- Fernández-Fontelo A, Puig P, Ainsbury EA, Higuera M. 2018. An exact goodness-of-fit test based on the occupancy problems to study zero-inflation and zero-deflation in biological dosimetry data. *Radiation Protection Dosimetry*. 179(4):317-326.
- Fisher RA. 1950. The significance of deviations from expectation in a Poisson series. *Biometrics*. 6(1):17-24.
- Fong L, Chen JY, Ting LL, Lui LT, Wang PM, Chen WL. 1995. Chromosome aberrations induced in human lymphocytes after partial-body irradiation. *Radiation Research*. 144(1):97-101.
- Fucic A, Bonassi S, Gundy S, Lazutka J, Sram R, Ceppi M, Lucas JN. 2016. Frequency of acentric fragments are associated with cancer risk in subjects exposed to ionizing radiation. *Anticancer Research*. 36(5):2451-2457.
- Higuera M, Puig P, Ainsbury EA, Vinnikov VA, Rothkamm K. 2015a. A new Bayesian model applied to cytogenetic partial body irradiation estimation. *Radiation Protection Dosimetry*. 168(3):330-336.
- Higuera M, Puig P, Ainsbury EA, Rothkamm K. 2015b. A new inverse regression model applied to radiation biodosimetry. *Proceedings of the Royal Society A*. 471(2174):20140588.
- Higuera M, González JE, Di Giorgio M, Barquinero JF. 2018. A note on Poisson goodness-of-fit tests for ionizing radiation induced chromosomal aberration samples. *International Journal of Radiation Biology*. 1-19.
- IAEA 2011. Cytogenetic dosimetry: applications in preparedness for and response to radiation emergencies. International Atomic Energy Agency: Vienna.
- Le Roux J, Slabbert J, Smit B, Blekkenhorst G. 1998. Assessment of the micronucleus assay as a biological dosimeter using cytokinesis-blocked lymphocytes from cancer patients receiving fractionated partial body-radiotherapy. *Strahlentherapie und Onkologie*. 174(2):75-81.
- Lee JK. 2011. Practical applications of cytogenetic biodosimetry in radiological emergencies. *The Korean Journal of Hematology*. 46(2):62-64.

Littlefield LG, Sayer AM, Frome EL. 1989. Comparisons of dose-response parameters for radiation-induced acentric fragments and micronuclei observed in cytokinesis-arrested lymphocytes. *Mutagenesis*. 4(4):265-270.

Liu Q, Cao J, Liu Y, Lü YM, Qin B, Jiang B, Fu H, Zhao FL, Jiang EH, et al. 2010. Follow-up study by chromosome aberration analysis and micronucleus assays in victims accidentally exposed to ^{60}Co radiation. *Health Physics*. 98(6):885-888.

Lloyd DC, Purrott RJ, Dolphin GW. 1973. Chromosome aberration dosimetry using human lymphocytes in simulated partial body irradiation. *Physics in Medicine & Biology*. 18(3):421.

Lloyd DC, Edwards AA, Natarajan AT, Darroudi F. 1991. Biological dosimetry applied to in vitro simulated partial body irradiation. *Treatment and Biological Dosimetry of Exposed Persons: Post-Chernobyl Action*. 51-80.

Paul SF, Venkatachalam P, Jeevanram RK. 1997. Analysis of radiation dose-response curve obtained with cytokinesis block micronucleus assay. *Nuclear Medicine and Biology*. 24(5):413-416.

Prasanna PG, Moroni M, Pellmar TC. 2010. Triage dose assessment for partial-body exposure: dicentric analysis. *Health Physics*. 98(2):244.

Puig P, Barquinero JF. 2011. An application of compound Poisson modelling to biological dosimetry. In *Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. The Royal Society. 467(2127): 897-910.

Purnami S, Nurhayati S, Syaifudin M, Ramadhani D. 2017. Biological dosimetry using micronucleus assay in simulated partial-body exposure to ionizing radiation. *Atom Indonesia*. 43(2):75-80.

R Core Team. 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Ramalho A, Sunjevaric I, Natarajan AT. 1988. Use of the frequencies of micronuclei as quantitative indicators of X-ray-induced chromosomal aberrations in human peripheral blood lymphocytes: comparison of two methods. *Mutation Research Letters*. 207(3-4):141-146.

Rao CR, Chakravarti IM. 1956. Some small sample tests of significance for a Poisson distribution. *Biometrics*. 12(3):264-282.

Rastkhah E, Zakeri F, Ghoranneviss M, Rajabpour MR, Farshidpour MR, Mianji F, Bayat M. 2016. The cytokinesis-blocked micronucleus assay: dose-response calibration curve, background frequency in the population and dose estimation. *Radiation and Environmental Biophysics*. 55(1):41-51.

Riecke A, Ruf CG, Meineke V. 2010. Assessment of radiation damage—the need for a multiparametric and integrative approach with the help of both clinical and biological dosimetry. *Health Physics*. 98(2):160-167.

Senthamizhchelvan S, Pant GS, Rath GK, Julka PK, Nair O, Joshi RC., Malhotra A, Pandey RM. 2006. Biodosimetry using chromosome aberrations in human lymphocytes. *Radiation Protection Dosimetry*. 123(2):241-245.

Senthamizhchelvan S, Pant GS, Rath GK, Julka PK, Nair O, Prabhakar R, Malhotra A. 2008. Biological estimation of dose in hemi-body irradiation of cancer patients by cytogenetic analysis. *Health Physics*. 94(2):112-117.

Senthamizhchelvan S, Pant GS, Rath GK, Julka PK, Nair O. 2009. Biodosimetry using micronucleus assay in acute partial body therapeutic irradiation. *Physica Medica*. 25(2):82-87.

Tucker JD. 2008. Low-dose ionizing radiation and chromosome translocations: a review of the major considerations for human biological dosimetry. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 659(3):211-220.

Van den Broek J. 1995. A score test for zero inflation in a Poisson distribution. *Biometrics*. 738-743.

Vaurijoux A, Gregoire E, Roch-Lefevre S, Voisin P, Martin C, Voisin P, Martin C, Voisin P, Roy L, Gruel G. 2011. Detection of partial-body exposure to ionizing radiation by the automatic detection of dicentrics. *Radiation Research*. 178(4):357-364.

Virsik RP, Harder D. 1981. Statistical interpretation of the overdispersed distribution of radiation-induced dicentric chromosome aberrations at high LET. *Radiation Research*. 85(1):13-23.

Vral A, Thierens H, De Ridder L. 1992. Study of dose-rate and split-dose effects on the in vitro micronucleus yield in human lymphocytes exposed to X-rays. *International Journal of Radiation Biology*. 61(6):777-784.

Vral A, Fenech M, Thierens H. 2011. The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionising radiation exposure. *Mutagenesis*. 26(1):11-17.

Wuttke K, Müller WU, Streffer C. 1998. The sensitivity of the in vitro cytokinesis-blocked micronucleus assay in lymphocytes for different and combined radiation qualities. *Strahlentherapie und Onkologie*. 174(5):262-268.

Tables and Figures

Table 1. Frequency and distribution of D+R, Ace and MN observed in lymphocytes for calibration curves fit.

Dose (Gy)	Cells scored	Cellular Distribution							Dispersion tests					Zero-inflation test			Bayesian test	
		0	1	2	3	4	5	6	D Index	u-test	u (p- value)	D (p- value)	L (p- value)	Z Index	Z (p- value)	CR(p- value)	2 log BF	Strength of evidence
D+R																		
0	6555	6546	9						0.999	-0.074	0.471	0.995	1.000	-0.001	0.469	0.995	1.122	WP (Su. ZIP)
0.15	1030	1026	4						0.997	-0.076	0.470	0.994	1.000	-0.002	0.465	0.994	1.103	WP (Su. ZIP)
0.25	1000	989	11						0.990	-0.235	0.407	0.946	1.000	-0.006	0.402	0.946	0.578	WP (Su. ZIP)
0.5	1000	963	37						0.964	-0.817	0.207	0.510	1.000	-0.019	0.200	0.510	-1.065	NEG (Su. Poisson)
1	1596	1451	142	3					0.948	-1.462	0.072	0.089	0.968	-0.027	0.066	0.090	-3.492	NEG (Su. Poisson)
2	316	216	92	6	2				0.873	-1.603	0.055*	0.055*	0.981	-0.093	0.015	0.020	-5.019	NEG (Su. Poisson)
3	158	87	46	17	6	1	1		1.284	2.260	0.006	0.014	0.015	0.119	0.025	0.032	1.391	WP (Su. ZIP)
4	233	67	112	38	14	2			0.755	-2.646	0.004	0.003	0.999	-0.22	0.0002	0.0003	-7.843	NEG (Su. Poisson)
5	65	12	21	14	13	4	1		0.934	-0.376	0.353	0.407	0.542	-0.008	0.476	0.587	-4.698	NEG (Su. Poisson)
Ace																		
0	6555	6410	144	1					0.992	-0.484	0.314	0.521	0.804	-0.004	0.312	0.521	-1.374	NEG (Su. Poisson)
0.15	1030	1000	30						0.972	-0.650	0.258	0.653	1.000	-0.015	0.251	0.653	-0.636	NEG (Su. Poisson)
0.25	1000	969	31						0.970	-0.682	0.248	0.625	1.000	-0.016	0.241	0.625	-0.722	NEG (Su. Poisson)
0.5	1000	873	106	18	3				1.208	4.660	<1e-4	0.000	<1e-4	0.101	<1e-4	0.000	13.324	VS (Su. ZIP)
1	1596	1424	147	22	3				1.185	5.250	<1e-4	<1e-4	<1e-4	0.09	<1e-4	<1e-4	17.002	VS (Su. ZIP)
2	316	209	88	16	3				0.983	-0.221	0.413	0.473	0.596	-0.013	0.383	0.456	-3.577	NEG (Su. Poisson)
3	158	105	35	12	5	1			1.361	3.220	0.001	0.005	0.002	0.172	0.002	0.003	6.167	STR (Su. ZIP)
4	233	125	66	27	11	4			1.274	2.962	0.002	0.004	0.002	0.142	0.002	0.003	5.032	POS (Su. ZIP)
5	65	36	16	7	3	1	1	1	1.940	5.366	<1e-4	0.0002	0.0002	0.289	0.001	0.001	8.194	STR (Su. ZIP)
MN																		
0	6000	5976	23	1					1.076	4.249	<1e-4	0.049	0.049	0.038	<1e-4	0.049	3.715	POS (Su. ZIP)
0.15	3000	2959	39	2					1.079	3.097	0.001	0.035	0.035	0.040	0.001	0.035	3.872	POS (Su. ZIP)
0.25	3000	2938	59	3					1.071	2.771	0.003	0.033	0.033	0.036	0.003	0.031	3.820	POS (Su. ZIP)
0.5	3000	2857	138	4	1				1.045	1.735	0.041	0.079	0.079	0.017	0.101	0.152	0.586	WP (Su. ZIP)
1	3000	2722	251	23	4				1.124	4.806	<1e-4	<1e-4	<1e-4	0.056	<1e-4	0.0001	12.270	VS (Su. ZIP)
2	3000	2517	453	28	2				0.961	-1.524	0.064	0.067	0.955	2.878	0.045	0.0515	-5.415	NEG (Su. Poisson)
3	2000	1551	397	44	8				1.013	0.418	0.338	0.351	0.404	0.004	0.476	0.496	-3.858	NEG (Su. Poisson)
4	1000	629	270	80	17	3	1		1.142	3.170	0.001	0.002	0.001	0.069	0.002	0.003	4.623	POS (Su. ZIP)
5	1000	518	256	157	38	27	4		1.354	7.925	<1e-4	<1e-4	<1e-4	0.190	<1e-4	<1e-4	58.017	VS (Su. ZIP)

D. Dispersion index, Z. Zero-inflation index, *Null hypothesis was not rejected, Su. Support WP. Weak positive, POS. Positive, NEG. Negative, STR. Strong, VS. Very strong.

Table 2. Frequency and distribution of D+R observed in lymphocytes from donor 1 and 2 for whole- and partial-body estimation.

Cellular Distribution								Dispersion tests					Zero-inflation test				Bayesian test			
Dose (Gy)	%	Cells	0	1	2	3	4	D Index	u-test	u (p-value)	D (p-value)	L (p-value)	Significant overdispersed?	Zi Index	Z (p-value)	CR(p-value)	Zero-inflated ?	2 log BF	Strength of evidence	
Donor 1																				
0		1551	1549	2				0.999	-0.025	0.490	0.999	1.000	No	-0.001	0.486	0.999	No	1.282	WP (Su. ZIP)	
0.5	25	500	497	3				0.996	-0.078	0.469	0.994	1.000	No	-0.003	0.462	0.994	No	1.089	WP (Su. ZIP)	
	50	607	602	5				0.993	-0.129	0.449	0.984	1.000	No	-0.004	0.443	0.984	No	0.920	WP (Su. ZIP)	
	100*	502	483	19				0.964	-0.584	0.280	0.708	1.000	No	-0.019	0.271	0.708	No	-0.473	WP (Su. ZIP)	
1	25	547	535	11	1			1.132	2.273	0.012	0.134	0.134	No	0.067	0.014	0.134	No	2.414	POS (Su. ZIP)	
	50	512	487	24	1			1.028	0.459	0.323	0.476	0.476	No	0.014	0.326	0.476	No	0.174	WP (Su. ZIP)	
	100*	593	531	60	2			0.956	-0.760	0.224	0.340	0.859	No	-0.023	0.216	0.344	No	-2.270	NEG (Su. Poisson)	
2	25	500	479	19	2			1.130	2.102	0.018	0.085	0.085	No	0.067	0.017	0.085	No	2.574	POS (Su. ZIP)	
	50	500	433	63	2	2		1.075	1.198	0.115	0.158	0.229	No	0.015	0.326	0.386	No	-1.097	NEG (Su. Poisson)	
	100*	316	216	91	8	1		0.855	-1.833	0.033	0.030	0.985	No	-0.093	0.015	0.020	Yes	-5.019	NEG (Su. Poisson)	
4	25	500	452	41	7			1.147	2.341	0.010	0.034	0.019	Yes	0.083	0.005	0.018	Yes	4.039	POS (Su. ZIP)	
	50	321	244	59	16	2		1.155	1.971	0.024	0.043	0.021	Yes	0.092	0.012	0.019	Yes	2.921	POS (Su. ZIP)	
	100*	109	31	59	13	5	1	0.706	-2.170	0.015	0.008	0.999	No	-0.318	0.0003	0.001	Yes	-6.868	NEG (Su. Poisson)	
Donor 2																				
0		1500	1498	2				0.999	-0.026	0.490	0.999	1.000	No	-0.001	0.485	0.999	No	1.280	WP (Su. ZIP)	
0.5	25	363	360	3				0.995	-0.091	0.464	0.992	1.000	No	-0.004	0.456	0.992	No	1.038	WP (Su. ZIP)	
	50	500	491	8	1			1.182	3.036	0.001	0.087	0.087	No	0.092	0.002	0.087	No	3.050	POS (Su. ZIP)	
	100*	545	521	24				0.958	-0.712	0.238	0.598	1.000	No	-0.023	0.229	0.598	No	-0.815	NEG (Su. Poisson)	
1	25	500	492	8				0.986	-0.237	0.406	0.945	1.000	No	-0.008	0.399	0.945	No	0.561	WP (Su. ZIP)	
	50	500	480	20				0.962	-0.617	0.269	0.680	1.000	No	-0.021	0.259	0.680	No	-0.563	NEG (Su. Poisson)	
	100*	500	459	41				0.920	-1.282	0.100	0.185	1.000	No	-0.043	0.088	0.185	No	-2.152	NEG (Su. Poisson)	
2	25	500	475	25				0.952	-0.775	0.219	0.543	1.000	No	-0.026	0.209	0.543	No	-0.980	NEG (Su. Poisson)	
	50	500	450	47	2	1		1.079	1.265	0.103	0.157	0.157	No	0.024	0.224	0.296	No	-0.194	NEG (Su. Poisson)	
	100*	431	324	90	13	4		1.096	1.416	0.078	0.101	0.105	No	0.039	0.136	0.162	No	-0.791	NEG (Su. Poisson)	
4	25	467	439	23	4	1		1.342	5.296	<1e-4	0.001	0.000	Yes	0.151	<1e-4	0.001	Yes	10.26	VS (Su. ZIP)	
	50	471	390	61	13	6	1	1.451	6.939	<1e-4	<1e-4	<1e-4	Yes	0.185	<1e-4	<1e-4	Yes	22.64	VS (Su. ZIP)	
	100*	113	32	63	12	6		0.648	-2.647	0.004	0.001	1.000	No	-0.358	0.0001	0.0001	Yes	-7.067	NEG (Su. Poisson)	

*Equal to WBI, D. Dispersion index, Z. Zero-inflation (or zero deflation) index, Su. Support, WP. Weak positive, POS. Positive, NEG. Negative, VS. Very strong.

Table 3. Frequency and distribution of MN observed in lymphocytes from donor 1 and 2 for whole- and partial-body estimation.

Cellular Distribution							Dispersion tests					Zero-inflation test				Bayesian test			
Dose (Gy)	%	Cells	0	1	2	3	4	D Index	u-test	u (p-value)	D (p-value)	L (p-value)	Significant overdispersed?	Zi Index	Z (p-value)	CR(p-value)	Zero-inflate d?	2 log BF	Strength of evidence
Donor 1																			
0		4727	4701	26				0.995	-0.262	0.397	0.933	1.000	No	-0.003	0.394	0.933	No	0.503	WP (Su. ZIP)
0.5	25	1000	986	13	1			1.120	2.763	0.003	0.100	0.100	No	0.060	0.004	0.100	No	2.810	POS (Su. ZIP)
	50	1000	972	27	1			1.041	0.933	0.176	0.336	0.336	No	0.021	0.178	0.336	No	0.875	WP (Su. ZIP)
	100*	3000	2863	124	13			1.124	4.806	<1e-4	0.0002	0.000	Yes	0.065	<1e-4	0.0001	Yes	13.847	VS (Su. ZIP)
1	25	1000	975	25				0.976	-0.548	0.292	0.739	1.000	No	-0.013	0.286	0.739	No	-0.358	NEG (Su. Poisson)
	50	1000	957	40	3			1.086	1.933	0.027	0.084	0.084	No	0.045	0.024	0.078	No	2.335	POS (Su. ZIP)
	100*	2000	1833	148	16	3		1.171	5.409	<1e-4	<1e-4	<1e-4	Yes	0.077	<1e-4	<1e-4	Yes	15.003	VS (Su. ZIP)
2	25	1000	952	44	4			1.103	2.323	0.010	0.046	0.038	Yes	0.054	0.008	0.038	Yes	3.276	POS (Su. ZIP)
	50	1000	924	69	7			1.087	1.951	0.026	0.058	0.043	Yes	0.048	0.018	0.042	Yes	2.590	POS (Su. ZIP)
	100*	1000	814	157	27	2		1.088	1.977	0.024	0.038	0.020	Yes	0.052	0.013	0.019	Yes	2.507	POS (Su. ZIP)
4	25	1000	932	58	9	1		1.226	5.084	<1e-4	0.0002	0.000	Yes	0.109	<1e-4	0.0001	Yes	12.981	VS (Su. ZIP)
	50	1000	862	103	29	5	1	1.377	8.448	<1e-4	<1e-4	<1e-4	Yes	0.175	<1e-4	<1e-4	Yes	42.138	VS (Su. ZIP)
	100*	500	330	122	41	5	2	1.147	2.334	0.010	0.017	0.008	Yes	0.085	0.006	0.008	Yes	3.446	POS (Su. ZIP)
Donor 2																			
0		5000	4978	22				0.996	-0.215	0.415	0.955	1.000	No	-0.002	0.413	0.955	No	0.653	WP (Su. ZIP)
0.5	25	1000	976	23	1			1.056	1.279	0.101	0.261	0.261	No	0.028	0.104	0.261	No	1.330	WP (Su. ZIP)
	50	1000	968	32				0.969	-0.705	0.241	0.606	1.000	No	-0.016	0.234	0.606	No	-0.780	NEG (Su. Poisson)
	100*	3000	2881	110	9			1.098	3.822	0.0001	0.002	0.001	Yes	0.051	<1e-4	0.001	Yes	8.494	STR (Su. ZIP)
1	25	1000	975	22	3			1.188	4.267	<1e-4	0.008	0.008	Yes	0.096	<1e-4	0.005	Yes	6.701	STR (Su. ZIP)
	50	1000	965	28	6	1		1.377	8.525	<1e-4	<1e-4	<1e-4	Yes	0.172	<1e-4	<1e-4	Yes	21.755	VS (Su. ZIP)
	100*	2000	1817	168	12	3		1.109	3.455	0.0003	0.002	0.003	Yes	0.045	0.002	0.007	Yes	4.853	POS (Su. ZIP)
2	25	1000	962	34	3	1		1.237	5.367	<1e-4	0.001	0.001	Yes	0.099	<1e-4	0.001	Yes	8.647	STR (Su. ZIP)
	50	1000	924	66	8	2		1.231	5.202	<1e-4	0.0001	0.000	Yes	0.102	<1e-4	0.0002	Yes	11.923	VS (Su. ZIP)
	100*	1000	809	164	25	2		1.063	1.409	0.080	0.100	0.070	No	0.037	0.057*	0.072	No	0.288	WP (Su. ZIP)
4	25	1000	932	60	7	1		1.184	4.138	<1e-4	0.002	0.001	Yes	0.085	0.0001	0.001	Yes	8.225	STR (Su. ZIP)
	50	1000	868	101	26	3	2	1.384	8.615	<1e-4	<1e-4	<1e-4	Yes	0.167	<1e-4	<1e-4	Yes	37.948	VS (Su. ZIP)
	100*	500	332	126	36	6		1.070	1.111	0.133	0.149	0.084	No	0.052	0.061	0.072	No	-0.273	NEG (Su. Poisson)

*Equal to WBI, *D*. Dispersion index, *Z*. Zero-inflation (or zero deflation) index, Su. Support, *Null hypothesis was not rejected, WP. Weak positive, POS. Positive, NEG. Negative, STR. Strong, VS. Very strong.

Table 4. Observed and estimated doses of D+R for whole- and partial-body estimation from both donors.

Dose (Gy)	%	Whole-body dose (Gy)			Qdr						Dolphin´s method						Bayesian method						
		(95% Confidence limits, combined Poisson and calibration curve error)			Estimated dose (Gy) to the irradiated fraction (95% confidence limits)			Fraction of the body irradiated. D ₀ was 2.7 Gy (95% confidence limits)			Estimated dose (Gy) to the irradiated fraction (95% confidence limits)			Fraction of the body irradiated. D ₀ was 2.7 Gy (95% confidence limits)			Estimated dose (Gy) to the irradiated fraction (95% credible limits)			Fraction of the body irradiated. (95% credible limits)			
Donor 1																							
0.5	25	0.119	-0.034	0.271	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.213	0.060	4.072	6%	2%	97%	
	50	0.164	0.019	0.31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.261	0.099	2.832	8%	3%	96%	
	100*	0.556	0.377	0.736	-	-	0.434	-	15%	-	-	-	-	-	-	-	0.679	0.469	1.836	60%	24%	98%	
1	25	0.399	0.231	0.567	0.163	-	0.676	11%	9%	-	1.392	-	2.518	22%	6%	-	0.663	0.378	2.902	16%	9%	90%	
	50	0.678	0.497	0.859	0.761	0.332	1.182	18%	16%	21%	0.900	-	1.699	72%	24%	-	0.838	0.611	2.075	46%	27%	97%	
	100*	1.092	0.914	1.269	0.963	0.685	1.242	34%	32%	37%	0.787	-	1.332	144%	73%	-	1.204	0.994	1.767	98%	60%	100%	
2	25	0.635	0.453	0.817	0.439	-	0.863	18%	16%	-	1.502	-	2.414	37%	12%	-	1.105	0.640	2.662	30%	19%	91%	
	50	1.308	1.113	1.503	1.426	1.087	1.757	40%	39%	43%	1.450	0.512	2.012	90%	50%	275%	1.487	1.230	2.185	84%	59%	99%	
	100*	2.152	1.898	2.407	1.922	1.654	2.179	71%	69%	75%	1.543	0.859	2.017	133%	111%	235%	2.224	1.968	2.566	99%	89%	100%	
4	25	1.104	0.913	1.295	1.253	0.864	1.637	33%	31%	36%	1.900	0.835	2.557	57%	26%	136%	1.791	1.192	2.681	52%	39%	88%	
	50	1.988	1.739	2.238	2.343	1.978	2.68	62%	61%	65%	2.574	1.871	3.107	81%	51%	105%	2.574	2.032	3.186	79%	67%	95%	
	100*	3.73	3.3	4.16	3.32	2.945	3.659	97%	95%	101%	2.920	2.246	3.445	114%	111%	136%	3.749	3.341	4.223	100%	97%	100%	
Donor 2																							
0.5	25	0.165	-0.02	0.35	-	-	0.32	-	4%	-	-	-	-	-	-	-	0.268	0.085	4.037	7%	3%	96%	
	50	0.35	0.177	0.524	-	-	0.509	-	8%	-	1.637	-	2.917	16%	4%	-	0.687	0.345	3.390	12%	6%	85%	
	100*	0.617	0.442	0.791	0.796	0.384	1.205	15%	14%	18%	-	-	-	-	-	-	0.722	0.529	1.720	78%	29%	99%	
1	25	0.294	0.124	0.464	-	-	0.26	-	7%	-	-	-	-	-	-	-	0.407	0.217	2.400	16%	8%	96%	
	50	0.578	0.398	0.758	0.413	-	0.804	16%	14%	-	-	-	-	-	-	-	0.696	0.489	1.815	60%	26%	98%	
	100*	0.922	0.734	1.11	0.562	0.258	0.85	30%	27%	35%	-	-	-	-	-	-	1.021	0.812	1.661	97%	52%	100%	
2	25	0.671	0.489	0.854	0.549	0.135	0.918	19%	17%	23%	-	-	-	-	-	-	0.793	0.577	1.739	92%	33%	99%	
	50	1.092	0.901	1.283	1.011	0.663	1.36	34%	31%	37%	1.360	-	1.993	79%	38%	-	1.286	1.031	2.179	68%	47%	98%	
	100*	1.969	1.747	2.191	1.771	1.463	2.066	66%	63%	69%	2.226	1.627	2.687	90%	62%	118%	2.207	1.898	2.771	88%	75%	99%	
4	25	0.856	0.664	1.048	1.245	0.683	1.795	22%	21%	26%	2.331	0.866	3.160	34%	13%	99%	2.277	1.328	3.343	32%	22%	57%	
	50	1.709	1.501	1.918	2.463	2.044	2.843	52%	50%	53%	2.974	2.317	3.489	64%	34%	77%	2.99	2.397	3.566	61%	51%	72%	
	100*	3.678	3.255	4.1	3.232	2.885	3.548	97%	95%	101%	2.753	2.082	3.271	118%	117%	143%	3.724	3.293	4.157	100%	97%	100%	

*Equal to WBI, -. Without results. D₀ was 2.7 Gy according to Lloyd et al. (1973).

Table 5. Observed and estimated doses of MN whole- and partial-body estimation from both donors.

Dose (Gy)	%	Whole-body dose (Gy)			Dolphin´s method						Bayesian method					
		(95% Confidence limits, combined Poisson and calibration curve error)			Estimated dose (Gy) to the irradiated fraction			Fraction of the body irradiated. D ₀ was 2.7 Gy			Estimated dose (Gy) to the irradiated fraction			Fraction of the body irradiated.		
					(95% confidence limits)			(95% confidence limits)			(95% credible limits)			(95% credible limits)		
Donor 1																
0.5	25	0.155	-0.334	0.644	1.274	-	2.103	20%	8%	-	0.435	0.176	4.640	14%	9%	80%
	50	0.352	-0.145	0.85	0.839	-	1.575	50%	22%	-	0.539	0.321	2.834	31%	21%	95%
	100*	0.624	0.133	1.114	1.499	1.164	1.774	52%	32%	62%	1.920	1.174	2.823	40%	33%	59%
1	25	0.298	-0.198	0.793	-	-	-	-	-	-	0.402	0.243	2.190	43%	22%	97%
	50	0.574	0.066	1.082	1.257	0.350	1.781	55%	29%	149%	1.265	0.609	3.115	40%	29%	91%
	100*	1.127	0.844	1.493	1.798	1.6	2.005	72%	52%	79%	2.495	1.8	3.298	57%	49%	71%
2	25	0.648	0.137	1.16	1.392	0.691	1.861	56%	32%	95%	1.523	0.734	3.270	42%	31%	87%
	50	1.004	0.474	1.534	1.474	0.991	1.840	76%	50%	101%	1.802	1.065	3.090	58%	46%	92%
	100*	2.23	1.625	2.835	2.041	1.867	2.201	105%	102%	111%	2.941	2.302	3.715	85%	76%	97%
4	25	0.961	0.433	1.488	2.009	1.700	2.275	60%	37%	66%	2.746	1.735	4.189	47%	38%	63%
	50	1.928	1.343	2.513	2.790	-	-	82%	-	-	4.402	3.534	5.296	67%	59%	74%
	100*	3.821	3.06	4.581	2.929	-	-	112%	-	-	4.656	3.910	5.467	93%	88%	98%
Donor 2																
0.5	25	0.298	-0.198	0.793	0.923	-	1.684	41%	17%	-	0.487	0.276	3.124	26%	17%	93%
	50	0.393	-0.107	0.982	-	-	-	-	-	-	0.504	0.328	1.986	61%	29%	98%
	100*	0.532	0.044	1.02	-	0.894	1.642	50%	30%	66%	1.582	0.841	2.551	39%	31%	67%
1	25	0.339	-0.158	0.836	1.708	0.937	2.232	29%	14%	45%	2.093	0.664	4.537	22%	15%	55%
	50	0.536	0.03	1.042	2.410	2.181	2.617	35%	17%	36%	3.678	2.068	5.523	27%	20%	38%
	100*	1.189	0.668	1.71	1.529	1.251	1.766	84%	64%	96%	2.006	1.351	2.762	67%	56%	89%
2	25	0.536	0.03	1.042	1.797	1.259	2.208	41%	21%	52%	2.349	1.041	4.245	31%	23%	56%
	50	1.058	0.525	1.591	1.983	1.684	2.242	65%	42%	72%	2.749	1.747	4.060	51%	42%	67%
	100*	2.254	1.647	2.861	1.942	1.751	2.115	109%	108%	117%	2.767	2.232	3.515	87%	79%	99%
4	25	0.938	0.412	1.465	1.802	1.421	2.116	63%	40%	74%	2.366	1.378	3.791	49%	39%	72%
	50	1.842	1.262	2.422	2.713	-	-	81%	-	-	4.402	3.534	5.296	67%	59%	74%
	100*	3.691	2.94	4.441	2.702	-	-	115%	-	-	4.159	3.596	5.038	94%	89%	99%

*Equal to WBI, -. Without results. D₀ was 2.7 Gy according to Lloyd et al. (1973).

Table 6. Results by shiny app from published in vitro data.

Sample	Ref.	Dose (Gy)	%	Dicentrics distribution					Dispersion tests					Over dispersed?	Zero-inflation test			Zero-inflated?	Bayesian test	
				0	1	2	3	4	D Index	u-test	u (p-value)	D (p-value)	L (p-value)		Z Index	Z (p-value)	CR(p-value)		2 Log BF	Strength of evidence
1	Barquinero et al. 1997	2	12.5	488	11	1			1.130	2.139	0.016	0.146	0.146	No	0.066	0.019	0.146	No	2.292	POS (Su. ZIP)
2		4	87.5	75	42	20	7	2	1.203	1.736	0.041	0.061	0.034	No	0.124	0.026	0.033	Yes	1.226	WP (Su. ZIP)
3	Prasanna et al 2010	5	50	56	2	1			1.457	2.841	0.002	0.099	0.099	No	0.230	0.006	0.099	No	3.080	POS (Su. ZIP)
4	Vaurijoux et al. 2011	*	A	458	33	2	1		1.171	2.725	0.003	0.024	0.024	Yes	0.066	0.021	0.061	No	2.525	POS (Su. ZIP)
5		*	B	2658	22	1			1.075	2.796	0.003	0.098	0.098	No	0.038	0.003	0.098	No	2.808	POS (Su. ZIP)

D. Dispersion index, Z. Zero-inflation (or zero deflation) index, Su. Support, *Based on accident scenario and/or clinical diagnostic, A. Accidental exposure from individual 4 by manual scoring method. B. Accidental exposure from individual 3 by automatic dicentrics scoring, WP. Weak positive, POS. Positive.

5 CALIBRATION CURVES WITH LOW DOSE RATE ARE DIFFERENT IN TERMS OF DOSE ESTIMATION – A COMPARATIVE STUDY

Curve with low dose rate

Mariana E Mendes^{a,b}, Julyanne CG Mendonça^b, Suy Hwang^b, Marina Di Giorgio^c, Fabiana F Lima^b and Neide Santos^{a,*}

^a Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Av. da Engenharia, S/N, 50740580, Recife, Brazil; ^b Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN-NE), Av. Professor Luiz Freire, 200, 50740-545, Recife, Brazil; ^c Autoridad Regulatoria Nuclear, Av. Del Libertador 8250, CP: C1429BNP, Ciudad de Buenos Aires, Argentina

*Corresponding author: Av. da Engenharia S/N, Cidade Universitária, Recife/PE CEP 50740580, tel.: +55 81 2126 8522 and e-mail addresses: neidesantos.ufpe@gmail.com.

Revista submetida

Genetics and Molecular Biology

Qualis:

B1

ABSTRACT

Biological dosimetry aims to estimate individual absorbed doses due ionizing radiation exposure. The dicentric chromosomes are considered the most sensitive biomarker for dose estimation. The aim of this study was to compare calibration curves for gamma radiation built from low dose rates and whether they varies in terms of dose estimation. For that we did a search in the literature of all calibration curves produced with low dose rates and we simulated the dose estimation from pre-established dicentric's frequencies. The information on methodologies and cytogenetic results of each study were analyzed. As expected dose rate influence β coefficients, especially at higher doses. The greatest divergences in absorbed dose values occurred because of reduced uncertainties limits. However, we have seen that some doses were not statistically different but they should be, because there is a significant association between productions of dicentric per cell per curve. We also reinforce that the dose rate is an importante factor to dose estimation and there is still little information about the health's risk of this type of protracted and fractionated exposures, mainly at molecular level in human cells.

Key words: Dicentrics; Gamma Radiation; Low Dose Rate; Biological Dosimetry

1 Introduction

2 Biological dosimetry aims to estimate individual absorbed doses due ionizing
3 radiation exposure. This estimation is based on analysis of sensitive and specific
4 biological markers that reflect biological damage caused by ionizing radiation. The
5 analysis of unstable chromosome aberration is widely used for dose estimation and
6 dicentric chromosomes are considered the most sensitive biomarker even at low
7 doses (~100 mGy) (IAEA, 2011; Lee *et al.*, 2012; Wong *et al.*, 2013).

8 The determination of absorbed dose using a biological method is critical
9 because bring essential information that will support the medical management of
10 patients in emergencies (Di Giorgio *et al.*, 2011; Gruel *et al.*, 2013). Dose estimation
11 is made using pre-defined dose-response calibration curves where the yields of
12 chromosome aberrations are related to dose by the linear quadratic equation (IAEA,
13 2011; Roy *et al.*, 2012). International Atomic Energy Agency (IAEA) recommends
14 that each biodosimetry laboratory should be set their own calibration curve, given
15 that intrinsic differences in protocols and interpretation of dose using a calibration
16 curve produced elsewhere may introduce extra uncertainty to dose estimation (IAEA,
17 2011).

18 Therefore, it is common that laboratories of biodosimetry build their own
19 calibration curves simulating acute exposition using dose rates of 0.5 Gy/min or
20 greater. However, the majority of accidental exposure scenarios involve irradiation
21 over an uncertain period from varying distances and hence with different dose rates
22 (IAEA, 2011; Vinnikov *et al.*, 2010). Some researchers have been choosing to
23 produce non-acute calibrations curve in order to have a better understanding of how
24 the β coefficient should be modified for interpreting aberration yields in accidents
25 involving prolonged irradiation (IAEA, 2011).

26 In this context, this study has the purpose to compare calibration curves for
27 low linear energy transfer (LET) radiation built from low dose rates and whether they
28 varies in terms of dose estimation. For that we did a search in the literature of all
29 calibration curves for gamma radiation produced with low dose rates and we
30 simulated the dose estimation from pre-established dicentric's frequencies.

32 Materials and methods

33 Construction of calibration curve

1 Firstly, we built a reference calibration curve for our laboratory, named “Our
2 curve”. For this purpose, blood samples (5 ml) were collected from a voluntary non-
3 smoking woman with informed consent (ethics approval no. 269.483). Each sample
4 was irradiated with gamma rays (Gamma cell 220 irradiator) at 0.055 to 0.048 Gy/min
5 with uncertainty of 2% at the point of irradiation. For the elaboration of the calibration
6 curve, blood samples were irradiated between 0.15 - 5 Gy and allowed to repair at 37
7 °C for two hours.

8 Lymphocytes (0.5 ml of irradiated whole blood) were culture for 48 hours in 4
9 ml of RPMI-1640 (Sigma) medium supplemented with 0.2 ml of phytohaemagglutinin
10 (Sigma), and 1 ml of fetal bovine serum (Biological Industries). In addition, 0.1 ml of
11 0.0016% colchicine (Sigma) was added 46 hours after culture started. Finally,
12 chromosomal preparations were stained with a Giemsa solution. We followed the
13 IAEA (2011) recommendation that only complete metaphases be recorded, i.e. those
14 with 46 centromeres and if the cell contains unstable aberrations, then it should
15 balance.

16 17 *Selected calibration curves*

18 For this comparative study, we made an exhaustive literature search of experimental
19 studies on Web of Science, reLYING on the following keywords: “dosimetry”, “dose
20 response”, “calibration curve”, “gamma radiation” and “dicentrics”. Once we located
21 these papers, we tested if they fulfilled our inclusion criteria. We also searched the
22 reference lists of all identified publications in an attempt to locate additional
23 publications. We included (1) calibration curves already set by cobalt-60 sources
24 have been selected with dose rates below 0.5 Gy/min and a single curve was used
25 as the standard (dose rate 0.5 Gy/min); (2) studies that presented all information
26 about frequencies of dicentrics; (3) dose effect curves established by manual scoring.
27 Exclusion criteria were (1) studies that presented only information about frequencies
28 of dicentric plus ring together; (2) studies without distributions of dicentric per cell; (3)
29 studies that the dose effect curves were established by automatic or semiautomatic
30 scoring. Until April 10 2019 we found 7 studies following these criteria. Then we
31 compared information on methodologies (dose analysis, scored cells) and
32 cytogenetic results from each study (frequencies and distribution of dicentrics).

33 34 *Comparison of Calibration Curves*

All selected calibration curves were compared using two approaches: 1) the parameters of each methodology, as well as dicentric distribution data with no modifications; and 2) all data (including statistic coefficients) were standardized using Dose Estimate software (Ainsbury *et al.*, 2010) to perform the statistics. Thus, all results were re-tested to analyze their conformity with Poisson distribution by means of the Papworth's u test (Acharya *et al.*, 2009; IAEA, 2011). Thereafter, using R-based tools2 (R development core team, 2012) the Pearson's Chi-squared test was applied to determine whether the yield of dicentric varies according to calibration curves.

Firstly, we simulate the dose estimation from six pre-established dicentric frequencies between 0.02-1 dicentric per cell. Thus all results of estimated absorbed doses along with their lower and upper confidence limits were used. The confidence limits were based on exact Poisson error on yield, because this simplified method is more commonly encountered in biodosimetry comparison exercise (Szluińska *et al.*, 2007).

In addition, we used ANOVA test to compare dose estimation among all calibration curves. In cytogenetic, ANOVA may be used in any circumstance when comparison of three or more groups, or two or more factors. ANOVA is a parametric method of analysis, which is usually applied to Normal data, but the type of data as Poisson distributed also approximates the Normal distribution in a manner sufficient to ensure that ANOVA can be applied. When we are conducting an analysis of variance, the null hypothesis considered is that there is no difference in treatments means, consequently in these cases there is no difference among estimated doses (IAEA, 2011; Wilkins *et al.*, 2015). Afterward, Tukey's multiple comparison tests were conducted to find means that are significantly different from each other, so this test compares all possible pairs of means.

Results

The results of dicentric distribution among cells from our calibration curve were in accordance to Poisson distribution; this model is expected in blood samples homogeneously exposed to low LET gamma-radiation (IAEA, 2011). Tendency toward underdispersion was observed in cell distribution of dicentric, though this trend was not statistically significant, except for the dose of 3 Gy (Table 1). Besides that, this curve was best adjusted by the linear-quadratic model (Table 2).

All the analyzed studies were performed using different methodologies for calibration curves construction. Consequently, these calibration curves presented different coefficients values (Table 2). Most of these studies used 48 hours of culture and few did not use BrdU (Bromodeoxyuridine), differences also include irradiation conditions (low dose rates and dose range). Differences on slide scoring criteria were not considered, because this type of information was not available in most selected studies.

The frequencies of dicentrics increase with absorbed dose and with dose rate, and the same tendency has been seen in the distribution of dicentrics per cell (Table 3). Therefore, to confirm this behavior Pearson's Chi-squared test was done; we just compared the doses of 0.5, 1 and 2 Gy, because only these points of doses were included in all calibration curves (Table 3). However, there is a significant association between production of one dicentric per cell per calibration curve at doses of 1 and 2 Gy. In case of more than one dicentric per cell there is a significant difference among dose rates mainly at 2 Gy dose, confirmed by Chi-squared test (available in Supplementary Table 1).

To reduce differences among coefficient values from statistical analyses for curve fitting, we decided to re-analyze all published calibration curves using a single software (Dose Estimate). After the re-analysis, there were found minimal differences of newly generated coefficients with the correspondent to the ones previously published in the selected works; the only exception was about α coefficient from Top *et al.* (2000) calibration curve (Table 4).

To evaluate if these differences among dose rates generated different results of estimated doses, we used six different frequencies of dicentrics (0.02 – 1 dicentric per cell) that result in absorbed doses in the range 0.5 to 5 Gy (Table 5). As supposed two major trends were observed: 1) while frequencies of dicentrics increase the estimated doses and their uncertainties on the estimate of dose were large, especially in the curves of lower dose rate; 2) the number of dicentrics from studies with the highest dose rates predicted the lowest absorbed dose results (Table 5 and Figure 1).

The estimated doses were compared using the absorbed doses from curve of Lloyd *et al.* (1986) as a reference and the estimated doses were considered correct when within ± 0.5 Gy. Some curves reported an overestimate outside of this range for dicentric's frequencies of 0.7 to 1, and these curves also presented absorbed doses

1 associated to different severity health's risk to the exposed individual (Figure 1).

2 In first instance, ANOVA has shown that estimated doses were difference in
3 almost all frequencies tested (number one of groups compared in Table 6).
4 Afterwards, Tukey's test (applied just for the cases where ANOVA resulted
5 statistically different) indicated differences related to to calibration curves with low
6 dose rates (Table 7), mainly absorbed doses from Schmid *et al.* (2002) with
7 calibration curves made with dose rates of 0.46 and 0.5 Gy.min⁻¹ (Koksal *et al.*, 1995
8 and Lloyd *et al.*, 1986, respectively).

9 To better understand the sources of bias, including the potential effects of
10 outlier curves in dose estimation, we replicated our analysis using a jackknife-like
11 resampling method. First, even though the absorbed doses from Schmid *et al.* (2002)
12 were withdrawn of the analysis group, difference of estimated doses persisted. Under
13 the same rationale, other calibration curves began to generate absorbed doses
14 statistically different (Tables 6 and 7). However, some calibration curves started for
15 all dicentrics' frequencies tested results not statistically different (Table 6).

16 All compared estimated doses and their respective uncertainties were not
17 statistically different for the dicentrics' frequency of 0.02. On the other hand, the
18 intermediate frequencies of 0.15 and 0.20 dicentric per cell generated more conflicts
19 (p-values < 0.05) than elevated frequencies. Thus, we suppose that this was
20 influenced by 95% confidence limits, because the uncertainties presented low values
21 that which were defined by exact Poisson errors, and then this allowed a greater
22 significant difference among estimated doses from intermediate frequencies in the
23 comparative analysis among calibration curves (Tables 6 and 7).

24 25 **Discussion**

26 Dicentric chromosomes represent specific and sensitive biomarkers for
27 estimated absorbed doses and this type of aberration appears regardless of the
28 protocol used for dose estimate (Tables 2 and 3) (Lee *et al.*, 2012; Wong *et al.*, 2013).
29 When the dose-response curves are constructed, interlaboratory differences inherent
30 to protocols might well happen. These factors that could be responsible for different
31 coefficient values of calibration curves are: total absorbed doses, dose rate,
32 irradiated cell lines, biological endpoints, LET, and energy (Lee, 2011; Okumura *et al.*,
33 2013).

However, some variables are most critical for dose estimate in protocols for dose-response curve construction, e.g., dose rate and scoring criteria. Dose rate is a factor to be considered in the analysis of aberrations because prolonged irradiation time reduces the frequency of dicentrics induced by low LET radiation. This extended irradiation time allows action of cellular repair mechanisms that consequently reduces dicentric frequencies. Two lesions, one in the DNA double helix of each unreplicated chromosome, need to be produced within a target zone to generate a dicentric. If the lesions are produced by two independent tracks, and the dose rate is low, there is likelihood that injury produced by first track is repaired before chromosome is crossed by a second track forming the second lesion (Vinnikov *et al.*, 2010; IAEA, 2011).

According to literature, linear coefficient (α) is independent of dose rate and quadratic coefficient (β) decreases with low dose rate (Brewen and Luippold, 1971; Lloyd *et al.*, 1975; Bauchinger *et al.*, 1979, 1983). This behavior was also observed in the calibration curves compared in this study, it noted reduction in the β term of the calibration curve with dose rate decrease (Table 2 and 4).

However, it is noteworthy that β coefficient from Schmid *et al.* (2002) was different from expected; the authors also affirmed that decrease of β coefficient could not be attributed to a dose-rate effect. However, some aspects might be influenced this coefficient value such as scoring criteria or perhaps the culture time. The scoring depends on two main factors (i) the spreading quality and metaphase selection and (ii) the dicentric identification (Roy *et al.*, 2004). Consequently, these aspects may influenced on criteria of accept the dicentric, so this can increase or decrease number of dicentrics considered in total analysis.

Besides that, the culture time might also have influenced the curve of Schmid *et al.* (2002) (Tables 2 and 4). Because a culture time of 48 hours is necessary to show mitotic activity by lymphocytes stimulated in vitro with phytohaemagglutinin (Rooney, 2001). For cells harvested at 48 hours, at least 90% of the population is in first division, independently of radiation type or absorbed dose (George *et al.*, 2001) and according to Rooney (2001), the later hours are crucial to mitotic cycle and collection of cells in metaphase. Therefore, the scoring process and the culture time adopted by Schmid *et al.* (2002) might have affected both α and β coefficients, especially the latter.

All the calibration curves compared have different estimated doses mainly due

to values of β coefficients and some of them may indicate different health's risk (Figure 1). However, in some points the estimated doses results were no different for all tested dicentric frequencies among calibration curves from Bauchinger *et al.*, 1983 to Top *et al.*, 2000, and from Lindholm *et al.*, 1998 to Lloyd *et al.*, 1986 (Table 6).

The greatest divergences in estimated doses values occurred because the uncertainties on estimate were reduced. In the case of higher absorbed doses, the respective uncertainties were higher, thus contributing to the lack of statistical differences (Szłuińska *et al.*, 2007). We decided to do this identical analysis by ANOVA and Tukey's test, but using the 95% confidence limits from combined Poisson and calibration curves errors, and the same behavior mentioned on results section occurred. However, the differences among calibration curves were less pronounced, because the uncertainties on estimated become numerically higher, allowing in compared analysis less difference among estimated doses (results in the Supplementary Material).

However, we have seen that some estimated doses were not statistically different but they should be, because there is a significant association between productions of dicentric per cell per calibration curve mainly due to dose rate (e.g., 0.017 Gy/min at 0.425 Gy/min). Even ANOVA and Tukey tests have indicated values without significant difference in the case of higher absorbed doses, depending on which calibration curve is used; individuals can be classified within different risk (Figure 1). Besides that, another problem related to calibration curves appears in intercomparisons exercises.

The propose of intercomparison exercises is to establish an operational network in biodosimetry to handle large numbers of potentially overexposed victims for mutual assistance in case of an emergency (Oestreicher *et al.*, 2017). They can be done in distinct methods and statistical analyses. For example, biodosimetry labs receive the irradiated blood samples to set up lymphocyte culture following their own standard protocols (Beinke *et al.*, 2013; Wilkins *et al.*, 2015; Oestreicher *et al.*, 2017) or receive slides or fixed suspensions (Ramalho *et al.*, 1991; Roy *et al.*, 2004; Di Giorgio *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2016). For comparison of the reported estimated doses per laboratory, is it possible to use the mean absolute difference (MAD), z test or ANOVA (Di Giorgio *et al.*, 2011; Beinke *et al.*, 2013; Wilkins *et al.*, 2015).

Intercomparison exercises that labs only receive slides or fixed suspensions has a greater advantage because reduce the effect of blood preparation, thus this

sort of intercomparison are only conditioned to dicentric scoring. Thus, the results from literature indicated that in this sort of exercise produce less variation among laboratories (Roy *et al.*, 2004; Di Giorgio *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2016).

Even some labs reporting higher frequencies of aberrations when the data are converted into absorbed doses using their own calibration curves the estimated doses present less variation (Grégoire *et al.* 2013). However, there are cases where laboratories defined the frequency of dicentricos near to general average, but when estimating the dose, the estimated doses were out of the recommendation statistical criteria. For example, the RENEB intercomparisons (Oestreicher *et al.*, 2017) caught our attention. This study was a global exercise using the dicentrics for dose assessment. In total 42 laboratories from 31 countries from all over the world participated. Blood samples were irradiated with Cs¹³⁷ gamma rays (dose rate 0.495 Gy/min) and each laboratory was requested to set up at least two lymphocyte cultures per sample following their own standard protocols, and considering the IAEA recommendations (IAEA 2011) and International Organization for Standardization (ISO) standards (ISO 19238: 2014; ISO 21243: 2008).

Therefore, as expected all calibration curves present specific shape, but there were curves with low beta coefficient from L10, N8, N9 and N14 labs. These laboratories presented a very good agreement of the number of dicentrics in 50 cells/slide with the theoretically expected range, even they having different lymphocytes cultures and scoring criteria; but their estimated doses were above the recommended range for both simulated doses of 0.85 Gy and 2.7 Gy. Consequently this intercomparison results corroborates with our results where the curves with lower beta coefficient generate estimated doses higher than expected, generating results outside the means, independently what sort of test was used, e.g., z test in this intercomparison and by ANOVA in our comparison study.

Another interesting point of this intercomparison was the percentage of correct dose estimations, for the low dose-point (0.85 Gy) among 42 labs did not change (81–76%) comparing the exercise only with eighteen laboratories involved in the RENEB. However, the percentage of correct dose estimations in the exercise involving all labs were increased from 39–61% for the high dose-point (2.7 Gy). This could happen due to the increase in the number of compared curves and to increasing uncertainties, not because there has been an improvement in lab's performances.

Thus, in cases of emergency, we suggest to use as reference curves those with the closest dose rate to the exposure scenarios especially for accidents involving dose rate below 0.2 Gy/min. On the other hand, it is possible to use a time dependent factor known as the G function proposed by Lea and Catcheside (1942) (apud IAEA, 2011). This factor is enable to modify the β coefficient and thus allow for the effects of dose protraction, but, this method allows the derivation of dose-effect relations for dicentrics after irradiation with low dose rates from pre-definite calibration curves with conventional dose rates (Bauchinger *et al.*, 1979; IAEA, 2011). Furthermore, the intercomparison exercises should take into account the dose rates of the participating laboratories because this may be another reason why some results of estimated doses are outside of the recommendations.

Although the biodosimetry methods can accurately estimate the absorbed doses, the knowledge about long-term biological effects that go beyond the structural damages as dicentrics is slight. As reported by Merrifield and Kovalchuk (2013), these radiation exposures could affect cell with more sensible ways such as changing gene expressions and epigenetics modifications, disruption of mitochondrial processes, cell cycle arrest, even apoptotic cell death, therefore studies of prolonged irradiation effects should be done beyond the cytogenetic methods.

Conclusions

This comparative study reinforces the robustness of dicentric assay and its importance in biological dosimetry. We also reinforce that the dose rate is an importante factor to dose estimation and there is still little information about the health's risk of this type of protracted and fractionated exposures, mainly at molecular level in human cells. Therefore, paramount further studies should be done for the analysis of long-term effects of prolonged exposure using more sensitive techniques than the dicentric's assay.

Acknowledgements

Authors would like to acknowledge CNPq, CAPES and Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN-NE) for the financial support. We thank Dr. Cibeles Gomes de Sotero-Caio and Suzy Hwang for helpful reviews of the manuscript.

1 Disclosure statement

2 The authors report no conflicts of interest.

4 References

6 Acharya S, Sanjeev G, Bhat NN, Siddappa K and Narayana Y (2009) The effect of
7 electron and gamma irradiation on the induction of micronuclei in cytokinesis-blocked
8 human blood lymphocytes. *Radiat Environ Biophys* 48: 197-203.

10 Ainsbury EA and Lloyd DC (2010) Dose Estimation Software for Radiation
11 Biodosimetry. *Health Physics Soc* 98: 290-295.

13 Bauchinger M, Schmid E and Dresch J (1979) Calculation of the dose-rate
14 dependence of the dicentric yield after Co γ -irradiation of human lymphocytes. *Int J*
15 *Radiat Biol* 35: 229-233.

17 Bauchinger M, Schmid E, Streng S and Dresch J (1983) Quantitative analysis of the
18 chromosome damage at first division of human lymphocytes after ^{60}Co γ -irradiation.
19 *Radiat Environ Biophys* 22: 225-229.

21 Beinke C, Barnard S, Boulay-Greene H, De Amicis A, De Sanctis S, Herodin F,
22 Jones A, Kulka U, Lista F, Lloyd D, et al. (2013) Laboratory intercomparison of the
23 dicentric chromosome analysis assay. *Radiat Res* 180: 129-137.

25 Brewen JG and Luippold HE (1971) Radiation-induced Human Chromosome
26 Aberrations: in vitro Dose Rate Studies. *Mut Res* 12: 105-314.

28 Di Giorgio M, Barquinero JF, Vallergera MB, Radl A, Taja MR, Seoane A, De Luca J,
29 Oliveira MS, Valdivia P, Lima OG, et al. (2011) Biological dosimetry intercomparison
30 exercise: an evaluation of triage and routine mode results by robust methods. *Radiat*
31 *Res* 175: 38-649.

33 George K, Wu H, Willingham V, Furusawa Y, Kawata T and Cucinotta FA (2001)
34 High- and Low-LET induced chromosome damage in human lymphocytes: a time-
35 course of aberrations in metaphase and interphase. *Int J Radiat Biol* 77: 175-183.

37 Grégoire E, Hadjidekova V, Hristova R, Hadjidekova V, Hritova R, Gruel G, Roch-
38 Lefevre S, Voisin P, Staynova A, Deleva S, Ainsbury EA and Lloyd DC, Barquinero
39 JF (2013) Biological dosimetry assessments of a serious radiation accident in
40 Bulgaria in 2011. *Radiat Protect Dos* 155: 418-422.

42 Gruel G, Grégoire E, Lecas S, Martin C, Roch-Lefevre S, Vaurijoux A, Voisin P,
43 Voisin P and Barquinero JF (2013) Biological Dosimetry by Automated Dicentric
44 Scoring in a Simulated Emergency. *Radiat Res* 179: 557-569.

46 International Atomic Energy Agency (IAEA) (2011) Cytogenetic analysis for radiation
47 dose assessment: a manual. IAEA Technical Reports Series No. 405. Vienna: IAEA.

- 1 International Organization for Standardization (ISO). 19238 (2014) Radiation
2 protection-performance criteria for service laboratories performing biological
3 dosimetry by cytogenetics. Geneva: ISO.
- 4
- 5 International Organization for Standardization (ISO). 21243 (2008) Radiation
6 protection – performance criteria for laboratories performing cytogenetic triage for
7 assessment of mass casualties in radiological or nuclear emergencies – general
8 principles and application to dicentric assay. Geneva: ISO.
- 9
- 10 Köksal G, Pala FS and Dalci DO (1995) In vitro dose-response curve for
11 chromosome aberrations induced in human lymphocytes by ^{60}Co γ -radiation. Mut
12 Res 329: 57-61.
- 13
- 14 Lee JK (2011) Practical applications of cytogenetic biodosimetry in radiological
15 emergencies. Koren J Hematol 46: 62-64.
- 16
- 17 Lee JK, Han E, Lee S, Ha W, Barquinero JF, Lee HR and Cho MS (2012)
18 Cytogenetic biodosimetry for Fukushima travelers after the nuclear power plant
19 accident: no evidence of enhanced yield of dicentrics. J Radiat Res 53: 876-881.
- 20
- 21 Lindholm C, Luomahaara S, Koivistoinen A, Ilus T, Edwards AA and Salomaa S
22 (1998) Comparison of dose-response curves for chromosomal aberrations
23 established by chromosome painting and conventional analysis. Int J Radiat Biol 74:
24 27-34.
- 25
- 26 Liu JX, Pan Y, Ruan JL, Piao C and Su X (2016) Intercomparison in cytogenetic
27 dosimetry among 22 laboratories in China. Genome Integ 7: 6.
- 28
- 29 Lloyd DC, Edwards AA and Prosser JS (1986) Chromosome Aberrations Induced in
30 Human Lymphocytes by *in vitro* Acute X and Gamma Radiation. Radiat Protect Dos
31 15: 83-88.
- 32 Lloyd DC, Purrott RJ, Dolphin GW, Bolton D and Edwards AA (1975) The relationship
33 between chromosome aberrations and low LET radiation dose to human
34 lymphocytes. Int J Radiat Biol 28: 75-90.
- 35
- 36 Martins V, Antunes AC and Monteiro Gil O (2013) Implementation of a dose-
37 response curve for γ -radiation in the Portuguese population by use of the
38 chromosomal aberration assay. Mut Res 750: 50–54.
- 39
- 40 Merrifield M and Kovalchuk O (2013) Epigenetics in radiation biology: a new research
41 frontier. Front Genet 4: 40.
- 42
- 43 Oestreicher U, Samaga D, Ainsbury E, Antunes AC, Baeyens A, Barrios L, Beinke C,
44 Beukes P, Blakely WF, Cucu A, et al (2017) RENEB intercomparisons applyING the
45 conventional Dicentric Chromosome Assay (DCA). Internat J Radiat Biol 93: 20-29.
- 46
- 47 Okumura K, Kinashi Y, Kubota Y, Kitajima E, Okayasu R, Ono K and Takahashi S
48 (2013) Relative biological effects of neutron mixed-beam irradiation for boron neutron
49 capture therapy on cell survival and DNA double-strand breaks in cultured
50 mammalian cells. J Radiat Res 54: 70-75.

- 1
2 R development core team (2012) R: A language and environment for statistical
3 computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-
4 07-0. URL <http://www.R-project.org/>.
5
- 6 Ramalho AT, Nascimento ACH, Littlefield LG, Natarajan AT and Sasaki MS (1991)
7 Frequency of chromosomal aberrations in a subject accidentally exposed to ^{137}Cs in
8 the Goiania (Brazil) radiation accident: Intercomparison among four laboratories. *Mut*
9 *Res/Environmental Mutag and Related Subjects* 252: 157-160.
10
- 11 Rooney DE (2001) *Human Cytogenetics: Constitutional Analysis: a Practical*
12 *Approach*. 3rd edition. Oxford University Press, USA, 1-53 pp.
13
- 14 Roy L, Buard V, Delbos M, Durand V, Paillole N, Grégoire E and Voisin P (2004)
15 International intercomparison for criticality dosimetry: the case of biological
16 dosimetry. *Radiat Protect Dos* 110: 471-476.
17
- 18 Roy L, Grégoire E, Gruel G, S. Roch-Lefevre S, Voisin P, Busset A, Martin C and
19 Voisin P (2012) Effect of lymphocytes culture variations on the mitotic index and on
20 the dicentric yield following gamma radiation exposure. *Radiat Protect Dos* 1-9.
21
- 22 Schmid E, Regulla D, Guldbakke S, Schlegel D and Roos M (2002) Relative
23 Biological Effectiveness of 144 keV Neutrons in Producing Dicentric Chromosomes in
24 Human Lymphocytes Compared with ^{60}Co Gamma Rays under Head-to-Head
25 Conditions. *Radiat Res* 157: 453-460.
26
- 27 Szłuińska M, Edwards A and Lloyd D (2007) Presenting statistical uncertainty on
28 cytogenetic dose estimates. *Radiat Protect Dos* 123: 443-449.
29
- 30 Top A, Coskun M and Orta T (2000) Biological Dosimetry of Co-60 Gamma
31 Irradiation. *Turk J Haematol* 17: 189-196.
32
- 33 Vinnikov VA, Ainsbury EA, Maznyk, NA, Lloyd DC and Rothkamm K (2010)
34 Limitations Associated with Analysis of Cytogenetic Data for Biological Dosimetry.
35 *Radiat Res Soc* 174: 403-414.
36
- 37 Wilkins RC, Beaton-Green LA, Lachapelle S, Kutzner BC, Ferrarotto C, Chauhan V,
38 Marro1 L, Livingston GK, Greene HB and Flegal FN (2015) Evaluation of the annual
39 Canadian biodosimetry network intercomparisons. *Internat J Radiat Biol* 91: 443-451.
40
- 41 Wong KF, Siu LLP, Ainsbury E and Moquet J (2013) Cytogenetic biodosimetry: what
42 it is and how we do it. *Hong Kong Medical J* 19: 168-73.

Legends

Tables

Table 1. Distribution of dicentric chromosomes produced using low dose rate with respective dispersion indexes and u values from “Our curve”.

Table 2. Comparison of methodologies and coefficient's values of calibration curve produced by cobalt-60 sources with low dose rates.

Table 3. Percentage of cells with one or more dicentrics per cell from different previously published curves produced by cobalt-60 sources with low dose rates.

Table 4. Re-analysis calibration curves obtained using Dose Estimate software.

Table 5. Comparison of estimated absorbed doses by selected calibration curves using Dose Estimate software.

Table 6. Comparison results of estimated absorbed doses by ANOVA after jackknife-like resampling method.

Table 7. Results of Tukey's test after compared all possible pairs of means.

Figure

Figure 1. Illustration of estimated doses obtained using calibration curve from Lloyd *et al.* (1986) as reference and the relationship between expected absorbed doses based on severity (mild, moderate and severe) of clinical symptoms six days after first exposure (IAEA and WHO, 1998 apud Lee, 2011). The solid lines represent ± 0.5 Gy intervals using as a reference the calibration curve of Lloyd *et al.* (1986).

Supplementary material - the following online material is available for this article

Table S1. P-values from Pearson's Chi-squared test.

Table S2. Comparison of estimated absorbed doses by selected calibration curves using Dose Estimate software.

Table S3. Comparison results of estimated absorbed doses by ANOVA after jackknife-like resampling method.

Table S4. Results of Tukey's test after compared all possible pairs of means.

Tables

Table 1. Distribution of dicentric chromosomes produced using low dose rate with respective dispersion indexes and u values from "Our curve".

Dose (Gy)	Cells scored	Dicentrics	Distribution of dicentrics						Yield	σ^2/y	U
			0D	1D	2D	3D	4D	5D			
0	2899	3	2896	3					0.001	0.999	-0.032
0.15	2029	10	2019	10					0.005	0.996	-0.149
0.25	1004	7	997	7					0.007	0.994	-0.145
0.5	1006	18	988	18					0.018	0.983	-0.39
0.75	1000	37	963	37					0.037	0.964	-0.816
1	1000	59	941	59					0.059	0.942	-1.31
1.5	1000	80	923	74	3				0.08	0.996	-0.09
2	483	95	397	77	9				0.197	0.995	-0.08
3	222	100	134	76	12				0.45	0.793	-2.19
4	136	104	61	54	15	4	2		0.765	0.993	-0.061
5	80	112	19	30	19	6	4	2	1.4	1.06	0.377

(σ^2) variance; (y) mean; (U) u-test.

Table 2. Comparison of methodologies and coefficient's values of calibration curve produced by cobalt-60 sources with low dose rates.

References	Country	Volunteers Number	Culture time (h)	Colcemid time (h)	BrdU ?	Dose range (Gy)	Dose rate (Gy/min)	Dose rate/0.5 (Gy/min)	C	± SE	α (Gy ⁻¹)	± SE	β (Gy ⁻²)	± SE
Bauchinger et al. (1983)	Germany	1 (M)	48	-	Yes	0.5 – 4	0.017	3%	0.00038	-	0.009	0.004	0.0417	0.0028
Schmid et al. (2002)	Germany	1 (W)	47	44	Yes	0.25 – 4	0.033	7%	0.000326	0.00019	0.0138	0.0044	0.03	0.002
“Our curve”	Brazil	1 (W)	48	46	No	0 – 5	0.055-0.048	11%	0.0014	0.001	0.0081	0.0073	0.0451	0.0046
Martins et al. (2013)	Portugal	16	48	47	No	0 – 3	0.18-0.13	36%	-	-	0.0105	0.0035	0.048	0.0019
Lindholm et al. (1998)	England	2 (1M and 1W)	48	45.5	No	0 – 5	0.24	48%	0.00055	0.00024	0.0135	0.0043	0.0544	0.0034
Top et al. (2000)	Turkey	3 (2M and 1W)	48	45	Yes	0 – 5	0.425	85%	-	-	0.0034	0.0073	0.0605	0.0028
Köksal et al. (1995)	Turkey	1 (W)	48	45	Yes	0.98 – 4.89	0.4573	91%	0.00048	0.00024	0.0209	0.0057	0.0711	0.0025
Lloyd et al. (1986)	England	a panel	48	45	Yes	0.05 – 5.05	0.5	100%	-	-	0.0142	0.0044	0.0759	0.0027

(-) Not informed; (SE) Standard error. Model equation $y = C + \alpha D + \beta^2 D$.

Table 3. Percentage of cells with one or more dicentrics per cell from different previously published curves produced by cobalt-60 sources with low dose rates.

References	Bauchinger et al. (1983)	Schmid et al. (2002)	“Our curve”	Martins et al. (2013)	Lindholm et al. (1998)	Top et al. (2000)	Köksal et al. (1995)	Lloyd et al. (1986)
Dose rate/0.5 (Gy/min)	3%	7%	11%	36%	48%	85%	91%	100%
<i>Dose (Gy)</i>	<i>% cells with 1 dicentric</i>							
0		0.03%	0.10%	0.09%	0.03%	0.05%	0.05%	
0.25		0.70%	0.70%	0.81%	0.64%	0.71%	0.86%	0.70%
0.5	1.65%	1.36%	1.79%	1.66%	1.93%	1.85%	2.47%	2.87%
1	4.62%	4.17%	5.90%	5.16%	6.00%	6.26%	8.20%	8.22%
2	16.67%	12.14%	15.94%	16.00%	20.75%	17.26%	24.40%	26.98%
3		20.83%	34.23%	26.94%	34.00%	32.41%	37.20%	34.57%
4	33.67%	28.00%	39.71%		31.50%	36.27%	37.32%	39.72%
5			37.50%		30.00%	33.24%	27.31%	28.85%
<i>Dose (Gy)</i>	<i>% cells with more than 1 dicentric</i>							
0		0	0	0	0	0	0	
0.25		0	0	0	0	0	0	0
0.5	0	0	0	0.03%	0	0	0	0
1	0	0.25%	0	0.34%	0.13%	0.27%	0.2%	0.32%
2	1.67%	1.14%	1.86%	2.41%	4.0%	2.55%	3.8%	3.45%
3		3.33%	5.41%	9.17%	11.33%	8.02%	15.9%	19.7%
4	16.33%	15.33%	15.44%		22.83%	25.60%	33.39%	41.12%
5			38.75%		42.0%	49.16%	57.5%	59.62%

Note. This table only shows main doses as 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4 and 5Gy.

Table 4. Re-analysis calibration curves obtained using Dose Estimate software.

References	C	SE	α	$\pm$ SE (Gy ⁻¹)	β	$\pm$ SE (Gy ⁻²)	X ²	Df	p value	R
Bauchinger et al. (1983) – 0.017 Gy/min	0.0009	0.0009	0.0095	0.0064	0.0415	0.0035	8.733	5	0.1202	0.9996
Schmid et al. (2002) – 0.033 Gy/min	0.0003	0.0002	0.0139	0.0052	0.0304	0.0030	5.697	4	0.6115	0.9931
“Our curve” – 0.055 Gy/min	0.0014	0.0010	0.0081	0.0073	0.0451	0.0046	16.67	8	0.7584	0.9958
Martins et al. (2013) – 0.18 Gy/min	0.0011	0.0006	0.0098	0.0036	0.0489	0.0020	2.025	4	0.8656	0.9999
Lindholm et al. (1998) – 0.24 Gy/min	0.0006	0.0003	0.0136	0.0045	0.0542	0.0035	9.32	8	0.8290	0.9967
Top et al. (2000) – 0.425 Gy/min	0.0007	0.0008	0.0070	0.0067	0.0601	0.0034	17.12	8	0.7572	0.9980
Köksal et al. (1995) – 0.4573 Gy/min	0.0005	0.0003	0.0216	0.0060	0.0706	0.0025	9.586	7	0.2133	0.9989
Lloyd et al. (1986) – 0.5 Gy/min	0.0004	0.0009	0.0145	0.0060	0.0760	0.0030	11.99	12	0.9077	0.9960

(SE) Standard error; (Df) degrees of freedom; (X²) chi-square distribution, (R) values of regression.

Table 5. Comparison of estimated absorbed doses by selected calibration curves using Dose Estimate software.

References	Bauchinger et al. (1983)	Schmid et al. (2002)	“Our curve”	Martins et al. (2013)	Lindholm et al. (1998)	Top et al. (2000)	Köksal et al. (1995)	Lloyd et al. (1986)
Country	Germany	Germany	Brazil	Portugal	England	Turkey	Turkey	England
Culture time (h)	48	47	48	48	48	48	48	48
Dose rate (Gy/min) / 0.5 Gy/min	3%	7%	11%	36%	48%	85%	91%	100%
Dicentric frequencies	Estimated doses $\pm$ 95% CL (Gy)							
0.02a	0.574 (0.420 0.743)	0.608 (0.438 0.800)	0.559 (0.408 0.724)	0.530 (0.387 0.687)	0.486 (0.354 0.633)	0.511 (0.383 0.653)	0.394 (0.282 0.521)	0.421 (0.310 0.545)
0.15b	1.784 (1.632 1.943)	2.002 (1.825 2.186)	1.728 (1.581 1.880)	1.648 (1.507 1.794)	1.540 (1.407 1.678)	1.519 (1.392 1.651)	1.310 (1.194 1.431)	1.311 (1.199 1.428)
0.2c	2.079 (1.927 2.236)	2.345 (2.167 2.528)	2.011 (1.864 2.162)	1.919 (1.779 2.064)	1.797 (1.664 1.934)	1.764 (1.637 1.895)	1.535 (1.419 1.655)	1.528 (1.416 1.644)
0.7d	3.991 (3.511 4.501)	4.574 (4.013 5.169)	3.847 (3.385 4.336)	3.982 (3.238 4.151)	3.469 (3.048 3.915)	3.353 (2.954 3.777)	2.998 (2.630 3.389)	2.940 (2.585 3.316)
0.75e	4.136 (3.655 4.644)	4.743 (4.181 5.336)	3.985 (3.524 4.473)	3.815 (3.371 4.283)	3.595 (3.174 4.040)	3.473 (3.073 3.896)	3.109 (2.740 3.498)	3.047 (2.691 3.422)
1f	4.793 (4.312 5.298)	5.510 (4.949 6.100)	4.617 (4.155 5.101)	4.421 (3.977 4.886)	4.170 (3.750 4.612)	4.020 (3.620 4.439)	3.613 (3.244 4.000)	3.533 (3.177 3.906)

(95% CL) 95% Confidence limits from exact Poisson error on yield; (a) 20 dic/1000cells; (b)150 dic/1000 cells; (c) 200 dic/1000 cells; (d) 70 dic/100 cells; (e) 75 dic/100 cells; (f) 100 dic/100 cells;

Table 6. Comparison results of estimated absorbed doses by ANOVA after jackknife-like resampling method.

		Identification number of groups compared											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Dose rate (Gy/min) /0.5 Gy/min	3%	Bauchiger et al. (1983)	Bauchinger et al. (1983)						Bauchinger et al. (1983)	Bauchinger et al. (1983)	Bauchinger et al. (1983)	Bauchinger et al. (1983)	Bauchinger et al. (1983)
	7%	Schmid et al. (2002)											
	11%	This work	“Our curve”	“Our curve”					“Our curve”	“Our curve”	“Our curve”	“Our curve”	“Our curve”
	36%	Martins et al. (2013)	Martins et al. (2013)	Martins et al. (2013)	Martins et al. (2013)				Martins et al. (2013)	Martins et al. (2013)	Martins et al. (2013)	Martins et al. (2013)	
	48%	Lindholm et al. (1998)	Lindholm et al. (1998)	Lindholm et al. (1998)	Lindholm et al. (1998)	Lindholm et al. (1998)			Lindholm et al. (1998)	Lindholm et al. (1998)	Lindholm et al. (1998)		
	85%	Top et al. (2000)	Top et al. (2000)	Top et al. (2000)	Top et al. (2000)	Top et al. (2000)	Top et al. (2000)		Top et al. (2000)	Top et al. (2000)			
	91%	Köksal et al. (1995)	Köksal et al. (1995)	Köksal et al. (1995)	Köksal et al. (1995)	Köksal et al. (1995)	Köksal et al. (1995)	Köksal et al. (1995)	Köksal et al. (1995)				
	100%	Lloyd et al. (1986)	Lloyd et al. (1986)	Lloyd et al. (1986)	Lloyd et al. (1986)	Lloyd et al. (1986)	Lloyd et al. (1986)	Lloyd et al. (1986)					
		p-values by ANOVA											
Frequencies of dicentric	0.02	0.66	0.66	0.666	0.683	0.665	0.522	0.799	0.702	0.949	0.898	0.94	0.912
	0.15	0.004*	0.003*	0.010*	0.033*	0.090	0.127	0.992	0.015*	0.178	0.268	0.563	0.673
	0.2	0.001*	0.001*	0.003*	0.014*	0.050	0.089	0.945	0.005*	0.092	0.176	0.464	0.611
	0.7	0.019*	0.060	0.100	0.157	0.343	0.418	0.856	0.144	0.446	0.603	0.866	0.733
	0.75	0.018*	0.053	0.101	0.187	0.318	0.399	0.848	0.131	0.417	0.551	0.722	0.722
	1	0.005*	0.020*	0.047*	0.106	0.220	0.320	0.804	0.064	0.285	0.441	0.649	0.677

(*) p-value < 0.05 means that the estimated doses are not statistically similar.

Table 7. Results of Tukey's test after compared all possible pairs of means.

Tukey multiple comparisons of means 95% family-wise confidence level	Bauchinger et al. (1983) versus Köksal et al. (1995)	Bauchinger et al. (1983) versus Lloyd et al. (1986)	Schmid et al. (2002) versus Martins et al. (2013)	Schmid et al. (2002) versus Lindholm et al. (1998)	Schmid et al. (2002) versus Top et al. (2000)	Schmid et al. (2002) versus Köksal et al. (1995)	Schmid et al. (2002) versus Lloyd et al. (1986)	“Our curve” versus Köksal et al. (1995)	“Our curve” versus Lloyd et al. (1986)	Martins et al. (2013) versus Köksal et al. (1995)	Martins et al. (2013) versus Lloyd et al. (1986)
Dose rate (Gy/min)/0.5 Gy/min	3% - 91%	3% - 100%	7% - 36%	7% - 48%	7% - 85%	7% - 91%	7% - 100%	11% - 91%	11% - 100%	36% - 91%	36% - 100%
Frequencies of dicentrics	Identification number of groups compared										
0.15	1	0.015	0.015		0.019	0.013	0.0004	0.006	0.039	0.039	
	2	0.011	0.011						0.027	0.027	
	3								0.021	0.022	0.074
	4										0.075
	8	0.013							0.029		0.056
0.20	1	0.0045	0.004	0.033	0.004	0.0024	0.00006	0.00006			
	2	0.003	0.003						0.010	0.009	0.045
	3								0.008	0.008	0.035
	4										0.028
	8	0.004							0.012		0.047
0.70	1						0.0115	0.0085			
0.75	1						0.0078	0.0057			
1	1				0.0359	0.0163	0.0019	0.0013			
	2	0.056	0.037								
	3								0.069		

Note. Here were only shown the comparisons of curves in Tukey's test that has a p-value <0.05, therefore it is the doses that differ statistically and had p-value <0.05 in the ANOVA test shown in table 6.

Figure

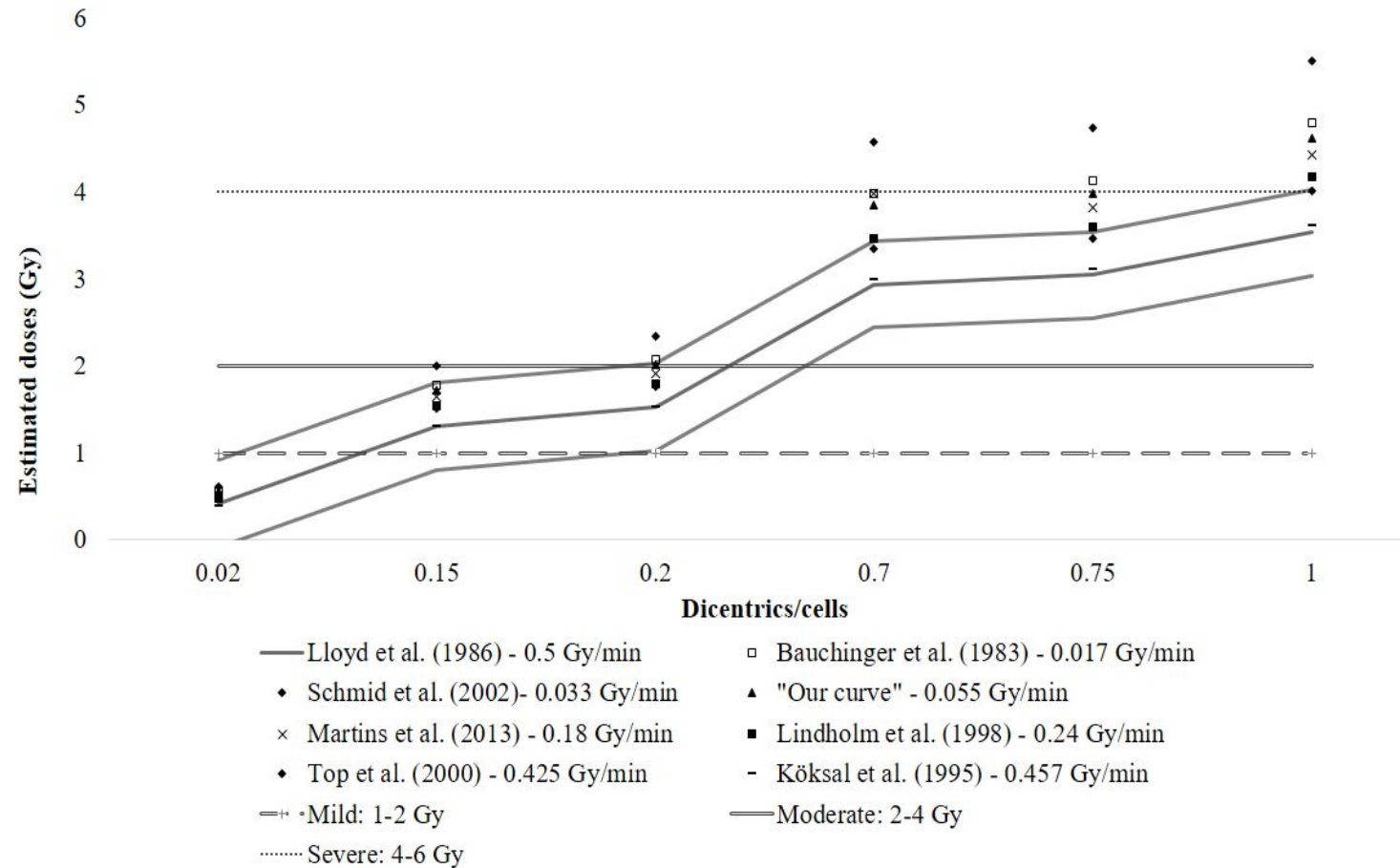


Figure 1. Illustration of estimated doses obtained using calibration curve from Lloyd et al. (1986) as reference and the relationship between expected absorbed doses based on severity (mild, moderate and severe) of clinical symptoms six days after first exposure (IAEA and WHO, 1998 apud Lee, 2011). The solid lines represent ± 0.5 Gy intervals using as a reference the calibration curve of Lloyd et al. (1986).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S1. P-values from Pearson's Chi-squared test.

Dose (Gy)	cells with 1 dicentric	cells with more than 1 dicentric
0.5	0.1758	0.919
1	1.93e^{-02}	0.5711
2	4.64e^{-13}	0.005668

Results of ANOVA and Tukey with 95% Confidence limits from combined Poisson and calibration curves error

Table S2. Comparison of estimated absorbed doses by selected calibration curves using Dose Estimate software.

References	Bauchinger et al. (1983)	Schmid et al. (2002)	"Our curve"	Martins et al. (2013)	Lindholm et al. (1998)	Top et al. (2000)	Köksal et al. (1995)	Lloyd et al. (1986)
Country	Germany	Germany	Brazil	Portugal	England	Turkey	Turkey	England
Culture time (h)	48	47	48	48	48	48	48	48
Dose rate (Gy/min) / 0.5 Gy/min	3%	7%	11%	36%	48%	85%	91%	100%
Dicentric frequencies	Estimated doses $\pm$ 95% CL (Gy)							
0.02a	0.574 (0.401 0.746)	0.608 (0.438 0.8)	0.559 (0.385 0.733)	0.53 (0.382 0.677)	0.486 (0.347 0.625)	0.511 (0.376 0.647)	0.394 (0.279 0.51)	0.421 (0.304 0.538)
0.15b	1.784 (1.575 1.994)	2.002 (1.825 2.186)	1.728 (1.506 1.949)	1.648 (1.493 1.802)	1.54 (1.377 1.702)	1.519 (1.373 1.665)	1.31 (1.189 1.432)	1.311 (1.19 1.432)
0.2c	2.079 (1.856 2.302)	2.345 (2.167 2.528)	2.011 (1.772 2.25)	1.919 (1.761 2.077)	1.797 (1.626 1.967)	1.764 (1.613 1.915)	1.535 (1.412 1.658)	1.528 (1.405 1.651)
0.7d	3.991 (3.429 4.554)	4.574 (4.013 5.169)	3.847 (3.273 4.421)	3.982 (3.22 4.143)	3.469 (3.005 3.933)	3.353 (2.927 3.779)	2.998 (2.623 3.374)	2.94 (2.575 3.305)
0.75e	4.136 (3.568 4.704)	4.743 (4.181 5.336)	3.985 (3.404 4.566)	3.815 (3.352 4.227)	3.595 (3.128 4.062)	3.473 (3.046 3.901)	3.109 (2.733 3.485)	3.047 (2.681 3.412)
1f	4.793 (4.2 5.387)	5.51 (4.949 6.1)	4.617 (4.002 5.232)	4.421 (3.952 4.889)	4.17 (3.689 4.652)	4.02 (3.584 4.456)	3.613 (3.234 3.991)	3.533 (3.164 3.902)

(95% CL) 95% Confidence limits from combined Poisson and calibration curves errors. "Method A." IAEA 2001; (a) 20 dic/1000cells; (b)150 dic/1000 cells; (c) 200 dic/1000 cells; (d) 70 dic/100 cells; (e) 75 dic/100 cells; (f) 100 dic/100 cells;

Table S3. Comparison results of estimated absorbed doses by ANOVA after jackknife-like resampling method.

		Identification number of groups compared											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Dose rate (Gy/min) /0.5 Gy/min	3%	Bauchiger et al. (1983)	Bauchinger et al. (1983)						Bauchiger et al. (1983)	Bauchinger et al. (1983)	Bauchinger et al. (1983)	Bauchinger et al. (1983)	Bauchinger et al. (1983)
	7%	Schmid et al. (2002)											
	11%	This work	“Our curve”	“Our curve”					“Our curve”	“Our curve”	“Our curve”	“Our curve”	“Our curve”
	36%	Martins et al. (2013)	Martins et al. (2013)	Martins et al. (2013)	Martins et al. (2013)				Martins et al. (2013)	Martins et al. (2013)	Martins et al. (2013)	Martins et al. (2013)	
	48%	Lindholm et al. (1998)	Lindholm et al. (1998)	Lindholm et al. (1998)	Lindholm et al. (1998)	Lindholm et al. (1998)			Lindholm et al. (1998)	Lindholm et al. (1998)	Lindholm et al. (1998)		
	85%	Top et al. (2000)	Top et al. (2000)	Top et al. (2000)	Top et al. (2000)	Top et al. (2000)	Top et al. (2000)		Top et al. (2000)	Top et al. (2000)			
	91%	Köksal et al. (1995)	Köksal et al. (1995)	Köksal et al. (1995)	Köksal et al. (1995)	Köksal et al. (1995)	Köksal et al. (1995)	Köksal et al. (1995)	Köksal et al. (1995)				
	100%	Lloyd et al. (1986)	Lloyd et al. (1986)	Lloyd et al. (1986)	Lloyd et al. (1986)	Lloyd et al. (1986)	Lloyd et al. (1986)	Lloyd et al. (1986)					
		p-values by ANOVA											
	0.02	0.66	0.686	0.68	0.677	0.66	0.514	0.793	0.726	0.955	0.909	0.947	0.922
Frequencies of dicentric	0.15	0.004*	0.018*	0.034*	0.056*	0.134	0.156	0.995	0.059*	0.364	0.464	0.71	0.764
	0.2	0.001*	0.009*	0.019*	0.031*	0.093	0.121	0.948	0.035*	0.277	0.399	0.633	0.737
	0.7	0.019*	0.101	0.159	0.229	0.366	0.426	0.856	0.215	0.539	0.654	0.785	0.771
	0.75	0.018*	0.085	0.14	0.21	0.343	0.408	0.847	0.191	0.507	0.624	0.749	0.764
	1	0.005*	0.045*	0.083	0.131	0.256	0.337	0.808	0.123	0.412	0.564	0.732	0.739

(*) p-value < 0.05 means that the estimated doses are not statistically similar.

Table S4. Results of Tukey's test after compared all possible pairs of means.

Tukey multiple comparisons of means 95% family-wise confidence level	Bauchinger et al. (1983) versus Köksal et al. (1995)	Bauchinger et al. (1983) versus Lloyd et al. (1986)	Schmid et al. (2002) versus Lindholm et al. (1998)	Schmid et al. (2002) versus Top et al. (2000)	Schmid et al. (2002) versus Köksal et al. (1995)	Schmid et al. (2002) versus Lloyd et al. (1986)	"Our curve" versus Köksal et al. (1995)	"Our curve" versus Lloyd et al. (1986)	Martins et al. (2013) versus Köksal et al. (1995)	Martins et al. (2013) versus Lloyd et al. (1986)
Dose rate (Gy/min)/0.5 Gy/min	3% - 91%	3% - 100%	7% - 48%	7% - 85%	7% - 91%	7% - 100%	11% - 91%	11% - 100%	36% - 91%	36% - 100%
Frequencies of dicentrics	Identification number of groups compared									
0.15	1				0.006	0.006				
	2	0.044	0.044							
	3						0.062	0.062		
	4								0.090	0.091
	8	0.050					0.097			
0.20	1		0.046	0.048	0.032	0.002	0.002			
	2	0.024	0.022					0.058	0.053	
	3							0.038	0.035	
	4								0.056	0.051
	8	0.030						0.065		
0.7	1					0.024	0.018			
0.75	1					0.022	0.017			
1	1			0.049	0.008	0.006				
	2		0.076							

Note. Here were only shown the comparisons of curves in Tukey's test that has a p-value <0.05, therefore it is the doses that differ statistically and had p-value <0.05 in the ANOVA test shown in table S3.

6 DISCUSSÃO GERAL

Os cromossomos dicêntricos representam biomarcadores específicos e sensíveis para a estimativa de doses absorvidas (Lee *et al.*, 2012; Wong *et al.*, 2013) e aparece independentemente do protocolo usado para estimativa de dose, logo, eles são de suma importância para a dosimetria biológica. Os esforços feitos na área de dosimetria biológica estão mais voltados para os cenários de exposição que envolvam altas doses absorvidas e de forma uniforme. No entanto, este tipo de cenário é mais incomum. São os acidentes de cenários complexos que ocorrem com maior frequência, principalmente envolvendo exposições parcial do corpo e prolongada ou fracionada (TUCKER, 2008; IAEA, 2011). Portanto, o estudo de biomarcadores sensíveis para estes tipos de cenários se torna importante, pois deste modo é possível melhorar a estimativa de doses absorvidas.

6.1 Exposição parcial

Poucos estudos descreveram uma estimativa de dose parcial do corpo (<4 Gy) usando os dicêntricos como biomarcador (BARQUINERO *et al.*, 1997; SENTHAMIZHCHELVAN *et al.*, 2006; FERNANDES *et al.*, 2008; TUCKER, 2008; PRASANNA *et al.*, 2010b). Esperava-se que os dados da irradiação parcial do corpo (PBI, *partial-body irradiation*) sempre apresentassem uma sobredispersão significativa ($u > 1,96$) e uma inflação de zero para os dicêntricos. No entanto, Fernández-Fontelo *et al.* (2018) demonstraram que em alguns cenários de exposição - por exemplo, experimentos *in vitro* e acidentes reais - poderiam dar origem a diferentes interpretações, onde a sobredispersão e o número de zeros poderia ser irregulares.

Com o intuito de corroborar com os achados de Fernández-Fontelo *et al.* (2018), foi feita uma reanálise de alguns dados de PBI da literatura que utilizaram a técnica de dicêntricos (BARQUINERO *et al.*, 1997; SENTHAMIZHCHELVAN *et al.*, 2006; TUCKER, 2008; PRASANNA *et al.*, 2010b; VAURIJOUX *et al.*, 2011). Essa reanálise foi auxiliada com *applet* de Poisson chamado de GOF (Higueras *et al.*, 2018). Para a maioria dos dados, os valores-p dos testes u, Z, D, L e CR estavam de acordo em rejeitar ou apoiar a suposição de Poisson (a um nível de significância de 5%) sendo apoiados pelo fator Bayes. No entanto, algumas amostras chamaram nossa atenção, pois não mostraram concordância entre todos os testes de sobredispersão e inflação de zero.

As diferentes interpretações sobre as sobredispersões significativas e de inflações de zero estão relacionadas a valores de u em torno de $\pm 1,96$. No entanto, para dicêntricos, esses cenários podem ocorrer quando é marcado apenas uma célula com mais de um dicêntrico ou quando muitas células apresentam nenhum tipo de alteração. Por isso, recomenda-se o aumento do número de células analisadas para confirmar a sobredispersão e inflação de zero.

Quanto ao MN, como esperado, para a maioria dos dados, todos os testes concordaram que este biomarcador é sobredisperso e zero inflado. Portanto, para esse marcador, o aumento do número de células analisadas provavelmente não alterará a determinação da sobredispersão e inflação de zero, inclusive ao aumentar o número de células analisadas o cálculo dos valores p , através dos testes exatos, torna-se muito intensivo.

Todos os testes Z , D , L , CR e o fator Bayes devem ser vistos como complementares ao teste u . Logo, a hipótese de uma PBI deve ser aceita quando todos os testes indicarem os valores de $p < 0,05$ (FERNÁNDEZ-FONTELO *et al.*, 2018).

No entanto, quando os dados sugerirem uma exposição parcial do corpo confirmada pelos testes, é possível calcular as doses absorvidas com base na fração irradiada do corpo com os métodos Qdr, Dolphin e Bayesiano.

Barquinero *et al.* (1997) analisaram doses de PBI de 2, 3, 4 e 5 Gy com frações irradiadas de 12,5 a 87,5%. As doses estimadas através do método de Dolphin estavam em grande parte de acordo com as doses administradas. Também foram vistos resultados semelhantes por Vaurijoux *et al.* (2011), mas que estudaram apenas uma dose de 2 Gy em experimentos *in vitro*. Ambos os trabalhos apresentaram dados com valores de u acima de 1,96, no entanto, nossas amostras não apresentaram uma sobredispersão significativa confirmada pelo teste u e os demais testes.

O Qdr apresenta-se como método alternativo quando não são obtidas sobredispersões significativas das amostras. Contudo, é necessário ter uma curva de calibração de fragmento isolado (Fgi) que assuma a distribuição de Poisson (IAEA, 2011). Quando as curvas de calibração construídas seguem a distribuição de Poisson, a avaliação da dose pode estar de acordo com as doses administradas, como observado por Barquinero *et al.* (1997) e Senthamizhchelvan *et al.* (2008). Esta suposição é uma desvantagem potencial para nossos resultados, porque nossa

curva de calibração para Fgi não assumiu a distribuição de Poisson, então a dose recebida não foi corretamente avaliada por meio do Qdr.

São poucos os estudos de acidentes que utilizaram os MN para avaliar a exposição parcial do corpo à radiação de baixa dose. Beinke *et al.* (2015) relataram uma exposição acidental à radiação γ com um trabalhador de radiografia industrial, mas a dosimetria biológica citogenética aplicando os ensaios dicêntrico e MN só foram realizados quatro meses após o incidente. Os resultados de dicêntricos indicaram uma dose de corpo inteiro de 0,066 Gy, corroborando com o valor do dosímetro termoluminescente. No entanto, a amostra apresentou uma sobredispersão significativa ($u = 9,78$) e a dose estimada para PBI foi de 2 Gy e com uma fração do corpo irradiada de 21%. Mas a frequência de MN obtida não foi diferente da frequência espontânea (*background*) do laboratório, portanto, nenhuma avaliação da dose foi feita através deste biomarcador.

Em geral, para exposições parciais, quando os métodos Qdr e Dolphin foram aplicados (LLOYD *et al.*, 1991; SENTHAMIZHCHELVAN *et al.* 2008, 2009), os resultados estimados com base nos dicêntricos foram melhores que os estimados com base no MN, pois os intervalos de incerteza estatísticos cobriram as doses reais absorvidas.

As doses estimadas com a metodologia bayesiana apresentam-se mais precisas do que os métodos Qdr e Dolphin, que são classicamente mais usados na dosimetria biológica. O modelo bayesiano podem ser mais preciso, pois os resultados são expressos na forma de densidades de probabilidade, que contêm intrinsecamente a informação sobre a dose modal e a incerteza, e a dose de sobrevivência celular é considerada uma variável aleatória. Em contraste, no método clássico, a dose de sobrevivência celular é considerada um valor pontual, fixado antes da estimação. Além disso, o modelo Bayesiano fornece a fração dos intervalos do corpo sempre no suporte dessa medida, ou seja, entre 0 e 1.

Assim, foi observado neste trabalho que o D+A é um biomarcador preciso para estimar a dose média de uma exposição parcial do corpo. No entanto, na ausência de sobredispersão significativa, o D+A torna-se mais complicado de executar. Quando o MN é usado como biomarcador, o fato dos dados tenderem a sobredispersão não implica que o modelo de Poisson (suposição equidispersa) não possa ser usado e dê resultados sensatos. No entanto, no caso de um acidente sem qualquer informação, o ensaio MN não poderia definir se o acidente pode ser

classificado como uma irradiação de corpo inteiro ou parcial, porque naturalmente os valores de u dos MN estão acima de 1,96.

As estimativas de doses parciais do corpo são complexas. Em comparação com as exposições de corpo inteiro, as exposições parciais exigem maiores certezas sobre o evento de exposição, porque a falta de conhecimento sobre o cenário do acidente pode gerar estimativas de dose errôneas incluindo a definição errada do risco de morte do indivíduo. No entanto, as decisões clínicas exigem múltiplos pontos integrados. Assim, para aumentar a confiabilidade, é necessário o uso da dosimetria biológica em conjunto com os diferentes testes, além de todos os parâmetros clínicos e físicos. Quando todas as abordagens forem utilizadas em conjunto, poderemos superar as lacunas inerentes a cada técnica.

6.2 Baixa taxa de dose

Cromossomos dicêntricos representam biomarcadores específicos e sensíveis para doses absorvidas estimadas e esse tipo de aberração aparece independentemente do protocolo usado para estimativa de dose (Tabelas 2 e 3) (LEE *et al.*, 2012; WONG *et al.*, 2013). Quando as curvas dose-resposta são construídas certas diferenças interlaboratoriais inerentes aos protocolos podem acontecer, são eles: as doses totais absorvidas, a taxa de dose, as linhas celulares irradiadas, os parâmetros biológicos, a LET e a energia (LEE, 2011; OKUMURA *et al.*, 2013).

No entanto, algumas variáveis são mais críticas na construção da curva dose-resposta, por exemplo, taxa de dose e critérios de pontuação. A taxa de dose é um fator a ser considerado na análise de aberrações porque o tempo de irradiação prolongada reduz a frequência de dicêntricos induzidos pela baixa radiação LET. Este tempo de irradiação prolongado permite a ação de mecanismos de reparo celular que, conseqüentemente, reduz as frequências dicêntricas. Duas lesões, uma na dupla hélice do DNA de cada cromossomo não replicado, precisam ser produzidas dentro de uma zona-alvo para gerar um dicêntrico. Se as lesões forem produzidas por duas vias independentes e a taxa de dose for baixa, é provável que a lesão produzida pela primeira via seja reparada antes que o cromossomo seja atravessado por uma segunda pista, formando a segunda lesão (VINNIKOV *et al.*, 2010; IAEA, 2011).

De acordo com a literatura, o coeficiente linear (α) é independente da taxa de dose e o coeficiente quadrático (β) diminui com baixa taxa de dose (BREWEN; LUIPPOLD, 1971; LLOYD *et al.*, 1975; BAUCHINGER *et al.*, 1979, 1983). Este comportamento também foi observado nas curvas de calibração comparadas neste estudo, notou-se redução no termo β da curva de calibração com diminuição da taxa de dose (Tabela 2 e 4).

No entanto, vale ressaltar que o coeficiente β de Schmid *et al.* (2002) foi diferente do esperado; os autores também afirmaram que a diminuição do coeficiente β não poderia ser atribuída a um efeito da taxa de dose. No entanto, alguns aspectos podem ser influenciados neste valor de coeficiente, como critérios de pontuação ou talvez o tempo de cultura. A pontuação depende de dois fatores principais: (i) a qualidade da disseminação e a seleção da metáfase e (ii) a identificação dicêntrica (ROY *et al.*, 2004). Consequentemente, esses aspectos podem influenciar nos critérios de aceitação dos dicêntricos, de modo que isso pode aumentar ou diminuir o número de dicêntricos aceitos na análise total.

Além disso, o tempo de cultura também pode ter influenciado a curva de Schmid *et al.* (2002) (Tabelas 2 e 4), pois o tempo de cultura de 48 horas é necessário para mostrar a atividade mitótica por linfócitos estimulados *in vitro* com fitohemaglutinina (Rooney, 2001). Para células colhidas às 48 horas, pelo menos 90% da população está na primeira divisão, independentemente do tipo de radiação ou dose absorvida (GEORGE *et al.*, 2001) e de acordo com Rooney (2001), as horas posteriores são cruciais para o ciclo mitótico e coleta de células em metáfase. Portanto, o processo de pontuação e o tempo de cultura adotado por Schmid *et al.* (2002) pode ter afetado os coeficientes α e β , especialmente o último.

Todas as curvas de calibração comparadas têm diferentes doses estimadas principalmente devido aos valores dos coeficientes β e alguns deles podem indicar diferentes riscos para a saúde. No entanto, em alguns pontos os resultados das doses estimadas não foram diferentes para todas as frequências dicêntricas testadas entre as curvas de calibração de BAUCHINGER *et al.*, 1983 para TOP *et al.*, 2000 e de LINDHOLM *et al.*, 1998 para LLOYD *et al.*, 1986).

As maiores divergências nos valores das doses estimadas ocorreram porque as incertezas nas estimativas foram reduzidas. No caso de doses mais absorvidas, as respectivas incertezas foram maiores, contribuindo para a falta de diferenças estatísticas (SZŁUIŃSKA *et al.*, 2007). Decidimos fazer essa análise idêntica por

ANOVA e teste de Tukey, mas usando os limites de confiança de 95% dos erros combinados de Poisson e curvas de calibração, e o mesmo comportamento mencionado na seção de resultados ocorreu. No entanto, as diferenças entre as curvas de calibração foram menos pronunciadas, pois as incertezas estimadas tornam-se numericamente superiores, permitindo em comparação a análise menor diferença entre as doses estimadas.

No entanto, vimos que algumas doses estimadas não eram estatisticamente diferentes, mas deveriam ser, porque há uma associação significativa entre produções de dicêntrico por célula por curva de calibração, principalmente devido à taxa de dose (por exemplo, 0,017 Gy/min a 0,425 Gy/min). Mesmo os testes ANOVA e Tukey indicando valores sem diferença significativa, no caso de doses mais altas, dependendo de qual curva de calibração é usada; os indivíduos podem ser classificados com risco diferente. Além disso, outro problema relacionado às curvas de calibração aparece nos exercícios de intercomparações.

A proposta de exercícios de intercomparação é estabelecer uma rede operacional em biodosimetria para lidar com um grande número de vítimas potencialmente superexpostas para assistência mútua em caso de emergência (OESTREICHER *et al.*, 2017). Eles podem ser feitos em métodos distintos e com diferentes testes estatísticos. Por exemplo, os laboratórios de biodosimetria recebem as amostras de sangue irradiadas para estabelecer a cultura de linfócitos seguindo seus próprios protocolos padrão (BEINKE *et al.*, 2013; WILKINS *et al.*, 2015; OESTREICHER *et al.*, 2017) ou recebem lâminas ou suspensões fixas (RAMALHO *et al.*, 1991; ROY *et al.*, 2004; DI GIORGIO *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2016). Para comparação das doses estimadas reportadas por cada laboratório, é possível usar os teste de diferença absoluta média (MAD), teste z ou ANOVA (DI GIORGIO *et al.*, 2011; BEINKE *et al.*, 2013; WILKINS *et al.*, 2015).

Os exercícios de intercomparação que os laboratórios recebem somente com lâminas ou suspensões fixas têm uma vantagem maior, pois reduzem o efeito do preparo do sangue, portanto, este tipo de intercomparação está apenas condicionado à pontuação dicêntrica. Assim, os resultados da literatura indicam que, nesse tipo de exercício, há menos variação entre os laboratórios (ROY *et al.*, 2004; DI GIORGIO *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2016).

Mesmo alguns laboratórios relatando maiores frequências de aberrações quando os dados são convertidos em doses absorvidas usando suas próprias curvas

de calibração, as doses estimadas apresentam menor variação (GRÉGOIRE *et al.* 2013). No entanto, há casos em que os laboratórios definiram a frequência dos dicêntricos próximos à média geral, mas ao estimar a dose, as doses estimadas ficaram fora dos critérios estatísticos de recomendação. Por exemplo, as intercomparações da RENEB (OESTREICHER *et al.*, 2017) chamaram nossa atenção. Este estudo foi um exercício global usando os dicêntricos para avaliação da dose. No total, 42 laboratórios de 31 países de todo o mundo participaram. Amostras de sangue foram irradiadas com raios gama ^{137}Cs (taxa de dose 0,495 Gy/min) e cada laboratório foi solicitado a estabelecer pelo menos duas culturas de linfócitos por amostra seguindo seus próprios protocolos padrão, e considerando as recomendações da AIEA (IAEA 2011) e Organização Internacional para Padrões de padronização (ISO) (ISO 19238: 2014; ISO 21243: 2008).

Portanto, como esperado, todas as curvas de calibração apresentam uma forma específica, mas houve curvas com baixo coeficiente beta como os apresentados pelos laboratórios L10, N8, N9 e N14 (Figura 18). Estes laboratórios apresentaram uma concordância muito boa do número de dicêntricos em 50 células/lâmina com a faixa teoricamente esperada, mesmo tendo diferentes culturas de linfócitos e critérios de pontuação; mas suas doses estimadas estavam acima da faixa recomendada para ambas as doses simuladas de 0,85 Gy e 2,7 Gy (Figura 19 e 20).

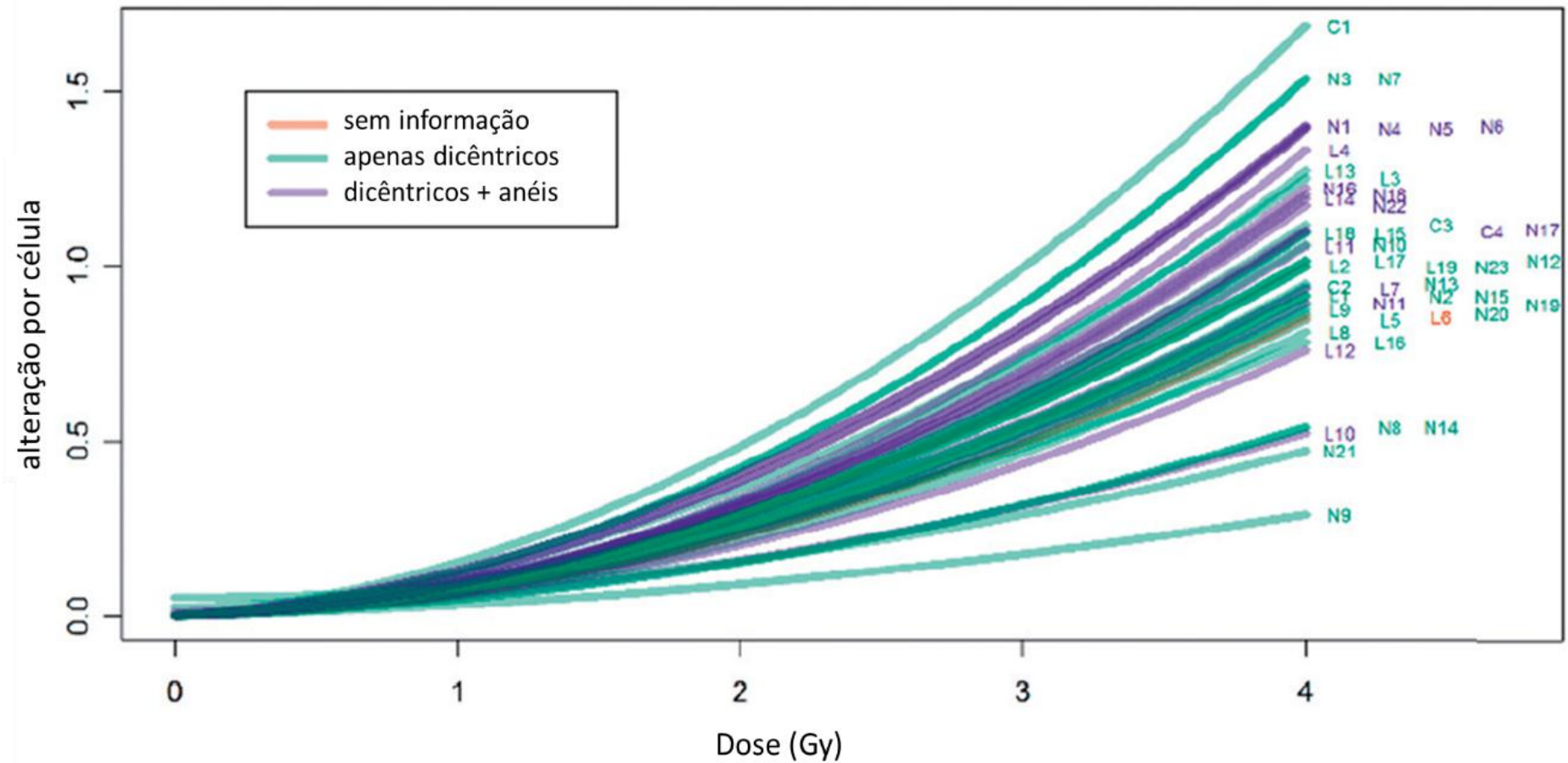


Figura 18. Curvas de efeito dose dos laboratórios participantes usadas para avaliação de dose com base em dicêntricos, dicêntricos e anéis ou nenhuma informação. Laboratórios parceiros RENE (L), candidatos RENE (C) e organizações não-união europeia (N) (Fonte: OESTREICHER *et al.* 2016).

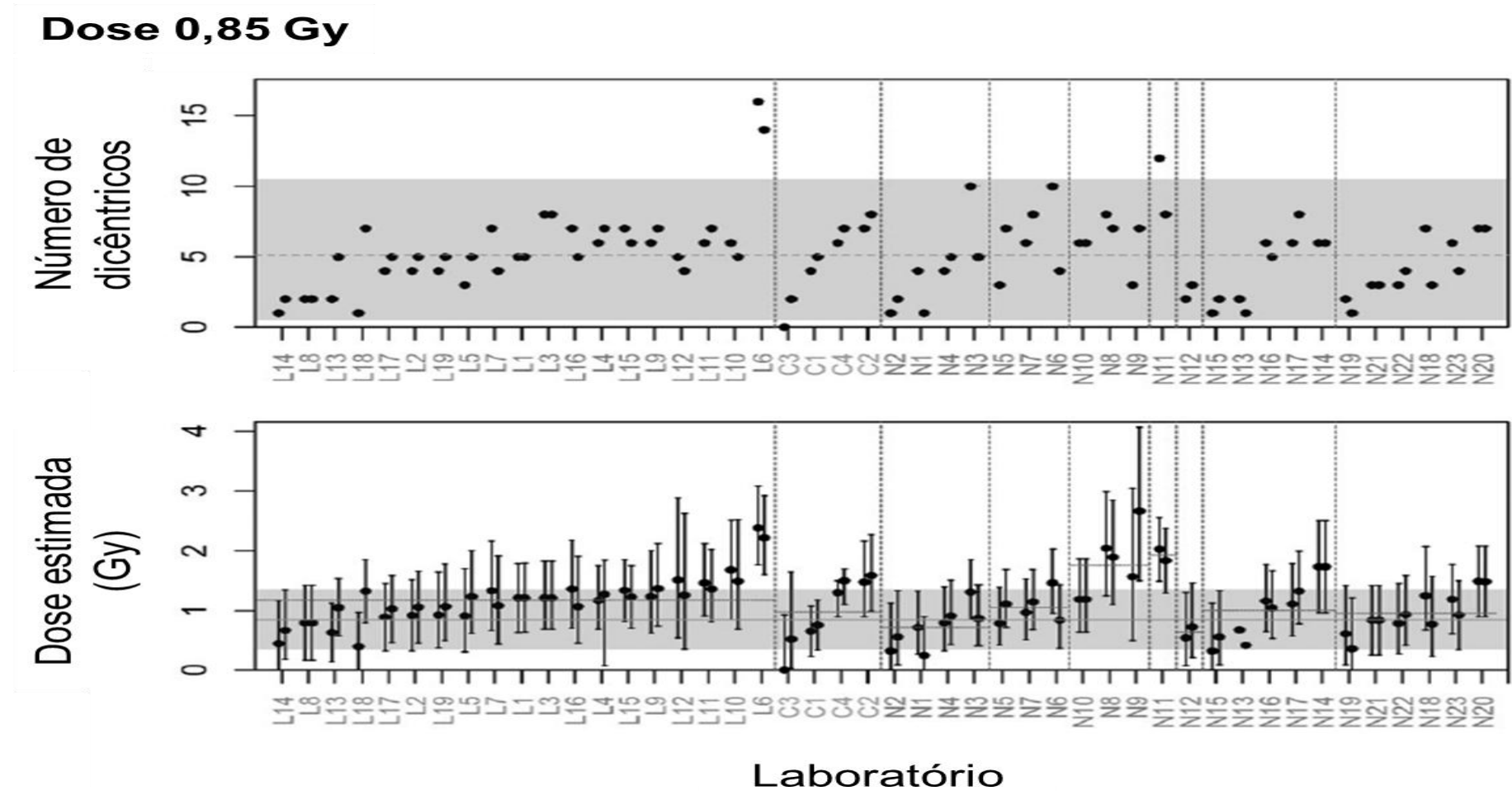


Figura 19. Resultados da 2ª intercomparação para dose de 0,85 Gy. Número de dicêntricos em 50 células marcadas para as duas lâminas de todos os laboratórios participantes, parceiros da RENEB (L1 – L19), os candidatos à RENEB (C1 – C4) e os parceiros não europeus (N1 – N23). Doses estimadas e intervalos de confiança de 95% para todas as lâminas, a dose física (linha contínua), a dose média (não linha sólida) e a região de tolerância ($0,85 \text{ Gy} \pm 20\%$, área sombreada e $2,7 \text{ Gy} \pm 20\%$, área sombreada) (Fonte: OESTREICHER *et al.* 2016).

(Continuação)

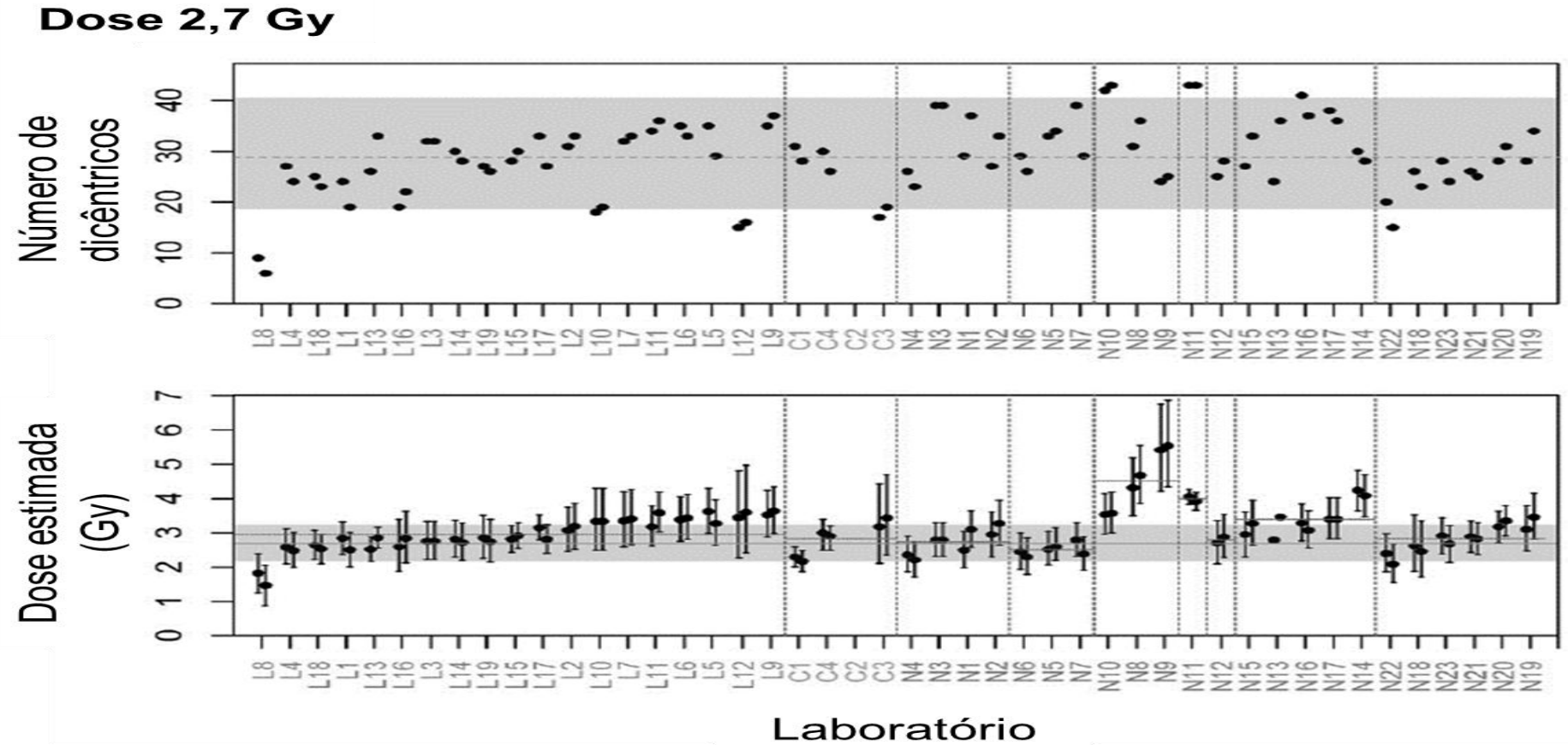


Figura 20. Resultados da 2ª intercomparação para dose de 2,7 Gy. Número de dicêntricos em 50 células marcadas para as duas lâminas de todos os laboratórios participantes, parceiros da RENEB (L1 – L19), os candidatos à RENEB (C1 – C4) e os parceiros não europeus (N1 – N23). Doses estimadas e intervalos de confiança de 95% para todas as lâminas, a dose física (linha contínua), a dose média (não linha sólida) e a região de tolerância (0,85 Gy $\pm$ 20%, área sombreada e 2,7 Gy $\pm$ 20%, área sombreada) (Fonte: OESTREICHER *et al.* 2016).

Consequentemente, esses resultados de intercomparação corroboram com nossos resultados onde as curvas com menor coeficiente β geram doses estimadas acima do esperado, gerando resultados fora das médias, independentemente do tipo de teste utilizado, por exemplo, teste z nesta intercomparação e ANOVA em nosso estudo comparativo.

Outro ponto interessante desta intercomparação foi a porcentagem ou estimativas de dose correta, pois na dose mais baixa de 0,85 Gy, o nível de acerto entre 42 laboratórios e com apenas 18 laboratórios envolvidos no RENEB não mudou muito (81-76%). No entanto, a porcentagem de estimativas corretas de dose no exercício envolvendo todos os laboratórios aumentou de 39-61% para a dose mais alta de 2,7 Gy. Provavelmente isto aconteceu devido ao aumento no número de curvas comparadas e ao aumento das incertezas, não porque houve uma melhora no desempenho dos laboratórios.

Assim, em casos de emergência, sugerimos usar como curvas de referência aquelas com taxa de dose mais próxima dos cenários de exposição, especialmente para acidentes envolvendo taxa de dose abaixo de 0,2 Gy/min. Por outro lado, é possível utilizar um fator dependente do tempo conhecido como função G proposto por Lea e Catcheside (1942) (apud AIEA, 2011). Este fator permite modificar o coeficiente β e assim permitir os efeitos da protração de dose, mas este método permite a derivação de relações dose-efeito para os dicêntricos após irradiação com baixas taxas de dose a partir de curvas de calibração pré-definidas com taxas de dose convencionais (BAUCHINGER *et al.*, 1979; AIEA, 2011). Além disso, os exercícios de intercomparação devem levar em conta as taxas de dose dos laboratórios participantes, pois isto pode ser outra razão pela qual alguns laboratórios apresentam resultados das doses estimadas fora das recomendações.

Embora os métodos de biodosimetria possam estimar com precisão as doses absorvidas, o conhecimento sobre os efeitos biológicos a longo prazo que vão além dos danos estruturais como dicêntricos é pequeno. Como relatado por Merrifield e Kovalchuk (2013), essas exposições à radiação podem afetar as células de maneiras mais sensíveis, como alteração de expressões gênicas e modificações epigenéticas, ruptura de processos mitocondriais, parada do ciclo celular, até morte por apoptose, portanto estudos de efeitos prolongados de irradiação ser feito para além dos métodos citogenéticos.

Em suma, no primeiro capítulo, apresentamos uma nova abordagem para avaliação da dose em casos particulares de exposição parcial do corpo, comparando os ensaios de MN e os cromossomos dicêntricos e anéis. Isso é significativo, pois existem novas metodologias de avaliação de dose que as comunidades de dosimetria biológica precisam conhecer e praticar em suas rotinas.

Acreditamos que este manuscrito ajude a esclarecer alguns cenários após a exposição à radiação parcial do corpo, que auxiliará na decisão médica. As irradiações parciais do corpo exigem maiores certezas sobre o evento de exposição, porque a falta de conhecimento sobre o cenário do acidente pode causar a estimativa da dose parcial do corpo como se fosse uma dose de corpo inteiro. Isso pode resultar erroneamente em uma estimativa de dose e definição de risco para o paciente.

Em relação ao segundo capítulo, ratificamos a importância da taxa de dose envolvida no acidente para a dosimetria biológica, pois depende da curva de calibração empregada, o nível de risco a saúde do indivíduo também pode ser definido diferentemente. Além disso, os exercícios de intercomparação devem levar em consideração as taxas de dose dos laboratórios participantes, pois provavelmente esse é o fator mais importante que está interferindo nos resultados, levando alguns laboratórios a estimarem doses fora das recomendações. Ao mesmo tempo, traz uma nova aplicação do teste ANOVA e Tukey para dosimetria biológica, que pode ser utilizado em exercícios de intercomparação laboratorial.

7 CONCLUSÕES

1. As alterações cromossômicas não balanceadas e os micronúcleos são marcadores que apresentam distribuição celular diferente, por isso suas curvas de calibração se apresentam de forma distinta;
2. Os dicêntricos somados aos anéis são preciso para estimar a dose média de uma exposição parcial do corpo quando houver sobredispersão significativa. Em se tratando dos MNs, eles podem apresentar resultados em termo de estimativa de dose coerente, mas em caso de um acidente sem qualquer informação, o ensaio MN pode não definir se o acidente foi uma exposição de corpo inteiro ou parcial;
3. Os achados reafirmam a necessidade de determinar a taxa de dose envolvida no cenário de exposição, pois esse fator é de suma importância para a correta estimativa de dose, além da taxa de dose interferir nos resultados de intercomparações laboratoriais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA, S. et al. The effect of electron and gamma irradiation on the induction of micronuclei in cytokinesis-blocked human blood lymphocytes. **Radiation and environmental biophysics**, v. 48, n. 2, p. 197-203, 2009.

ALEXANDER, G. A. et al. 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, 2007.

ALIZADEH, E.; ORLANDO, T. M.; SANCHE, L. Biomolecular damage induced by ionizing radiation: the direct and indirect effects of low-energy electrons on DNA. **Annual review of physical chemistry**, v. 66, p. 379-398, 2015.

ANTUNES, A. C. et al. The cytokinesis-blocked micronucleus assay: dose estimation and inter-individual differences in the response to γ -radiation. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 760, p. 17-22, 2014.

BALA, M. et al. Concerted action of Nrf2-ARE pathway, MRN complex, HMGB1 and inflammatory cytokines-implication in modification of radiation damage. **Redox biology**, v. 2, p. 832-846, 2014.

AZZAM, E. I.; JAY-GERIN, J.; PAIN, D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. **Cancer letters**, v. 327, n. 1-2, p. 48-60, 2012.

BAKER-JARVIS, J.; KIM, S. The interaction of radio-frequency fields with dielectric materials at macroscopic to mesoscopic scales. **Journal of research of the National Institute of Standards and Technology**, v. 117, p. 1, 2012.

BARCELLOS-HOFF, M. H.; NGUYEN, D. H. Radiation carcinogenesis in context: how do irradiated tissues become tumors?. **Health physics**, v. 97, n. 5, p. 446, 2009.

BARQUINERO, F. et al. Biological dosimetry in simulated in vitro partial irradiations. **International journal of radiation biology**, v. 71, n. 4, p. 435-440, 1997.

BAUCHINGER, M.; SCHMID, E.; DRESP, J. Calculation of the dose-rate dependence of the dicentric yield after Co γ -irradiation of human lymphocytes. **International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine**, v. 35, n. 3, p. 229-233, 1979.

BAUCHINGER, M. et al. Quantitative analysis of the chromosome damage at first division of human lymphocytes after ^{60}Co γ -Irradiation. **Radiation and environmental biophysics**, v. 22, n. 3, p. 225-229, 1983.

BEINKE, C. et al. Laboratory intercomparison of the dicentric chromosome analysis assay. **Radiation research**, v. 180, n. 2, p. 129-137, 2013.

BEINKE, C. et al. A case report: cytogenetic dosimetry after accidental radiation exposure during ¹⁹²Ir industrial radiography testing. **Radiation research**, v. 184, n. 1, p. 66-72, 2015.

BERESFORD, N. A.; COPPLESTONE, D. Effects of ionizing radiation on wildlife: what knowledge have we gained between the Chernobyl and Fukushima accidents?. **Integrated environmental assessment and management**, v. 7, n. 3, p. 371-373, 2011.

BERGINK, S. et al. DNA damage triggers nucleotide excision repair-dependent monoubiquitylation of histone H2A. **Genes & development**, v. 20, n. 10, p. 1343-1352, 2006.

BORRÀS-FRESNEDA, M. et al. Differences in DNA repair capacity, cell death and transcriptional response after irradiation between a radiosensitive and a radioresistant cell line. **Scientific reports**, v. 6, p. 27043, 2016.

BREWEN, J. G.; LUIPPOLD, H. E. Radiation-induced human chromosome aberrations: in vitro dose rate studies. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 12, n. 3, p. 305-314, 1971.

BUDWORTH, H. et al. DNA repair and cell cycle biomarkers of radiation exposure and inflammation stress in human blood. **PloS one**, v. 7, n. 11, p. e48619, 2012.

BURIGO, L. et al. Distributions of deposited energy and ionization clusters around ion tracks studied with Geant4 toolkit. **Physics in Medicine & Biology**, v. 61, n. 10, p. 3698, 2016.

CHRISTENSEN, D. M.; IDDINS, C. J.; SUGARMAN, S. L. Ionizing radiation injuries and illnesses. **Emergency Medicine Clinics**, v. 32, n. 1, p. 245-265, 2014a.

CHRISTENSEN, D. M. et al. Management of ionizing radiation injuries and illnesses, part 4: acute radiation syndrome. **The Journal of the American Osteopathic Association**, v. 114, n. 9, p. 702-711, 2014b.

COEYTAUX, Karen et al. Reported radiation overexposure accidents worldwide, 1980-2013: a systematic review. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0118709, 2015.

CRESPO, R. H.; DOMENE, M. M.; RODRÍGUEZ, M. J. P. Biodosimetry and assessment of radiation dose. **Reports of Practical Oncology & Radiotherapy**, v. 16, n. 4, p. 131-137, 2011.

DAINIÁK, N. Hematologic consequences of exposure to ionizing radiation. **Experimental hematology**, v. 30, n. 6, p. 513-528, 2002.

DARZYNKIEWICZ, Z. et al. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). **Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 27, n. 1, p. 1-20, 1997.

DELVES, P. J.; ROITT, I. M. The immune system. **New England journal of medicine**, v. 343, n. 1, p. 37-49, 2000.

DENG, B. et al. Cytogenetic Effects of Low-Dose Tritiated Water in Human Peripheral Blood Lymphocytes—Experimental Studies on the Relative Biological Effectiveness and Chromosome Aberration Rate and CBMN in Human Blood Lymphocyte Irradiated by Tritium Low Dose Tritium β -Rays and ^{60}Co γ -Rays. **Open Journal of Clinical Diagnostics**, v. 5, n. 04, p. 125, 2015.

DI GIORGIO, M. et al. Biological dosimetry intercomparison exercise: an evaluation of triage and routine mode results by robust methods. **Radiation research**, v. 175, n. 5, p. 638-649, 2011.

DIANOV, G. L.; HÜBSCHER, U. Mammalian base excision repair: the forgotten archangel. **Nucleic acids research**, v. 41, n. 6, p. 3483-3490, 2013.

DORR, H.; GOULKO, G.; MEINEKE, V. Clinical Aspects of Radiation Accident Medical Management. **Radiation Emergency Med**, v. 3, n. 2, p. 13-8, 2014.

EL-SAGHIRE, H. et al. Gene set enrichment analysis highlights different gene expression profiles in whole blood samples X-irradiated with low and high doses. **International journal of radiation biology**, v. 89, n. 8, p. 628-638, 2013.

FENECH, M. The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. **Environmental health perspectives**, v. 101, n. suppl 3, p. 101-107, 1993.

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

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature protocols**, v. 2, n. 5, p. 1084, 2007.

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

FERNÁNDEZ-FONTELO, A. et al. An exact goodness-of-fit test based on the occupancy problems to study zero-inflation and zero-deflation in biological dosimetry data. **Radiation protection dosimetry**, v. 179, n. 4, p. 317-326, 2018.

FISHER, R. A. The significance of deviations from expectation in a Poisson series. **Biometrics**, v. 6, n. 1, p. 17-24, 1950.

FUCIC, A. et al. Frequency of acentric fragments are associated with cancer risk in subjects exposed to ionizing radiation. **Anticancer research**, v. 36, n. 5, p. 2451-2457, 2016.

GARCIA-SAGREDO, J. M. Fifty years of cytogenetics: a parallel view of the evolution of cytogenetics and genotoxicology. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1779, n. 6-7, p. 363-375, 2008.

GEORGE, K. et al. High-and low-LET induced chromosome damage in human lymphocytes: A time-course of aberrations in metaphase and interphase. **International journal of radiation biology**, v. 77, n. 2, p. 175-183, 2001.

GERING, F. et al. Potential consequences of the Fukushima accident for off-site nuclear emergency management: a case study for Germany. **Radiation protection dosimetry**, v. 155, n. 2, p. 146-154, 2013.

GRUEL, G. et al. Biological dosimetry by automated dicentric scoring in a simulated emergency. **Radiation research**, v. 179, n. 5, p. 557-569, 2013.

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

HATCH, M. et al. The Chernobyl disaster: cancer following the accident at the Chernobyl nuclear power plant. **Epidemiologic reviews**, v. 27, n. 1, p. 56-66, 2005.

HATCH, M. et al. The Chernobyl disaster: cancer following the accident at the Chernobyl nuclear power plant. **Epidemiologic reviews**, v. 27, n. 1, p. 56-66, 2005.

HIGUERAS, M. et al. A note on Poisson goodness-of-fit tests for ionizing radiation induced chromosomal aberration samples. **International journal of radiation biology**, v. 94, n. 7, p. 656-663, 2018.

HIGUERAS, M. et al. A new Bayesian model applied to cytogenetic partial body irradiation estimation. **Radiation protection dosimetry**, v. 168, n. 3, p. 330-336, 2015.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, IAEA. **Relative biological effectiveness in ion beam therapy**. International Atomic Energy Agency, 2008.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, IAEA. **Cytogenetic dosimetry: applications in preparedness for and response to radiation emergencies**. IAEA, 2011.

INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION; VALENTIN, Jack. **The 2007 recommendations of the international commission on radiological protection**. Oxford: Elsevier, 2007.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). Radiation protection—Performance criteria for service laboratories performing biological dosimetry by cytogenetics. **Geneva: ISO**, v. 19238, p. 2014, 2004.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). Radiation protection—Performance criteria for laboratories performing cytogenetic triage for assessment of mass casualties in radiological or nuclear emergencies—General

principles and application to dicentric assay. **General principles and application to dicentric assay**. Geneva: ISO, v. 21243, p. 2008, 2008.

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

JEGGO, P.; LAVIN, M. F. Cellular radiosensitivity: how much better do we understand it?. **International journal of radiation biology**, v. 85, n. 12, p. 1061-1081, 2009.

KAMIYA, K. et al. Long-term effects of radiation exposure on health. **The lancet**, v. 386, n. 9992, p. 469-478, 2015.

KAVANAGH, J. N. et al. DNA double strand break repair: a radiation perspective. **Antioxidants & redox signaling**, v. 18, n. 18, p. 2458-2472, 2013.

KAWATA, T. et al. Chromosome aberrations induced by high-LET radiations. **Biological Sciences in Space**, v. 18, n. 4, p. 216-223, 2004.

KHAN, F. M.; GIBBONS, J. P. **Khan's the physics of radiation therapy**. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 28- 39, 2014.

KIM, J. H.; JENROW, K. A.; BROWN, S. L. Mechanisms of radiation-induced normal tissue toxicity and implications for future clinical trials. **Radiation oncology journal**, v. 32, n. 3, p. 103, 2014.

KNOPS, K. et al. Gene expression in low-and high-dose-irradiated human peripheral blood lymphocytes: possible applications for biodosimetry. **Radiation research**, v. 178, n. 4, p. 304-312, 2012.

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

KÖKSAL, G.; PALA, F. S.; DALCI, D. Ö. In vitro dose-response curve for chromosome aberrations induced in human lymphocytes by 60Co γ -radiation. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 329, n. 1, p. 57-61, 1995.

LAGERWERF, S. et al. DNA damage response and transcription. **DNA repair**, v. 10, n. 7, p. 743-750, 2011.

LANS, H. et al. Involvement of global genome repair, transcription coupled repair, and chromatin remodeling in UV DNA damage response changes during development. **PLoS genetics**, v. 6, n. 5, p. e1000941, 2010.

LARA, P. C. et al. Direct and bystander radiation effects: A biophysical model and clinical perspectives. **Cancer letters**, v. 356, n. 1, p. 5-16, 2015.

LEE, J. K. Practical applications of cytogenetic biodosimetry in radiological emergencies. **The Korean journal of hematology**, v. 46, n. 2, p. 62-64, 2011.

LEE, J. K. et al. Cytogenetic biodosimetry for Fukushima travelers after the nuclear power plant accident: no evidence of enhanced yield of dicentrics. **Journal of radiation research**, v. 53, n. 6, p. 876-881, 2012.

LÉONARD, A. et al. Usefulness and limits of biological dosimetry based on cytogenetic methods. **Radiation protection dosimetry**, v. 115, n. 1-4, p. 448-454, 2005.

Lindholm, C. et al. Comparison of dose-response curves for chromosomal aberrations established by chromosome painting and conventional analysis. **International Journal of Radiation Biology**, n. 74, p. 27-34, 1998.

LINET, M. S. et al. Cancer risks associated with external radiation from diagnostic imaging procedures. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 62, n. 2, p. 75-100, 2012.

LITTLE, M. P. et al. Risks associated with low doses and low dose rates of ionizing radiation: why linearity may be (almost) the best we can do. **Radiology**, v. 251, n. 1, p. 6-12, 2009.

LIU, J. X. et al. Intercomparison in cytogenetic dosimetry among 22 laboratories in China. **Genome integrity**, v. 7, 2016.

LLOYD, D. C. et al. The relationship between chromosome aberrations and low LET radiation dose to human lymphocytes. **International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine**, v. 28, n. 1, p. 75-90, 1975.

LLOYD, D. C. et al. Chromosome aberrations induced in human lymphocytes by neutron irradiation. **International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine**, v. 29, n. 2, p. 169-182, 1976.

LLOYD, D. C.; DOLPHIN, G. W. Radiation-induced chromosome damage in human lymphocytes. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 34, n. 4, p. 261-273, 1977.

LLOYD, D. C.; PURROTT, R. J. Chromosome aberration analysis in radiological protection dosimetry. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 1, n. 1, p. 19-28, 1981.

LOUCAS, Bradford D. et al. Chromosome damage in human cells by γ rays, α particles and heavy ions: track interactions in basic dose-response relationships. **Radiation research**, v. 179, n. 1, p. 9-20, 2012.

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

MEADOWS, S. K. et al. Diagnosis of partial body radiation exposure in mice using peripheral blood gene expression profiles. **PloS one**, v. 5, n. 7, p. e11535, 2010.

MERRIFIELD, M.; KOVALCHUK, O. Epigenetics in radiation biology: a new research frontier. **Frontiers in genetics**, v. 4, p. 40, 2013.

MEZENTSEV, A.; AMUNDSON, S. A. Global gene expression responses to low-or high-dose radiation in a human three-dimensional tissue model. **Radiation research**, v. 175, n. 6, p. 677-688, 2011.

MOISEENKO, V. et al. Biological dosimetry to assess risks of health effects in victims of radiation accidents: Thirty years after Chernobyl. **Radiotherapy and Oncology**, v. 119, n. 1, p. 1-4, 2016.

MULTHOFF, G.; RADONS, J. Radiation, inflammation, and immune responses in cancer. **Frontiers in oncology**, v. 2, p. 58, 2012.

NIKJOO, H. et al. Radiation track, DNA damage and response—a review. **Reports on Progress in Physics**, v. 79, n. 11, p. 116601, 2016.

NOSEL, I. et al. Characterization of gene expression profiles at low and very low doses of ionizing radiation. **DNA repair**, v. 12, n. 7, p. 508-517, 2013.

OESTREICHER, U. et al. RENEB intercomparisons applying the conventional Dicentric Chromosome Assay (DCA). **International journal of radiation biology**, v. 93, n. 1, p. 20-29, 2017.

OKUMURA, K. et al. Relative biological effects of neutron mixed-beam irradiation for boron neutron capture therapy on cell survival and DNA double-strand breaks in cultured mammalian cells. **Journal of radiation research**, v. 54, n. 1, p. 70-75, 2012.

PANAGOPOULOS, D. J.; JOHANSSON, O.; CARLO, G. L. Evaluation of specific absorption rate as a dosimetric quantity for electromagnetic fields bioeffects. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. e62663, 2013.

PERNOT, E. et al. Ionizing radiation biomarkers for potential use in epidemiological studies. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 751, n. 2, p. 258-286, 2012.

POHL-RÜLING, J. Low level dose induced chromosome aberrations in human blood lymphocytes. **Radiation protection dosimetry**, v. 45, n. 1-4, p. 623-627, 1992.

POUGET, J. et al. Introduction to radiobiology of targeted radionuclide therapy. **Frontiers in medicine**, v. 2, p. 12, 2015.

PRASANNA, P. G. S. et al. Synopsis of partial-body radiation diagnostic biomarkers and medical management of radiation injury workshop. **Radiation Research**, v. 173, n. 2, p. 245-253, 2010a.

PRASANNA, P. G. S.; MORONI, M.; PELLMAR, T. C. Triage dose assessment for partial-body exposure: dicentric analysis. **Health Physics**, v. 98, n. 2, p. 244, 2010b.

RAMALHO, A. T.; NASCIMENTO, A. C. H.; NATARAJAN, A. T. Dose assessments by cytogenetic analysis in the Goiania (Brazil) radiation accident. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 25, n. 2, p. 97-100, 1988.

RAMALHO, A. T. et al. Frequency of chromosomal aberrations in a subject accidentally exposed to ¹³⁷Cs in the Goiania (Brazil) radiation accident: Intercomparison among four laboratories. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 252, n. 2, p. 157-160, 1991.

RAMIREZ-JIMENEZ, F. J. et al. Considerations on the measurement of practical peak voltage in diagnostic radiology. **The British Journal of Radiology**, v. 77, n. 921, p. 745-750, 2004.

RAO, C. R.; CHAKRAVARTI, I. M. Some small sample tests of significance for a Poisson distribution. **Biometrics**, v. 12, n. 3, p. 264-282, 1956.

ROMM, H. et al. Laboratory intercomparison of the cytokinesis-block micronucleus assay. **Radiation Research**, v. 180, n. 2, p. 120-128, 2013.

ROONEY, D. E.; CZEPULKOWSKI, B. (3^a Ed.). **Human cytogenetics: constitutional analysis: a practical approach**. Oxford University Press, USA, 1-53 pp, 2011.

ROTHKAMM, K. et al. Comparison of established and emerging biodosimetry assays. **Radiation research**, v. 180, n. 2, p. 111-119, 2013.

ROY, L. et al. International intercomparison for criticality dosimetry: the case of biological dosimetry. **Radiation protection dosimetry**, v. 110, n. 1-4, p. 471-476, 2004.

ROY, L. et al. Effect of lymphocytes culture variations on the mitotic index and on the dicentric yield following gamma radiation exposure. **Radiation protection dosimetry**, v. 151, n. 1, p. 135-143, 2012.

RÜHM, W. et al. Typical doses and dose rates in studies pertinent to radiation risk inference at low doses and low dose rates. **Journal of radiation research**, v. 59, n. suppl_2, p. ii1-ii10, 2018.

SAUNI, R. et al. Cancer incidence among Finnish male cobalt production workers in 1969–2013: a cohort study. **BMC cancer**, v. 17, n. 1, p. 340, 2017.

SCHLÜTER, S. et al. Image processing of multiphase images obtained via X-ray microtomography: a review. **Water Resources Research**, v. 50, n. 4, p. 3615-3639, 2014.

SCHMID, E. et al. Relative biological effectiveness of 144 keV neutrons in producing dicentric chromosomes in human lymphocytes compared with ⁶⁰Co gamma rays under head-to-head conditions. **Radiation research**, v. 157, n. 4, p. 453-460, 2002.

SENTHAMIZHCHELVAN, S. et al. Biodosimetry using chromosome aberrations in human lymphocytes. **Radiation protection dosimetry**, v. 123, n. 2, p. 241-245, 2006.

SENTHAMIZHCHELVAN, S. et al. Biological estimation of dose in hemi-body irradiation of cancer patients by cytogenetic analysis. **Health physics**, v. 94, n. 2, p. 112-117, 2008.

SENTHAMIZHCHELVAN, S. et al. Biodosimetry using micronucleus assay in acute partial body therapeutic irradiation. **Physica Medica**, v. 25, n. 2, p. 82-87, 2009.

SEVAN'KAEV, A. V. et al. Cytogenic investigations of serious overexposures to an industrial gamma radiography source. **Radiation protection dosimetry**, v. 102, n. 3, p. 201-206, 2002.

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

WARREN, S. Effects of radiation on normal tissues. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 30, n. 6, p. 350-355, 1980.

SHIM, G. et al. Crosstalk between telomere maintenance and radiation effects: A key player in the process of radiation-induced carcinogenesis. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 760, p. 1-17, 2014.

SINGH, R.; SINGH, D.; SINGH, A. Radiation sterilization of tissue allografts: A review. **World journal of radiology**, v. 8, n. 4, p. 355, 2016.

BELLONI, J. et al. Radiation chemistry from basics to applications in material and life sciences. 2008.

SUGASAWA, K. et al. A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair. **Genes & development**, v. 15, n. 5, p. 507-521, 2001.

SZŁUIŃSKA, M.; EDWARDS, A.; LLOYD, D. Presenting statistical uncertainty on cytogenetic dose estimates. **Radiation protection dosimetry**, v. 123, n. 4, p. 443-449, 2006.

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

THIERENS, H.; VRAL, A.. The micronucleus assay in radiation accidents. **Annali Dell Istituto Superiore Di Sanita**, v. 45, n. 3, p. 260-264, 2009.

THIERENS, H. et al. Cytogenetic biodosimetry of an accidental exposure of a radiological worker using multiple assays. **Radiation protection dosimetry**, v. 113, n. 4, p. 408-414, 2005.

TERINI, R. A. et al. Measurement of the quantity Practical Peak Voltage in the radiology practice. **Radiologia Brasileira**, v. 42, n. 6, p. 389-394, 2009.

TUCKER, J. D. Low-dose ionizing radiation and chromosome translocations: a review of the major considerations for human biological dosimetry. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 659, n. 3, p. 211-220, 2008.

VAURIJOUX, A. et al. Detection of partial-body exposure to ionizing radiation by the automatic detection of dicentrics. **Radiation research**, v. 178, n. 4, p. 357-364, 2011.

VAURIJOUX, A. et al. Detection of partial-body exposure to ionizing radiation by the automatic detection of dicentrics. **Radiation research**, v. 178, n. 4, p. 357-364, 2011.

VENKATACHALAM, P. et al. Estimation of dose in cancer patients treated with fractionated radiotherapy using translocation, dicentrics and micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 429, n. 1, p. 1-12, 1999.

VINNIKOV, V. A. et al. Limitations associated with analysis of cytogenetic data for biological dosimetry. **Radiation research**, v. 174, n. 4, p. 403-414, 2010.

VRAL, M. et al. Apoptosis induced by fast neutrons versus ⁶⁰Co gamma-rays in human peripheral blood lymphocytes. **International journal of radiation biology**, v. 73, n. 3, p. 289-295, 1998.

VRAL, A. et al. Induction and disappearance of G2 chromatid breaks in lymphocytes after low doses of low-LET γ -rays and high-LET fast neutrons. **International journal of radiation biology**, v. 78, n. 4, p. 249-257, 2002.

VRAL, A.; FENECH, M.; THIERENS, H.. The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionising radiation exposure. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 11-17, 2011.

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

WEBER-DONAT, G. et al. MRI assessment of local acute radiation syndrome. **European radiology**, v. 22, n. 12, p. 2814-2821, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) et al. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. 1993.

WOJCIK, A. et al. Cytogenetic damage in lymphocytes for the purpose of dose reconstruction: a review of three recent radiation accidents. **Cytogenetic and genome research**, v. 104, n. 1-4, p. 200-205, 2004.

WONG, K. F. et al. Cytogenetic biodosimetry: what it is and how we do it. **Hong Kong Med J**, v. 19, n. 2, p. 168-173, 2013.

WYROBEK, A. J. et al. Low dose radiation response curves, networks and pathways in human lymphoblastoid cells exposed from 1 to 10 cGy of acute gamma radiation. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 722, n. 2, p. 119-130, 2011.

YASUNARI, T. J. et al. Cesium-137 deposition and contamination of Japanese soils due to the Fukushima nuclear accident. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 49, p. 19530-19534, 2011.

YIN, J. et al. Oxidative stress-mediated signaling pathways: a review. **J. Food Agric. Environ**, v. 11, n. 2, p. 132-139, 2013.

Yoshimura, E. M. Física das Radiações: interação da radiação com a matéria. **Revista Brasileira de Física Médica**, n. 3, p. 57-67, 2009.

Yunis, R. et al. Genomic characterization of a three-dimensional skin model following exposure to ionizing radiation. **Journal of Radiation Research**, n. 53, p. 860-875, 2012.

ANEXO A – CURRÍCULO LATTES

Mariana Esposito Mendes
Curriculum Vitae

Dezembro/2018

Mariana Esposito Mendes

Curriculum Vitae

Nome civil

Nome Mariana Esposito Mendes

Dados pessoais

Filiação Alexandre Mendes de Oliveira e Rosane Esposito Mendes

Nascimento 18/07/1990 - Recife/PE - Brasil

Carteira de Identidade 7546593 SDS - PE - 28/04/2004

CPF 087.954.614-00

Endereço residencial Rua Padre Anchieta - lado par
Torre - Recife
50710165, PE - Brasil
Telefone: 81 30906180
Celular 81 997125384

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

Endereço eletrônico

E-mail para contato: mendes_sb@hotmail.com

E-mail alternativo mariespositomendes@gmail.com

Formação acadêmica/titulação

- 2015** Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Estudo dos efeitos citogenético e molecular em linfócitos humanos expostos parcialmente a diferentes radiações ionizantes e suas aplicações na dosimetria biológica
Orientador: Neide Santos
Co-orientador: Fabiana Farias de Lima Guimarães
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
Palavras-chave: Dosimetria biológica, Citogenética, Biologia Molecular
Áreas do conhecimento: Genética Humana e Médica
Setores de atividade: Pesquisa e desenvolvimento científico
- 2012 - 2014** Mestrado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Verificação da taxa de alterações cromossômicas em sangue humano irradiado em feixe gama, Ano de obtenção: 2014
Orientador: Neide Santos
Co-orientador: Fabiana Farias de Lima
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Palavras-chave: Dosimetria biológica, Citogenética, Radiação gama
- 2008 - 2011** Graduação em Biomedicina.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Verificação da taxa de alterações cromossômicas em sangue humano

irradiado com diferentes doses absorvidas em feixe gama
Orientador: Fabiana Farias de Lima Guimarães

Formação complementar

2016	Espanhol Básico A1 e A2. (Carga horária: 60h). Núcleo de Línguas e Cultura da Universidade Federal de Pernambuco, NLC, Brasil
2018 - 2018	Regional Meeting on the Calibration Curves of the New Laboratories. . (Carga horária: 16h). Latin American Bio-Dosimetry Network, LDBNET, Argentina
2018 - 2018	Curso de curta duração em Radioproteção. (Carga horária: 12h). Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste, CRCN/NE, Brasil
2018 - 2018	Regional Meeting on Intercomparison Exercise in Bio-Dosimetry. . (Carga horária: 40h). Latin American Bio-Dosimetry Network, LDBNET, Argentina
2016 - 2016	Curso de curta duração em Epigenética: Revolucionando o entendimento da genética, herança e doenças. (Carga horária: 3h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
2016 - 2016	Curso de curta duração em Contabilidade para não contadores. (Carga horária: 8h). MGN Treinamentos, MGN TREINAMENTOS, Brasil
2016 - 2016	Green Belt - Six Sigma. (Carga horária: 40h). RL & Associados, RL, Brasil
2016 - 2016	Curso de curta duração em Excel Avançado. (Carga horária: 20h). MD Capacitação e Treinamento, MD, Brasil
2016 - 2016	Curso de curta duração em Ferramentas de bioinformática aplicadas à citogenética moderna. (Carga horária: 3h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Vínculo institucional

2016 - 2016	Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Estágio em Docência, Regime: Parcial Outras informações: No período de abril a maio de 2016, foram preparadas aulas da Disciplina Genética Humana 1 (GN2016), disciplina pertencente ao ciclo básico dos cursos da área de saúde da Universidade Federal de Pernambuco. As aulas preparadas e ministradas foram aulas de Alterações Cromossômicas e Genética do Câncer, as quais foram ministradas nas turmas de Odontologia, Fisioterapia, Terapia Ocupacional e Nutrição sobre a supervisão da Professora Neide Santos.
--------------------	---

- 2016 - 2016** Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Estágio em Docência, Regime: Parcial
Outras informações:
No período de setembro a outubro de 2016, foram preparadas aulas sobre tópicos em Citogenética, disciplina pertencente ao curso de licenciatura em ciências biológicas da Universidade Federal de Pernambuco. Foram produzidas aulas sobre meiose, mapa gênico e alterações cromossômicas, ambas as aulas foram ministradas para a mesma turma sobre a supervisão da Professora Vilma Loreto.
- 2015 - Atual** Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Aluna de Doutorado, Carga horária: 40, Regime: Integral

Atividades

- 2016 - 2017** Estágio, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Genética
Estágio:
Elaborar e ministrar aulas de genética humana I e citogenética para alunos da graduação.

2. Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste - CRCN/NE

Vínculo institucional

- 2015 - Atual** Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Aluna de Doutorado, Carga horária: 40, Regime: Integral
- 2014 - 2015** Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Bolsista CNPq nível DD, Carga horária: 40, Regime: Integral

Atividades

- 03/2015 - Atual** Pesquisa e Desenvolvimento, CRCN/NE
Linhas de pesquisa:
Estudo sobre os efeitos biológicos da radiação ionizantes, utilizando técnicas de mutagêneses, como as alterações cromossômicas, micronúcleo, técnica de FISH e expressão gênica.
- 06/2014 - Atual** Pesquisa e Desenvolvimento, CRCN/NE
Linhas de pesquisa:
Utilização da técnica de micronúcleo para estimativa de dose absorvida após exposição à radiação ionizante.

Linhas de pesquisa

1. Construção de curva de calibração para estimativa de dose após exposição à radiação ionizante.
2. Estudo sobre os efeitos biológicos da radiação ionizantes, utilizando técnicas de mutagêneses, como as alterações cromossômicas, micronúcleo, técnica de FISH e expressão gênica.
3. Utilização da técnica de micronúcleo para estimativa de dose absorvida após

exposição à radiação ionizante.

Projetos

Projetos de pesquisa

2014 - Atual Implementação da técnica de micronúcleos para dosimetria biológica no CRCN-NE visando possíveis acidentes em grandes eventos

Descrição: Tendo em vista os grandes eventos esportivos que vêm ocorrendo no país desde 2013 (Copa das Confederações) e se estenderá até 2016 (Olimpíadas), o Brasil se torna alvo potencial de ataques terroristas que podem envolver radiações ionizantes. Como haverá um grande número de pessoas participando dos eventos, seja como desportistas, comissões técnicas ou expectadores, um acidente radiológico resultará em um grande número de indivíduos expostos à radiação que necessitará de atendimento de emergência com avaliação das doses absorvidas. No caso desses acidentes radiológicos em grande escala, quando centenas de pessoas podem ser expostas, a Agência Internacional de Energia Atômica recomenda distinguir os indivíduos que foram expostos severamente ($D \geq 1\text{Gy}$), que requerem tratamento médico imediato, daqueles menos expostos. Para isso, se faz necessário um ensaio dosimétrico biológico rápido, uma vez que as alterações biológicas são os únicos monitores presentes nos indivíduos (IAEA, 2011). Sabe-se que a dosimetria biológica tem como finalidade avaliar ou estimar a dose absorvida pelo organismo de indivíduos envolvidos ou suspeitos de envolvimento em evento de exposição à radiação ionizante. A estimativa de dose absorvida é baseada na análise de marcadores biológicos sensíveis e específicos à radiação e que reflitam os danos biológicos causados pela mesma. A técnica que melhor reúne essas condições é a contagem das alterações cromossômicas radioinduzidas, tendo os cromossomos dicêntricos como o principal biomarcador, entretanto, a técnica de dicêntricos é laboriosa e demorada (IAEA, 2011). Com isso, o ensaio de micronúcleos por bloqueio da citocinese (CBMN) torna-se a técnica mais importante em eventos de exposição à radiação envolvendo inúmeras pessoas, por ser uma técnica mais rápida tanto no processamento quanto na análise das lâminas, sendo utilizados para uma rápida triagem entre os indivíduos expostos significativamente ou não à radiação ionizante.

Situação: Em andamento **Natureza:** Projetos de pesquisa

Integrantes: Mariana Esposito Mendes; Fabiana Farias Lima (Responsável); Suy Ferreira Hwangb

Idiomas

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

Espanhol Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Escreve Razoavelmente, Lê Razoavelmente

Prêmios e títulos

2017 Menção Honrosa pelo trabalho intitulado: Avaliação da taxa de alterações cromossômicas instáveis em Sangue humano irradiado por raios x:

Estabelecimento de curva dose-resposta, International Joint Conference RADIO 2017

- 2016** Menção honrosa, na área Mutagênese e Farmacogenômica pelo trabalho intitulado CROMOSSOMO DICÊNTRICO NA AVALIAÇÃO DE DOSE ABSORVIDA, XXI Encontro de Genética do Nordeste

Produção

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. ANDRADE, A. M. G.; **MENDES, M. E.**; Lima, F. F.; Mendonça, J. C. G.; HWANG, S. F.; SILVA, L. M.; Santos, N.
ANÁLISE DE ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM ESTUDO DE EXPOSIÇÃO PARCIAL À RAIOS X In: Engene, 2016, Recife.

Mutagênese e Farmacogenômica. 2016.

Áreas do conhecimento: Mutagênese

Referências adicionais: Brasil/Português.

2. **MENDES, M. E.**; Mendonça, J. C. G.; Lima, F. F.; Santos, N.
CROMOSSOMO DICÊNTRICO NA AVALIAÇÃO DE DOSE ABSORVIDA In: Engene, 2016, Recife.

Mutagênese e Farmacogenômica. 2016.

Referências adicionais: Brasil/Português.

3. SILVA, L. M.; Mendonça, J. C. G.; **MENDES, M. E.**; ANDRADE, A. M. G.; HWANG, S. F.; Lima, F. F.
ESTUDO DA FREQUÊNCIA DE ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS INSTÁVEIS EM LINFÓCITOS DEVIDO À RADIAÇÃO IONIZANTE In: Engene, 2016, Recife.

Mutagênese e Farmacogenômica. 2016.

Referências adicionais: Brasil/Português.

Apresentação de trabalho e palestra

1. **MENDES, M. E.**; SILVA, J. C. G.; SILVA, L. M.; Lima, F. F.; Santos, N.
Aplicação do ensaio de micronúcleo em casos de exposição parcial do corpo a baixas doses absorvidas, 2018. (Outra, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais: Brasil/Português; Local: UFPE; Cidade: Recife; Evento: VIII Jornada PPGG; Inst. Promotora/financiadora: Programa de Pós-graduação em Genética

2. SILVA, L. M.; Mendonça, J. C. G.; **MENDES, M. E.**; ANDRADE, A. M. G.; HWANG, S. F.; MELO, A. M. M. A.; Lima, F. F.

Análise estatística das frequências de alterações cromossômicas instáveis em diferentes tipos de radiação, 2017. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais: Brasil/Português; Local: Brasil; Cidade: Natal; Evento: Congresso Regional da Sociedade Brasileira de Biofísica

3. Mendonça, J. C. G.; SILVA, L. M.; **MENDES, M. E.**; ANDRADE, A. M. G.; HWANG, S. F.; Lima, F. F.; MELO, A. M. M. A.

Avaliação da taxa de alterações cromossômicas instáveis em Sangue humano irradiado por raios x: Estabelecimento de curva dose-resposta, 2017. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais: Brasil/Português; Local: Brasil; Cidade: Goiânia; Evento: International Joint Conference RADIO 2017

4. **MENDES, M. E.**; Mendonça, J. C. G.; ANDRADE, A. M. G.; SILVA, L. M.; HWANG, S. F.; MELO, A. M. M. A.; Santos, N.; Lima, F. F.

Comparative study of dose-response curve for chromosome aberrations induced in human

lymphocytes by 60Co and X-Rays, 2017. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais: Brasil/Português; Local: Brasil; Cidade: Belo Horizonte; Evento: International Nuclear Atlantic Conference - INAC 2017

5. **MENDES, M. E.**; Mendonça, J. C. G.; ANDRADE, A. M. G.; SILVA, L. M.; HWANG, S. F.; Santos, N.; Lima, F. F.

Curva de Calibração Dose-Resposta para Ensaio com Micronúcleo, 2017. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais: Brasil/Português; Local: Brasil; Cidade: Natal; Evento: Congresso Regional da Sociedade Brasileira de Biofísica

6. **MENDES, M. E.**; ANDRADE, A. M. G.; Lima, F. F.; Santos, N.

Estudo preliminar dos fragmentos cromossômicos na estimativa de dose absorvida para exposição parcial do corpo, 2017. (Outra, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais: Brasil/Português; Local: Brasil; Cidade: Recife; Evento: IIV Jornada do Programa de Pós-graduação em Genética da UFPE

7. **MENDES, M. E.**; Mendonça, J. C. G.; Lima, F. F.; Santos, N.

Cromossomo Dicêntrico na Avaliação de Dose Absorvida, 2016. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Áreas do conhecimento: Mutagênese

Referências adicionais: Brasil/Português; Local: UFPE; Cidade: Recife; Evento: XXI Encontro de Genética do Nordeste; Inst. Promotora/financiadora: UFPE

Inovação Projetos

Projetos de pesquisa

2014 - Atual Implementação da técnica de micronúcleos para dosimetria biológica no CRCN-NE visando possíveis acidentes em grandes eventos

Descrição: Tendo em vista os grandes eventos esportivos que vêm ocorrendo no país desde 2013 (Copa das Confederações) e se estenderá até 2016 (Olimpíadas), o Brasil se torna alvo potencial de ataques terroristas que podem envolver radiações ionizantes. Como haverá um grande número de pessoas participando dos eventos, seja como desportistas, comissões técnicas ou expectadores, um acidente radiológico resultará em um grande número de indivíduos expostos à radiação que necessitará de atendimento de emergência com avaliação das doses absorvidas. No caso desses acidentes radiológicos em grande escala, quando centenas de pessoas podem ser expostas, a Agência Internacional de Energia Atômica recomenda distinguir os indivíduos que foram expostos severamente (D≥1Gy), que requerem tratamento médico imediato, daqueles menos expostos. Para isso, se faz necessário um ensaio dosimétrico biológico rápido, uma vez que as alterações biológicas são os únicos monitores presentes nos indivíduos (IAEA, 2011). Sabe-se que a dosimetria biológica tem como finalidade avaliar ou estimar a dose absorvida pelo organismo de indivíduos envolvidos ou suspeitos de envolvimento em evento de exposição à radiação ionizante. A estimativa de dose absorvida é baseada na análise de marcadores biológicos sensíveis e específicos à radiação e que reflitam os danos biológicos causados pela mesma. A técnica que melhor reúne essas condições é a contagem das alterações cromossômicas radioinduzidas, tendo os cromossomos dicêntricos como o principal biomarcador, entretanto, a técnica de dicêntricos é laboriosa e demorada (IAEA, 2011). Com isso, o ensaio de micronúcleos por bloqueio da citocinese (CBMN) torna-se a técnica mais importante em eventos de exposição à radiação envolvendo inúmeras pessoas, por ser uma técnica mais rápida tanto no processamento quanto na análise das lâminas, sendo utilizados para uma rápida triagem entre os indivíduos expostos significativamente ou não à radiação ionizante.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Mariana Esposito Mendes; Fabiana Farias Lima (Responsável); Suy Ferreira Hwang

Orientações e Supervisões

Orientações e supervisões

Orientações e supervisões concluídas

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. Júlio César Gomes da Silva. **Averiguação da frequência de micronúcleo em sangue humano irradiado por feixe misto nêutron gama em três diferentes doses absorvidas**. 2018. Curso (Biomedicina) - Centro Universitário Tiradentes de Pernambuco

Referências adicionais: Brasil/Português.

2. Aida Mayra Guedes de Andrade. **Análise de alterações cromossômicas: um estudo de exposição parcial à Raios X**. 2017. Curso (Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco

Referências adicionais: Brasil/Português.

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. **XXI Encontro de Genética do Nordeste**, 2016. (Encontro)
Cromossomo Dicêntrico na Avaliação de Dose Absorvida.

2. **V Jornada de Pós-Graduação em Genética**, 2015. (Outra)

Bancas

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Graduação

1. MELO, A. M. M. A.; **MENDES, M. E.**

Participação em banca de Laís Melo da Silva. **Validação da curva de calibração dose-resposta para Raios-X de 250 KVp do laboratório de dosimetria biológica do CRCN/CNEN**, 2017

(Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco

Referências adicionais: Brasil/Português.

Totais de produção

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos.....	4
Apresentações de trabalhos (Congresso).....	14
Apresentações de trabalhos (Seminário).....	1
Apresentações de trabalhos (Outra).....	6
Produção técnica	
Curso de curta duração ministrado (outro).....	1
Orientações	
Orientação concluída (trabalho de conclusão de curso de graduação)	3
Eventos	
Participações em eventos (congresso).....	10
Participações em eventos (seminário).....	1
Participações em eventos (simpósio).....	2
Participações em eventos (encontro).....	1
Participações em eventos (outra).....	3
Participação em banca de trabalhos de conclusão (graduação).....	1

ANEXO B - CARTA DE ACEITE DO CAPÍTULO 1



The online platform for Taylor & Francis Group content

[Author Services](#) | [FAQ](#) | [Twitter](#) | [Facebook](#)

Dear author,

We're delighted to let you know your accepted manuscript [Comparative study of Micronucleus assays and Dicentric plus ring chromosomes for dose assessment in particular cases of partial-body exposure](#) is now on Taylor & Francis Online. This is the version of your manuscript which has been through peer review and been accepted by the journal editor.

After your manuscript has been typeset, you will be able to check the proofs. We will then email you when the final version of your article (the Version of Record) is published, and when it has been assigned to an issue. But what should you do now?

Register now to access your Authored Works

[Authored Works](#) is where you can view all articles you have published with Taylor & Francis. You can check how many people have viewed your articles and how many times they have been cited, as well as access your Altmetric data. If you register today, you'll be able to view your article as soon as it has been published.

How to register

You will need to register with the email you used when submitting your manuscript. This is:

mendes_sb@hotmail.com

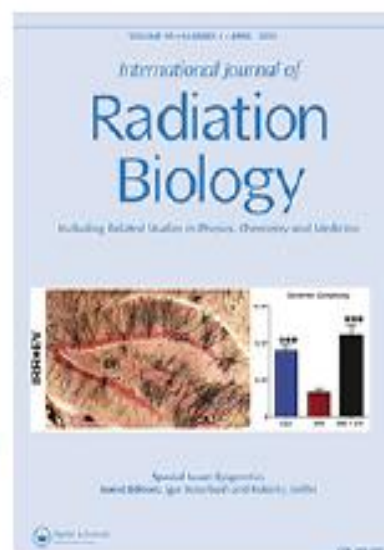
Once you've completed the quick registration you'll be sent an email asking you to confirm. Click on the verification link and you can then login (using the above email address) whenever you want to by going to [Taylor & Francis Online](#). Once you have logged in, click on "Your Account" at the top of the page to see the latest updates on your article.

Next steps

We'll be in touch to let you know when your proofs are ready, but if you have any queries in the interim don't hesitate to get in touch with your production editor.

Kind regards,

Stewart Gardiner
Global Production Director, Journals
Taylor & Francis Group



Taylor & Francis

ANEXO C - CARTA DE ENCAMINHAMENTO DO CAPÍTULO 2

Genetics and Molecular Biology - Manuscript ID GMB-2018-0370

Genetics and Molecular Biology <onbehalf@manuscriptcentral.com>

Qui, 17/01/2019 17:53

Para: neidesantos.ufpe@gmail.com <neidesantos.ufpe@gmail.com>

Cc: mendes_sb@hotmail.com <mendes_sb@hotmail.com>; july_cgm@gmail.com
<july_cgm@gmail.com>; shwang@cnen.gov.br <shwang@cnen.gov.br>; mdigiorgio@arn.gob.ar
<mdigiorgio@arn.gob.ar>; fflima@cnen.gov.br <fflima@cnen.gov.br>; neidesantos.ufpe@gmail.com
<neidesantos.ufpe@gmail.com>

17-Jan-2019

Dear Dr. Santos:

Your manuscript entitled "Calibration curves with low dose rate are different in terms of dose estimation – a comparative study" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Genetics and Molecular Biology. Your manuscript ID is GMB-2018-0370.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/gmb-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/gmb-scielo>.

Note that Genetics and Molecular Biology has established a publication charge for accepted manuscripts. For detailed information, please consult our homepage <http://www.gmb.org.br>.

Thank you for submitting your manuscript to the Genetics and Molecular Biology.

Sincerely,

Genetics and Molecular Biology Editorial Office

ANEXO D – COMITÊ DE ÉTICA

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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Implementação do Serviço de Dosimetria Biológica no Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste - CRCN-NE/CNEN

Pesquisador: Fabiana Farias de Lima Guimarães

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 09186813.7.0000.5208

Instituição Proponente: COMISSAO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR

Patrocinador Principal: COMISSAO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 269.483

Data da Relatoria: 08/05/2013

Apresentação do Projeto:

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

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

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

ANEXO E – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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

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

Este estudo tem por objetivo principal avaliar as alterações cromossômicas (nos cromossomos estão contidos a informação genética) nas células de adultos saudáveis cujas amostras sanguíneas voluntariamente cedidas serão irradiadas ou não por fontes radioativas. No caso das irradiadas, a partir de variações na dose, serão elaboradas curvas de resposta biológica em relação à dose de radiação absorvida para diferentes tipos de radiação. No caso das não irradiadas, serão fornecidas informações acerca do background genético de alterações cromossômicas da população residente no Estado de Pernambuco à comunidade científica.

Tal pesquisa é necessária, pois, diariamente, sejam por motivos médicos ou ocupacionais, a população é cada vez mais exposta às radiações, sendo necessário um estudo mais aprofundado que forneça informações que possam ser correlacionadas com os possíveis danos causados aos indivíduos.

Sua participação nessa pesquisa consistirá em fornecer amostras de sangue (10 ml), por punção venosa, em seringas estéreis descartáveis contendo heparina sódica na concentração de 5000U/mL, após assinatura deste termo. Seu material será usado exclusivamente para efeito desta pesquisa. O(a) Sr(a). também responderá um questionário para verificação do seu estado geral de saúde, apontando se nos últimos seis meses antes da coleta houve alguma exposição à radiação terapêutica ou raios X diagnóstico; aplicação de vacinas; ou consumo de drogas ilícitas. Essas informações são necessárias, pois os fatores citados podem alterar os resultados.

Os riscos inerentes a sua participação são mínimos. Durante a coleta, que obedecerá aos requisitos de segurança e assepsia, o(a) senhor(a) poderá sentir uma



ardência local e, eventualmente, após coleta poderá se formar um hematoma (mancha roxa) no local, que desaparecerá em poucos dias. Ressaltamos que, em momento algum, o(a) senhor(a) será exposto(a) a quaisquer fontes radioativas. O benefício direto é a possibilidade de fornecer a informação quanto aos níveis espontâneos de alterações cromossômicas que o(a) Sr(a) possui, caso seja de seu interesse. Essa informação será enviada pós análise por meio de um documento/carta padrão via correio ou e-mail. Além disso, esse projeto possibilitará que haja o primeiro laboratório de pesquisa do Nordeste, bem como o primeiro serviço de dosimetria biológica para nêutrons do Brasil.

Garantimos que todas as medidas serão tomadas para assegurar a total privacidade dos seus dados pessoais, uma vez que são de caráter sigiloso e que, em nenhuma hipótese, seus dados pessoais serão levados a público. Esses dados ficarão sob a guarda da pesquisadora responsável, Dra. Fabiana Farias de Lima, no Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste, sito à Av. Prof. Luiz Freire, nº 200, Cidade Universitária, Recife-PE. Eles serão guardados por um período de 5 (cinco) anos após o término da pesquisa, os quais posteriormente serão destruídos. O acesso e a análise dos dados coletados se farão apenas pelos pesquisadores e assistentes envolvidos no projeto.

O (A) senhor(a) receberá uma cópia deste documento onde consta o telefone e o endereço institucional da pesquisadora principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento. Caso deseje saber se este projeto foi avaliado por um Comitê de Ética, ou mesmo fazer alguma denúncia sobre procedimentos antiéticos o(a) senhor(a) poderá contatar o Comitê de Ética em Pesquisa (Avenida da Engenharia s/n – 1º andar, sala 4, Cidade Universitária, Recife, PE, CEP: 50740-600, telefone 2126-8588, email: cepccs@ufpe.br).

Recife, ____ de _____ de 201 ____

Pesquisadora responsável: Fabiana Farias de Lima Guimarães
Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste
Av. Professor Luiz Freire, 200, CDU, Recife/PE
Fone: (81) 3797-8024
Email: fflima@cnen.gov.br



Ministério da
Ciência, Tecnologia
e Inovação



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

Nome: _____

RG: _____

Data: _____

Assinatura : _____

Testemunha 1: _____ Data ____/____/____

Testemunha 2: _____ Data ____/____/____

A rogo de _____,
assino o presente
termo.