



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS

CAIO FERREIRA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DA VIABILIDADE DO PROTOCOLO COMBINADO
DE TÉCNICAS CITOGENÉTICAS PARA TRIAGEM E
ESTIMATIVA DE DOSE ABSORVIDA EM ACIDENTES
RADIOLÓGICOS E NUCLEARES**

RECIFE
2025

CAIO FERREIRA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DA VIABILIDADE DO PROTOCOLO COMBINADO
DE TÉCNICAS CITOGENÉTICAS PARA TRIAGEM E
ESTIMATIVA DE DOSE ABSORVIDA EM ACIDENTES
RADIOLÓGICOS E NUCLEARES**

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

Orientador(a): Dra. Fabiana Farias de Lima Guimarães

Coorientador: Me. Gael Freires de Lima

Recife
2025

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

Oliveira, Caio Ferreira de.

Análise da viabilidade do protocolo combinado de técnicas citogenéticas para triagem e estimativa de dose absorvida em acidentes radiológicos e nucleares / Caio Ferreira de Oliveira. - Recife, 2025.

53p. : il., tab.

Orientador(a): Fabiana Farias de Lima Guimarães

Coorientador(a): Gael Freires de Lima

(Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2025.

Inclui referências, anexos.

1. Biodosimetria. 2. Radiobiologia. 3. Genética. 4. Dicêntrico. 5. Micronúcleo. I. Lima Guimarães, Fabiana Farias de . (Orientação). II. Lima, Gael Freires de . (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

CAIO FERREIRA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DA VIABILIDADE DO PROTOCOLO COMBINADO
DE TÉCNICAS CITOGENÉTICAS PARA TRIAGEM E
ESTIMATIVA DE DOSE ABSORVIDA EM ACIDENTES
RADIOLÓGICOS E NUCLEARES**

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

Aprovada em: 18/02/2025

BANCA EXAMINADORA

Orientador(a): Prof. Dra. Fabiana Farias de Lima Guimarães
CRCN/CNEN / Departamento de Dosimetria

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

Me. Júlio César Gomes da Silva
CRCN/CNEN / Departamento de Dosimetria

Dedico este trabalho primeiramente aos meus pais que sempre me mostraram que o melhor caminho é a educação. Em seguida, a todas as pessoas que necessitam da ciência nuclear como ferramenta em saúde.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora por ter me dado forças e sabedoria na realização deste trabalho como também durante a graduação e em tantos momentos difíceis até a conclusão desse curso.

A minha Orientadora, Dra. Fabiana Farias Lima Guimarães, por ter aberto as portas da ciência para mim e me acolher em seu laboratório. Por toda compreensão, paciência, incentivo e por sempre estar presente durante todos esses anos. Obrigado, Fabi!

A minha família científica do Laboratório de Dosimetria Biológica (LDB/CRCN-NE/CNEN) por todo apoio na realização deste trabalho e por toda parceria construída diariamente. Fazer ciência com vocês é uma honra e sorte a minha encontrá-los no caminho. Agradeço especialmente a Gael Freires de Lima, meu coorientador e amigo, por sempre estar presente desde o início da minha iniciação científica me guiando, com sua paciência durante todo esse processo, sem você seria impossível. A Amanda França e Suy Hwang pelo imensurável apoio em cada etapa do trabalho, desde a coleta até as culturas noturnas e análises.

Ao Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN/CNEN) pela infraestrutura para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Carla Maria e Rivaldo Silva, por todo apoio e suporte desde sempre e que, por diversas vezes, deixaram de tecer os seus próprios sonhos para que eu pudesse construir os meus. Amo vocês e sou eternamente grato!

Ao meu irmão e minha cunhada, Rodolfo Ferreira e Renata Kelly, por terem sido minha rede de apoio em muitos momentos durante essa jornada e através deles eu conhecer o meu amor que traz luz para minha vida, minha sobrinha e afilhada, Maria Júlia. Amo vocês.

Aos meus avós, José Alves e Edinalva Dolores, por sempre me apoiarem e fazerem, por muitas vezes, o impossível para mim. Amo vocês mais do que tudo.

As minhas tias, Lúvia Maria (*in memoriam*), Dalka Maria, Maria Sé, Lúbia Maria e Kátia Maria e aos meus tio José Nélio e José Humberto que desde pequeno sempre estiveram ao meu lado me ajudando e apoiando em tantas fases da minha vida. Amo vocês! Obrigado!

Ao meu tio, José Gutemberg (*in memoriam*), por sempre torcer em cada prova de vestibular que eu fazia e que, por ironia do destino, não chegou a me ver ingressando na universidade, mas sei que de onde o senhor estiver, também está comemorando essa vitória. Conseguimos!

Ao meu amigo de longa data, Yure Romero, que para mim, é como um irmão, por todo apoio durante tanto tempo que esse espaço se torna pouco para eu expressar toda minha gratidão. Obrigado por me ouvir e sempre acreditar em mim até quando eu mesmo não acreditava. Te amo, amigo!

As minhas amigas, Mariana Camila e Angela Nascimento, que apesar do tempo corrido e a distância física serem constantes, sempre se fazem presentes na minha vida. Amo vocês!

Aos amigos que a UFPE me deu para a vida Bianca, Clara e David. Encontrar vocês na minha caminhada foi muito mais do que um presente, é um privilégio. Com vocês criei laços que vão além da amizade e que vai perdurar além dos muros da UFPE. Obrigado por todo apoio, suporte e conselho em cada etapa da graduação e fora dela nos momentos bons e ruins tornando essa jornada com certeza mais leve. Amo vocês!

Ao Laboratório de Análises Clínicas do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE), onde realizei meu estágio e tive a oportunidade de conhecer profissionais incríveis e de aprender com cada um lições que vou levar para sempre na minha vida profissional. Em especial a Naila Veras, Patricia Haver, Veridiana Sales, Osmário Tavares, Igor Domingos, Fernanda Pacífico, Ana Cristina, Eduardo Ribeiro, Vanessa, Valmir, Dayse, Rosane, Marta, Maria, Fábio e Thadzia Ramos.

A todas as pessoas que diretamente ou indiretamente contribuíram para esse trabalho, meu muito obrigado!

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

“(..) Só eu saberei se a falha foi necessária.”
Clarice Lispector

OLIVEIRA, Caio Ferreira de. **ANÁLISE DA VIABILIDADE DO PROTOCOLO COMBINADO DE TÉCNICAS CITOGENÉTICAS PARA TRIAGEM E ESTIMATIVA DE DOSE ABSORVIDA EM ACIDENTES RADIOLÓGICOS E NUCLEARES.** 2025. 53 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2025.

RESUMO

A utilização das radiações ionizantes no cotidiano atribui riscos de superexposição a pessoas ocupacionalmente expostas e a sociedade em geral, apesar de rigorosas leis de radioproteção e prevenção de riscos em espaços que utilizam dispositivos radioativos para algum fim benéfico, exigindo vigilância constante. Nesse contexto, surge a Dosimetria Biológica, um campo da ciência que estuda a ação das radiações ionizantes e os efeitos biológicos gerados pela sua exposição por meio de análises citogenéticas de linfócitos do sangue periférico traduzidas em estimativa de dose absorvida por curvas de calibração. Dentre as técnicas utilizadas na biodosimetria destacam, a Técnica de Dicêntricos considerada "padrão ouro" na área e a análise de micronúcleos em células binucleadas, que é altamente sensível na avaliação do poder genotóxico das radiações. Num cenário de emergência radiológica ou nuclear, essas técnicas precisam ser analisadas de modo rápido e assertivo. Logo, uma análise por meio de um protocolo combinado que utilize simultaneamente a alta especificidade e a alta sensibilidade das técnicas tradicionais torna-se interessante. Portanto, este trabalho visa analisar a viabilidade do ensaio combinado em um tempo intermediário das culturas isoladas em situações de triagem e estimativa de dose. Para isso, amostras sanguíneas de um doador voluntário foi irradiado em 2Gy e 3Gy em uma fonte de Co60 (Gammacel 220) no Departamento de Energia Nuclear da UFPE (DEN/UFPE) seguindo protocolos da cultura de linfócitos e posteriormente análise microscópica. Foram analisadas simultaneamente 3323 células binucleadas e 51 células metafásicas. As doses foram estimadas dentro do intervalo de confiança de 95% por meio da curva de calibração do Laboratório de Dosimetria Biológica do CRCN/CNEN. Os resultados obtidos mostraram que o protocolo combinado é eficiente para triagem em situações emergenciais com redução de custos laboratoriais e de tempo com a necessidade de adequações metodológicas para alcançar um melhor rendimento de metáfases nas doses estudadas sendo necessário estudos interlaboratoriais e construção de curvas dose-resposta para a técnica.

Palavras-chave: Biodosimetria. Radiobiologia. Genética. Dicêntrico. Micronúcleo.

OLIVEIRA, Caio Ferreira de. **ANALYSIS OF THE FEASIBILITY OF THE COMBINED PROTOCOL OF CYTOGENETIC TECHNIQUES FOR SCREENING AND ESTIMATION OF ABSORBED DOSE IN RADIOLOGICAL AND NUCLEAR ACCIDENTS**. 2025. 53 pages. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2025.

ABSTRACT

The use of ionizing radiation in everyday life assigns risks of overexposure to people who are exposed to it in their occupations and to society in general, despite strict laws on radiation protection and risk prevention in places where radioactive devices are used for some beneficial purpose and are constantly monitored. In this context, Biological Dosimetry emerges, a field of science that studies the dynamics of ionizing radiation and the biological effects generated by its exposure through cytogenetic analyses of peripheral blood lymphocytes translated into an estimate of the absorbed dose by manipulation curves. Among the techniques used routinely, the Dicentric Technique, considered the "gold standard" in the area, and the analysis of micronuclei in binucleated cells, which is highly sensitive in assessing the genotoxic power of radiation. In a radiological or nuclear emergency scenario, these techniques need to be proven quickly and assertively. Therefore, an analysis through a combined protocol that simultaneously has the high specificity and high sensitivity of traditional techniques becomes an interesting tool in the radioprotection field. Therefore, this study aims to analyze the prediction of the combined assay in an intermediate time of isolated cultures in screening and dose estimation situations. For this, blood samples from a voluntary donor were irradiated at 2Gy and 3Gy in a Co60 source (Gammacel 220) at the Department of Nuclear Energy of UFPE (DEN/UFPE) following lymphocyte culture protocols and subsequent microscopic analysis. A total of 3323 binucleated cells and 51 metaphase cells were analyzed simultaneously. The doses were estimated within the 95% confidence interval using the occurrence curve of the Biological Dosimetry Laboratory of CRCN/CNEN. The results obtained demonstrated that the combined protocol is efficient for screening in emergency situations with reduced laboratory costs and time, with the need for methodological adjustments to achieve a better metaphase yield at scientific doses, requiring interlaboratory studies and construction of dose-response curves for the technique.

Key words: Biodosimetry. Radiobiology. Genetics. Dicentric. Micronuclei.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Espectro eletromagnético	16
Figura 2 – Poder de penetração das radiações	18
Figura 3 – Representação do efeito fotoelétrico	19
Figura 4 – Representação do efeito Compton	19
Figura 5 – Representação da produção de pares	20
Figura 6 – Ilustração do processo de transferência de energia em relação a um espaço	22
Figura 7 – Relação entre RBE e LET	23
Figura 8 – Relação entre dose e probabilidade/severidade dos efeitos biológicos	24
Figura 9 – Ilustração que representa os efeitos diretos e indiretos	25
Figura 10 – Esquematização da radiólise da molécula da água	26
Figura 11 – Esquema ilustrado da lesão radioinduzida	27
Figura 12 – Atuação dos linfócitos no sistema imunológico	28
Figura 13 – Ilustração simplificada do ciclo celular	29
Figura 14 – Imagem de anéis cromossômicos e seu fragmento acêntrico	31
Figura 15 – Cromossomo Dicêntrico (Aumento 1000x)	31
Figura 16 – Ilustração da formação do Cromossomo Dicêntrico	32
Figura 17 – Ilustração da formação do Micronúcleo	32
Figura 18 – Célula Binucleada com presença de micronúcleo (Aumento 400x)	33
Figura 19 – Metáfase validada a partir do protocolo da Agência Internacional de Energia Atômica	36
Figura 20 – Célula Binucleada (BN) com presença de 4 micronúcleos (MN) validada a partir do protocolo da Agência Internacional de Energia Atômica	37
Figura 21 – Análise simultânea de metáfase e célula binucleada no modelo combinado (Aumento 400x)	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação entre dose absorvida e consequência clínica	21
Tabela 2 – Alterações em células binucleadas a partir da distribuição celular	39
Tabela 3 – Grupo de prioridades <i>versus</i> dose em situações de emergência	41
Tabela 4 – Análise de metáfases neste estudo	41
Tabela 5 – Análise de metáfases no protocolo combinado em diferentes estudos	42
Tabela 6 – Comparação do rendimento de metáfases e dicêntricos com doses > 1 Gy	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BN	Células Binucleadas
CBMN	Ensaio de Micronúcleos com Bloqueio de Citocinese
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
CRCN-NE	Centro Regional de Energia Nuclear do Nordeste
Cyt-B	Citocalasina-B
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
IAEA	International Atomic Energy Agency
PHA	Fitohemaglutinina
RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
RNA _m	Ácido Ribonucléico Mensageiro
LDB	Laboratório de Dosimetria Biológica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	RADIAÇÃO IONIZANTE	16
2.2	INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO IONIZANTE COM A MATÉRIA	18
2.3	INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO COM O TECIDO BIOLÓGICO	20
2.3.1	Dose e taxa de dose absorvida	20
2.3.2	Transferência Linear de Energia	21
2.3.3	Efetividade Biológica Relativa (RBE)	22
2.3.4	Efeitos Biológicos	23
2.4	ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS RADIOINDUZIDAS	24
2.5	MODIFICAÇÕES GENÉTICAS RADIOINDUZIDAS	26
2.6	RADIOSENSIBILIDADE E LINFÓCITOS	27
2.7	CICLO CELULAR	28
2.8	DOSIMETRIA BIOLÓGICA	30
3	OBJETIVOS	34
3.1	OBJETIVO GERAL	34
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	34
4	METODOLOGIA	35
4.1	IRRADIAÇÃO DE AMOSTRAS	35
4.2	CULTIVO CELULAR	35
4.3	OBTENÇÃO DE LÂMINAS	36
4.4	ANÁLISE MICROSCÓPICA	36
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
6	CONCLUSÃO	44
6.1	PERSPECTIVAS	44
	REFERÊNCIAS	45
	ANEXOS	48
	ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS DA UFPE	48
	ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO	52

1 INTRODUÇÃO

O vasto uso de radiações ionizantes em diferentes setores sociais para fins médicos, industriais, agrícolas, de pesquisa e militares aumenta a probabilidade do risco de superexposição de pessoas ocupacionalmente expostas e da população geral (INCA,2021; INCA,2012). A Dosimetria Biológica, a partir de estudo das alterações citogenéticas, destaca o ensaio de dicêntricos, técnica considerada padrão ouro na dosimetria biológica, e o ensaio de micronúcleo por bloqueio de citocinese, técnica considerada para triagem. Ambas possibilitaram a rotina na estimativa de dose absorvida em exposições acidentais ou ocupacionais agudas para avaliação do dano causado no indivíduo associando a dose com os efeitos biológicos ocasionados (IAEA,2011).

As análises citogenéticas utilizam como base os linfócitos periféricos humanos por serem radiosensíveis e assim fornecem um meio de estimativa de doses absorvidas após superexposição real ou suspeita às radiações ionizantes por meio do uso de curvas de calibração dose resposta pré-estabelecidas a partir de experimentos padronizados *in vitro* (Mendes *et al.*,2019; Mendes *et al.*,2020). Em casos de acidentes radiológicos de grande escala, os indivíduos suspeitos de exposição precisam de uma avaliação eficiente e rápida capaz de estimar a dose absorvida a que foram expostos para que seja feita a intervenção médica necessária. Nesse contexto, é necessário o uso de métodos de triagem para que os indivíduos expostos a doses mais elevadas tenham prioridade na avaliação médica devido aos efeitos biológicos severos e de morte associadas a essas doses (IAEA,2011).

Logo, o ensaio de micronúcleo por bloqueio da citocinese surge como uma alternativa, por possuir alta sensibilidade e uma análise mais fácil e rápida, tornando esse método viável para procedimentos de triagem em situações de emergência em larga escala. Apesar disso, os micronúcleos não são específicos para a radiação ionizante, pois existe uma variação de acordo com fatores fisiológicos, como idade, sexo, estilo de vida e o surgimento também ocorre devido a fatores ambientais por exposições a outros agentes genotóxicos e mutagênicos. Desta forma, após a triagem, o ensaio de dicêntrico deve ser aplicado para uma estimativa de dose absorvida mais exata, tendo em vista a sua alta especificidade (Fenech,2000; IAEA,2011).

Diante disso, um ensaio combinado que integre as técnicas de micronúcleos e dicêntricos e que ainda permita a distinção de diferentes fases do ciclo celular,

apresenta-se como uma abordagem altamente promissora para a avaliação de doses em cenários de emergências em larga escala desafogando os serviços de saúde em situações urgentes com a proposta de redução do tempo de cultura e análise permitindo uma triagem e estimativa de dose mais eficaz. Portanto, a validação e análise contínuas em laboratórios de dosimetria biológica desempenham um papel crucial como ferramentas na dinâmica e na eficiência das respostas laboratoriais, além de fornecerem suporte importante para a área de radioproteção (Testa *et al.*,2019).

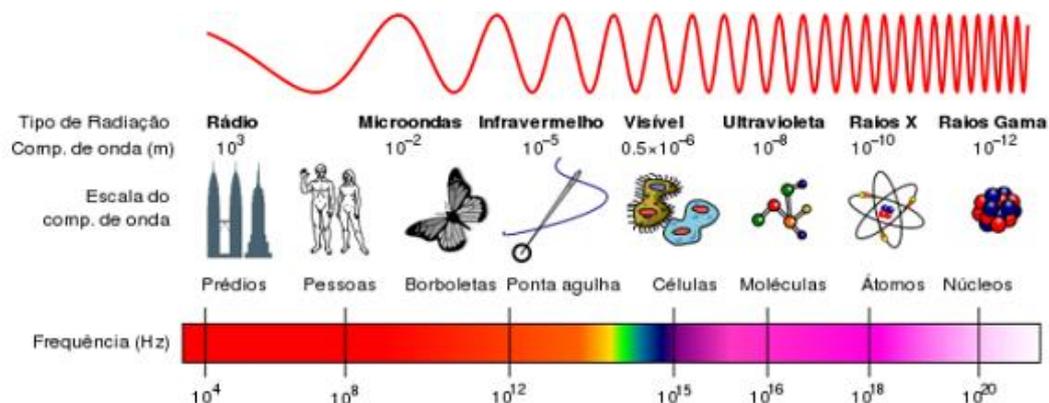
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 RADIAÇÃO IONIZANTE

A radiação é um fenômeno natural que acontece desde a origem do planeta terra, sendo caracterizada por ser uma energia em movimento, que se origina a partir de processos no núcleo atômico ou a nível eletrônico, ou ainda por meio da interação de outros tipos de radiações e partículas com o átomo ou núcleo. (Tauhata *et al.*,2013)

A Radiação pode ser conceituada em dois tipos dentro do espectro eletromagnético (Figura 1): não ionizante e ionizante. A radiação não ionizante apresenta baixa frequência e energia que se propagam no meio por ondas eletromagnéticas com a capacidade de vibrar ou mover átomos em torno da molécula, como, por exemplo, as ondas de rádio, luz visível e infravermelho. Por outro lado, a radiação ionizante tem como principal característica uma energia mais elevada, acima da energia de ligação do elétron, de forma a remover este elétron do átomo ou molécula, resultando em uma espécie química eletricamente carregada, os íons. Esse tipo de radiação abrange os raios X e raios gama. (Tauhata *et al.*,2013; Yoshimura,2009; INCA,2021).

Figura 1. Espectro eletromagnético



Disponível em: <https://pt.khanacademy.org/science/9-ano/materia-e-energia-as-ondas/ondas-eletromagneticas/a/o-espectro-eletromagnetico> .Acesso em: 19/01/2025

Partículas alfa (α), partículas beta (β) e nêutrons são originadas a partir da necessidade de alcançar a estabilidade nuclear dos elementos radioativos através do seu decaimento. A formação da partícula α ocorre devido ao número elevado de prótons e nêutrons que ocasiona uma instabilidade no núcleo, emitindo partículas que

possuem 2 prótons e 2 nêutrons. Dessa forma, a massa atômica diminui em 4, enquanto o número atômico decai em 2 para tornar-se estável. A partícula β ocorre quando existe um excesso de nêutrons e é emitida quando um nêutron se transforma em um par próton-elétron. Essas partículas possuem a característica de ionizar os átomos durante todo seu trajeto até perder sua energia (Tauhata *et al.*, 2013; Boff *et al.*, 2017).

Os raios X se originam a partir das transições das camadas eletrônicas dos átomos por meio de interações nucleares ou de freamento, isto é, pela captura ou expulsão do elétron da camada interna de um núcleo instável que leva a um orbital vazio. Este será preenchido por um elétron em um nível eletrônico mais externo, enquanto no freamento a produção de raio x será ocasionada pela interação de partículas carregadas (Lima *et al.*, 2009). Já os raios gama surgem após a emissão de uma partícula alfa ou beta que, ainda com excesso de energia, o núcleo emite a radiação gama para conseguir sua estabilidade (Cardoso, 2004).

A radiação cósmica foi descoberta por volta de 1911, por estudiosos da área de condutividade do ar, que perceberam uma alta quantidade de íons presentes na atmosfera (Bustamante, 2013). Os raios cósmicos acontecem quando elétrons, prótons e núcleos de alta energia colidem em ambientes extraterrestres e viajam através do universo alcançando o planeta terra. Quanto mais próximo da atmosfera, mais impacto esse tipo de radiação irá causar, devido a sua alta atividade energética. Logo, pessoas que ficam em altas altitudes, como astronautas, viajantes espaciais e em tripulação de aviões estão em maior contato com esse tipo de radiação e recebem uma maior exposição, resultando numa dose absorvida mais elevada quando comparada a pessoas que estão ao nível do mar, ou seja, em menor altitude (IFUSP, 2025).

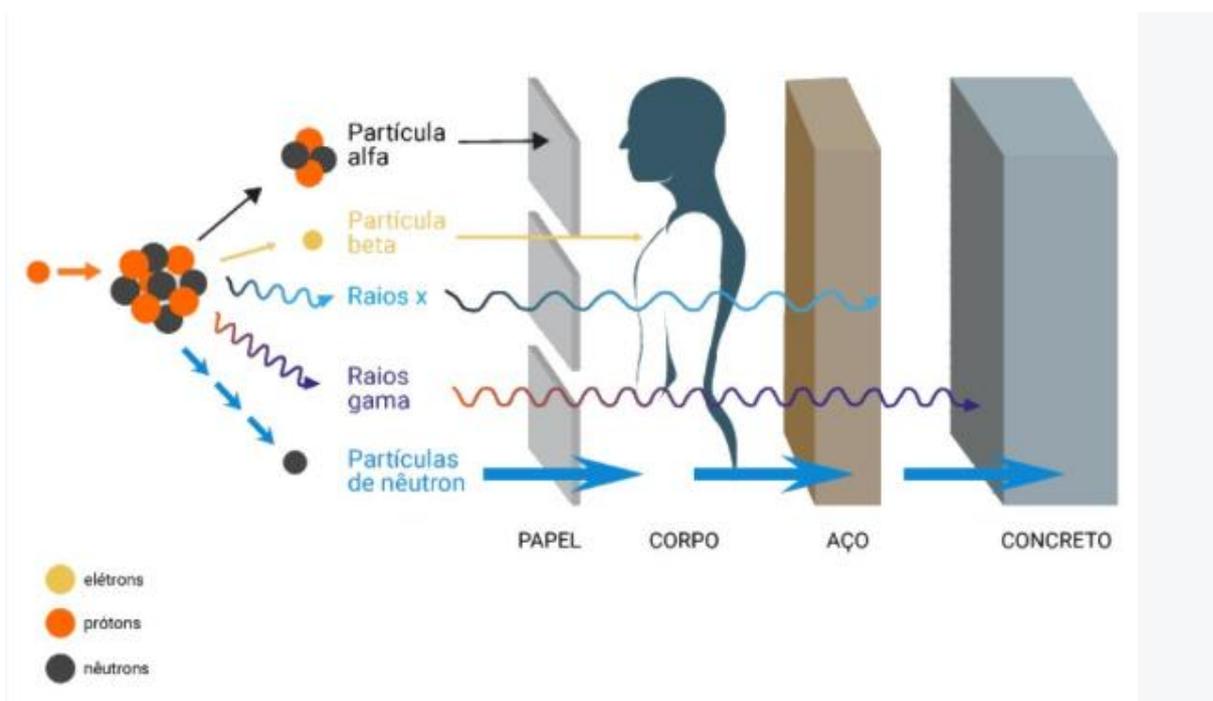
Assim, a radiação está presente no cotidiano das pessoas devido à sua ampla aplicabilidade, que varia conforme a energia necessária para diferentes áreas, como indústria, medicina, pesquisa e agricultura. Além disso, ela ocorre naturalmente em diversas formas, tornando-se um fator relevante no estudo de sistemas biológicos, ao evidenciar a interação dos indivíduos com o ambiente em que vivem.

As radiações eletromagnéticas (raios X e gama) pela sua natureza ondulatória, ausência de carga e a inexistência de massa de repouso, essas radiações têm a capacidade de penetrar em materiais, atravessando grandes espessuras antes de

ocorrer a primeira interação enquanto as particuladas mostram um menor poder de penetração na matéria como ilustrado na Figura 2 (Tauhata *et al.*,2013).

Os principais modos de interação dessas radiações podem ser explicados através do efeito fotoelétrico, efeito Compton e produção de pares (Tauhata *et al.*,2013).

Figura 2. Poder de penetração das radiações.

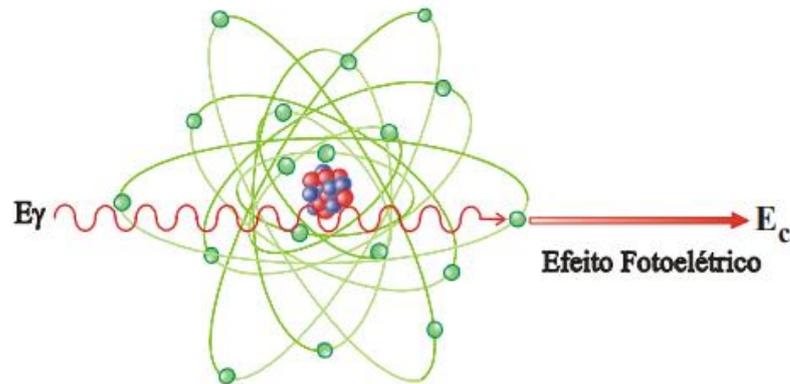


Disponível em: <https://images.app.goo.gl/gmodMwj5ZZdQkec87> . Acesso em: 19/01/2025

2.2 INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO IONIZANTE COM A MATÉRIA

O efeito fotoelétrico (Figura 3) ocorre quando há interação entre um fóton e um elétron ligado a um átomo. Esse efeito é predominante em baixas energias e elementos químicos de elevado número atômico, com maior probabilidade de ocorrência com elétrons das camadas eletrônicas K, L e M pois possuem maior energia de ligação. Raios gama e X são capazes de realizar a transferência total da energia em um único elétron orbital e possuem energia cinética definida (Tauhata *et al.*,2013).

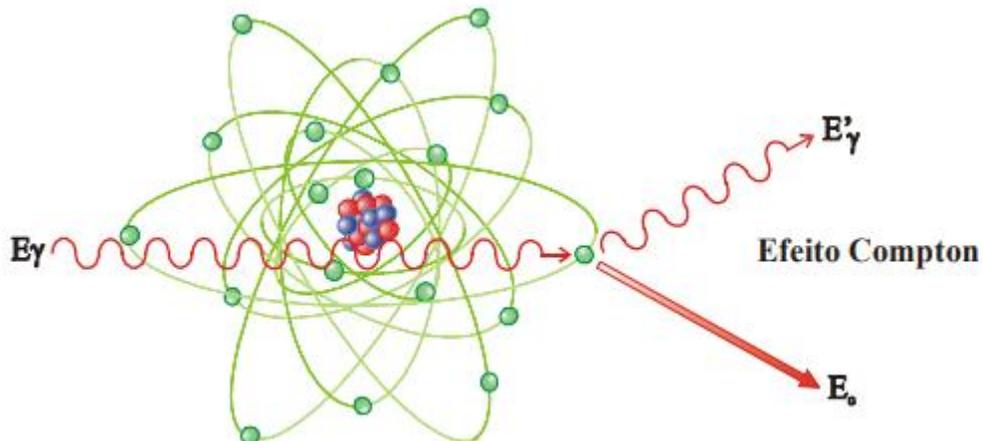
Figura 3. Representação do efeito fotoelétrico.



(Fonte: Tauhata *et al*, 2013)

O efeito Compton (Figura 4) caracteriza-se pelo espalhamento de fótons por elétrons livres ou com baixa energia de ligação, sendo esse efeito mais evidente quando a energia da radiação incidente aumenta e a energia de ligação dos elétrons se torna significativamente baixa. Ao contrário do efeito fotoelétrico descrito acima, os fótons só transferem parte de sua energia aos elétrons (Tauhata *et al.*,2013).

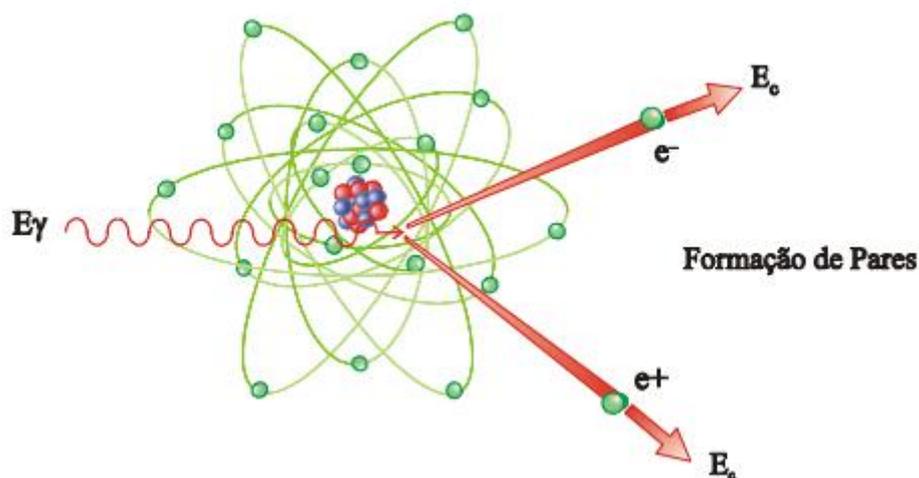
Figura 4. Representação do efeito Compton.



(Fonte: Tauhata *et al*,2013)

A produção de pares (Figura 5) ocorre quando a energia do fóton produz o par elétron-pósitron. Esse tipo de interação acontece quando fótons de energia superior a 1,022 MeV passam próximos de núcleos de número atômico elevado e há interação com o seu campo elétrico (Tauhata,2013).

Figura 5. Representação da produção de pares



(Fonte: Tauhata *et al.*,2013)

A interação da radiação com a matéria promove mudanças, sendo a ionização responsável por gerar consequências significativas ao entrar em contato com a matéria biológica. Isso ocorre devido à deposição de energia, que é proporcional à dose absorvida pelo indivíduo, resultando em danos diretos e indiretos ao organismo humano (IAEA, 2011; Tauhata *et al.*, 2013). A severidade desses danos pode ser explicada com base na dose e na taxa de dose absorvida, bem como em fatores como a Transferência Linear de Energia (LET) e a Efetividade Biológica Relativa (RBE).

2.3 INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO COM O TECIDO BIOLÓGICO

A correlação entre a exposição à radiação ionizante e os efeitos biológicos induzidos no homem foi inicialmente estabelecida de forma dual, confirmando sua existência. Entretanto, com os experimentos realizados, pode-se observar que os efeitos iriam depender de alguns fatores e características da exposição, tais como, tipo de radiação, da energia da radiação e de transferência linear de energia, da dose e da taxa de absorvida, do sistema biológico exposto, dentre outros fatores (IAEA, 2011; Tauhata *et al.*, 2013).

2.3.1 Dose e taxa de dose absorvida

A Dose Absorvida (D) é uma grandeza física utilizada na área de dosimetria e proteção radiológica, caracterizada pela energia média depositada em um órgão e/ou tecido e dividida pela massa do órgão. É expressa em J/Kg segundo o Sistema Internacional de Medidas (SI) ou simplificada para gray (Gy), sendo representada pela equação 1 (Castro,2005).

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

Sendo $d\varepsilon$ a energia média transmitida pela radiação ionizante à matéria em Joule (J), e dm representa a massa em quilogramas (kg) da matéria (IAEA,2011). A uma determinada dose absorvida, o valor real da energia transmitida a uma célula é dado pelo produto da frequência dos eventos de deposição de energia e do valor da energia depositada em cada evento (Dietze,2004).

A taxa de dose refere-se à quantidade de energia depositada por um período de tempo. De acordo com o Sistema Internacional de Medidas (SI), pode ser expressa em Gy (gray) por s (segundo) (IAEA,2011). A partir desses conceitos, os efeitos biológicos podem ser observados e os sintomas associados de acordo com a dose e a taxa de dose absorvida como exemplificado na Tabela 1 (Tauhata *et al.*,2013).

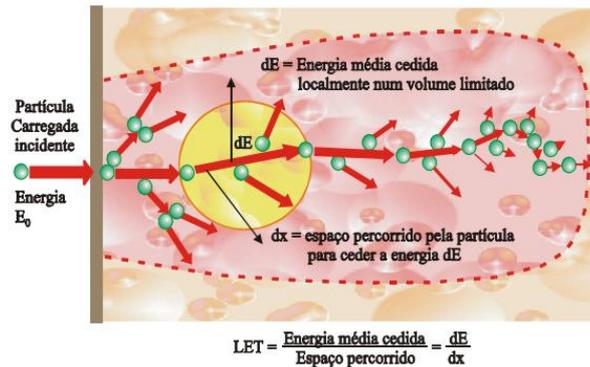
Tabela 1. Relação entre dose absorvida e consequência clínica.

Dose absorvida (Gy)	Sintomas Clínicos
<1	Geralmente ausência de sintomas
1-2	Náuseas e vômitos após 3-6h
2-4	Síndrome Hematopoiética Leve
4-6	Depressão da função medular
6-7	Síndrome do Sistema Gastrointestinal
7-10	Insuficiência Respiratória aguda
>10	Síndrome do Sistema Nervoso central

2.3.2 Transferência Linear de Energia

A Transferência Linear de Energia (LET) é caracterizada pela perda média de energia por colisão, a partir de uma partícula carregada por unidade de comprimento. Dessa forma, explica-se a partir desse conceito o efeito que a partícula tem no meio material (Figura 6). Isso ocorre pela transferência ou conversão de energia que resulta em excitação, ionização do átomo, emissão de radiação de freamento e mudança de direção da partícula, uma vez que, os elétrons estão interagindo a partir de um campo elétrico criado (Tauhata *et al.*,2013).

Figura 6. Ilustração do processo de transferência de energia em relação a um espaço.



(Fonte: Tauhata *et al*,2013)

A LET está diretamente relacionada à qualidade da radiação, ou seja, às características da distribuição espacial das partículas e à transferência de energia ao longo de seu trajeto. Isso explica as variações nos efeitos sobre os tecidos com base na eficácia de cada tipo de radiação, mesmo quando outras grandezas, como dose e taxa de dose absorvida, energia total dissipada e fracionamento da dose absorvida, permanecem constantes (Rodrigues, 2014).

Radiações de baixa LET (como beta, elétrons e fótons) ionizam a matéria por meio de uma distribuição aleatória, necessitando de um maior número de colisões para depositar sua energia. Em contrapartida, radiações de alta LET conseguem ionizar de forma mais concentrada e densa, exigindo menos colisões para a deposição da mesma quantidade de energia. Por essa razão, radiações de alta LET causam danos mais significativos em comparação com as de baixa LET (IAEA, 2011).

2.3.3 Efetividade Biológica Relativa (RBE)

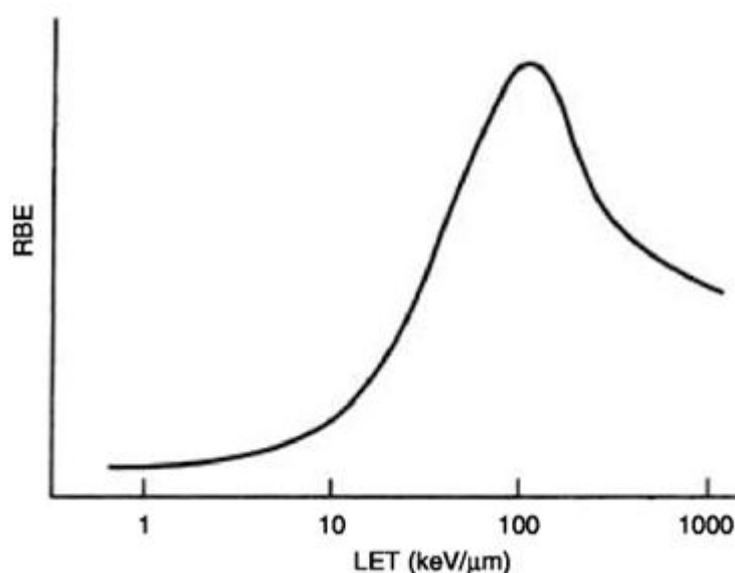
A Efetividade Biológica Relativa (RBE) pode ser definida como a qualidade da radiação em sistemas biológicos (Tauhata *et al.*, 2013), sendo capaz de produzir um nível específico de resposta para um determinado efeito biológico (IAEA, 2011). Essa eficácia pode ser quantificada utilizando a Equação 2.

$$\text{RBE} = \frac{\text{Dose Referência}}{\text{Dose Radiação A}} \quad (2)$$

Sendo, a *Dose Referência* a dose necessária para se produzir um determinado efeito biológico, geralmente é Raios X de 250kVp, e a *Dose Radiação A* é a radiação que produz um efeito igual (Tauhata,2013).

A RBE varia em função da LET, aumentando até um valor ótimo de $100 \text{ keV}\mu\text{m}^{-1}$ com o decaimento posterior, como exemplificado na Figura 7. No entanto, a RBE depende também da dose absorvida, da taxa de dose absorvida e do fracionamento desta dose, bem como da idade e condição fisiológica da pessoa exposta (Tauhata *et al.*, 2013).

Figura 7. Relação entre RBE e LET.



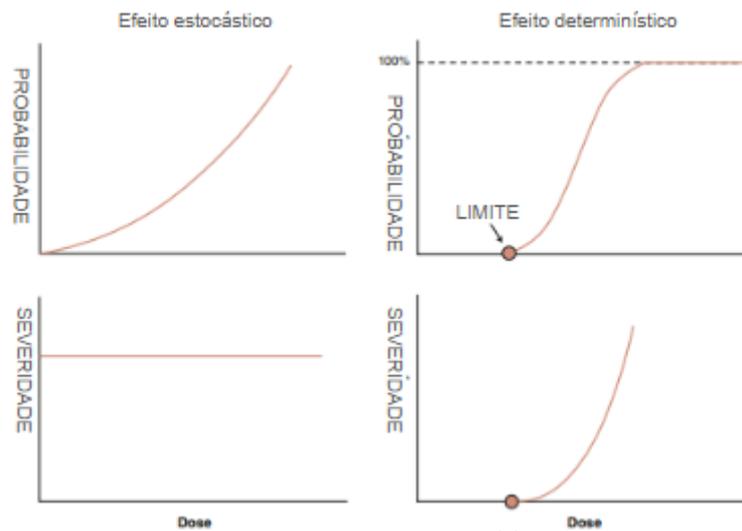
(Fonte: IAEA,2011)

2.3.4 Efeitos Biológicos

Os efeitos biológicos causados pela interação da radiação ionizante com o ser humano são estudados através da Radiobiologia e podem ser subdivididos em dois principais grupos em função de dose e efeito: Estocásticos e Determinísticos (Christensen,2014).

O efeito estocástico ocorre de forma probabilística sem a existência de um limiar, caracterizando-se por um aumento na probabilidade de dano proporcional ao aumento da dose absorvida, sem que haja incremento na severidade do dano. Por outro lado, o efeito determinístico resulta em uma morte celular mais acentuada do que a capacidade de compensação do organismo, fazendo com que a gravidade do dano aumenta com o aumento da dose a partir de um limiar (Figura 8). Esses danos podem ser reversíveis ou irreversíveis, dependendo do contexto (Navarro *et al.*, 2008).

Figura 8. Relação entre Dose e probabilidade/severidade dos efeitos biológicos.



(Fonte: Adaptado de Zanzonico *et al.*, 2016).

Os efeitos da radiação, dependendo do tempo de manifestação e do nível do dano, podem ser classificados como imediatos ou tardios e como somáticos ou hereditários (Tauhata *et al.*, 2013). Os efeitos imediatos manifestam-se dentro de poucas horas a semanas após a exposição, enquanto os tardios podem levar anos para surgir. Os efeitos somáticos afetam as células do corpo, manifestando-se na pessoa irradiada, dependendo de fatores como a dose absorvida, a taxa de absorção e a área irradiada. Por outro lado, os efeitos hereditários afetam os descendentes do indivíduo exposto, resultando da irradiação das gônadas de modo cumulativo e independem da dose absorvida (Tauhata *et al.*, 2013).

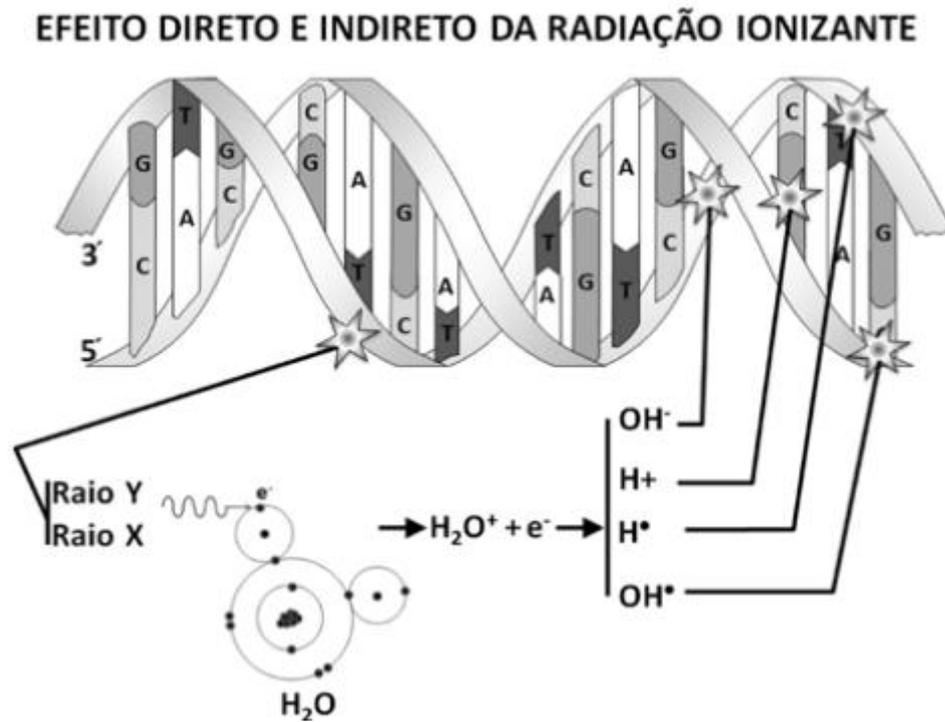
Esses efeitos podem ser observados de forma direta ou indireta, manifestando-se por meio de alterações genéticas, bioquímicas e fisiológicas. Essas alterações podem ocorrer tanto em macromoléculas, como o DNA, quanto no meio extracelular, promovendo desequilíbrios que afetam o funcionamento celular (Navarro *et al.*, 2008).

2.4 ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS RADIOINDUZIDAS

A radiação ionizante pode causar lesões nos tecidos humanos de diversas formas. Os efeitos diretos ocorrem quando a energia depositada nas macromoléculas rompe estruturas atômicas, promovendo alterações no microambiente por meio de modificações bioquímicas e, conseqüentemente, metabólicas. Esses efeitos têm como principais alvos o RNA mensageiro (RNAm), o DNA e as proteínas, rompendo suas ligações covalentes de forma irreversível. Por outro lado, os efeitos indiretos

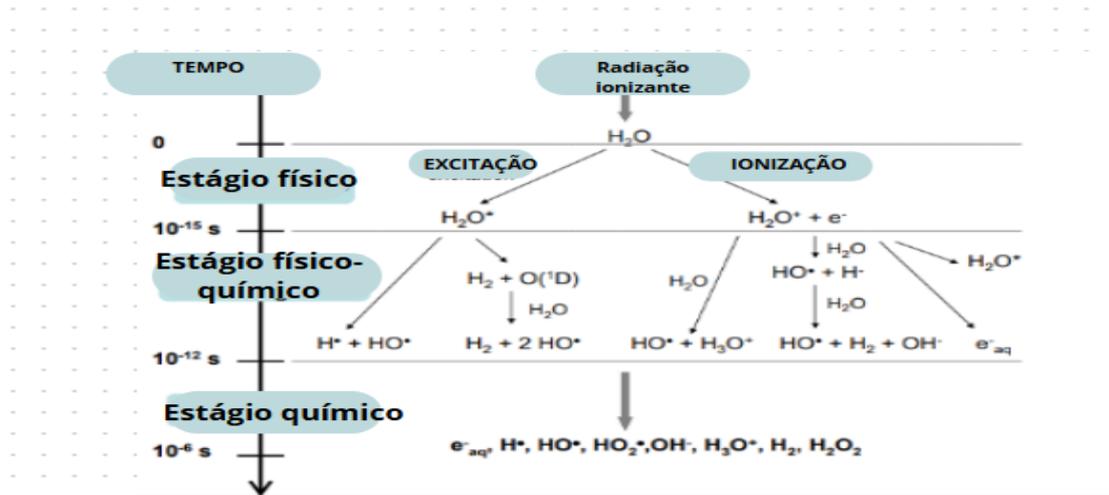
resultam da interação das partículas ionizadas com a água, levando à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), como ilustrado na Figura 9 (Bonato,2011; Wang,J; Wang,H; Qian,H,2018).

Figura 9. Ilustração que representa os efeitos direto e indireto.



Os efeitos diretos e indiretos iniciam uma cascata de mudanças bioquímicas e sinalizações moleculares que podem reparar o dano causado ou acumular esses danos, ocasionando disfunções fisiológicas permanentes (Spitz *et al.*,2004). O corpo humano é formado por mais de 70% de água e, quando a radiação interage com a molécula da água, quebra a molécula iniciando a radiólise, como pode ser visto na figura 10 (Okuno,2013). De forma indireta, a produção de produtos da radiólise, como, por exemplo, eaq^- , HO^\bullet , H^\bullet , HO_2^\bullet , H_3O^+ , OH^- , H_2O_2 e H_2 reagem prontamente com biomoléculas na célula e resultam em danos a biomoléculas importantes, como DNA e proteínas pelo estresse oxidativo. Tais danos podem levar à inibição da divisão celular, alterações cromossômicas, mutação genética e morte celular (Aggarwall,2014).

Figura 10. Esquemática da radiólise da molécula de água

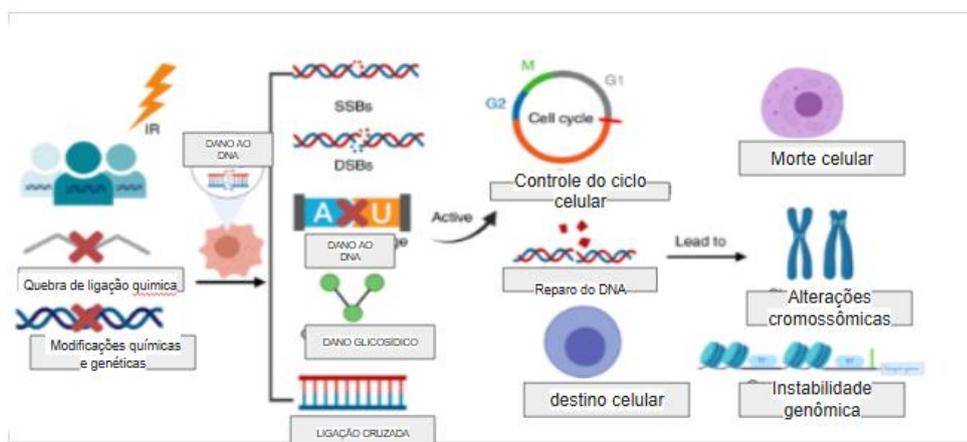


(Fonte: Adaptado de Le Caër *et al.*, 2011)

2.5 MODIFICAÇÕES GENÉTICAS RADIOINDUZIDAS

A Radiação Ionizante pode lesionar o DNA e produzir uma variedade de danos (Figura 11), incluindo principalmente quebras de fita dupla (DSBs), quebras de fita simples de DNA (SSBs), bases modificadas e sítios abásicos, que estão associados a vários tipos de doenças humanas (S.P. Jackson, 2009) por levar a consequências graves, como morte celular, alterações cromossômicas e instabilidade genômica (Liu *et al.*, 2023). A indução desses danos é ocasionada pelo estresse oxidativo e produção de ROS, quebrando a molécula em uma ou mais cadeias do DNA, e esse erro pode ser induzido na replicação posteriormente (Berra, 2008).

Figura 11. Esquema ilustrado da lesão radioinduzida.



(Fonte: Adaptado de Liu *et al.*, 2023)

Entre as lesões no DNA, as quebras de fita dupla (DSBs) são consideradas as mais deletérias, representando as principais ameaças à integridade e estabilidade do genoma. Elas desempenham um papel crucial na determinação do destino celular, seja para a sobrevivência, a carcinogênese ou até para a apoptose celular após exposição à radiação ionizante. Caso não haja um reparo eficiente, haverá perda de material genético importante, o que pode acarretar riscos à saúde do indivíduo (Liu *et al.*, 2023).

2.6 RADIOSENSIBILIDADE E LINFÓCITOS

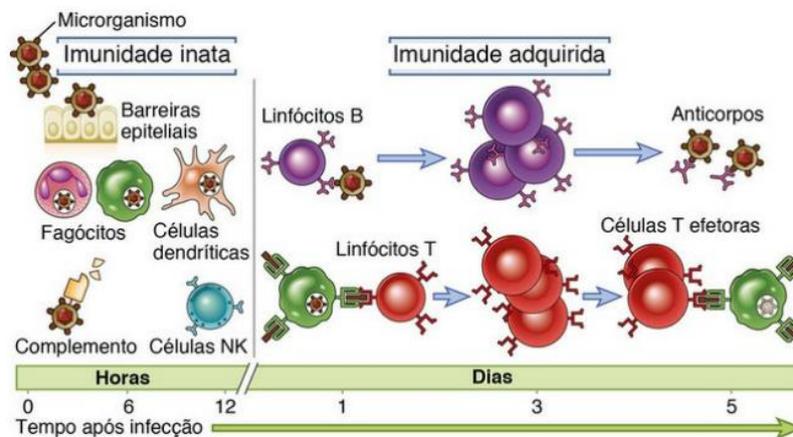
A radiosensibilidade dos vários tipos de células e seus ciclos de vida ajudam a determinar a presença de lesão das radiações ionizantes. De acordo com a Lei de Bergonié e Tribondeau (1906), a radiosensibilidade das células está associada a características como alta taxa de divisão celular, atividade mitótica, falta de diferenciação e capacidade de proliferação. Exemplos de células altamente radiosensíveis incluem células epidérmicas, células hematopoiéticas, células epiteliais germinativas, células endoteliais e aquelas do trato gastrointestinal (Christensen, 2014).

A lei da radiosensibilidade estabelece que células imaturas e indiferenciadas, devido à sua alta taxa de divisão, são mais radiosensíveis em comparação às células já diferenciadas. No entanto, os linfócitos representam uma exceção a essa regra, pois, embora sejam células maduras e diferenciadas, exibem elevada radiosensibilidade (Vogin. G.; Foray N. 2012).

Os linfócitos são células que atuam no sistema imunológico contra patógenos e invasores através da imunidade inata e adaptativa, como exemplificado na figura 12, sendo classificados em linfócitos T, B e NK (Cruvinel *et al.*, 2010). Os linfócitos B estão ligados a imunidade humoral mediada por anticorpos, enquanto os linfócitos T estão conectados à imunidade celular que controla os microrganismos intracelulares e as células NK conectam esses dois mecanismos de interação imunológica (Abbas, 2013).

Os linfócitos são amplamente utilizados como biomarcadores na dosimetria biológica e na radioproteção devido às suas características bem definidas, elevada radiosensibilidade e facilidade de obtenção por meio da coleta de sangue periférico. Além disso, por permanecerem na fase G₀ do ciclo celular, os linfócitos permitem a análise de alterações induzidas durante seu ciclo celular por meio de estimulação *in vitro* com fitohemaglutinina (PHA) (IAEA, 2011).

Figura 12. Atuação dos linfócitos no sistema imunológico.



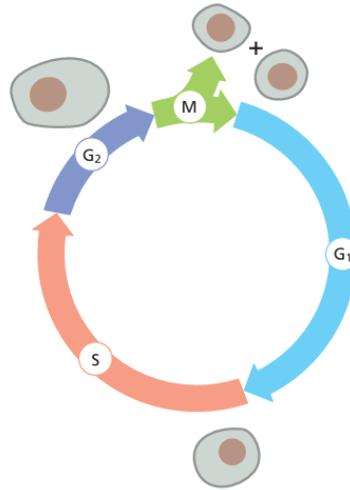
(Fonte: Abbas,2013)

2.7 CICLO CELULAR

O ciclo celular compreende uma série de eventos coordenados que resultam na divisão de uma célula original (mãe) em duas células recém-geradas (filhas). É um mecanismo universalmente compartilhado por todas as células eucarióticas (Uzbekov R.; Prigent C.,2022). Esse ciclo é dividido em fase G1, S (síntese de DNA), G2 e M (fase mitótica) (Gao *et al.*,2019) (Figura 13).

Nos eucariontes, a replicação do DNA ocorre na fase S, e a segregação cromossômica ocorre na mitose ou fase M. Duas fases Gap separam a fase S e a mitose, conhecidas como G1 e G2. Estes não são períodos de inatividade, mas sim períodos em que as células ganham massa, integram sinais de crescimento, organizam um genoma replicado e se preparam para a segregação cromossômica (Barnum *et al.*,2014).

Figura 13. Ilustração simplificada do ciclo celular.



(Fonte: Alberts, B *et al*, 2017)

A mitose é dividida em quatro fases principais:

I) Prófase: a cromatina começa a se condensar, formando os cromossomos visíveis;

II) Metáfase: os cromossomos atingem seu grau máximo de condensação e se alinham na placa equatorial da célula;

III) Anáfase: as cromátides-irmãs se separam e migram para os polos opostos da célula;

IV) Telófase: os cromossomos começam a se descondensar, e ocorre a formação de novos envoltórios nucleares, seguida pela citocinese.

Ao final desse processo, a divisão do citoplasma gera duas células-filhas geneticamente idênticas à célula-mãe, que entram na fase G₀, onde permanecem até que uma nova divisão seja necessária ou até que se diferenciem (Cooper; Hausman, 2007).

A robustez e reprodutibilidade do ciclo celular são garantidas por mecanismos de controle de qualidade chamados pontos de verificação, que somente quando satisfeitos permitem que o ciclo celular progrida (Uzbekov R.; Prigent C., 2022).

Para prevenir a progressão contínua do ciclo celular na presença de lesões de DNA não reparadas por agentes genotóxicos, como, por exemplo, as radiações

ionizantes, pontos de verificação ocorrem para interromper a progressão do ciclo celular até que as lesões de DNA sejam resolvidas. O ponto de verificação G1 impede que células danificadas iniciem a replicação do DNA. Quando surgem quebras de DNA durante a fase S, o ponto de verificação intra-S é ativado, o que regula negativamente a atividade do CDK (quinases dependente de ciclinas), limitando assim a replicação geral. Posteriormente, o ponto de verificação G2/M impede que as células entrem na mitose com lesões de DNA (Audrey *et al.*,2022).

Entretanto, mesmo com todos estes pontos de verificação, algumas lesões não reparadas são transmitidas às células filhas que levam consigo as consequentes alterações.

2.8 DOSIMETRIA BIOLÓGICA

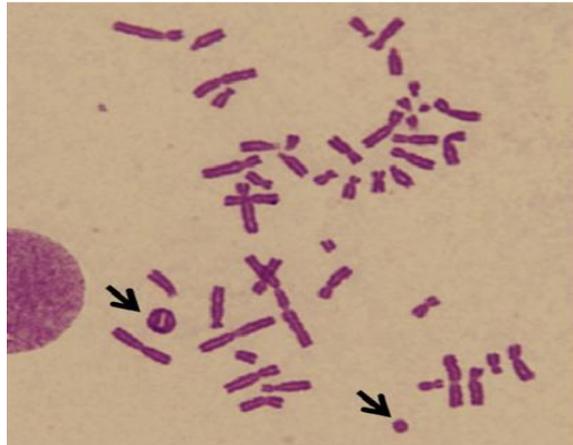
A dosimetria biológica baseia-se na investigação de efeitos biológicos induzidos pela radiação ionizante com o objetivo de relacioná-los à dose absorvida, utilizando biomarcadores como ferramentas-chave. Essa abordagem permite a reconstrução da dose individual em situações em que a exposição à radiação não está claramente definida ou apresenta inconsistências, sendo especialmente útil quando a medição direta da radiação ionizante não é viável ou já não pode ser realizada (Amaral,2002; Kulka *et al.*,2018).

A citogenética é a abordagem mais indicada em dosimetria biológica para avaliar uma dose absorvida devido à exposição à radiação ionizante. Técnicas mais modernas surgiram recentemente, mas nenhuma é tão específica e sensível quanto às análises citogenéticas, como, por exemplo, a técnica convencional de cromossomos dicêntricos e o ensaio de micronúcleo por bloqueio de citocinese (Ricoul *et al.*,2017).

A análise citogenética de alterações instáveis é realizada pela quantificação e observação de cromossomos dicêntricos, anéis cromossômicos e fragmentos acêntricos (Figura 14). Os cromossomos dicêntricos (Figura 15) são alterações instáveis que resultam de quebras nos filamentos de DNA ou de reparos inadequados durante a replicação do material genético. Eles são específicos para radiação ionizante, independentemente de se tratar de uma exposição total ou parcial, e podem ser utilizados para estimar doses absorvidas desconhecidas em emergências, sendo detectáveis a partir de 0,1 Gy. Por sua alta especificidade e confiabilidade, os

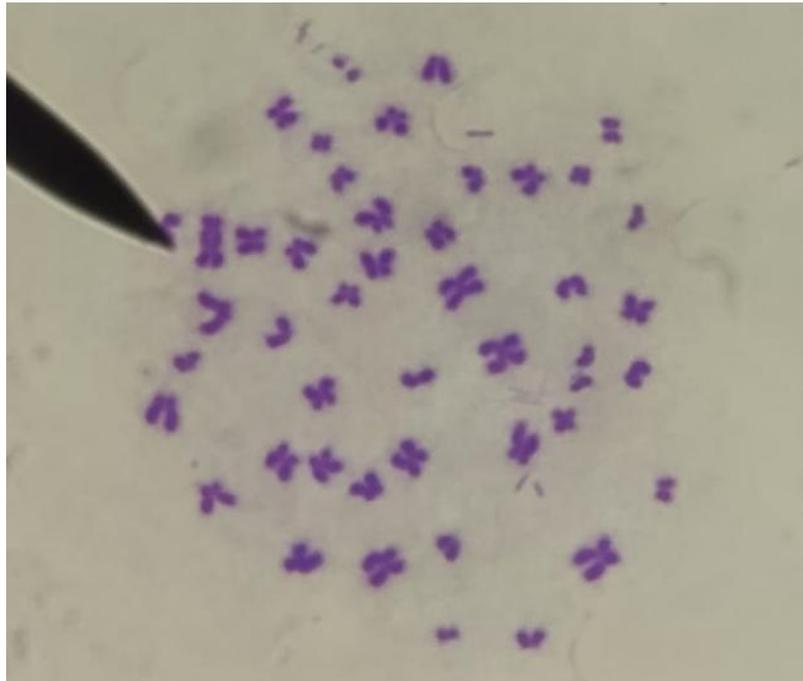
cromossomos dicêntricos são considerados o padrão ouro na dosimetria biológica. (IAEA,2011).

Figura 14. Imagem de anéis cromossômicos e seu fragmento acêntrico.



(Fonte: IAEA,2011).

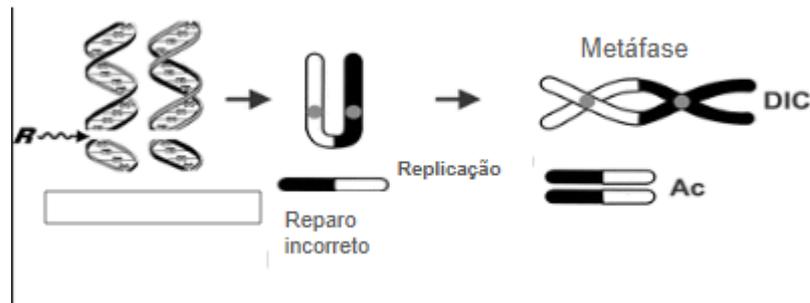
Figura 15. Seta indicando o cromossomo dicêntrico. (Aumento 1000x)



(Fonte: do Autor,2024)

Os dicêntricos são translocações assimétricas que surgem pela troca entre dois ou mais cromossomos devido a uma quebra produzida no início da interfase, sendo replicada durante a síntese do DNA (Figura 16) (Cunha, 2015). As análises dessas alterações cromossômicas são traduzidas em dose absorvida por meio de uma curva dose-resposta estabelecida para cada laboratório, a fim de estimar a dose real que o indivíduo foi previamente exposto (IAEA, 2011).

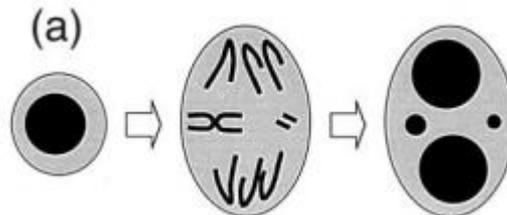
Figura 16. Ilustração da formação do cromossomo dicêntrico.



Disponível em: <https://remm.hhs.gov/aboutdicentric.htm> Acesso em: 19/01/2025.

Outro marcador citogenético importante são os micronúcleos (MN), que se formam a partir de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que, durante a anáfase, não são incluídos nos núcleos das células-filhas (Figura 17).

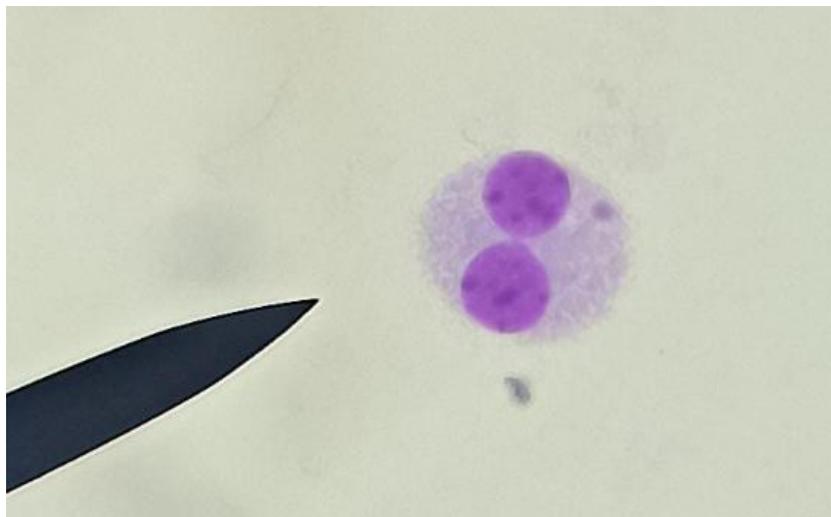
Figura 17. Ilustração da formação de micronúcleo.



(Fonte: Adaptado de Fenech, 2000).

Os micronúcleos podem ser observados em células binucleadas como estruturas esféricas, pequenas, separadas e distintas no citoplasma das células-filhas. Eles apresentam morfologia e coloração semelhantes às dos núcleos principais, como observado na figura 18 (Ricoul *et al.*, 2017; IAEA, 2011).

Figura 18. Célula Binucleada com presença de micronúcleo. (Aumento 400x).



(Fonte: Acervo do Laboratório de Dosimetria Biológica CRCN/CNEN, 2024).

Os MN são amplamente utilizados como marcadores para o monitoramento ambiental de agentes genotóxicos, incluindo radiações ionizantes, devido à sua sensibilidade na detecção de diferentes doses de radiação. No entanto, essa técnica apresenta menor especificidade em comparação à análise de cromossomos dicêntricos, uma vez que fatores como idade, sexo, estilo de vida e ambiente em que o indivíduo vive podem influenciar o surgimento dos micronúcleos. (Fenech,2000).

Embora as técnicas citogenéticas apresentem alta sensibilidade (CBMN) e alta especificidade (Ensaio de Dicêntrico) para avaliar a dose absorvida, esses métodos são trabalhosos, exigindo tempos de cultura de linfócitos de 72 e 48 horas, respectivamente, além de demandarem extensa análise microscópica. Nesse contexto, laboratórios de dosimetria biológica e radioproteção buscam alternativas para diminuir o tempo de análise laboratorial em busca de respostas eficazes e coerentes com a clínica que o paciente exposto venha possuir.

Em situações de emergência radiológica e/ou nuclear, há a necessidade de respostas laboratoriais rápidas e eficazes para fornecer suporte à equipe médica, reduzindo a incerteza clínica, auxiliando no tratamento adequado do indivíduo exposto e desafogando os sistemas de saúde em emergências de larga escala. Nesse contexto, foi desenvolvido um protocolo combinado que integra as técnicas mencionadas em uma única cultura celular, permitindo a análise simultânea de células binucleadas para a detecção de micronúcleos em células binucleadas e de metáfases para a observação de cromossomos dicêntricos (Testa *et al.*,2019; IAEA,2011).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

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

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a viabilidade da técnica do protocolo combinado implementado no LDB/CRCN-NE em um diferente tempo de cultivo (58h) dos tempos convencionais;
- Analisar o comportamento do protocolo combinado em doses absorvidas de 2Gy e 3Gy;
- Estimar a dose absorvida a partir do ensaio combinado de técnicas citogenéticas com a curva de calibração dose resposta do Laboratório de Dosimetria Biológica do CRCN (LDB/CRCN-NE)
- Verificar a eficiência do protocolo combinado como um método de triagem em casos de acidentes radiológicos e/ou nucleares em larga escala.

4 METODOLOGIA

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Dosimetria Biológica do Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN/NE) e faz parte de um projeto aprovado pelo Comitê de Ética que envolve pesquisas com seres humanos da Universidade Federal de Pernambuco sob o número de CAAE 69131323.4.0000.5208 e do parecer consubstanciado 6.250.761 (**ANEXO A**).

4.1 SELEÇÃO DE DOADORES E COLETA DE AMOSTRAS

Foi selecionado uma voluntária saudável, do sexo feminino, 54 anos de idade, que atendia os critérios de inclusão e exclusão estabelecidos (GAJENDIRAN *et al.*,2001) e que foi entrevistada por meio de anamnese. Assim, foi verificado se a voluntária foi exposta à radiação ionizante em condição terapêutica e/ou diagnóstica nos últimos 6 meses, se consumiu drogas ou é fumante. Antes da coleta sanguínea, a voluntária assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**ANEXO B**).

Foram coletadas 6 amostras de sangue periférico em tubos vacutainer de heparina com um volume de 4ml cada para seguir para a fase de irradiação. (IAEA,2011).

4.1 IRRADIAÇÃO DE AMOSTRAS

Foram separadas 2 amostras indicadas como controle (não irradiada) mantida em temperatura ambiente e 4 amostras foram preparadas para serem irradiadas.

A irradiação foi realizada em dois momentos no Departamento de Energia Nuclear da UFPE, em uma fonte de Co-60, irradiador Gammacel 220 (temperatura da sala ~22°C), com doses absorvidas de 2Gy e 3Gy a uma taxa de dose 0,911 kGy/h na primeira irradiação, com tempos de exposição de 3,387s e 7,339s, respectivamente, e na segunda irradiação uma taxa de dose 0,871 kGy/h com tempos de 3,754s e 7,889s para cada dose absorvida.

4.2 CULTIVO CELULAR

As preparações citológicas para as análises cromossômicas foram obtidas a partir da cultura de linfócitos. Para a cultura de linfócitos, foi adicionado 0,5ml de sangue total nos frascos de cultura contendo 4ml de meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado

com 1 ml de soro bovino fetal (Biological Industries), 0,2 ml de fitohemaglutinina (Biological Industries) e 0,06 ml de antibiótico (estreptomina). Em seguida, os frascos foram mantidos na estufa a 37°C e foi adicionado 0,1 ml de citocalasina B (Cyt-B) (Sigma) após 24 horas. No tempo de 55h de início da cultura foi adicionada a Colchicina (Biological Industries). Ao completar as 58 horas, o material foi centrifugado por 6 minutos a 180 g, o sobrenadante foi desprezado e adicionado 8 ml de KCl previamente aquecido a 37°C, para causar o choque hipotônico. Durante a hipotonia, os tubos foram colocados na estufa a 37°C por 20 minutos. Em seguida, os tubos foram novamente centrifugados por 6 minutos a 180 g, o sobrenadante foi retirado e adicionado o fixador metanol:ácido acético (3:1) até completar 8 ml. Para a preparação de lâminas, foram realizadas tantas centrifugações e trocas de fixador necessárias para que o conteúdo da cultura estivesse totalmente transparente e límpido. No protocolo combinado, foi feito um tempo intermediário entre os protocolos padronizados (IAEA,2011) para as técnicas de dicêntrico e Micronúcleo seguindo o protocolo de Testa, 2019.

4.3 OBTENÇÃO DE LÂMINAS

A obtenção das lâminas foi realizada depois do processo de fixação a partir da precipitação das células ressuspensas em 0,5-0,75 ml da solução fixadora. Com isso, o precipitado é gotejado em dois pontos da lâmina, previamente em uma camada de água sob a lâmina a partir de uma altura de aproximadamente de 1 m para facilitar o espalhamento dos cromossomos e deixadas para secar por 24h. Em seguida, as lâminas foram coradas com corante Giemsa 5% por 7 minutos.

4.4 ANÁLISE MICROSCÓPICA

As observações citogenéticas foram realizadas no microscópio óptico (Leica DM500). As lâminas foram analisadas na procura de metáfases, células binucleadas e micronúcleos viáveis a partir de critérios de validação para estimar dose absorvida. As metáfases são validadas a partir da contagem de 46 cromossomos e com centrômeros visíveis como exemplificado na figura 19 (IAEA,2011).

Figura 19. Metáfase validada a partir do protocolo da Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA,2011).

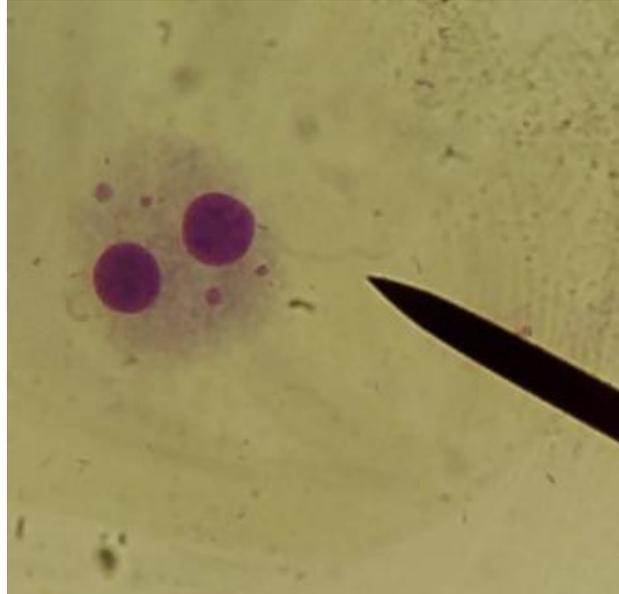


(Fonte: Do Autor,2024.)

As Células Binucleadas (BN) também seguem critérios de validação para triagem e estimativa de dose na análise dos micronúcleos. Os dois núcleos de uma célula BN devem ter membranas nucleares intactas e estar situados dentro do mesmo limite citoplasmático; devem ser aproximadamente iguais em tamanho sem sobreposição e distinguível; devem ter padrão e intensidade de coloração iguais; podem não estar conectados ou podem estar ligados por uma ou mais pontes nucleoplasmáticas finas que não ultrapassem $1/4$ do diâmetro nuclear.

Os micronúcleos (MN) também seguem regras de validação, tais como: o diâmetro do MN em linfócitos humanos geralmente varia entre $1/16$ e $1/3$ do diâmetro médio dos núcleos principais; os MN são não refráteis e, portanto, podem ser facilmente distinguidos de artefatos como manchas de partículas; não estão ligados ou conectados aos núcleos principais, sem sobreposição e com limites bem delimitados; geralmente têm a mesma intensidade de coloração que os núcleos principais, mas ocasionalmente a coloração pode ser mais intensa (IAEA,2011). (Figura 20).

Figura 20. Célula Binucleada (BN) com presença de 4 micronúcleos (MN) validada a partir do protocolo da Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA,2011).



(Fonte: Do Autor,2024.)

No protocolo combinado essa análise é feita simultaneamente nas lâminas a partir da ordem de surgimento de cada célula.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos a partir da leitura das lâminas do protocolo combinado (dicêntrico mais micronúcleo) foram submetidos a testes estatísticos para a avaliação quanto à conformidade ao modelo de Poisson, sendo utilizados o índice de dispersão, variância e o teste u de Papworth para verificar se as alterações celulares seguem esse modelo (IAEA, 2011).

As alterações citogenéticas foram observadas através da frequência do surgimento de micronúcleo e alterações cromossômicas por célula.

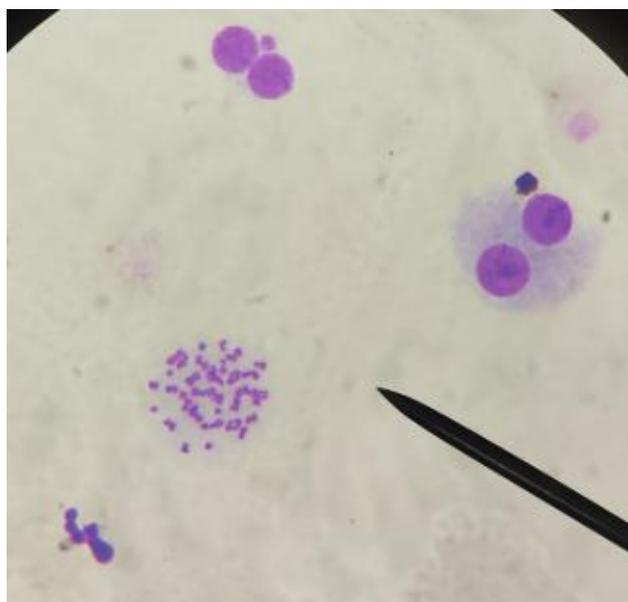
As estimativas de dose absorvida foram feitas utilizando o ¹coeficiente das curvas de dose-resposta para radiação gama implementadas no Laboratório de Dosimetria Biológica do CRCN-NE e com o auxílio do programa Dose Estimate (Ainsbury; Lloyd, 2010).

¹ Coeficientes da curva de calibração: $C (0.0048) \pm 0.0009$ $\alpha (0.0637) \pm 0.0045$ $\beta (0.0141) \pm 0.0015$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi realizada a análise simultânea das técnicas de micronúcleo e dicêntrico em um modelo combinado como mostrado na Figura 21. Segundo a Agência Internacional de Energia Atômica, o Ensaio de Micronúcleo por Bloqueio de Citocinese apresenta maior sensibilidade para a estimativa de dose e é o mais indicado para a triagem em situações de emergência por proporcionar uma análise mais rápida (IAEA,2011).

Figura 21. Análise simultânea de metáfase e célula binucleada no modelo combinado (Aumento 400x).



Fonte: do Autor,2024.

Foram analisadas, no total, 3323 células binucleadas, sendo 2168 das amostras controles e 1155 das amostras irradiadas (Tabela 2).

TABELA 2. Alterações em células binucleadas a partir da distribuição celular

DOSE	BN	1MN	2MN	3MN	TOTAL MN	Y	VAR	VAR/Y	u	Dose Estimada (Gy)
0Gy *	2168	14	1	0	16	0.007	0.008	1.119	4.034	0,040 ±0,245
2Gy	698	62	16	1	97	0.142	0.174	1.229	4.302	1,564 ± 0,292
3Gy	457	80	17	8	138	0.302	0.391	1.295	4.472	2,858± 0,342

Legenda: BN= Célula Binucleada; MN= Micronúcleo; Y= Frequência de micronúcleo; VAR= variância; VAR/Y= variância sobre frequência; u= teste u; *= controle

É possível verificar que no controle (amostra não irradiada) a quantidade de

micronúcleos (MN) encontra-se dentro do esperado em uma frequência de *background* (40 Micronúcleos por 1000 Células Binucleadas) conforme descrito na literatura (IAEA,2011), fatores como idade, sexo e estilo de vida pode acometer o surgimento desses micronúcleos independentemente de exposição à radiação ionizante.

As amostras irradiadas apresentaram, na tabela 2, um aumento da frequência de micronúcleos, com a presença de até 3 micronúcleo por célula, com o aumento da dose absorvida, apresentando uma relação de dependência do rendimento de MN com a dose.

Foi avaliada se a distribuição de MN nas células se ajusta a uma distribuição de Poisson por meio do índice de dispersão e o teste u de Papworth. Para uma distribuição de Poisson perfeita, o índice de dispersão tem que ser igual a 1, sendo o teste u uma unidade nesse índice. No intervalo de confiança de 95%, os valores de u podem variar entre $\pm 1,96$. Valores de u acima de 1,96 indicam sobredispersão significativa, enquanto valores abaixo de 1,96 indicam subdispersão significativa (IAEA,2011).

Como observado na Tabela 2, há uma sobredispersão em todas as doses, sendo esse resultado esperado como demonstrado na literatura (Antunes *et al.*,2014; Thierens *et al.*,2009), uma vez que, os micronúcleos podem ter fatores adicionais que possam causar seu aparecimento.

A dose de 3Gy foi estimada dentro do nível de confiança, como mostrada na Tabela 2. Na estimativa de dose de 2Gy em seu limite superior mostrou-se menor do que o irradiado (Tabela 2), isso pode ser atribuído possivelmente à incerteza da dose irradiada para esse valor, pois a fonte de Co-60 utilizada apresenta uma alta taxa de dose absorvida na faixa de segundos e essa dose atualmente é a mínima realizada. Em um contexto de emergência radiológica e/ou nuclear é necessário realizar uma triagem para distinguir as pessoas expostas das que não foram expostas e, assim, a equipe laboratorial a partir das células analisadas repassar para a equipe médica a estimativa da dose para que a melhor conduta seja tomada. Para isso, nesses cenários de emergências, o número de células mínimas que garante uma estimativa acima de 1 Gy nesses casos são de 200 células binucleadas de acordo com o que é relatado na literatura (IAEA,2011; McNamee *et al.*,2009). É observado na Tabela 2 que em todas as doses estudadas o número de células binucleadas é maior que o dobro necessário para realizar a triagem das pessoas potencialmente expostas.

Dessa forma, o modelo de protocolo combinado, mostra-se eficiente para a triagem em situações de exposições acidentais. Logo, pode ser aplicado e separar o grupo de prioridades, como é referido na Tabela 3 (IAEA,2011).

TABELA 3. Grupo de prioridades versus dose em situações de emergência.

GRUPO DE PRIORIDADE	DOSES (Gy)
I	1
II	2
III	2-4
IV	4-6
V	>6

Fonte: Adaptado de IAEA,2011.

Na técnica de dicêntricos, na análise de metáfases válidas foi observado um rendimento muito abaixo do esperado nesta técnica nas doses estudadas, conforme observa-se na Tabela 4.

TABELA 4. Análise de metáfases neste estudo.

Dose (Gy)	M1	M2	DIC	ANEL
0	41	3	0	0
2	3	2	0	0
3	2	0	0	2

Legenda: M1= primeira metáfase; M2= segunda metáfase; DIC= dicêntrico.

De acordo com a Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA,2011) são necessários de 500 metáfases para se estimar uma dose absorvida alta e, em casos de emergências, pode ser estimada, a princípio, a partir de 50 metáfases ou 30 dicêntricos dentre as células analisadas.

Durante a análise microscópica, foram observadas diversas metáfases inválidas com sobreposição e com cromossomos insuficientes (menos de 46 cromossomos), dificultando a análise das alterações cromossômicas e, posteriormente, uma triagem e estimativa de dose.

Segundo Patrono *et al.* (2021), no protocolo combinado a quantidade de

metáfases inválidas e o baixo rendimento dessas células podem ser explicadas devido à falta de adequação de alguns parâmetros nesta metodologia para alcançar maior proliferação celular e melhorar a visualização dos cromossomos. Entre as modificações necessárias sugeridas estão: I) aumentar o tempo de incubação com a colchicina 0,1 µg/ml para, no mínimo, 4 horas; II) incubar por 30 minutos com KCl para o choque hipotônico; III) utilizar apenas 1 ml da solução de fixação ácido acético:metanol (3:1).

A metodologia aplicada neste trabalho, baseado em Testa *et al* (2019), utiliza um tempo intermediário (58h) entre os tempos de cultura comuns para cada técnica isolada (Técnica de Dicêntrico - 48h; Ensaio de Micronúcleo por Bloqueio de Citocinese - 72h) (IAEA,2011). No entanto, nota-se na literatura que com doses inferiores das que foram estudadas neste trabalho e com modificação do tempo de cultura dentro dessa técnica combinada apresenta uma diferença significativa no número de metáfases e alterações cromossômicas, como evidenciado na Tabela 5.

Tabela 5. Análise de metáfases no protocolo combinado em diferentes estudos.

Dose (Gy)	Testa et al., 2019 (58h)	Torreão, 2022 (48h)	Torreão, 2022 (72h)
0	M1: 500, M2: *, DIC: 0	M1: 95, M2: 0, DIC: 0	M1: 98, M2: 1, DIC: 0
0,5	M1: 500, M2: *, DIC: 60	M1: 338, M2: 1, DIC: 9	M1: 140, M2: 2, DIC: 3
0,75	M1: 500, M2: *, DIC: 75	M1: 155, M2: 0, DIC: 5	M1: 83, M2: 2, DIC: 5

Legenda: M1= primeira metáfase; M2= segunda metáfase; DIC= dicêntrico; *= No estudo as M2 não foram contabilizadas

Percebe-se na Tabela 5 que o tempo intermediário de 58h se mostrou mais eficiente para o rendimento de células nessas doses apresentadas, enquanto o tempo de 48h e 72h aponta ser interessante como um possível modelo de triagem. Doses acima de 1 Gy dentro dessa técnica combinada apenas foi estudada neste trabalho e em Testa *et al.*,2019 (Tabela 6).

Tabela 6. Comparação do rendimento de metáfases e dicêntricos com doses > 1 Gy

Dose (Gy)	M1	DIC	Referência
2	200	33	Testa et al., 2019
2	3	0	Este trabalho

Legenda: M1= primeira metáfase; DIC= dicêntrico.

Na Tabela 6, observa-se uma redução no número de metáfases em comparação com a Tabela 5, referente ao estudo de Testa *et al.* (2019), e uma queda acentuada

no número de metáfases neste trabalho em relação à mesma dose utilizada no estudo citado. Essa diferença pode ser atribuída a fatores relacionados à adequação metodológica, conforme discutido anteriormente, e à variação nas técnicas de análise microscópica. Enquanto no trabalho de Testa *et al* (2019) utilizaram análise microscópica automatizada, este estudo e o de Torreão (2022) realizaram a análise manual com dois analisadores.

A análise automatizada consiste na detecção de metáfases por meio de programas de softwares e apresenta diferenças das manuais segundo estudos na literatura (H.Romm *et al.*,2013; Terri *et al.*, 2019; G. Gruel *et al.*,2013) por ser mais sensível em um tempo de análise mais curto, principalmente em situações emergenciais, do que a maneira tradicional, apesar da necessidade de um analista para validar as células encontradas pelos programas de computação. Essa diferença na metodologia da análise e validação das células pode interferir no rendimento das metáfases em diferentes estudos.

Esses fatores são exclusivos e podem ser adaptados a cada realidade do laboratório de dosimetria biológica e Radiobiologia como recomendado pela Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA,2011). Sendo assim, são recomendados estudos interlaboratoriais para se definir qual melhor abordagem a ser seguida para a análise da técnica.

6 CONCLUSÃO

- O Protocolo Combinado em situações de emergência radiológica e/ou nuclear mostra-se eficiente para triagem de indivíduos potencialmente expostos com uma estimativa de dose dentro do nível de confiança para a dose de 3Gy;
- O Protocolo combinado garante uma redução no tempo de análise com redução de gastos laboratoriais e mostra-se com potencial uso em situações de acidentes em larga escala;
- A adequação metodológica é necessária para obter o maior número de células metafásicas e posteriormente ser usada na triagem e estimativa das doses estudadas.

6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS PARA O PROJETO

- Adequar a metodologia realizando modificações na metodologia, tais como: aumento no tempo de incubação com a colchicina, mudança da quantidade de solução de fixação, entre outras, buscando obter o maior número de células metafásicas;
- Realizar novos experimentos com diferentes doses absorvidas (baixas e altas doses) com outros indivíduos de diferentes, idade, sexo, estilo de vida diferentes para validação da técnica;
- Realizar estudos interlaboratoriais para indicar a melhor abordagem que alcance o melhor resultado com o objetivo de implementação da técnica em outros laboratórios de dosimetria biológica.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2017.
- AGGARWAL, L. Biological effects of ionizing radiation. *Shodh Prerak*, v. 4, n. 1, p. 342-348, 2014.
- AINSBURY, E. A.; LLOYD, D. C. Dose estimation software for radiation biodosimetry. *Health Physics*, v. 98, n. 2, p. 290–295, 2010.
- AMARAL, A. Trends in biological dosimetry: an overview. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Disponível em <<https://doi.org/10.1590/S1516-89132002000500017>>. 45(spe), 119–124. 2002.
- AUDREY A. DE HAAN L, VAN VUGT, M. A. T. M., DE BOER, H. R. Processing DNA lesions during mitosis to prevent genomic instability. *Biochem Soc Trans.*31;50(4):1105-1118. Disponível em: doi: 10.1042/BST20220049. PMID: 36040211; PMCID: PMC9444068. Agosto,2022.
- BARNUM, K. J.; O'CONNELL, M. J. Cell cycle regulation by checkpoints. In: *Methods in Molecular Biology*, 1170: 29-40. Disponível em: doi: 10.1007/978-1-4939-0888-2_2. 2014
- BERA, C. M.; MENCK, C. F. M.; DI MASCIO, P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. *Química Nova*. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000600032>. v. 29, n. 6, p. 1340-1344, 2006.
- BERA, Carolina Maria. Estudos de reparo de DNA por excisão de nucleotídeos em lesões oxidativas em células de mamíferos. **Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo (USP), Instituto de Ciências Biomédicas (ICB/SDI)**, São Paulo.2008
- BOFF, Cleber Adelar; BASTOS, Rodrigo Oliveira; MELQUIADES, Fábio Luiz. Práticas experimentais no ensino de física nuclear utilizando material de baixo custo. *Caderno Brasileiro de Ensino de Física*, v. 34, n. 1, p. 236-247, 2017.
- BUSTAMANTE, M. C. A descoberta dos raios cósmicos ou o problema da ionização do ar atmosférico. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1806-11172013000200030> , v. 35, n. 2, p. 2603, 2013
- CARDOSO, Eliezer de Moura. (org). **Apostila Educativa Radioatividade**. Comissão Nacional de Energia Nuclear - CNEN. Disponível em: <https://www.gov.br/cnen/pt-br/aceso-rapido/centro-de-informacoes-nucleares/materiais-de-apoio-ao-ensino-e-pesquisa> Acesso em: 15/01/2025.
- CASTRO, Robson Costa de. Cálculo de dose equivalente em órgão de pacientes devido a fotonêutrons gerados em aceleradores lineares clínicos. **Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Nuclear, UFRJ**, Rio de Janeiro, 85 f 2005.
- 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, 2014.
- CRUVINEL, W. de M.; MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S. de; SILVA, N. P. da; ANDRADE, L. E. C. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Revista Brasileira de Reumatologia*, Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0482-50042010000400008> v. 50, n. 4, p. 434-447, 2010.
- CUNHA, Kelly de Paula. **Aplicação de Mapas Auto-Organizáveis na Classificação de Aberrações Cromossômicas Utilizando Imagens de Cromossomos Humanos Submetidos à Radiação Ionizante**. 2015. Dissertação (Mestrado) - Tecnologia Nuclear, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

DIETZE, G.; MENZEL, H. G. Dose quantities in radiation protection and their limitations. *Radiat Prot Dosimetry*, Disponível em: doi: 10.1093/rpd/nch097. PMID: 15623879. v. 112, n. 4, p. 457-463, 2004.

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

G. Gruel, E. Gregoire, S. Lecas, C. Martin, S. Roch-Lefevre, A. Vaurijoux, P. Voisin, P. Voisin, J.F. Barquinero, Biological dosimetry by automated dicentric scoring in a simulated emergency, *Radiation research*, 179,557-569,2013.

GAJENDIRAN, Natarajan et al. Neutron-induced Adaptive Response Studied in Go Human Lymphocytes Using the Comet Assay. *Journal of Radiation Research*, v. 42, n. 1, p. 91–101, 2001.

GAO, S. W.; LIU, F. Novel insights into cell cycle regulation of cell fate determination. *J Zhejiang Univ Sci B*, Disponível em: doi: 10.1631/jzus.B1900197. v. 20, n. 6, p. 467-475, 2019

H. ROMM, E. AINSBURY, S. BARNARD, L. BARRIOS, J.F. BARQUINERO, C. BEINKE, M. DEPERAS, E. GREGOIRE, A. KOIVISTOINEN, C. LINDHOLM, J. MOQUET, U. OESTREICHER, R. PUIG, K. ROTHKAMM, S. SOMMER, H. THIERENS, V. VANDERSICKEL, A. VRAL, A. WOJCIK, Automatic scoring of dicentric chromosomes as a tool in large scale radiation accidents, *Mutation research*, 756, 174-183, 2013.

IFUSP, Instituto de Física da USP. Livro ABC da física nuclear. Disponível em: <https://portal.if.usp.br/fnc/pt-br/p%C3%A1gina-de-livro/raios-c%C3%B3smicos>. Acesso em: 04 jan. 2025.

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

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Ambiente, trabalho e câncer: aspectos epidemiológicos, toxicológicos e regulatórios**. Rio de Janeiro: INCA, 2021.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Diretrizes para a vigilância do câncer relacionado ao trabalho**. Rio de Janeiro: INCA; 2012.

JACKSON, S. P.; BARTEK, J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, v. 461, n. 7267, p. 1071–1078, 2009.

KULKA, U.; WOJCIK, A.; DI GIORGIO, M.; WILKINS, R.; SUTO, Y.; JANG, S.; QUING-JIE, L.; JIAXIANG, L.; AINSBURY, E.; WODA, C.; ROY, L.; LI, C.; LLOYD, D.; CARR, Z. Biodosimetry and biodosimetry networks for managing radiation emergency. *Radiat Prot Dosimetry*, Disponível em: . doi: 10.1093/rpd/ncy137. PMID: 30423161. v. 182, n. 1, p. 128-138, 2018.

LIMA, R. da S.; AFONSO, J. C.; PIMENTEL, L. C. F. Raios-x: fascinação, medo e ciência. *Química Nova*. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000100044>. v. 32, n. 1, p. 263-270, 2009.

LIU, L.; LIANG, Z.; MA, S.; LI, L.; LIU, X. Radioprotective countermeasures for radiation injury (Review). *Mol Med Rep*. Disponível em: doi: 10.3892/mmr.2023.12953. Epub 2023 Feb 17. PMID: 36799170; PMCID: PMC9926870., v. 27, n. 3, p. 66, 2023

McNAMEE, J. P.; FLEGAL, F. N.; GREENE, H. B.; MARRO, L.; WILKINS, R. C. Validation of the cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay for use as a triage biological dosimetry tool. *Radiat Protect Dosim*, v. 135, p. 232–242, 2009.

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

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

NAVARRO, M. V. T.; LEITE, H. J. D.; ALEXANDRINO, J. da C.; COSTA, E. A. Controle de riscos à saúde em radiodiagnóstico: uma perspectiva histórica. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0104-59702008000400009>. v. 15, n. 4, p. 1039–1047, 2008.

OKUNO, Emico. Efeitos biológicos das radiações ionizantes: acidente radiológico de Goiânia. **Estudos Avançados**, v. 27, n. 77, p. 185-200, 2013.

PATRONO, Clarice; PALMA, Valentina; KENZHINA, Laura. NATO Science for Peace and Security (SPS) project “BioPhyMeTRE”: “Novel biological and physical methods for triage in radiological and nuclear (R/N) emergencies”. **Il Nuovo Cimento D**, v. 43, p. 153, 2021.

RICOUL, M.; GNANA-SEKARAN, T.; PIQUERET-STEPHAN, L.; SABATIER, L. Cytogenetics for Biological Dosimetry. In: **Methods in Molecular Biology**, Disponível em: . doi: 10.1007/978-1-4939-6703-2_17.1541: 189-208, 2017

RODRIGUES, Sane Simone Oliveira Fonseca. Estudo das distribuições de LET, QF e RBE para feixes de fótons de baixa energia em meios biológicos usando o método de Monte Carlo. 2014. 91 f. **Tese (Doutorado em Biociências Nucleares; Ecologia) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, 2014.

SPITZ, D. R.; AZZAM, E. I.; LI, J. J.; GIUS, D. Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: a unifying concept in stress response biology. **Cancer Metastasis Rev.**, Disponível em: doi: 10.1023/B:CANC.0000031769.14728.bc. v. 23, p. 311-322, 2004.

TAUHATA, Luiz et al. Radioproteção e Dosimetria: Fundamentos. Rio de Janeiro: IRD/CNEN, 2003.

TERRA, L. et al. **Radioproteção e Dosimetria: Fundamentos**. 9ª revisão, novembro/2013. Rio de Janeiro: IRD/CNEN, 345 p.

TERRI L. RYAN, MARIA B. ESCALONA, TAMMY L. SMITH, JOSEPH ALBANESE, CAROL J. IDDINS, ADAYABALAM S. BALAJEE, Optimization and validation of automated dicentric chromosome analysis for radiological/nuclear triage applications, **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.503087> 503087, ISSN 1383-5718. Volume 847, 2019.

TESTA, A.; PALMA, V.; PATRONO, C. A novel biological dosimetry assay as a potential tool for triage dose assessment in case of large-scale radiological emergency. **Radiation Protection Dosimetry**, p. 1-3, 2019.

TORREÃO, Akíria Ohana. Desenvolvimento do protocolo combinado no CRCN-NE para triagem e estimativa de dose absorvida. 2022. **Trabalho de Conclusão de Curso (Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife**, 2022.

UZBEKOV R, PRIGENT C. A Journey through Time on the Discovery of Cell Cycle Regulation. *Cells*. Disponível em: doi: 10.3390/cells11040704. PMID: 35203358; PMCID: PMC88703402022.Feb 17;11(4):704..

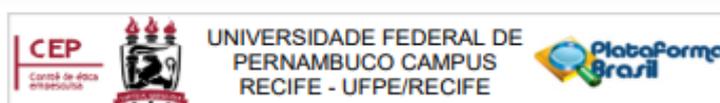
VOGIN, G.; FORAY, N. The law of Bergonié and Tribondeau: a nice formula for a first approximation. **International Journal of Radiation Biology**, v. 89, n. 1, p. 2-8, 2013.

YOSHIMURA, E. M. Física das Radiações: interação da radiação com a matéria. **Revista Brasileira de Física Médica**, v. 3, n. 1, p. 57-67, 2009.

ZANZONICO, P.; DAUER, L.; STRAUSS, H. W. Radiobiology in cardiovascular imaging. **JACC Cardiovasc Imaging**, v. 9, n. 12, p. 1446-1461, 2016.

ANEXOS

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS DA UFPE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IMPLANTAÇÃO DO PROTOCOLO COMBINADO NO CRCN-NE PARA TRIAGEM E ESTIMATIVA DE DOSE ABSORVIDA EM CASOS DE ACIDENTES RADIOLÓGICOS

Pesquisador: Fabiana Farias de Lima Guimarães

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 2

CAAE: 69131323.4.0000.5208

Instituição Proponente: COMISSAO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR

Patrocinador Principal: COMISSAO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR

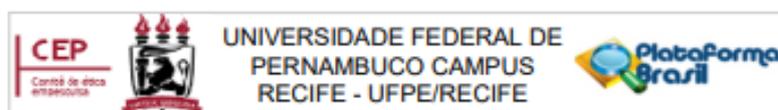
DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.250.761

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de pesquisa não ligado diretamente a um programa de pós-graduação, que investiga os efeitos biológicos das radiações ionizantes, especificamente a formação de micronúcleos e alterações cromossômicas em células sanguíneas. O projeto é composto por Pesquisadora Responsável 1 (Dra. Fabiana Farias de Lima Guimarães), Pesquisadora Responsável 2 (Dra. Mariana Esposito Mendes), Assistente de Pesquisa (Suy Ferreira Hwang), Biomédica (bolsista) (Lais Melo da Silva), biomédico (bolsista) Gael Freires de Lima, bolsista IC (Caio Ferreira de Oliveira). Para a realização do projeto, a pesquisadora irá recrutar o sujeito da pesquisa que já frequenta o Campus Recife da UFPE e o CRCN. Serão 30 sujeitos de pesquisa, em que 10 terão amostras sanguíneas irradiadas com as doses de 0,25; 0,40; 0,55; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 5,0 Gy de raios-X e raios gama. Os outros 20 doadores cederão amostras para a validação da Curva. Os critérios de inclusão e exclusão envolvem voluntários que não tenham sido expostos à radiação terapêutica, raios X diagnóstico ou que não tenham consumido drogas ilícitas. Ficam excluídos do estudo, além dos menores de 18 anos, aqueles voluntários que não atenderem aos critérios de inclusão de cada fase (construção e validação). A pesquisadora e equipe pretendem, com isso, dotar o CRCN de uma curva de calibração para um protocolo combinado de alterações cromossômicas e micronúcleos, que permite identificar como triagem quem foi exposto de

Endereço: Av. das Engenheiras, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefona: (51)2126-8588 **Fax:** (51)2126-3163 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 6.258.761

maneira acidental ou ocupacional à radiação. Trata-se de um importante projeto para a segurança radiológica da população.

Objetivo da Pesquisa:

O projeto visa implementar um protocolo combinado das técnicas de alterações cromossômicas instáveis e de micronúcleos e estabelecer curvas de calibração dose-resposta após exposição a diferentes tipos de radiação ionizante, visando sua aplicação tanto em dosimetria biológica, bem como em outras atividades que envolvam a exposição à radiação.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos para os doadores voluntários foram apresentados, a citar: 1- risco de constrangimento com alguma pergunta do questionário; 2- risco da coleta sanguínea, a citar ardência e hematomas no local de coleta da punção venosa.

Para minimizar os riscos, foram relatados que em 1-, o questionário será realizado em ambiente privativo e individual, de maneira a minimizar quaisquer constrangimentos quanto às perguntas; e 2-, será disponibilizado gelo em caso de haver qualquer formação de hematomas durante a coleta.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa que envolve a coleta de amostras sanguíneas de doadores voluntários recrutados, para irradiações destas amostras e elaboração de curvas de calibração em dosimetria biológica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos anexados encontram-se em conformidade com as exigências do CEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

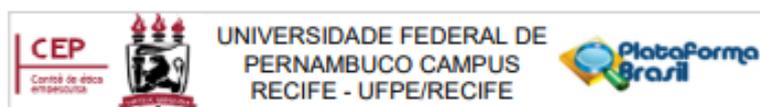
Todas as recomendações foram devidamente seguidas, item a item, e as modificações feitas foram destacadas nos respectivos trechos.

Apenas o questionamento a respeito do número de amostras de sangue por paciente foi respondido que será mantido, pois a pesquisadora justifica que cada amostra será irradiada com uma dose diferente de radiação. Portanto, o Protocolo está Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Conforme as instruções do Sistema CEP/CONEP, ao término desta pesquisa, o pesquisador tem o dever e a responsabilidade de garantir uma devolutiva acessível e compreensível acerca dos resultados encontrados por meio da coleta de dados a todos os voluntários que participaram deste estudo, uma vez que esses indivíduos têm o direito de tomar

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 Fax: (81)2126-3163 E-mail: cep@ufpe.br



Continuação do Parecer: 6.250.761

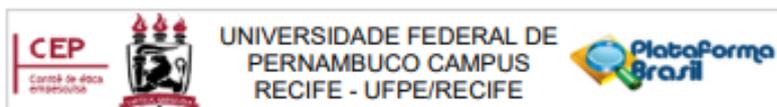
conhecimento sobre a aplicabilidade e o desfecho da pesquisa da qual participaram. Informamos que a aprovação definitiva do projeto só será dada após o envio da NOTIFICAÇÃO COM O RELATÓRIO FINAL da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final disponível em www.ufpe.br/cep para enviá-lo via Notificação de Relatório Final, pela Plataforma Brasil. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado. Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB INFORMAÇÕES BÁSICAS DO PROJETO_2126892.pdf	02/08/2023 13:33:35		Aceito
Outros	Carta_de_resposta.pdf	02/08/2023 13:31:31	Fabiana Farias de Lima Guimarães	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEMaiores18_corrigido.pdf	02/08/2023 13:29:27	Fabiana Farias de Lima Guimarães	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_FabianaLima_corrigido.pdf	02/08/2023 13:29:07	Fabiana Farias de Lima Guimarães	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEMaiores18.pdf	27/04/2023 11:05:05	Fabiana Farias de Lima Guimarães	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_FabianaLima.pdf	27/04/2023 11:04:48	Fabiana Farias de Lima Guimarães	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_Confidencialidade.pdf	26/04/2023 12:33:38	Fabiana Farias de Lima Guimarães	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CartaAnuenciacaoCRCN.pdf	25/04/2023 08:47:27	Fabiana Farias de Lima Guimarães	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	25/04/2023 08:47:14	Fabiana Farias de Lima Guimarães	Aceito
Outros	Lattes_Caio.pdf	24/04/2023 10:47:07	Fabiana Farias de Lima Guimarães	Aceito

Endereço: Av. das Engenheiras, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81) 2126-8588 **Fax:** (81) 2126-3163 **E-mail:** cep@ufpe.br



Continuação do Parecer: 6.258.761

Outros	Lattes_Lais.pdf	24/04/2023 10:45:18	Fabiana Farias de Lima Guimarães	Aceito
Outros	Lattes_Gael.pdf	24/04/2023 10:44:50	Fabiana Farias de Lima Guimarães	Aceito
Outros	Lattes_Suy.pdf	24/04/2023 10:44:29	Fabiana Farias de Lima Guimarães	Aceito
Outros	Lattes_Mariana.pdf	24/04/2023 10:44:01	Fabiana Farias de Lima Guimarães	Aceito
Outros	Lattes_Fabiana.pdf	24/04/2023 10:43:42	Fabiana Farias de Lima Guimarães	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	24/04/2023 10:40:49	Fabiana Farias de Lima Guimarães	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

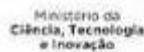
Não

RECIFE, 21 de Agosto de 2023

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador(a))

Endereço: Av. das Engenheiras, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefons: (81) 2126-8588 **Fax:** (81) 2126-3163 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE 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 codados 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 rosa) 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/nº – 1º andar, sala 4, Cidade Universitária, Recife, PE, CEP: 50740-600, telefone 2126-8588, email: cepces@ufpe.br).

Recife, ___ de _____ de 201__

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