



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR
CENTRO REGIONAL DE CIÊNCIAS NUCLEARES DO NORDESTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

GIOVANNA SIQUEIRA DE LIMA

**INFLUÊNCIA DO COLCEMID EM ANÁLISES DE DOSIMETRIA
CITOGENÉTICA: OTIMIZAÇÃO METODOLÓGICA**

Recife

2025

GIOVANNA SIQUEIRA DE LIMA

**INFLUÊNCIA DO COLCEMID EM ANÁLISES DE DOSIMETRIA
CITOGENÉTICA: OTIMIZAÇÃO METODOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências - CTG, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Tecnologias Energéticas e Nucleares.
Área de concentração: Dosimetria e Instrumentação Nuclear.

Orientador: Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral

Coorientadora: Prof. Dra. Simey de Souza Leão Pereira Magnata

Recife
2025

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Lima, Giovanna Siqueira.

Influência do Colcemid em análises de dosimetria citogenética: otimização metodológica / Giovanna Siqueira de Lima. - Recife, 2025.

71f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, 2025.

Orientação: Ademir de Jesus Amaral.

Coorientação: Simey de Souza Leão Pereira Magnata.

1. Colcemid; 2. Dosimetria citogenética; 3. Dicêntricos; 4. Cultura prolongada. I. Amaral, Ademir de Jesus. II. Magnata, Simey de Souza Leão Pereira. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

GIOVANNA SIQUEIRA DE LIMA

**INFLUÊNCIA DO COLCEMID EM ANÁLISES DE DOSIMETRIA
CITOGENÉTICA: OTIMIZAÇÃO METODOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências - CTG, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Tecnologias Energéticas e Nucleares.
Área de concentração: Dosimetria e Instrumentação Nuclear.

Aprovado em: 14/03/2025

BANCA EXAMINADORA

Dra. Isvânia Maria Serafim da Silva Lopes (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dr. Edvane Borges da Silva (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dr. André Maciel Netto (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

**Dedico a todos que me apoiaram em minha jornada, especialmente aos
que, com palavras de incentivo, me ajudaram a superar os desafios.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus e aos benfeitores que estiveram ao meu lado durante essa jornada. Sou profundamente grata por me guiarem a enxergar o lado positivo dessa experiência, transformando-a em uma oportunidade de acreditar na minha própria capacidade e alcançar meus objetivos.

À minha avó Maria do Carmo, minha eterna fonte de fé, obrigada por todas as orações proferidas pelo meu bem e sucesso. Tenho certeza de que foram elas que me deram força para persistir e encontrar a vontade de continuar. À minha avó Maria Cleide (*in memoriam*), minha protetora aonde quer que eu vá, sigo sentindo seu carinho e sua bênção em cada passo que dou.

À minha família — Cinthia, Marco, Jhosef, Márcio, Elisângela, Rogério, Maria Júlia, Maria Eduarda e Barbara —, minha gratidão pelo apoio incondicional. Obrigada por me ouvirem nos momentos difíceis, por me oferecerem abrigo quando precisei encurtar distâncias e por cada gesto de cuidado que tornou essa caminhada mais leve. Um agradecimento especial a Jhosef, meu companheiro de vida, que sempre me acolheu com carinho e amor em todas as minhas dores e alegrias.

À equipe do Lambda, meu sincero agradecimento, especialmente a Luciano e professora Simey, por me acolherem tão generosamente, tanto no PIBIC quanto no mestrado. Luciano, obrigada pelas conversas sempre enriquecedoras sobre os mais diversos temas. Professora Simey, sua coorientação e suas palavras de conforto foram essenciais nos momentos em que mais precisei.

Aos meus amigos de estudos, João, João Tadeu, Mário e Ewerton, obrigada pelas valiosas trocas de conhecimento e pelas risadas que trouxeram leveza à jornada. Um agradecimento especial à Ianka, pela amizade sincera e por ser um pilar importante no meu desenvolvimento pessoal e profissional. Sou imensamente grata por você ter acreditado em mim, muitas vezes mais do que eu mesma.

Ao meu orientador, professor Ademir Amaral, expresso minha sincera gratidão pelo suporte contínuo, que tornou possível a conclusão deste trabalho, e pelos aprendizados que foram fundamentais para o meu amadurecimento.

Aos professores do GERAR, em especial André Maciel, meu muito obrigada por compartilhar seu conhecimento em estatística, elevando a qualidade dos meus resultados e, consequentemente, desta dissertação.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco - FACEPE pelo apoio financeiro, essencial para a realização deste estudo.

**"Há uma luz que vem para dizer: tudo vai dar certo.
Expandindo a mente e pensando sem limites, você
tem a habilidade nata para vencer e criar a realidade
que deseja viver."**

(Natiruts)

RESUMO

O ensaio de cromossomos dicêntricos, em linfócitos do sangue periférico, é a técnica padrão-ouro em dosimetria citogenética para avaliação da dose de radiação individual absorvida. Neste tipo de ensaio, o Colcemid é empregado no cultivo celular para bloquear a mitose na fase de metáfase. Todavia, as propriedades do Colcemid, associadas à sua toxicidade, tornam a concentração e o instante de sua adição na cultura fatores críticos para a qualidade e a frequência das metáfases elegíveis para análise de dicêntricos. Nesse contexto, este estudo investigou a influência da concentração e do instante de adição do Colcemid para as análises de dicêntricos em biodosimetria. As amostras de sangue periférico coletadas de indivíduos voluntários foram separadas em duas alíquotas, sendo uma não irradiada utilizada como controle e a outra irradiada com 6 Gy através de um irradiador Gammacell (^{60}Co). Posteriormente, as amostras foram cultivadas *in vitro* por 72h. No primeiro experimento, o Colcemid foi adicionado no início da cultura ($t = 0\text{h}$) em concentrações de 0,05 $\mu\text{g/mL}$ e 0,10 $\mu\text{g/mL}$. No segundo experimento, as mesmas concentrações foram testadas, mas adicionadas em instantes diferentes: 24h e 45h de cultura. Após a incubação, as células foram fixadas com metanol e ácido acético (3:1); em seguida, as lâminas foram coradas pela técnica FPG e analisadas por microscopia óptica. Constatou-se que, para a metodologia proposta, a concentração de 0,05 $\mu\text{g/mL}$ de Colcemid, adicionada no início da cultura, proporcionou os melhores índices mitóticos e frequências de metáfases em primeira divisão, atingindo valores superiores a 90%, eliminando a necessidade do uso da coloração FPG. Além disso, cerca de 63% das metáfases apresentaram qualidade adequada para análise, contribuindo para a melhoria do processo. Os resultados obtidos nesta pesquisa indicam que o emprego do Colcemid numa concentração de 0,05 $\mu\text{g/mL}$, adicionado no início da cultura de linfócitos, contribuem para uma maior precisão dos ensaios de cromossomos dicêntricos em biodosimetria, especialmente em eventos envolvendo exposição individual a doses de radiação ionizante elevadas ($> 4\text{ Gy}$).

Palavras-chave: Colcemid; dosimetria citogenética; dicêntricos; cultura prolongada.

ABSTRACT

The dicentric chromosome assay in peripheral blood lymphocytes is the gold standard technique in cytogenetic dosimetry for assessing the individual absorbed radiation dose. In this type of assay, Colcemid is used in cell culture to block mitosis at the metaphase stage. However, the properties of Colcemid, combined with its toxicity, make its concentration and the timing of its addition to the culture critical factors affecting the quality and frequency of metaphases suitable for dicentric analysis. In this context, this study investigated the influence of Colcemid concentration and the timing of its addition on dicentric analysis protocols in biodosimetry. Peripheral blood samples collected from volunteer individuals were divided into two aliquots: one non-irradiated sample used as a control and another irradiated with 6 Gy using a Gammacell (60Co) irradiator. Subsequently, the samples were cultured in vitro for 72 hours. In the first experiment, Colcemid was added at the beginning of the culture ($t = 0\text{h}$) at concentrations of $0.05\text{ }\mu\text{g/mL}$ and $0.10\text{ }\mu\text{g/mL}$. In the second experiment, the same concentrations were tested but added at different time points: 24h and 45h of culture. After incubation, the cells were fixed with methanol and acetic acid (3:1); subsequently, the slides were stained using the FPG technique and analyzed by optical microscopy. The results showed that, for the proposed methodology, the concentration of $0.05\text{ }\mu\text{g/mL}$ of Colcemid, added at the beginning of the culture, provided the best mitotic indices and first-division metaphase frequencies, reaching values above 90%, thus eliminating the need for FPG staining. Additionally, approximately 63% of the metaphases exhibited adequate quality for analysis, contributing to process improvement. The findings of this study indicate that using Colcemid at a concentration of $0.05\text{ }\mu\text{g/mL}$, added at the beginning of lymphocyte culture, enhances the accuracy of dicentric chromosome assays in biodosimetry, particularly in events involving individual exposure to high doses of ionizing radiation ($> 4\text{ Gy}$).

Keywords: Colcemid; cytogenetic dosimetry; dicentric; prolonged culture.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Representação gráfica do ciclo celular.	18
Figura 2 –	Cromossomo metafásico.	19
Figura 3 –	Vias de mecanismo de reparo.	21
Figura 4 –	Aberrações cromossômicas instáveis.	25
Figura 5 –	Efeito arlequim.	28
Figura 6 –	Radicais das moléculas de Colchicina e Colcemid.	32
Figura 7 –	Efeito da concentração do Colcemid em exposição de 30 minutos de amostras coradas por bandeamento G.	33
Figura 8 –	Fluxograma do protocolo experimental.	35
Figura 9 –	Ilustração do procedimento de análise de lâmina em microscópio óptico.	38
Figura 10 –	Fluxograma dos testes estatísticos selecionados para o estudo.	41
Figura 11 –	Metáfases com cromossomos classificados como de ‘contração satisfatória’.	53
Figura 12 –	Metáfases com cromossomos classificados como de ‘contração não satisfatória’.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Médias e desvios padrão do Índice Mitótico (IM) para diferentes concentrações de Colcemid e doses de irradiação no Experimento 1, com os resultados do teste de normalidade de Shapiro-Wilk indicados.	42
Tabela 2 –	Estatísticas descritivas da frequência de metáfases (percentis 25°, 50° e 75°) do Experimento 2 em função das diferentes concentrações de Colcemid, tempos de adição e doses de irradiação, com resultados do teste de normalidade de Shapiro-Wilk indicados.	44
Tabela 3 –	Médias, desvios padrão e percentis (25°, 50° e 75°) da frequência de metáfases em primeira divisão em função das concentrações de Colcemid e doses de irradiação no Experimento 1, com resultados do teste de normalidade de Shapiro-Wilk indicados.	47
Tabela 4 –	Percentis (25°, 50° e 75°) da frequência de metáfases em primeira e segunda divisão (M1 e M2) em função das concentrações de Colcemid, tempos de adição e doses de irradiação no Experimento 2, com resultados do teste de normalidade de Shapiro-Wilk indicados.	48
Tabela 5 –	Médias e desvios padrão da frequência de metáfases com contração satisfatória (FMCS) em função das diferentes doses de irradiação e concentrações de Colcemid, com resultados do teste de normalidade de Shapiro-Wilk indicados.	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACs – Alterações Cromossômicas

ACIs – Alterações Cromossômicas Instáveis

BrdU – Bromodeoxiuridina

CDKs – Cinases Dependentes de Ciclina

DCA – Ensaio de cromossomos dicêntricos (*Dicentric Chromosome Assay*)

DNA – Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*)

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

FMCS – Frequência de metáfases com contração satisfatória

FM1 – Frequência de metáfases em primeira divisão

FPG – *Fluorescence plus Giemsa*

HR – Recombinação homóloga (Homologous recombination- HR)

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

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

IOEs – Indivíduos Ocupacionalmente Expostos

IM – Índice Mitótico

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

NHEJ – Junção terminal não homóloga (*Nonhomologous end-joining*)

PHA – Fitohemaglutinina (*Phytohemagglutinin*)

RI – Radiações Ionizantes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 Interação da radiação ionizante com as células: Danos ao DNA	16
3.1.1 Ciclo Celular: Sistema de Controle e Reparo	17
3.1.2 Efeitos Biológicos	21
3.2 Radioproteção e a Dosimetria Biológica	22
3.3 Dosimetria Citogenética	24
3.3.1 Ensaio de Cromossomos Dicêntricos (DCA)	26
3.3.1.1 Bloqueador Mitótico no Ensaio DCA	31
4 METODOLOGIA	34
4.1 Perfil da Pesquisa	34
4.2 Critérios de Inclusão e Exclusão	34
4.3 Etapa de Processamento das Amostras	34
4.3.1 Coleta de Amostras de Sangue Periférico	36
4.3.2 Irradiação das amostras	36
4.3.3 Cultura de Linfócitos	36
4.3.3.1 Colcemid: Concentração e Tempo de Adição	36
4.4 Avaliação de Índice Mitótico e Frequência de Metáfases em Primeira Divisão	37
4.5 Qualidade das Metáfases	39
4.6 Análise estatística dos resultados	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 Avaliação das concentrações de Colcemid e Tempos de Adição do Colcemid	42
5.1.1 Dose versus Índice Mitótico	42
5.1.2 Concentrações versus Índice Mitótico	45
5.1.3 Dose versus Frequência de Metáfases em Primeira Divisão	46
5.1.4 Concentrações versus Frequência de Metáfases em Primeira Divisão	49
5.2 Qualidade das Metáfases tratadas com Colcemid adicionado no tempo 0h	52
6 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58
APÊNDICES	67
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	67
ANEXOS	70
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	70

1 INTRODUÇÃO

As aplicações das radiações ionizantes (RIs) devem ser realizadas em conformidade com normas de radioproteção em vigor, visando à proteção da saúde humana e do meio ambiente. Embora amplamente benéficas, as aplicações das RIs envolvem riscos que podem levar a acidentes, podendo afetar profissionais ocupacionalmente expostos e a população em geral. Na monitoração de exposições individuais, a dosimetria física é comumente realizada com auxílio de instrumentos que são sensíveis aos efeitos físicos da RI (os dosímetros). Entretanto, na maioria dos casos envolvendo exposição acidental (real ou suspeita), os indivíduos não estão usando dosímetros e a avaliação da dose absorvida não é uma tarefa evidente. Nestas situações, a dosimetria biológica (ou biodosimetria) emerge como uma ferramenta complementar aos métodos convencionais de monitoramento dosimétrico (Amaral, 2002; Kulka *et al.*, 2018; Mu *et al.*, 2018).

Na biodosimetria, a dose absorvida individualmente é avaliada com o auxílio de biomarcadores induzidos pelas RIs. Alguns desses biomarcadores podem ser classificados como: (i) clínicos, que incluem sintomas físicos como náuseas, vômitos e eritemas; (ii) moleculares, que compartilham a expressão de proteínas, como a p53; e (iii) citogenéticos, que se destacam pela relevância em resposta à exposição, previsão de toxicidade, estimativa de doses e avaliação de riscos associados (Amaral, 2005; Herate; Sabatier, 2020; Vinnikov; Belyakov, 2022).

Os marcadores citogenéticos foram propostos como referência em 1962, quando Bender e Gooch demonstraram a correlação entre a dose de radiação absorvida e as aberrações cromossômicas instáveis (ACIs) no sangue periférico de indivíduos irradiados. As ACIs, como os cromossomos dicêntricos, aneis e fragmentos, têm curta permanência nas células devido ao comprometimento da divisão celular, que resulta na perda de material genético e redução da viabilidade celular. No entanto, ainda são considerados marcadores biológicos de referência na avaliação de exposições individuais às RIs (Balajee; Hadjidekova, 2021).

A identificação das ACIs é realizada por meio de técnicas citogenéticas, como o Ensaio de Cromossomos Dicêntricos (DCA), que utiliza os linfócitos do sangue periférico como modelo biológico. Nesse ensaio, os linfócitos são cultivados *in vitro* por aproximadamente 48 horas e estimulados por mitógenos para entrar no ciclo celular. Esse processo possibilita a observação da metáfase, fase da mitose em que os cromossomos atingem o maior grau de condensação e apresentam morfologia definida, permitindo a

visualização das ACIs. Para viabilizar essa observação, a mitose é bloqueada na metáfase por substâncias que inibem a polimerização das fibras do fuso mitótico, sendo o Colcemid um exemplo clássico (Gnanasekaran, 2021; IAEA, 2011).

Apesar de ser uma técnica padrão-ouro em biodosimetria, o ensaio DCA apresenta limitações, principalmente relacionadas aos desafios técnicos. Por exemplo, a identificação dos cromossomos dicêntricos exige profissionais capacitados e demanda um tempo significativo, levando em média três dias por profissional para análise por microscopia óptica. Além desses aspectos, o método enfrenta desafios em cenários específicos, como irradiação prolongada ou fracionada, bem como na análise de exposições em extremos de dose, são fatores que podem comprometer a precisão do ensaio (Swartz *et al.*, 2011; Vinnikov *et al.*, 2010).

Apesar dessas limitações, o DCA continua sendo o método de referência em dosimetria biológica devido à sua alta especificidade para radiações ionizantes. Para superar suas restrições, estratégias vêm sendo adotadas para aprimorar a metodologia, uma vez que variações no protocolo experimental podem impactar as doses estimadas. Alguns estudos, por exemplo, optam por estender o tempo de cultura celular, pois alterações nesse período podem influenciar a proporção de metáfases em relação ao total de células. No entanto, os resultados dessas abordagens nem sempre foram eficazes para diferentes condições de dose, sendo a utilização do Colcemid um dos principais pontos de discussão (Ferreira-Lucena *et al.*, 2024; Roy *et al.*, 2012; Yao *et al.*, 2010).

O Colcemid, uma substância antimitótica sintética amplamente empregada na dosimetria citogenética há cerca de 60 anos, apresenta restrições significativas que devem ser consideradas no seu uso. A maioria dessas restrições está relacionada à sua toxicidade, pois, dependendo da concentração e do momento de adição ao cultivo celular, interfere no índice mitótico e na frequência de metáfases em primeira divisão. Além disso, o Colcemid também afeta a qualidade das imagens, aspecto que pode refletir negativamente na avaliação da dose absorvida (Al-Ammar; Abdulameer, 2023; Arsham; Barch; Lawce, 2017; Florian; Mitchison, 2016; Kanda *et al.*, 1994).

Nesse contexto, este estudo buscou investigar o impacto do Colcemid na eficiência dos protocolos de dosimetria citogenética, sendo definido os seguintes objetivos específicos:

1. Investigar diferentes concentrações e tempos de adição do Colcemid e seus reflexos no índice mitótico;
2. Correlacionar os parâmetros investigados com a qualidade de metáfases de linfócitos em primeira divisão.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Interação da radiação ionizante com as células: Danos ao DNA

A radioatividade é um fenômeno natural associado a fontes de radiação no ambiente, caracterizadas como ionizantes por sua capacidade de interagir com átomos, promovendo excitação, ao deslocar elétrons entre camadas eletrônicas, ou ionização, ao ejetar elétrons dessas camadas e formar íons. Além das fontes naturais, a exposição humana às radiações ionizantes também ocorre por meio de fontes artificiais, como equipamentos de diagnóstico médico (Ex.: aparelhos de raios-x e tomógrafos) e aplicações industriais (Ex.: usina nuclear e radiografia industrial), evidenciando suas diversas e benéficas utilidades. Contudo, essas radiações podem interagir com o tecido biológico em diferentes estágios: físico, físico-químico, químico e, posteriormente, biológico (Obrador *et al.*, 2020; Okuno, 2013; Tauhata *et al.*, 2014).

O primeiro estágio, o físico, acontece num intervalo de tempo da ordem de 10^{-17} segundos (Pouget; Mather, 2001). Nesse momento, ocorre o processo de ionização ou excitação, formando íons, elétrons e radicais livres. Em seguida, no estágio físico-químico, há o rompimento das ligações físico-químicas das moléculas. No estágio seguinte, o químico, formam-se radicais livres altamente reativos, que podem interagir com proteínas, enzimas e com a molécula de DNA, causando danos. Por fim, no estágio biológico, essas interações podem danificar biomoléculas críticas, como o DNA, levando a consequências celulares, como mutações genéticas, apoptose ou proliferação celular descontrolada, o que pode causar o desenvolvimento de processos cancerígenos (Okuno, 2013; Tauhata *et al.*, 2014).

Esses danos podem ser causados por dois mecanismos principais: direto e indireto. No direto, a radiação interage diretamente com a molécula-alvo, o DNA, promovendo sua ionização e danos estruturais. Já no mecanismo indireto, a radiação ionizante interage primeiramente com moléculas de água, gerando produtos da radiólise, como os radicais livres H^+ e OH^- . Esses radicais, altamente reativos, podem danificar biomoléculas essenciais, amplificando os efeitos celulares (Bushong, 2010; Elgazzar; Kazem, 2014; Powell; McMillan, 1990).

Os eventos de interação da radiação ionizante no corpo humano são randômicos, pois não há controle sobre onde e quando ocorrerão. No entanto, devido à abundância de água, que corresponde a aproximadamente 80% do corpo humano, o mecanismo de ação indireta é o mais frequente *in vivo*. Embora os danos causados em moléculas numerosas geralmente não

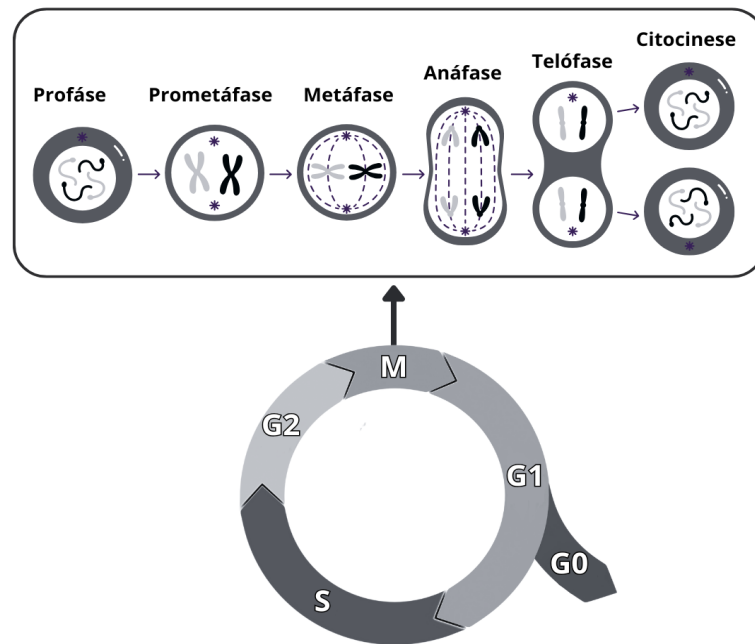
resultem em prejuízos significativos, danos em moléculas essenciais, como o DNA, que representa menos de 1% do corpo humano, podem acarretar consequências graves (Bushong, 2010).

Nesse sentido, o DNA é considerado uma molécula-alvo das radiações ionizantes devido ao seu papel essencial na manutenção e funcionamento das células. Lesões em sua estrutura podem resultar em alterações que comprometem a replicação e a transcrição do seu material genético. Essas alterações, especialmente as quebras de fita dupla, desencadeiam uma série de respostas celulares voltadas à restauração da integridade genética, o que pode afetar a sequência do ciclo celular (Averbeck *et al.*, 2020; Santivasi; Xia, 2014).

3.1.1 Ciclo Celular: Sistema de Controle e Reparo

O ciclo celular é o processo que engloba todas as etapas que uma célula passa até se dividir em células filhas, ou seja, desde sua formação até sua divisão. Esse mecanismo é fundamental para a proliferação celular e para assegurar a transferência precisa e equivalente da informação genética para as células-filhas. Ele é dividido em duas etapas principais: a interfase, composta pelas fases G1, S e G2, e a fase M, que inclui dois processos: a mitose, responsável pela divisão do núcleo, e a citocinese, que realiza a divisão do citoplasma. Além dessas etapas, o ciclo celular inclui uma fase de quiescência, chamada G0 (**Figura 1**) (Alberts *et al.*, 2017).

Figura 1 – Representação gráfica das etapas do ciclo celular.

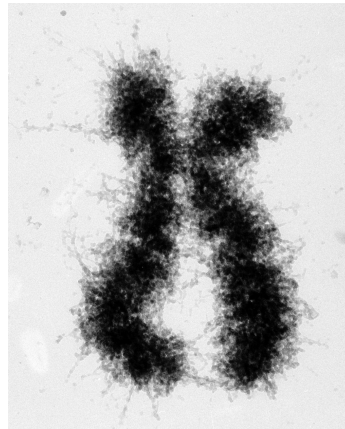


Fonte: Adaptada de Canva, 2025.

O início do ciclo é marcado pela transição das células quiescentes em G0 para a Interfase, iniciando a fase G1. Essa transição é desencadeada pela ação de mitógenos, que estimulam a entrada das células no ciclo. Durante a fase G1, há crescimento celular e preparação para a replicação do DNA. Em seguida, a célula entra na fase S, na qual ocorre a síntese e replicação do DNA. Após a conclusão da replicação é iniciada a fase G2, onde a célula continua a aumentar sua massa e se prepara para entrar na Mitose (Johnson; Walker, 1999).

A mitose é composta por cinco estágios, cada uma com eventos específicos relacionados à estrutura celular e aos cromossomos. A prófase marca o início do processo, caracterizada pelos cromossomos replicados, formados por duas cromátides-irmãs, e pelo início da formação do fuso mitótico. Na prometáfase, o envelope nuclear se desintegra, permitindo a conexão dos microtúbulos aos cinetócoros dos cromossomos. Posteriormente na metáfase, os cromossomos alcançam sua máxima condensação (**Figura 2**) e se alinham na placa equatorial. Durante a anáfase, as cromátides-irmãs se separam em direção aos polos opostos. Na telófase, novos envelopes nucleares envolvem os cromossomos segregados. Após a mitose, a citocinese finaliza a divisão celular, formando duas células-filhas (Alberts *et al.*, 2017; Walczak; Cai; Khodjakov, 2010).

Figura 2 – Cromossomo metafásico.



Fonte: Ris, 2011.

O ciclo celular é controlado por um sistema regulador composto por uma rede de proteínas que atuam através de pontos de verificação, os checkpoints. Esses pontos pausam o ciclo celular para garantir que as condições necessárias, como a integridade do DNA e a replicação adequada, sejam atendidas antes de a célula avançar para a próxima etapa. Os checkpoints desempenham um papel essencial na regulação dos complexos ciclina-CDK, formados por ciclinas e cinases dependentes de ciclinas (CDKs) que controlam transições críticas, como G1/S e G2/M. Além disso, há o complexo APC/C, complexo promotor de anáfase/ciclossomo, que regula a transição entre metáfase e anáfase, promovendo a separação precisa dos cromossomos (Elledge, 1996; Matthews; Bertoli; De Bruin, 2022).

O controle no final da fase G1 ocorre quando as G1/S-ciclinas ativam CDKs para induzir a entrada no ciclo celular e a replicação dos cromossomos. Em seguida, S-ciclinas promovem a ação das Cdk's que estimulam a duplicação cromossômica. Na transição da fase G2 para a fase M, as M-ciclinas ativam as CDKs que viabilizam a entrada na Mitose. Finalmente, a transição entre a metáfase e a anáfase acontece pela degradação de proteínas específicas pelo complexo APC/C, permitindo a continuidade para os estágios finais da divisão celular (Matthews; Bertoli; De Bruin, 2022).

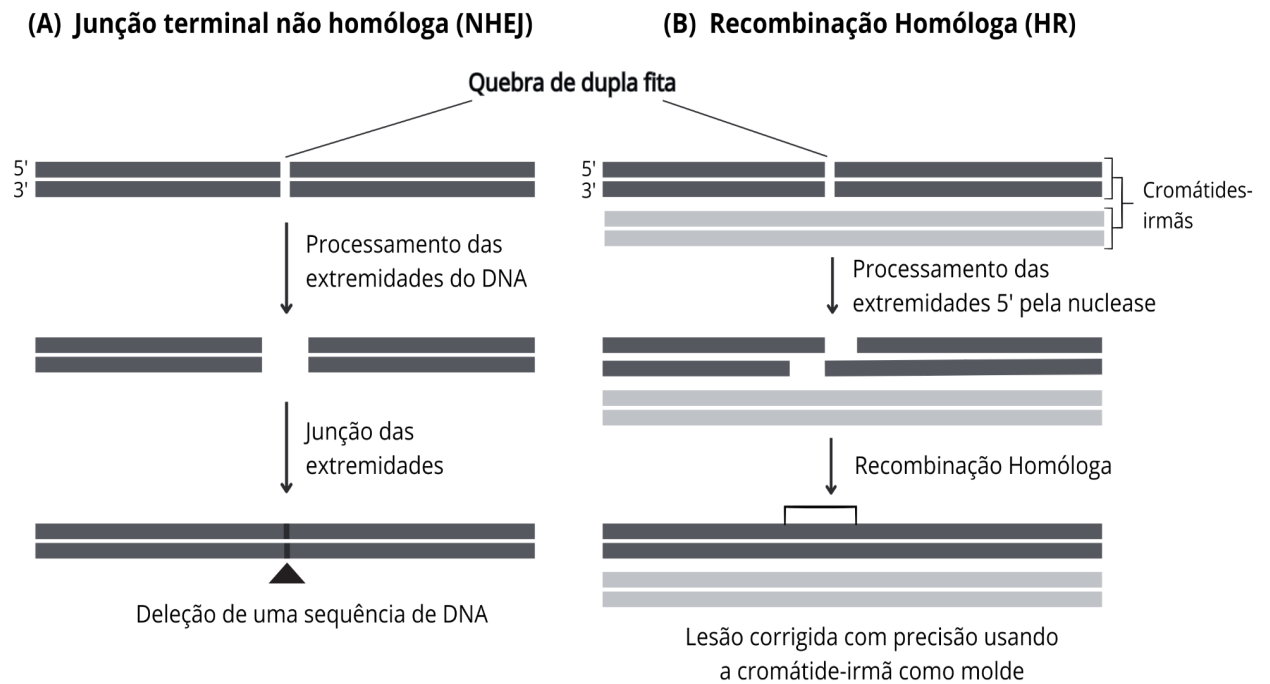
Na ocorrência de danos ao DNA, como os provocados por radiação ionizante, os checkpoints são fundamentais. Nessas condições, a progressão do ciclo celular é interrompida em dois pontos: primeiro, no início, bloqueando a entrada no ciclo e na fase S; e depois na transição G2/M, impedindo a entrada na Mitose. Esse processo ativa uma cascata de sinalização mediada por proteínas cinases, que aumentam a concentração da proteína p53. A p53, por sua vez, exerce um papel essencial ao ativar proteínas inibidoras de CDKs, as quais

inibem as atividades de complexos ciclinas-CDK, interrompendo, assim, a progressão do ciclo celular (Alberts *et al.*, 2017; Barnum; O'Connell, 2014).

Após a interrupção do ciclo celular em razão dos danos ao DNA, a célula pode ser conduzida a diferentes caminhos, dependendo principalmente da gravidade. Em casos de danos graves, a célula pode ser direcionada à morte celular programada, denominada apoptose, para evitar a propagação do material danificado. No entanto, na ausência ou deficiência da p53, o DNA poderá ser replicado, transmitindo mutações para as células-filhas. Alternativamente, a célula pode ativar os mecanismos de reparo para corrigir as lesões, se o reparo for bem-sucedido, a célula retoma o ciclo e segue suas funções normais (Barnum; O'Connell, 2014; Heijink; Krajewska; Van Vugt, 2013; Santivasi; Xia, 2014).

As células irradiadas possuem diferentes mecanismos de reparo com o objetivo de preservar sua estabilidade genética. Entre os principais mecanismos de reparo, destacam-se o reparo por excisão de bases (BER), a recombinação homóloga (*Homologous recombination*-HR) e a junção terminal não homóloga (*Nonhomologous end-joining* - NHEJ) (Branzei; Foiani, 2008).

Os mecanismos de reparo do DNA atuam de forma específica para cada tipo de dano. No reparo por excisão de bases, lesões causadas por oxidação, irradiação ou alquilação são corrigidas pela remoção da base alterada pela enzima DNA-glicosilase, formando um sítio AP (apurínico ou apirimidínico). Esse sítio é reparado por nucleases e seguido pela síntese de DNA. Já no caso de quebras de dupla fita, a recombinação homóloga utiliza a cromátide-irmã como molde para o reparo, ocorrendo nas fases S e G2. Em contraste, a junção de extremidades não homóloga atua na fase G1 e realiza o reparo sem o uso de molde (**Figura 3**). Esse mecanismo promove a ligação direta das extremidades quebradas no mesmo cromossomo, sem envolvimento do par homólogo, sendo mais suscetível a erros (Krokan; Bjørås, 2013; Wright; Shah; Heyer, 2018).

Figura 3 - Vias de mecanismos de reparo.

Fonte: Adaptada de Alberts *et al.*, 2017.

A eficiência dos mecanismos de reparo determina se as lesões no DNA serão ou não eliminadas. Na ausência de reparo adequado, ou em casos de erro nesses processos, o DNA danificado poderá ser replicado e transmitido para as células-filhas, acumulando mutações ao longo do tempo. Consequentemente, esse acúmulo de mutações irá interferir no crescimento celular podendo desencadear determinados efeitos biológicos, especialmente quando o dano envolve quebras de fita dupla (*Double-Strand Breaks* – DSBs), consideradas as lesões mais graves ao DNA devido ao seu alto potencial de causar instabilidade genômica. A relevância das DSBs e os mecanismos envolvidos em seu reparo serão explorados nos próximos tópicos (Branzei; Foiani, 2008; O'Donnell; Langston; Stillman, 2013).

3.1.2 Efeitos Biológicos

A resposta individual (efeitos biológicos) à irradiação depende de vários fatores, a exemplo do tipo de radiação ionizante, dose e taxa de dose, além da estrutura biológica afetada, os quais determinam a ocorrência de efeitos determinísticos e estocásticos. Além disso, os efeitos podem ser classificados como imediatos ou tardios, dependendo do tempo de manifestação, e como hereditários ou somáticos, conforme o nível orgânico atingido (Bushong, 2010; Tauhata *et al.*, 2014).

Os efeitos determinísticos resultam dos danos causados pela radiação a um conjunto de células, levando à morte celular e ao comprometimento da funcionalidade de tecidos ou órgãos expostos. Esses efeitos ocorrem principalmente após exposições a altas doses de RIs e manifestam-se somente quando a dose-limiar é ultrapassada. A gravidade do dano aumenta proporcionalmente à dose aplicada. Caso os danos celulares não sejam reparados de forma eficiente, os efeitos podem surgir imediatamente, em dias ou semanas, ou de forma tardia, anos após a exposição (Obrador, 2022; Tauhata *et al.*, 2014).

Entre os efeitos imediatos decorrentes de altas doses de radiação destacam-se sintomas como vômitos, diarreia e eritema, que caracterizam a Síndrome da Irradiação Aguda. Essa síndrome é composta por quatro manifestações específicas, que variam de acordo com a dose absorvida: a síndrome hematopoiética (2 a 6 Gy), a síndrome gastrointestinal (6 a 7 Gy), a síndrome pulmonar (7 a 10 Gy) e a síndrome neurovascular (>10 Gy). Por outro lado, os efeitos determinísticos também podem manifestar-se de forma tardia. Exemplos incluem o desenvolvimento de hipotireoidismo e catarata, sendo este último observado anos após a exposição de sobreviventes das bombas atômicas no Japão (De Lemos Pinto; Santos; Amaral, 2010; Obrador, 2022; Okuno, 2013).

Por sua vez, os efeitos estocásticos não apresentam um limiar de dose, pois a probabilidade de ocorrência de danos é proporcional à dose. Isso implica que, mesmo em exposições abaixo dos limites estabelecidos, esses efeitos podem ser desencadeados ao provocar danos em uma ou várias células. Quando as células reprodutivas são atingidas, as mutações podem ser transmitidas aos descendentes, resultando em possíveis anomalias no desenvolvimento embrionário. Por outro lado, quando as células afetadas são somáticas, os danos manifestam-se exclusivamente nos indivíduos expostos à radiação, geralmente na forma de câncer (Chaturvedi; Jain, 2019; Choudhary, 2018; Tauhata *et al.*, 2014).

Considerando que os efeitos biológicos causados pela radiação ionizante podem ter consequências graves para os indivíduos expostos, é fundamental desenvolver estratégias para minimizar os impactos dessa exposição. Nesse contexto, surge a radioproteção, cujo objetivo é reduzir a interação prejudicial com a radiação ionizante, protegendo tanto os trabalhadores quanto o público em geral (ICRP, 2007).

3.2 Radioproteção e a Dosimetria Biológica

A compreensão dos efeitos radioinduzidos ao tecido biológico despertou maior interesse pelo gerenciamento dos riscos da radiação ionizante, especialmente devido ao

aumento da exposição humana decorrente do seu uso ampliado. Em função disso, foram estabelecidos um conjunto de medidas com a finalidade de proteger tanto os trabalhadores quanto o público em geral de possíveis exposições prejudiciais à saúde (De Lemos Pinto; Santos; Amaral, 2010).

O controle e monitoramento dos riscos associados de exposições às RIs são atribuições desenvolvidas em radioproteção por órgãos como o *International Commission on Radiological Protection* (ICRP), *International Atomic Energy Agency* (IAEA), Organização Mundial de Saúde (OMS) e pelo *United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation* (UNSCEAR) (Gnanasekaran, 2021; Mu *et al.*, 2018).

Entre as recomendações e diretrizes estabelecidas por essas instituições, são definidos os limites anuais de doses para o público em geral e para os indivíduos ocupacionalmente expostos (IOEs). No que se refere ao monitoramento individual dessa população exposta, são utilizadas grandezas dosimétricas específicas, como a dose absorvida, para determinar a energia média de radiação ionizante depositada por unidade de massa no volume irradiado, sendo essa grandeza denominada Gray, conforme o Sistema Internacional de Unidades (SI) (CNEN, 2024; ICRP, 2007).

A partir da dose absorvida, definem-se outras duas grandezas dosimétricas: a dose equivalente e a dose efetiva. A dose equivalente considera o tipo de radiação, refletindo seus efeitos biológicos, enquanto a dose efetiva pondera a sensibilidade dos tecidos irradiados. Essas grandezas permitem uma avaliação mais precisa dos riscos biológicos da exposição à radiação, levando em conta a qualidade da radiação e a vulnerabilidade dos tecidos do corpo humano (ICRP, 1990).

Na avaliação das doses absorvidas por IOEs, a dosimetria física é o método mais comumente utilizado, sendo realizado através de dosímetros sensíveis aos efeitos físicos das RIs para monitorar a dose cumulativa, fornecendo um valor representativo dessa absorção. No entanto, esses equipamentos apresentam desvantagens significativas, como as incertezas associadas aos valores medidos, a falta de registros em casos de exposição à radiação sem o seu uso e a limitação em exposições de corpo inteiro (Swartz; Williams; Flood, 2014; Vanhavere; Van Hoey, 2022).

Essas limitações destacam a necessidade de métodos alternativos ou complementares que proporcionem uma avaliação mais confiável da dose absorvida, especialmente em cenários onde os dosímetros não estão disponíveis, de modo a oferecer subsídios para tratamentos adequados com base nos impactos reais da radiação, tanto a curto quanto a longo prazo. Diante dessas restrições, a dosimetria biológica, ou biodosimetria, tem sido proposta

como uma alternativa complementar para avaliar a dose absorvida nesses indivíduos através de marcadores biológicos (biomarcadores) (De Lemos Pinto; Santos; Amaral, 2010; Sakamoto-Hojo, 2018).

A variedade encontrada de biomarcadores induzidos pela interação da radiação ionizante com o tecido biológico, leva à necessidade do estabelecimento de critérios para a escolha dos potencialmente interessantes para a biodosimetria. Dentre os critérios estabelecidos, temos: a especificidade à radiação ionizante, o baixo rendimento espontâneo, a pouca influência de fatores externos (idade, sexo, hábitos de vida), a variabilidade conhecida, respostas claras para um amplo espectro de dose, o curto período de tempo para a conclusão do ensaio, o baixo custo e a alta reprodutibilidade (Swartz; Williams; Flood, 2014; Vinnikov; Belyakov, 2022).

Entretanto, com exceção dos marcadores citogenéticos poucos atendem a grande parte desses critérios, pois, além de sua alta especificidade às RIs, são capazes de prever a toxicidade, estimar a dose absorvida e avaliar os riscos associados à exposição. Por essas razões, a dosimetria citogenética, que utiliza esses marcadores, é considerada a técnica padrão-ouro para essas exposições, pois permite a quantificação da radiação por meio de danos citogenéticos radioinduzidos (Pernot *et al.*, 2012; Vinnikov; Belyakov, 2022).

3.3 Dosimetria Citogenética

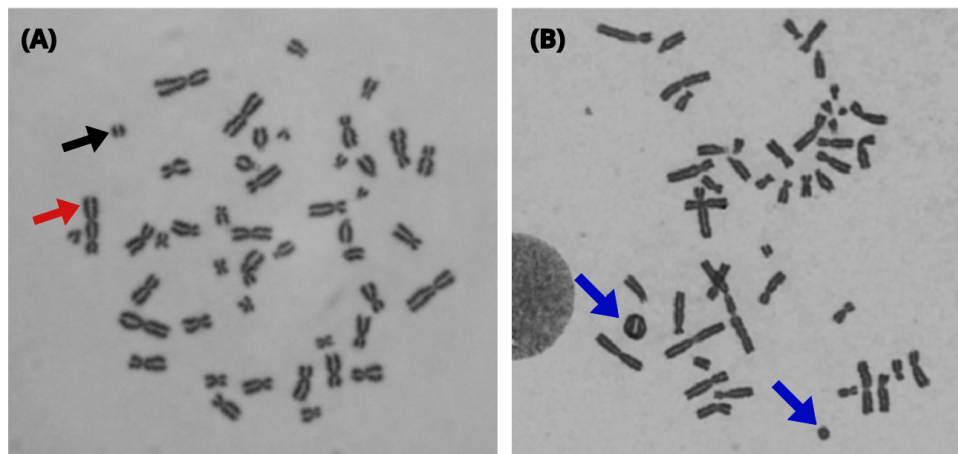
Dentre os marcadores citogenéticos mais utilizados para estimar a dose de radiação absorvida, destacam-se as Aberrações Cromossômicas (ACs), devido à sua frequência e sensibilidade, que permitem estabelecer uma relação precisa com a dose recebida. Essa relação dose-resposta é viabilizada pelas lesões no DNA causadas pela exposição à radiação ionizante, sendo a quebra de fita dupla (DSB) a mais significativa (Natarajan, 2002; Obe *et al.*, 2002).

A correção de DSBs pode recorrer para duas vias principais de reparo, dependendo da fase do ciclo celular em que a lesão ocorre. A recombinação homóloga (HR) é a mais precisa, porém ocorre apenas em fases específicas, como S e G2. Em contrapartida, a NHEJ predomina em G1, embora seja mais propensa a erros é a via mais utilizada para o reparo de DSBs. Adicionalmente, em condições que a célula está sobrecarregada com múltiplas lesões e com danos mais complexos, a probabilidade de erros no reparo aumenta consideravelmente (Han; Yu, 2010; Natarajan, 2002) .

Embora as DSBs possam ser reparadas, falhas ou erros nesse processo podem resultar na formação dessas aberrações cromossômicas estruturais. Cada uma dessas aberrações é capaz de fornecer informações sobre a dose da radiação, a depender das condições específicas de exposição e do intervalo de tempo em que a estimativa de dose será realizada (Lloyd; Purrott, 1981; Powell; McMillan, 1990).

Algumas aberrações cromossômicas são classificadas como instáveis, pois comprometem a divisão celular e reduzem sua viabilidade devido à perda de material genético, permanecendo no organismo por um curto período. Entre elas estão os cromossomos dicêntricos, formados pela junção das extremidades quebradas de dois cromossomos adjacentes, os cromossomos em anel, que se originam de quebras nas extremidades de um único cromossomo, cujas pontas se unem e os fragmentos acêntricos (**Figura 4**). Por outro lado, há aberrações que podem persistir por longos períodos e são consideradas estáveis, como translocações, inversões e deleções (Balajee; Hadjidekova, 2021; Vinnikov; Belyakov, 2022).

Figura 4 - Aberrações cromossômicas instáveis.



A imagem (A) indica na seta vermelha um cromossomo dicêntrico e na seta preta um fragmento acêntrico; enquanto, na imagem (B) as setas azuis indicam um cromossomo em anel.

Fonte: Adaptada de IAEA, 2011.

A visualização e quantificação das aberrações cromossômicas são realizadas por meio de técnicas citogenéticas, que permitem identificar os diferentes tipos de alterações causadas pela radiação. Entre as principais técnicas estão o ensaio de translocações, de micronúcleo com bloqueio de citocinese, de condensação prematura dos cromossomos e de cromossomos

dicêntricos, descritos abaixo: (Gnanasekaran, 2021; Herate; Sabatier, 2020; Vinnikov; Belyakov, 2022)

- **Translocações:** Analisa as translocações cromossômicas, geralmente utilizando a técnica FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*). Contudo, sua frequência pode variar de acordo com idade, sexo e tabagismo, sendo mais indicado para casos específicos de exposições tardias;
- **Ensaio de micronúcleo com bloqueio de citocinese (MN):** Avalia micronúcleos, que são partículas resultantes da má segregação de cromossomos aberrantes. É um método prático e requer menor conhecimento técnico, mas apresenta uma frequência espontânea entre 0,002 e 0,036 por célula, com sensibilidade de 0,25 Gy. Assim como as translocações, a frequência de micronúcleos pode ser influenciada por fatores etários, ambientais e de estilo de vida;
- **Ensaio de condensação prematura dos cromossomos (PCC):** Método ideal para avaliar exposições a altas doses de radiação, pois evita os problemas do atraso mitótico e da morte celular. Possui processamento mais rápido que outras técnicas, uma vez que dispensa o cultivo celular, embora exija alto nível técnico para sua execução;
- **Ensaio de cromossomos dicêntricos (DCA):** Baseia-se na análise de cromossomos dicêntricos, que são respostas sensíveis e específicas à radiação ionizante. Sua frequência espontânea é de 0,001 por célula, e sua sensibilidade é de 0,1 Gy. Por sua alta especificidade, é considerado o "padrão-ouro" em biodosimetria.

Dentre as técnicas de dosimetria citogenética, amplamente utilizadas para quantificar a exposição à radiação em vítimas de exposições ocupacionais ou acidentais, em estudos epidemiológicos e em diversas situações clínicas, o ensaio de cromossomos dicêntricos destaca-se como o mais empregado devido à sua alta especificidade e sensibilidade (Lee *et al.*, 2019).

3.3.1 Ensaio de Cromossomos Dicêntricos (DCA)

O ensaio de cromossomos dicêntricos (DCA) é amplamente reconhecido como o padrão-ouro em dosimetria citogenética devido à sua eficácia em avaliar a dose de radiação absorvida após a exposição à radiação ionizante. Esse método, que se destaca em relação a outras técnicas, segue, geralmente, o protocolo descrito no manual da IAEA (2011) e utiliza

linfócitos do sangue periférico como material principal para análise (Gnanasekaran, 2021; Voisin, 2015).

Os linfócitos, células quiescentes na fase G0 do ciclo celular, são facilmente obtidos por coleta de sangue. Sua alta radiosensibilidade e capacidade de armazenar danos radioinduzidos tornam-os ideais para identificar lesões no DNA, como os cromossomos dicêntricos. Após a coleta, esses linfócitos são cultivados por aproximadamente 48 horas, embora o tempo possa variar entre 46 e 52 horas, dependendo das condições e especificações laboratoriais. Esse período de cultivo é crucial para maximizar o número de células em primeira divisão mitótica (M1), visto que as aberrações cromossômicas instáveis tendem a desaparecer nas divisões celulares subsequentes (Amaral, 2005; Balajee; HadjiDekova, 2021; IAEA, 2011).

Para estimular a entrada dos linfócitos no ciclo celular, utiliza-se um mitógeno, como a fitohemaglutinina, que induz a progressão das células pelas fases G1, S e G2, culminando na mitose. A visualização dos cromossomos dicêntricos requer um bloqueio mitótico na fase de metáfase, momento em que os cromossomos apresentam o maior grau de condensação e organização, facilitando sua análise. Esse bloqueio é alcançado com a adição de Colcemid ao meio de cultura, uma substância que inibe a formação das fibras do fuso mitótico, impedindo a progressão para a anáfase. O protocolo padrão recomenda a adição de 25-50 μL de uma solução estoque de 10 $\mu\text{g/mL}$ de Colcemid de 2 a 3 horas antes do término do cultivo (Brinkley; Stubblefield; Hsu, 1967; IAEA, 2011; Stewart; Cramer; Stewart, 1975).

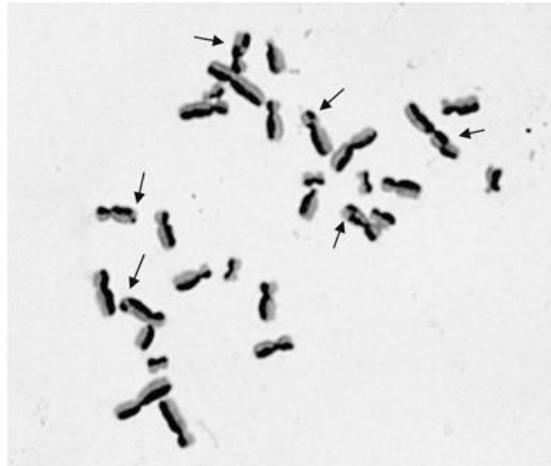
Em situações específicas, como prolongamento do cultivo celular, o Colcemid pode ser adicionado mais cedo, por exemplo, após 24 horas de cultura ou no início do cultivo. Nesses casos, é essencial reduzir sua concentração para o mínimo necessário (0,05 $\mu\text{g/mL}$) para mitigar a toxicidade celular e evitar a contração excessiva dos cromossomos, o que poderia comprometer a análise (IAEA, 2011).

Após o período de incubação, as células passam por um choque hipotônico, que promove o inchaço celular, facilitando a separação e o espalhamento dos cromossomos, etapa essencial para a preparação das lâminas. Em seguida, as células são fixadas com uma solução de metanol e ácido acético, na proporção de 3:1, preservando a integridade estrutural dos cromossomos (Arsham, Barch e Lawce, 2017).

As lâminas preparadas são submetidas à coloração, sendo a técnica *Fluorescence plus Giemsa* (FPG) uma das mais recomendadas. Essa técnica permite diferenciar células em primeira divisão mitótica (M1) daquelas em segunda divisão (M2). Para isso, utiliza-se o bromodesoxiuridina (BrdU), um análogo da timidina, incorporado durante a replicação do

DNA. O BrdU gera um efeito de "arlequim" em que as cromátides irmãs apresentam coloração diferenciada, facilitando a identificação das células M1, indispensáveis para uma análise precisa das aberrações cromossômicas (**Figura 5**) (Beaton *et al.*, 2013; Speit, 1984).

Figura 5 – Efeito arlequim.



Fonte: Hagelstrom *et al.*, 2008.

No entanto, a técnica FPG apresenta algumas limitações, como a qualidade variável da coloração, a deterioração das lâminas com o tempo e a possível redução na qualidade das metáfases observadas. Para minimizar esses efeitos, a proporção de células em M1 e M2 pode ser avaliada, e caso o número de células em M2 seja inferior a 5%, pode-se realizar a replicação das lâminas da mesma amostra e corá-las exclusivamente com Giemsa, contornando as limitações presentes na técnica FPG (Hayata; Kajima; Okabe, 1992; IAEA, 2011).

Dessa forma, a análise do índice mitótico e da frequência de metáfases em primeira divisão (M1) é essencial para o sucesso do ensaio. O índice mitótico corresponde à proporção de metáfases em relação ao total de células analisadas, sendo um indicador crucial da atividade proliferativa celular (**Equação 1**). Enquanto a frequência de metáfases em M1 avalia a eficácia do bloqueio mitótico, permitindo determinar o rendimento de células em primeira divisão (**Equação 2**). Esses parâmetros são fundamentais para assegurar que a análise dos cromossomos dicêntricos demonstre com precisão a dinâmica celular da população estudada, garantindo a confiabilidade dos resultados obtidos (Ferreira-Lucena *et al.*, 2024; IAEA, 2011).

$$\text{Índice Mitótico} = \frac{\text{Metáfases} \times 100}{\text{Total de Células}} \quad (1)$$

$$\text{Frequência de M1} = \frac{(\text{metáfases em primeira divisão}) \times 100}{\text{Total de Metáfases}} \quad (2)$$

Além disso, a análise das lâminas no ensaio DCA baseia-se na identificação e na pontuação de cromossomos dicêntricos, o que possibilita a estimativa da dose de radiação absorvida. De modo geral, recomenda-se a pontuação de 500 células em casos de acidentes envolvendo doses mais baixas, nos quais o número de células disponíveis não é um fator limitante, ou a contagem de 100 dicêntricos para exposições a doses superiores a 1 Gy. Contudo, em situações que demandam triagens mais rápidas, a pontuação de 50 células ou a contagem de 30 dicêntricos é considerada como suficiente para fornecer uma estimativa de dose (IAEA, 2011; Lloyd *et al.*, 2000).

Para estimar com precisão a relação entre a dose de radiação e a frequência de cromossomos dicêntricos é essencial construir uma curva dose-resposta. Essa curva estabelece a relação entre a dose de radiação absorvida e a frequência das aberrações cromossômicas observadas nas células. Geralmente, essas curvas são geradas utilizando amostras irradiadas *in vitro*, considerando que o rendimento de cromossomos dicêntricos em amostras *in vivo* e *in vitro* é semelhante (Amaral, 2002; Lemos Pinto, 2011).

As curvas de dose-resposta variam de acordo com a qualidade da radiação, caracterizada pelo LET (*Linear Energy Transfer*, ou Transferência Linear de Energia), e pela eficácia biológica relativa (RBE - *Relative Biologic Effectiveness*). Radiações de baixo LET, como raios X e gama, geralmente seguem um modelo linear-quadrático, pois apresentam uma menor densidade de deposição de energia ao longo de seu trajeto, resultando em menor probabilidade de danos irreparáveis no DNA. Em contrapartida, radiações de alto LET, como partículas alfa, produzem uma maior densidade de deposição de energia, sendo mais eficazes na indução de aberrações cromossômicas, o que resulta em uma curva com comportamento linear (De Lemos Pinto; Santos; Amaral, 2010; Pouget; Mather, 2001).

A diferença na deposição de energia entre radiações de baixo e alto LET está diretamente relacionada à eficácia biológica, com radiações de alto LET causando danos mais localizados e letais ao DNA. Esses fatores influenciam a forma da curva dose-resposta, o que torna indispensável sua calibração para cada tipo de radiação e cenário de exposição. Após a calibração, pode ser utilizada para estimar doses absorvidas em casos de exposições acidentais à radiação. Essa aplicação é particularmente importante para a avaliação de risco e o manejo

médico em emergências radiológicas, pois permite interpretar os cromossomos dicêntricos pontuados em termos de dose de radiação (Lemos-Pinto, 2015; Pouget; Mather, 2001).

Embora o ensaio de cromossomos dicêntricos seja amplamente utilizado para quantificar a exposição à radiação, especialmente em casos de exposições recentes, ele apresenta limitações relevantes abrangendo tanto desafios técnicos quanto restrições relacionadas à sua aplicação em diferentes contextos (Herate; Sabatier, 2020; Ryan *et al.*, 2019; Swartz; Williams; Flood, 2014; Vinnikov *et al.*, 2010; Vinnikov; Belyakov, 2022; Voison, 2015).

Entre os principais requisitos técnicos para processamento de DCA, se destaca a necessidade de profissionais capacitados para identificação de cromossomos dicêntricos, além do tempo significativo exigido para a análise microscópica. Adicionalmente, o processo demanda um período considerável para garantir um número adequado de metáfases elegíveis para análise (Herate e Sabatier, 2020; Ryan *et al.*, 2019).

No que se refere à aplicabilidade, a aplicabilidade do DCA dependerá de cenários de exposição que envolvem reconhecimento tardio, irradiação prolongada ou fracionada, bem como em situações de extremos de dose, os quais podem comprometer a precisão dos resultados obtidos (Vinnikov *et al.*, 2010).

No entanto, apesar dessas limitações, o DCA continua sendo o método mais confiável devido à sua especificidade para radiações ionizantes, uma característica que outros biomarcadores não conseguem replicar com a mesma eficácia. Nesse contexto, diversas pesquisas têm se concentrado na otimização de parâmetros metodológicos, como a cultura celular, visando melhorar o rendimento e minimizar as limitações associadas às aberrações instáveis. Testes com culturas prolongadas, com tempos de 50, 52, 56, 72 e até 96 horas, têm mostrado resultados promissores, permitindo contornar os atrasos mitóticos e oferecer mais tempo para o reparo celular (Chen *et al.*, 2011; Ferreira-Lucena *et al.*, 2024; Roy *et al.*, 2012; Swartz; Williams; Flood, 2014; Vinnikov; Maznyk, 2013; Yao *et al.*, 2010).

Dentre essas estratégias de prolongamento, contudo, surgiram desafios específicos relacionados ao bloqueador mitótico utilizado. Em especial, a obtenção insuficiente de metáfases ao empregar colchicina pelo método convencional evidenciou uma limitação significativa. Por outro lado, a extensão do tempo de cultura aliada ao uso de uma concentração menor de Colcemid (0,01 µg/mL) apresentou resultados mais satisfatórios. No entanto, essa abordagem também trouxe implicações, como o aumento na frequência de metáfases em divisões posteriores à primeira, o que pode comprometer a precisão da análise (Ferreira-Lucena *et al.*, 2024; Yao *et al.*, 2010).

Estudos indicam que a exposição das células a agentes como o Colcemid, recomendado pelo manual da IAEA, influencia no rendimento das metáfases e na qualidade das análises citogenéticas. Logo, compreender os efeitos desse bloqueador, suas limitações e as possibilidades de otimização são fundamentais para aprimorar a eficiência e a confiabilidade do ensaio de cromossomos dicêntricos em diferentes condições experimentais (Arsham; Barch; Lawce, 2017; Fernandes; Lloyd; Amaral, 2008; Guerra; Souza, 2002).

3.3.1.1 Bloqueador Mitótico no Ensaio DCA

Os bloqueadores mitóticos são amplamente utilizados para induzir a parada do ciclo celular durante a metáfase, fase em que os cromossomos apresentam maior grau de condensação e espalhamento, permitindo sua visualização detalhada. Esse aspecto é especialmente relevante em estudos citogenéticos, nos quais permite a identificação de alterações cromossômicas e a elaboração de diagnósticos, como no ensaio de cromossomos dicêntricos. Esses compostos desempenham seu papel ao interagir diretamente com os microtúbulos, estruturas essenciais para a divisão celular (Guerra; Souza, 2002; Jordan, 2002).

Os microtúbulos são estruturas dinâmicas formadas por dímeros de tubulina alfa e beta, cuja estabilidade é modulada pelos compostos antimitóticos. A dinâmica de polimerização e despolimerização dos microtúbulos ocorrem de maneira polarizada: enquanto a extremidade positiva, rica em tubulina beta, apresenta crescimento e encolhimento rápidos, a extremidade negativa, dominada por tubulina alfa, é mais estável. Essas propriedades tornam os microtúbulos essenciais para a separação das cromátides-irmãs durante a anáfase e os tornam alvos primários de compostos que bloqueiam a mitose (Alberts *et al.*, 2017; Akhmanova; Steinmetz, 2015; Walczak; Cai; Khodjakov, 2010).

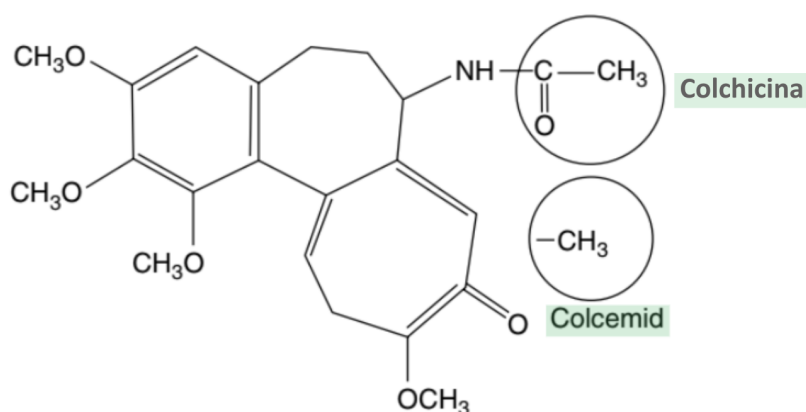
Com base nesse princípio, os bloqueadores mitóticos são classificados conforme seu mecanismo de ação. Alguns compostos, como o paclitaxel, atuam estabilizando os microtúbulos ao se ligar à β -tubulina de microtúbulos já formados, impedindo sua despolimerização. Outros, como a Velban, a Colchicina e o Colcemid, inibem a polimerização, desestabilizando os microtúbulos ao se associar às tubulinas livres e bloquear a adição de novos dímeros de tubulina (Florian; Mitchison, 2016; Jordan, 2002).

Dentre os bloqueadores mitóticos, a Colchicina e o Colcemid se destacam pela ampla aplicação em estudos citogenéticos. A Colchicina, principal alcaloide do *Colchicum autumnale*, é utilizada como medicamento anti-inflamatório no tratamento e prevenção de crises agudas de gota, além de outras indicações clínicas. Estudos indicam que os efeitos da

colchicina dependem das doses administradas: em doses baixas promovem o bloqueio mitótico, enquanto em doses elevadas podem causar intoxicação e levar à morte celular (Arsham; Barch; Lawce, 2017; Jordan; Wilson, 2004; Leung; Hui; Kraus, 2015).

Por outro lado, o Colcemid, um análogo estrutural da Colchicina, é amplamente empregado com o mesmo objetivo em estudos citogenéticos, especialmente no ensaio DCA. Esse agente possui alta afinidade pela tubulina solúvel, formando complexos que são incorporados às extremidades dos microtúbulos em crescimento, interrompendo sua polimerização (Banerjee; Bhattacharyya, 1979; Florian; Mitchison, 2016)

Figura 6 - Radicais das moléculas de Colchicina e Colcemid.



Fonte: Adaptada de Arsham; Barch; Lawce, 2017.

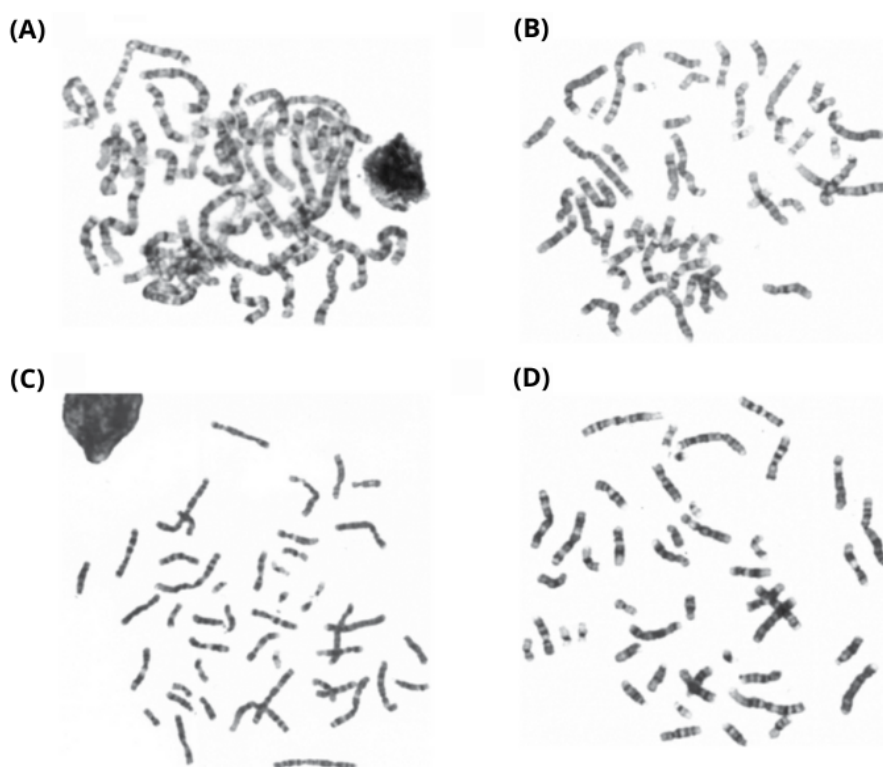
Como ilustrado na **Figura 6**, a Colchicina e o Colcemid diferem por apenas um radical em sua estrutura molecular, embora apresentem diferenças significativas em sua velocidade de interação com a tubulina e na toxicidade. Enquanto a Colchicina forma uma ligação irreversível com a tubulina, em um processo de interação que ocorre de maneira mais lenta quando comparada ao Colcemid. Esse bloqueador mitótico, por sua vez, além de interagir mais rapidamente, apresenta menor toxicidade e maior segurança nas aplicações laboratoriais (Arsham; Barch; Lawce, 2017; Banerjee; Bhattacharyya, 1979; Florian; Mitchison, 2016).

O uso do Colcemid oferece vantagens em relação à colchicina, pois proporciona um índice mitótico significativamente superior em culturas com tempos de incubação entre 48 e 72 horas, o que justifica sua escolha preferencial em análises citogenéticas (Chen e Zhang, 1992; Kanda *et al.*, 1994).

Embora o Colcemid seja um insumo essencial em dosimetria citogenética e tenha sido amplamente utilizado por mais de seis décadas, seu mecanismo de ação apresenta limitações

consideráveis, especialmente em relação à toxicidade e à qualidade das preparações citogenéticas. Evidências científicas indicam que tanto concentrações elevadas quanto tempos de exposição prolongados de Colcemid podem levar à condensação excessiva dos cromossomos, prejudicando a qualidade das metáfases e comprometendo a integridade celular (**Figura 7**) (Al-Ammar; Abdulameer, 2023; Arsham; Barch; Lawce, 2017; Da Matta *et al.*, 2013; Fernandes; Lloyd; Amaral, 2008; Guerra; Souza, 2002).

Figura 7 - Efeito da concentração do Colcemid em exposição de 30 minutos de amostras coradas por Bandeamento G.



A imagem (A) representa cromossomos sem adição de Colcemid, enquanto as imagens (B), (C) e (D) correspondem às concentrações de 0,02 µg/mL; 0,05 µg/mL e 0,1 µg/mL, respectivamente.

Fonte: Adaptada de Arsham; Barch; Lawce, 2017.

Considerando esses aspectos, é fundamental investigar a influência da concentração e do tempo de adição do Colcemid no índice mitótico, assim como na frequência e qualidade das metáfases contabilizadas em dosimetria citogenética.

4 METODOLOGIA

4.1 Perfil da Pesquisa

Nesta pesquisa foram utilizadas amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis. Essas amostras foram coletadas em conformidade com o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco, conforme parecer nº 6.337.895 (**Anexo A**).

4.2 Critérios de Inclusão e Exclusão

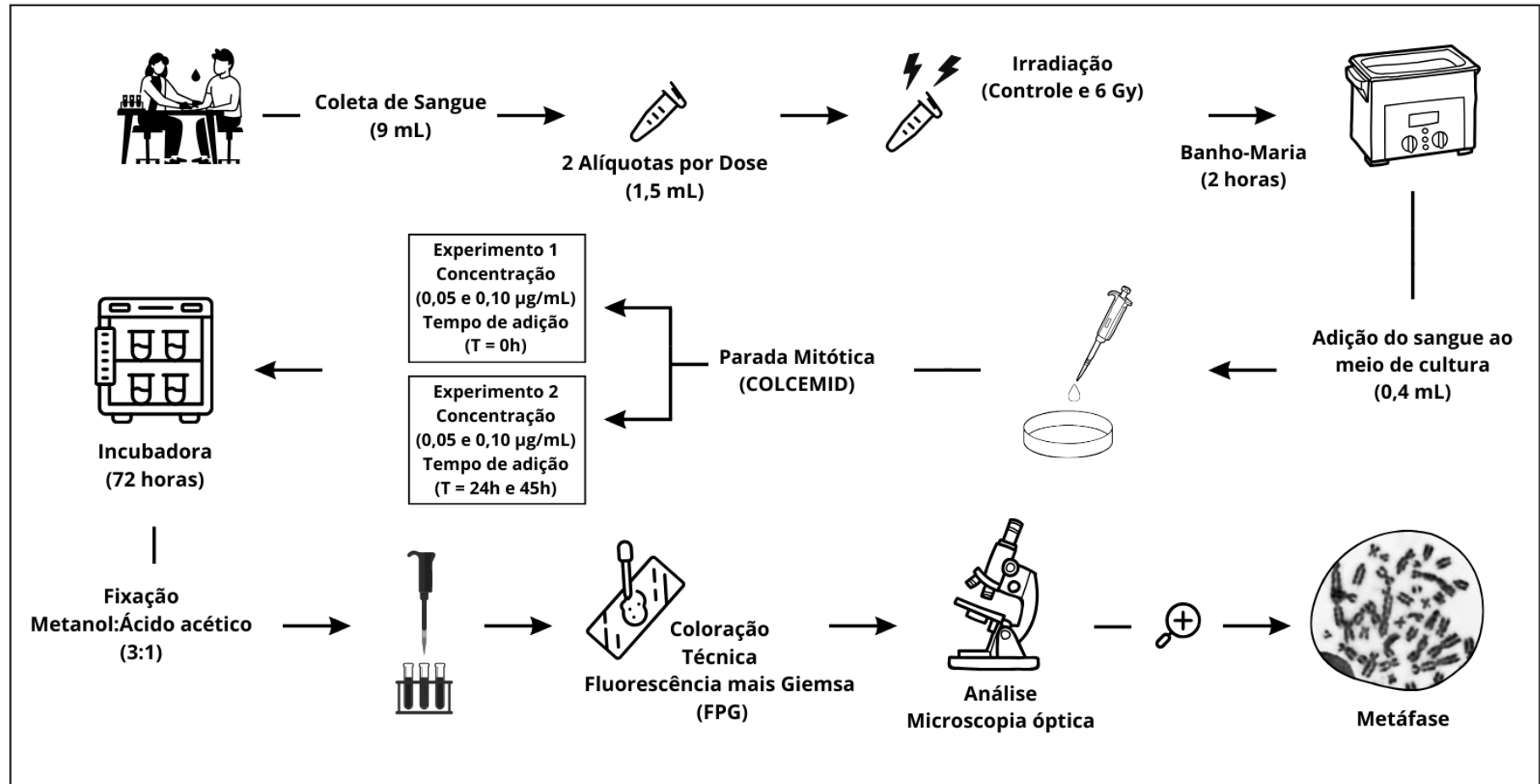
Critério de inclusão – Serem indivíduos saudáveis não fumantes.

Critérios de exclusão – Indivíduos com histórico de exposição à radiação ionizante, recente a este estudo, seja através de radioterapia ou exames que utilizam da mesma; Indivíduos com alterações no hemograma, como na contagem dos componentes sanguíneos (linfócitos e plaquetas).

4.3 Etapa de Processamento das Amostras

A **Figura 8**, a seguir apresenta, de forma esquemática, as etapas metodológicas empregadas no estudo, desde a coleta de sangue periférico, irradiação das amostras e cultivo celular, até a fixação, coloração e análise microscópica das lâminas. Vale ressaltar as etapas críticas do experimento, como a concentração do Colcemid e sua adição em diferentes intervalos de tempo.

Figura 8 - Fluxograma do protocolo experimental.



Fonte: Autora.

4.3.1 Coleta de Amostras de Sangue Periférico

Após concordância e assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram coletadas amostras (9 mL) de sangue periférico de cada um dos 2 (dois) indivíduos voluntários, A e B.

4.3.2 Irradiação das amostras

As alíquotas de sangue foram divididas em amostras controle não irradiadas (NIR) e amostras irradiadas com 6 Gy. A irradiação foi realizada através do irradiador Gammacell com fonte de ^{60}Co , operando a uma taxa de dose média de 1,0335 kGy/h para o conjunto de amostras, do voluntário A e B. O equipamento utilizado pertence ao Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco. Imediatamente após a irradiação, as amostras foram mantidas em banho-maria a 37°C durante 2 h para promover o reparo inicial do DNA.

4.3.3 Cultura de Linfócitos

Para cada amostra de sangue periférico, os linfócitos foram cultivados em meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 20% de soro fetal bovino, 2% de fitohemaglutinina e BrdU (30 μM), conforme a metodologia recomendada pela Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA, 2011). O material foi mantido em incubadora a 37°C e 5% CO_2 por um tempo prolongado de 72 h. Ao término da cultura, as células foram fixadas em solução de metanol e ácido acético. Após sucessivas lavagens com o fixador, o material foi alíquotado em lâminas e corado pela técnica *Fluorescence plus Giemsa* (FPG) (IAEA, 2011).

4.3.3.1 Colcemid: Concentração e Tempo de Adição

Foram realizados dois experimentos para avaliar a influência do Colcemid, utilizando duas concentrações distintas: 0,05 $\mu\text{g/mL}$ e 0,10 $\mu\text{g/mL}$. As concentrações foram alcançadas pela adição de 25 μL e 50 μL de solução de Colcemid, respectivamente.

- **Experimento 1 (Voluntário A):**

- As amostras do voluntário A foram cultivadas e tratadas com Colcemid nas concentrações de 0,05 µg/mL e 0,10 µg/mL, adicionado no início da cultura (T = 0 h);
- Após a sua realização, o desenho experimental foi ampliado para avaliar a influência do tempo de adição do Colcemid na metodologia, se fazendo necessária a realização do Experimento 2.

- **Experimento 2 (Voluntário B):**

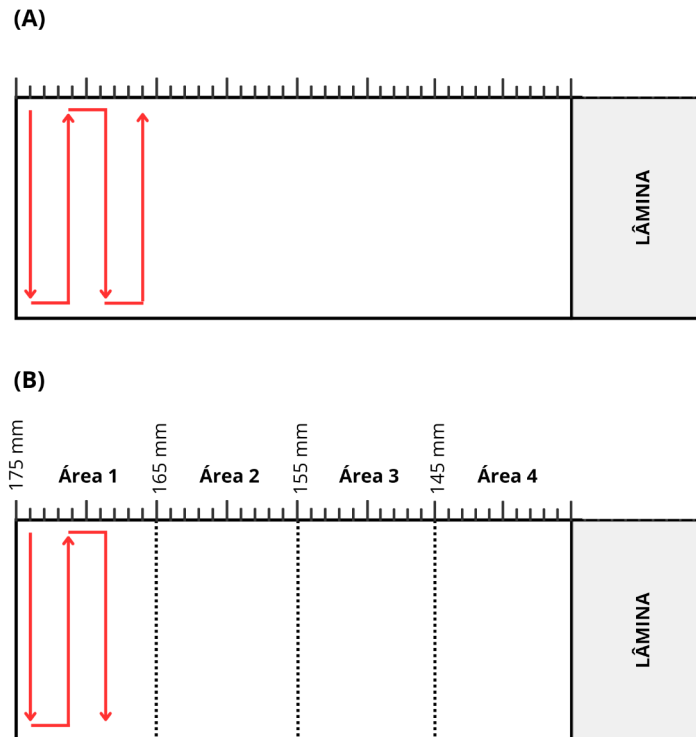
- Para este experimento, foram utilizadas as amostras do voluntário B, com as mesmas concentrações de Colcemid do voluntário A (0,05 µg/mL e 0,10 µg/mL);
- A adição do Colcemid foi testada em dois momentos distintos: 24 horas e 45 horas após o início da cultura.

Em ambos os experimentos, as concentrações de Colcemid foram mantidas constantes durante as diferentes condições de tempo de adição, e as amostras foram monitoradas para avaliar os efeitos sobre o Índice Mitótico e a Frequência de metáfases em primeira divisão.

4.4 Avaliação de Índice Mitótico e Frequência de Metáfases em Primeira Divisão

Utilizando microscopia óptica convencional no Laboratório de Modelagem e Biodosimetria Aplicada (LAMBDA-UFPE), as amostras foram analisadas e as metáfases das células linfocitárias quantificadas, de acordo com os critérios de pontuação estabelecidos pela IAEA (2011). Conforme ilustrado na **Figura 9**, cada lâmina foi subdividida em quatro áreas, com base na régua do microscópio, visando cobrir uma maior extensão da lâmina e garantir a homogeneidade da análise. Em cada área, foram contabilizadas 250 células, totalizando 1.000 células por lâmina.

Figura 9 - Ilustração do procedimento de análise da lâmina em microscópio óptico.



A imagem (A) apresenta o método convencional de análise, enquanto a imagem (B) demonstra o procedimento específico adotado neste estudo.

Fonte: Autora.

O índice mitótico (IM) foi calculado pela relação entre o número total de metáfases e o total de células analisadas (**Equação 1**, vide pág. 28). Por outro lado, a frequência de metáfases em primeira divisão (FM1) foi determinada pela razão entre o número total de metáfases em primeira divisão e o total de metáfases observadas (**Equação 2**, vide pág. 28).

Os procedimentos adotados em cada experimento para a análise do IM e da FM1 estão descritos a seguir:

- **Experimento 1:** Foram utilizadas lâminas replicadas seis vezes para cada condição experimental, as quais incluíram:
 - Amostra Controle com concentração de 0,05 µg/mL de Colcemid;
 - Amostra Controle com concentração de 0,10 µg/mL de Colcemid;
 - Amostra irradiada (6 Gy) com concentração de 0,05 µg/mL de Colcemid;
 - Amostra irradiada (6 Gy) com concentração de 0,10 µg/mL de Colcemid;

Assim, o IM e a FM1 foram analisados em função da irradiação (Controle e 6 Gy) e da concentração de Colcemid (0,05 µg/mL e 0,10 µg/mL).

- **Experimento 2:** As análises foram realizadas em triplicata para cada condição experimental, que contemplaram:

- Amostra Controle com concentração de 0,05 µg/mL de Colcemid, com adição do Colcemid 24h após o início da cultura;
- Amostra Controle com concentração de 0,05 µg/mL de Colcemid, com adição do Colcemid 45h após o início da cultura;
- Amostra Controle com concentração de 0,10 µg/mL de Colcemid, com adição do Colcemid 24h após o início da cultura;
- Amostra Controle com concentração de 0,10 µg/mL de Colcemid, com adição do Colcemid 45h após o início da cultura;
- Amostra irradiada (6 Gy) com concentração de 0,05 µg/mL de Colcemid, com adição do Colcemid 24h após o início da cultura;
- Amostra irradiada (6 Gy) com concentração de 0,05 µg/mL de Colcemid, com adição do Colcemid 45h após o início da cultura;
- Amostra irradiada (6 Gy) com concentração de 0,10 µg/mL de Colcemid, com adição do Colcemid 24h após o início da cultura;
- Amostra irradiada (6 Gy) com concentração de 0,10 µg/mL de Colcemid, com adição do Colcemid 45h após o início da cultura.

Com isso, o IM e a FM1 foram analisados em função da irradiação (Controle e 6 Gy), da concentração de Colcemid (0,05 µg/mL e 0,10 µg/mL) e do tempo de adição do Colcemid (24h e 45h).

4.5 Qualidade das Metáfases

As metáfases foram classificadas em duas categorias: “contração satisfatória”, com centrômeros visíveis, cromossomos alongados, cromátides unidas e condensadas; e, “contração não satisfatória” com a presença de cromossomos excessivamente contraídos, com formato circular, impossibilitando a visualização das cromátides e dos centrômeros.

A partir da classificação das metáfases, foi determinada a frequência de metáfases com “contração satisfatória”, uma vez que estas permitem uma análise mais confiável,

especialmente dos cromossomos dicêntricos. A frequência dessas metáfases com contração satisfatória (FMCS) foi calculada pela razão entre o total dessas metáfases e o total de metáfases em primeira divisão (**Equação 3**).

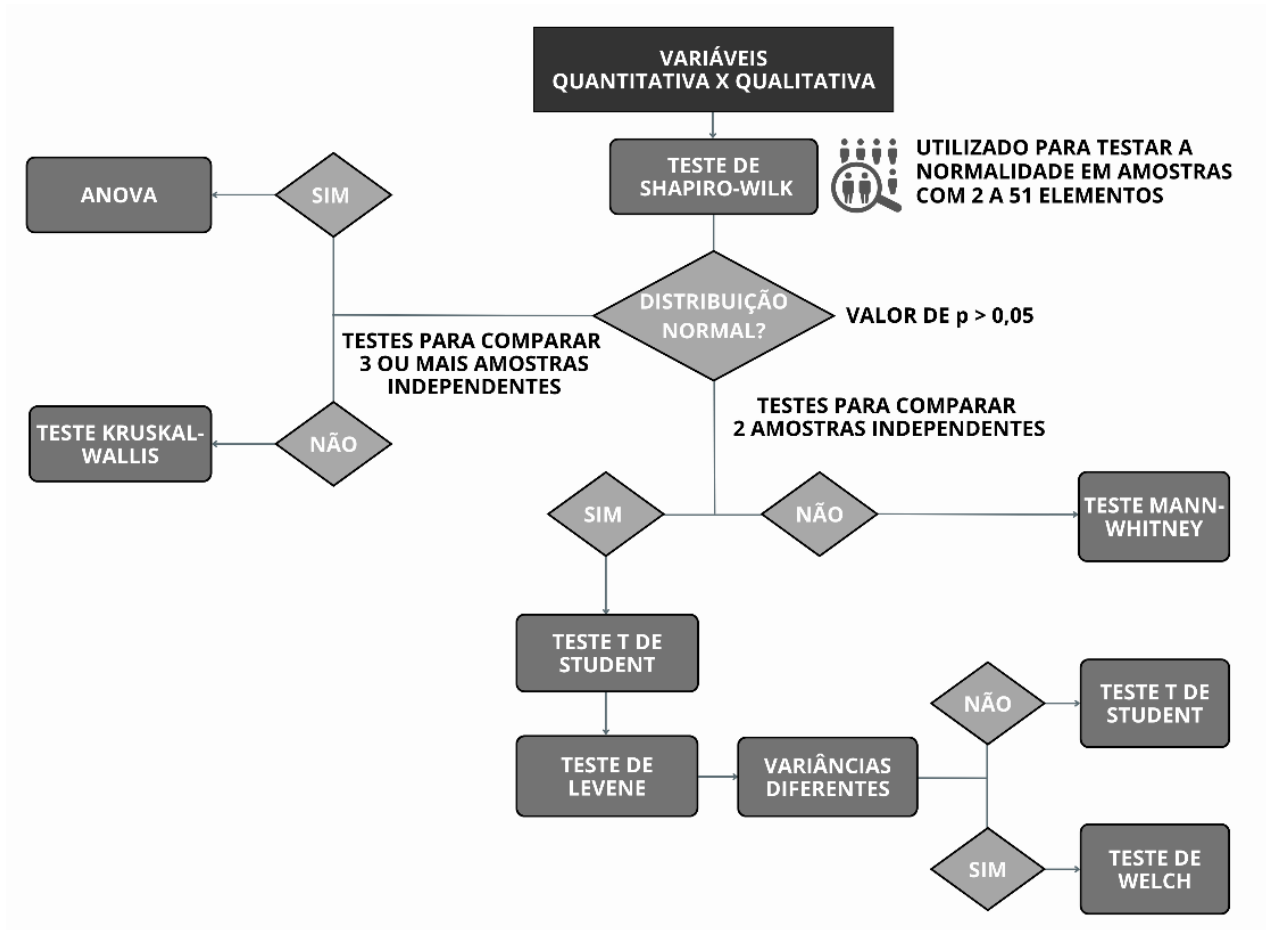
$$FMCS = \frac{\text{Total de metáfases com contração satisfatória}}{\text{Total de metáfases em primeira divisão}} \quad (3)$$

4.6 Análise estatística dos resultados

Para a análise dos resultados, o número de metáfases foi adotado como o tamanho amostral (N). Primeiramente, foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Para a comparação entre duas amostras independentes, aplicou-se o teste t de Student nos casos em que os dados apresentaram distribuição normal; para os dados que não atenderam ao pressuposto de normalidade, utilizou-se o teste de Mann-Whitney. Adicionalmente, o teste de Levene foi realizado para verificar a homogeneidade das variâncias. Para a comparação entre três ou mais amostras independentes, empregou-se a análise de variância (ANOVA) nos casos em que os dados seguiram a normalidade, enquanto que o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para dados que não atenderam a essa premissa.

A **Figura 10**, a seguir, apresenta um modelo esquemático dos testes estatísticos selecionados para este estudo.

Figura 10 - Fluxograma dos testes estatísticos selecionados para o estudo.



Fonte: Autora.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação das concentrações de Colcemid e Tempos de Adição do Colcemid

5.1.1 Dose *versus* Índice Mitótico

A realização de dois experimentos distintos possibilitou uma perspectiva ampliada na investigação do impacto do Colcemid na metodologia empregada. Embora conduzidos com amostras independentes, os achados demonstram uma convergência significativa, indicando que os resultados de ambos os experimentos não apenas corroboram entre si, mas também se complementam.

No Experimento 1 (E1), as médias e os desvios padrão do Índice Mitótico (IM) em função da dose de irradiação e das concentrações de Colcemid estão apresentados na **Tabela 1**. O teste de normalidade de Shapiro-Wilk, também mostrado na Tabela 1, indicou que os dados seguem uma distribuição normal, com p -valores superiores a 0,05 para as amostras Controle e irradiadas, nas concentrações de 0,05 e 0,10 $\mu\text{g/mL}$ de Colcemid.

Tabela 1 - Médias e desvios padrão do Índice Mitótico (IM) para diferentes concentrações de Colcemid e doses de irradiação no Experimento 1, com os resultados do teste de normalidade de Shapiro-Wilk indicados.

Irradiação	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Média $\pm$ D.P (%)	Shapiro-Wilk (p -valor)
Controle	0,05	14,5 $\pm$ 1,8	0,432 ^{ns}
	0,10	19,6 $\pm$ 4,03	0,284 ^{ns}
6 Gy	0,05	8,98 $\pm$ 1,8	0,328 ^{ns}
	0,10	6,8 $\pm$ 1,7	0,578 ^{ns}

[s] significativo para $\alpha \leq 0,05$; [ns] não significativo para $\alpha > 0,05$

Fonte: Autora.

No entanto, ao analisar a relação entre a dose de irradiação e o IM para a concentração de 0,10 $\mu\text{g/mL}$, o teste de Levene revelou a ausência de homogeneidade das variâncias, exigindo a aplicação do teste de Welch. Esse efeito pode estar associado a um aumento aleatório na quantidade de metáfases observadas em duas das seis lâminas das amostras de Controle analisadas. Para as demais condições experimentais, o teste t de Student foi

empregado. Em ambos os testes, o valor de p foi 0,001 ($p < 0,05$), indicando diferença estatisticamente significativa no IM entre Controle e 6 Gy para ambas as concentrações de Colcemid.

A partir desses resultados, a análise das médias do IM revela que as amostras Controle apresentaram valores superiores em comparação às amostras irradiadas. Nessas amostras irradiadas, a partir da diferença relativa foi observada uma redução do IM de 38,07% na concentração de 0,05 $\mu\text{g/mL}$ e de 65,31% na concentração de 0,10 $\mu\text{g/mL}$, tomando como referência o IM inicial das amostras Controle.

No Experimento 2 (E2), foram avaliadas as mesmas concentrações de Colcemid (0,05 e 0,10 $\mu\text{g/mL}$), porém adicionadas em tempos distintos (24h e 45h após o início da cultura). O Índice Mitótico (IM) foi submetido ao teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos dados, revelando que a amostra irradiada com Colcemid a 0,05 $\mu\text{g/mL}$, adicionado em 45h, não seguiu uma distribuição normal.

Diante da falta de normalidade em algumas amostras e da inclusão do tempo de adição como variável adicional no E2, optou-se pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparar três fatores experimentais: dose de irradiação, concentração de Colcemid e tempo de adição. Os resultados não indicaram diferenças estatisticamente significativas no IM em relação às concentrações de Colcemid ou aos tempos de adição testados. Essa ausência de significância pode estar associada ao número reduzido de amostras e à proximidade entre os tempos de adição (24h e 45h), possivelmente limitando a detecção de variações reais.

No entanto, ao comparar as doses testadas (Controle e 6 Gy), observou-se uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,001$), indicando uma redução expressiva no IM das amostras irradiadas. A estatística descritiva (**Tabela 2**) confirma esse efeito, mostrando que o maior IM registrado na amostra Controle foi de 13,5%, enquanto na amostra irradiada com 6 Gy o valor máximo foi de 6%, evidenciando uma redução superior a 50%.

Tabela 2 - Estatísticas descritivas da frequência de metáfases (percentis 25º, 50º e 75º) do Experimento 2 em função das diferentes concentrações de Colcemid, tempos de adição e doses de irradiação, com resultados do teste de normalidade de Shapiro-Wilk indicados.

Irradiação	Tempo de Adição (h)	Concentração (µg/mL)	25th Percentil	50th Mediana	75th Percentil	Shapiro-Wilk (p-valor)
Controle	24	0,05	12,3%	13,5%	13,7%	0,253 ^{ns}
		0,10	8,50%	9,2%	10,25%	0,780 ^{ns}
	45	0,05	10,05%	10,1%	11,55%	0,056 ^{ns}
		0,10	7,80%	8,2%	8,60%	1,000 ^{ns}
6 Gy	24	0,05	4,90%	6,0%	6,45%	0,546 ^{ns}
		0,10	2,55%	2,6%	2,95%	0,220 ^{ns}
	45	0,05	3,05%	3,2%	3,20%	0,001 ^s
		0,10	2,95%	4,0%	4,05%	0,077 ^{ns}

[s] significativo para $\alpha \leq 0,05$; [ns] não significativo para $\alpha > 0,05$

Fonte: Autora.

Assim como observado no E1, no qual as médias do IM indicaram a redução do percentual celular nas amostras irradiadas, no E2, a análise das medianas reforçam essa tendência. Dessa forma, a análise integrada dos Experimentos 1 e 2, considerando o Índice Mitótico em função da dose, sugere que ambos refletem de maneira consistente os efeitos esperados da radiação sobre as células, indicando a relação entre a exposição à radiação e a diminuição do índice mitótico.

A redução da proliferação celular em amostras irradiadas pode estar associada à ativação de mecanismos de resposta ao dano no DNA durante os checkpoints do ciclo celular. Nesse contexto, as células podem interromper temporariamente o ciclo para reparo, retomar a divisão após a correção das lesões ou, em caso de danos irreparáveis, sofrer apoptose. Em doses elevadas, o aumento da apoptose e o prolongamento do atraso mitótico reduzem o número de metáfases observadas, pois muitas células não chegam a completar a mitose (Deckbar; Jeggo; Löbrich, 2011; Li; Story; Legerski, 2001; Mavragani et al., 2019; Pujol-Canadell et al., 2020).

Apesar da redução no Índice Mitótico observada no Experimento 1, na amostra de 6Gy, não compromete a eficácia do protocolo adotado. Os valores obtidos (9% para 0,05 µg/mL e 7% para 0,10 µg/mL de Colcemid) são superiores aos relatados, por exemplo, por

Ferreira-Lucena *et al.* (2024). Esses autores, ao utilizar 0,01 µg/mL de Colcemid sob as mesmas condições de irradiação, cultura, concentração e tempo de adição do Colcemid, observaram índices ainda menores (5–6%). Da mesma forma, os valores de IM do Experimento 2 variaram entre 3–6%, embora, nesse caso, o Colcemid tenha sido adicionado em 24 h e 45 h. Esses resultados indicam que a metodologia empregada no E1 favoreceu uma maior atividade proliferativa das células, mesmo sob altas doses de radiação, demonstrando a eficácia do protocolo utilizado.

5.1.2 Concentrações *versus* Índice Mitótico

Neste tópico, serão apresentados e discutidos os resultados do E1, visto que no E2, como mencionado no tópico anterior, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações testadas. Ao relacionar o IM do E1 com as concentrações de Colcemid (0,05 e 0,10 µg/mL) nas diferentes condições de irradiação (Controle e 6 Gy), observou-se normalidade em todos os dados, conforme mostrado na **Tabela 1**.

No entanto, nas amostras Controle, foram detectadas falta de homogeneidade das variâncias, possivelmente devido ao mesmo resultado apresentado na quantidade das metáfases observadas, já que o aumento aleatório ocorreu em duas lâminas de Controle, na concentração de 0,10 µg/mL. Para essas condições, foi necessário utilizar o teste de Welch, enquanto as demais foram analisadas com o teste t de Student. Os resultados (t de Welch = 0,025; t de Student = 0,049; $p < 0,05$) indicaram diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações nas duas amostras testadas (Controle e 6 Gy).

Com base nesses resultados, pode-se afirmar que, nas amostras Controle, a concentração de 0,10 µg/mL resultou no maior IM (19,6%), superior ao observado com 0,05 µg/mL (14,5%). Em contraste, na dose de 6 Gy, a tendência se inverteu, com a menor concentração (0,05 µg/mL) apresentando um IM mais alto (8,98%) em comparação à maior concentração (6,8%).

Esses resultados confirmam que a exposição às radiações ionizantes desencadeia diversas alterações celulares, cuja intensidade varia de acordo com a dose aplicada e as condições experimentais. Em doses elevadas, por exemplo, é comum a ocorrência de um atraso significativo no ciclo celular e linfopenia, ambos resultantes dos danos severos induzidos pela irradiação. Tais lesões graves frequentemente levam à morte celular, reduzindo sua viabilidade, comprometendo o seu cultivo e dificultando sua análise citogenética. Além

disso, esses efeitos podem interferir substancialmente nas fases subsequentes da divisão celular (Duthoo, Vral & Baeyens, 2022; Elgazzar & Kazem, 2014).

Diante disso, a dose elevada de radiação foi aplicada neste estudo com o objetivo de ampliar a margem entre as doses e possibilitar uma observação mais detalhada dos efeitos da radiação em combinação com o Colcemid, levando em consideração que este agente também pode ser tóxico para as células, dependendo das condições de exposição.

Essa abordagem é respaldada por estudos como o de Da Matta e colaboradores (2013), que evidenciam que tanto a concentração quanto o momento de adição do Colcemid são fatores cruciais para o rendimento das metáfases, mesmo sob as condições recomendadas pelo manual da IAEA (2011). Além disso, o tempo de exposição ao Colcemid também desempenha um papel fundamental na qualidade das metáfases, pois, segundo Rieder e Palazzo (1992), períodos prolongados podem induzir uma condensação excessiva dos cromossomos, comprometendo seu comprimento normal. Esses achados enfatizam a necessidade de um ajuste preciso das condições de uso do Colcemid, visando otimizar as análises citogenéticas e garantir resultados confiáveis.

Nesse contexto, os efeitos combinados do Colcemid e dos danos induzidos pela radiação podem potencializar a redução da capacidade de proliferação celular e aumentar a suscetibilidade ao estresse celular, destacando a importância de um controle rigoroso dessas variáveis experimentais. Assim, o uso de uma concentração reduzida de Colcemid atua de modo a minimizar esses efeitos adversos, permitindo uma contagem de metáfases mais representativa das condições da cultura após a irradiação, como evidenciado pelos resultados do E1 (Fernandes; Lloyd; Amaral, 2008; Kanda *et al.*, 1994).

Por outro lado, nas amostras não expostas à radiação ionizante (Controle), onde os danos causados pela radiação estão ausentes, a maior concentração de Colcemid (0,10 µg/mL) mostrou-se mais vantajosa. Nessa situação, o Colcemid é o único fator influente sobre as células, e sua concentração elevada potencializa o aprisionamento de metáfases, resultando em um IM elevado nessas amostras.

5.1.3 Dose *versus* Frequência de Metáfases em Primeira Divisão

Nesta análise, foram considerados os resultados estatísticos dos Experimentos 1 e 2, permitindo identificar divergências importantes associadas às condições experimentais. A comparação entre esses experimentos possibilitou uma avaliação mais detalhada do efeito do

Colcemid sobre a frequência de metáfases em primeira divisão (FM1), considerando tanto a dose de irradiação quanto o tempo de adição da substância.

As médias e medianas da frequência de metáfases na primeira divisão (FM1) permaneceram acima de 90% em todas as condições testadas, indicando consistência dos resultados, independentemente da dose de irradiação (**Tabela 3**). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk, revelando que, na concentração de 0,10 µg/mL, os dados não seguiram uma distribuição normal em ambas as doses. No entanto, para 0,05 µg/mL, a normalidade foi confirmada.

Tabela 3 - Médias, desvios padrão e percentis (25°, 50° e 75°) da frequência de metáfases em primeira divisão em função das concentrações de Colcemid e doses de irradiação no Experimento 1, com resultados do teste de normalidade de Shapiro-Wilk indicados.

Irradiação	Concentração (µg/mL)	Média ± D.P (%)	25th Percentil	50th Mediana	75th Percentil	Shapiro-Wilk (p-valor)
Controle	0,05	95 ± 1,7	94%	95%	96%	0,252 ^{ns}
	0,10	99 ± 1,2	99%	100%	100%	0,003 ^s
6 Gy	0,05	93,8 ± 2,04	92%	94%	96%	0,393 ^{ns}
	0,10	99,7 ± 0,82	100%	100%	100%	0,001 ^s

[s] significativo para $\alpha \leq 0,05$; [ns] não significativo para $\alpha > 0,05$

Fonte: Autora.

Com base nesses pressupostos, os testes t de Student e Mann-Whitney foram aplicados para comparar as doses. Os resultados (t de Student = 0,304; U de Mann-Whitney = 0,599; $p > 0,05$) indicaram que não houve diferença estatisticamente significativa na FM1 entre as doses de irradiação.

Para o Experimento 2, os resultados do teste de Shapiro-Wilk considerando a variável FM1, indicaram que duas condições não apresentaram distribuição normal: as amostras irradiadas e tratadas com Colcemid nas concentrações de 0,05 µg/mL (adicionado em 24h) e 0,10 µg/mL (adicionado em 45h) (**Tabela 4**). Dessa forma, com base nesses resultados, considerou-se que os dados apresentam uma distribuição não normal.

Diante disso, aplicou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para avaliar os efeitos das variáveis experimentais (irradiação, concentração e tempo de adição) sobre a frequência de metáfases na primeira divisão. Os resultados revelaram uma diferença

estatisticamente significativa entre as amostras irradiadas e não irradiadas ($p = 0,001$), confirmando a leve redução na frequência de metáfases observada na estatística descritiva, conforme indicado pelas medianas da **Tabela 4**, que mostram uma diminuição nas amostras de Controle em comparação com as de 6 Gy.

Tabela 4 - Percentis (25º, 50º e 75º) da frequência de metáfases em primeira e segunda divisão (M1 e M2) em função das concentrações de Colcemid, tempos de adição e doses de irradiação no Experimento 2, com resultados do teste de normalidade de Shapiro-Wilk indicados.

Irradiação	Tempo de Adição (h)	Concentração (µg/mL)	M1			M2	Shapiro-Wilk (<i>p</i> -valor)
			25th Percentil	50th Mediana	75th Percentil	50th Mediana	
Controle	24	0,05	64,5%	65%	68%	35%	0,253 ^{ns}
		0,10	87,5%	88%	88,5%	12%	1,000 ^{ns}
	45	0,05	81%	82%	83,5%	18%	0,780 ^{ns}
		0,10	74%	76%	79,5%	24%	0,702 ^{ns}
6 Gy	24	0,05	86%	90%	90,0%	10%	0,001 ^s
		0,10	85%	88%	92,0%	12%	0,843 ^{ns}
	45	0,05	87%	88%	92,5%	12%	0,328 ^{ns}
		0,10	80,5%	93%	93,0%	7%	0,001 ^s

[s] significativo para $\alpha \leq 0,05$; [ns] não significativo para $\alpha > 0,05$

Fonte: Autora.

No Experimento 2, a adição do Colcemid (24h e 45h) resultou em uma redução significativa na FM1, especialmente nas amostras Controle, sugerindo que, no momento da adição, muitas células já haviam progredido para divisões avançadas. Esse efeito está relacionado às culturas prolongadas, nas quais a progressão do ciclo celular é mais evidente tanto em células normais quanto naquelas irradiadas com baixas doses.

A interpretação desses resultados exige a consideração dos mecanismos celulares envolvidos na resposta à radiação e na progressão do ciclo celular. Nos linfócitos, há um intervalo específico para o início do ciclo, e, dependendo da gravidade dos danos, o atraso na progressão tende a ser menor, especialmente em comparação com danos de maior severidade. Assim, a menor frequência de metáfases em primeira divisão em culturas prolongadas pode

estar relacionada à ausência de danos significativos ou à rápida resolução de lesões brandas, reduzindo a necessidade de atrasos no ciclo celular (Duthoo; Vral; Baeyens, 2022).

Nesse contexto, ao comparar a FM1 de amostras irradiadas com diferentes doses em culturas prolongadas, observa-se que aquelas expostas a doses mais altas tendem a apresentar uma maior frequência de células em primeira divisão. Isso reflete o impacto dos danos induzidos pela radiação, que retardam a progressão do ciclo celular e aumentam o tempo necessário para a recuperação antes que as células possam completar a divisão (Chao e outros, 2017; Duthoo; Vral; Baeyens, 2022; Purrott *et al.*, 1980; Wei *et al.*, 2017).

Embora os experimentos 1 e 2 tenham sido conduzidos com amostras independentes, ambos utilizaram as mesmas concentrações de Colcemid, diferenciando-se apenas pelo momento de sua adição. Dessa forma, a diferença nos resultados sugere que o tempo de adição do Colcemid foi o principal fator responsável pelas variações observadas. No E1, as condições experimentais resultaram em valores significativamente mais altos do que o esperado para as células da amostra Controle, que, comumente, apresentam uma redução na FM1 devido à progressão do ciclo celular. Esse resultado indica que a adição do Colcemid no início da cultura garantiu sua disponibilidade em quantidade suficiente para capturar as células em metáfase, contrastando com a tendência observada no E2.

Essa diferença fica ainda mais evidente pelo fato de que, no Experimento 1, mesmo com uma menor concentração de Colcemid (0,05 µg/mL) adicionada no tempo 0h, alcançou-se uma FM1 mínima na amostra Controle de 95%. Em contraste, nas condições de adição em 24h e 45h, a mediana foi de 65% e 82%, respectivamente, e não ultrapassou 88%, mesmo na concentração mais alta.

Ademais, o protocolo experimental utilizado no Experimento 1 demonstrou eficácia também para as amostras irradiadas, pois a disponibilidade de Colcemid foi suficiente para garantir o aprisionamento das células M1, mesmo após o período de recuperação celular, prevenindo sua progressão para divisões subsequentes. Isso se evidencia pelas médias de 94% e 100% de metáfases em primeira divisão encontradas nas amostras irradiadas nas duas concentrações testadas. Esses achados reforçam tanto a eficiência do protocolo do E1 quanto o papel essencial do Colcemid na dinâmica celular sob diferentes condições experimentais.

5.1.4 Concentrações *versus* Frequência de Metáfases em Primeira Divisão

Os dados estatísticos obtidos a partir do Experimento 2 não mostraram diferenças significativas entre as concentrações testadas, segundo o teste de Kruskal-Wallis (**Tabela 13**).

Neste contexto, serão apresentados os resultados estatísticos do Experimento 1, e a discussão incluirá considerações entre os dados dos Experimentos 1 e 2.

Nos resultados estatísticos do Experimento 1, foi inicialmente considerada a frequência de metáfases em primeira divisão em relação às concentrações testadas. O p -valor do teste de Shapiro-Wilk indicou ausência de distribuição normal para a amostra Controle na concentração de 0,10 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0,003$) e para a amostra exposta a 6 Gy na mesma concentração ($p = 0,001$) (**Tabela 3**, vide pág. 48). Como uma das amostras não atendeu ao critério de normalidade, foi necessário aplicar o teste de Mann-Whitney a todas as amostras analisadas.

A aplicação do teste de Mann-Whitney revelou valores de p inferiores a 0,05 ($p\text{-valor}_{\text{CONTROLE}} = 0,004$; $p\text{-valor}_{\text{IRRADIADA}} = 0,007$) em ambos os casos, sugerindo diferenças significativas entre as duas concentrações, tanto nas amostras Controle quanto nas Irradiadas. Com base nesses resultados e na comparação das medianas obtidas, pode-se inferir que, em ambas as culturas, a concentração de 0,10 $\mu\text{g/mL}$ apresentou melhores resultados, atingindo 100% de M1. No entanto, a concentração de 0,05 $\mu\text{g/mL}$ também demonstrou boa eficiência, alcançando medianas de 95% no Controle e 94% em 6 Gy.

A frequência de metáfases em primeira divisão (FM1) está diretamente relacionada às condições de uso do Colcemid, uma vez que sua ação permite o aprisionamento de metáfases. No entanto, tanto a concentração quanto o tempo de exposição influenciam a obtenção de valores mais elevados ou reduzidos. Fernandes e colaboradores (2008) ressaltam que, além do momento de adição, é essencial determinar uma faixa de concentração que seja suficientemente baixa para evitar a contração cromossômica, mas alta o bastante para garantir o acúmulo predominante de M1. Dessa forma, uma escolha inadequada pode comprometer a análise, reduzindo a precisão dos resultados.

Esse efeito é evidenciado pelo estudo de Heimers *et al.* (2005), que, ao utilizar uma concentração mais elevada de Colcemid (0,33 $\mu\text{g/mL}$) com exposição limitada a 3 horas em uma cultura de 72 horas, obteve apenas 54% de M1. Da mesma forma, Ferreira-Lucena e colaboradores (2024), apesar de empregarem uma concentração menor de Colcemid (0,01 $\mu\text{g/mL}$), adicionado no início da cultura, observaram uma baixa frequência de metáfases em primeira divisão (81,5% e 43,6%). Em contraste, no Experimento 2, com concentrações de 0,05 e 0,10 $\mu\text{g/mL}$ e adição em 24 h e 45 h após o início da cultura, a média mínima de FM1 foi de 90%, e a mediana não ultrapassou 93%, mesmo na concentração mais alta (**Tabela 4**, vide pág. 53).

No entanto, esses estudos, assim como o Experimento 2 (E2), contrastam com os resultados obtidos no Experimento 1. No E1, a combinação de concentrações adequadas (0,05 µg/mL ou 0,10 µg/mL) e tempo de exposição prolongado ao Colcemid (T = 0h) resultaram em índices superiores a 90%, destacando a importância do equilíbrio entre esses dois parâmetros para a eficácia do protocolo. Na concentração de 0,10 µg/mL, a maior disponibilidade de moléculas favoreceu a captura quase total das metáfases em primeira divisão. Por outro lado, a concentração de 0,05 µg/mL obteve desempenho semelhante, sugerindo que o tempo prolongado de exposição permitiu que o Colcemid interagisse com as células enquanto completavam o reparo e avançavam para a metáfase.

Além disso, os resultados do E1 indicam a viabilidade do uso da menor concentração (0,05 µg/mL) na metodologia aplicada, com potencial para aprimoramento. Essa conclusão baseia-se nos valores de FM1 obtidos, que, dentro das margens de erro, atendem às diretrizes estabelecidas pelo manual da IAEA (2011). Essas diretrizes recomendam que a frequência de metáfases em segunda divisão (M2) seja inferior a 5%, o que dispensa a aplicação da técnica de FPG, simplificando o procedimento e aumentando a eficiência da análise.

Por outro lado, no Experimento 2, as medianas observadas revelam uma proporção significativamente maior de metáfases em segunda divisão, variando de 35% a 7% (**Tabela 4**). Embora esses valores sejam relativamente altos, eles não comprometem a viabilidade de uma análise inicial. No entanto, para garantir a precisão na distinção das metáfases nos diferentes ciclos celulares, o uso da técnica de FPG torna-se indispensável para assegurar a acurácia na estimativa de dose.

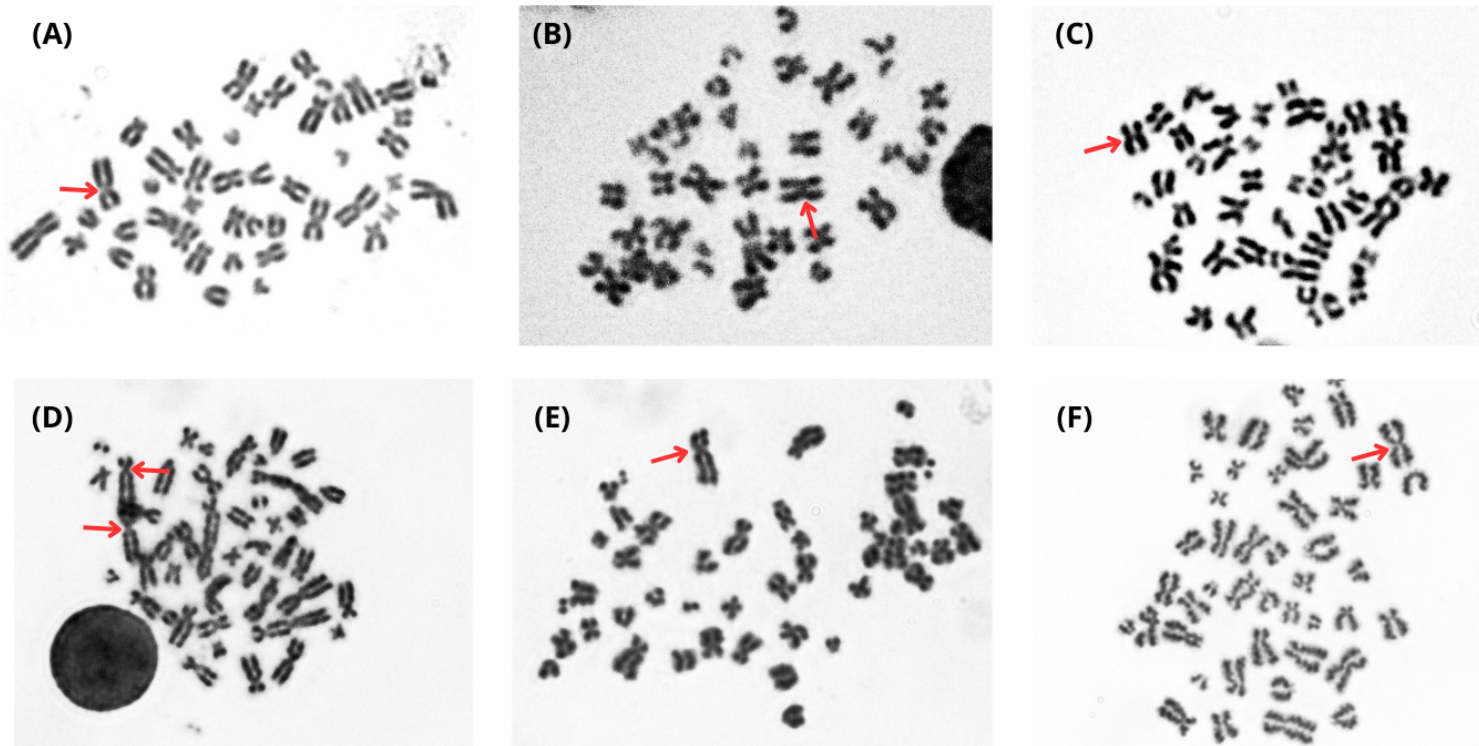
Portanto, a comparação entre os dois experimentos evidencia que o equilíbrio adequado entre a concentração de Colcemid e o tempo de exposição é crucial para otimizar a eficácia do protocolo. Nesse sentido, o Experimento 1 se destaca por permitir uma análise mais precisa, uma vez que o baixo percentual de células em M2 – fase em que as aberrações cromossômicas instáveis já não estão presentes – evita a subestimação da dose e dispensa a técnica de FPG.

A eliminação da técnica FPG da metodologia representa uma vantagem significativa, pois esta técnica apresenta limitações, como degradação da amostra, variação na intensidade da coloração e redução da qualidade da análise. Dessa forma, a metodologia adotada no Experimento 1 não apenas assegura maior precisão na estimativa de dose, como também preserva a qualidade das metáfases (Cavanagh *et al.*, 2011; IAEA, 2011; Rønne, 1989).

5.2 Qualidade das Metáfases tratadas com Colcemid adicionado no tempo 0h

A varredura da lâmina permitiu identificar e classificar as metáfases em primeira divisão com base no grau de contração dos cromossomos, categorizando-as como de contração satisfatória (**Figura 11**) ou não satisfatória. A contração não satisfatória pode dificultar a visualização dos centrômeros e, consequentemente, a identificação de cromossomos dicêntricos (**Figura 12**). Assim, a análise permitiu avaliar a influência do Colcemid na metodologia, uma vez que, ao considerar apenas as metáfases expostas ao Colcemid desde o início da cultura, seus efeitos tóxicos tendem a se intensificar e tornar a análise mais significativa.

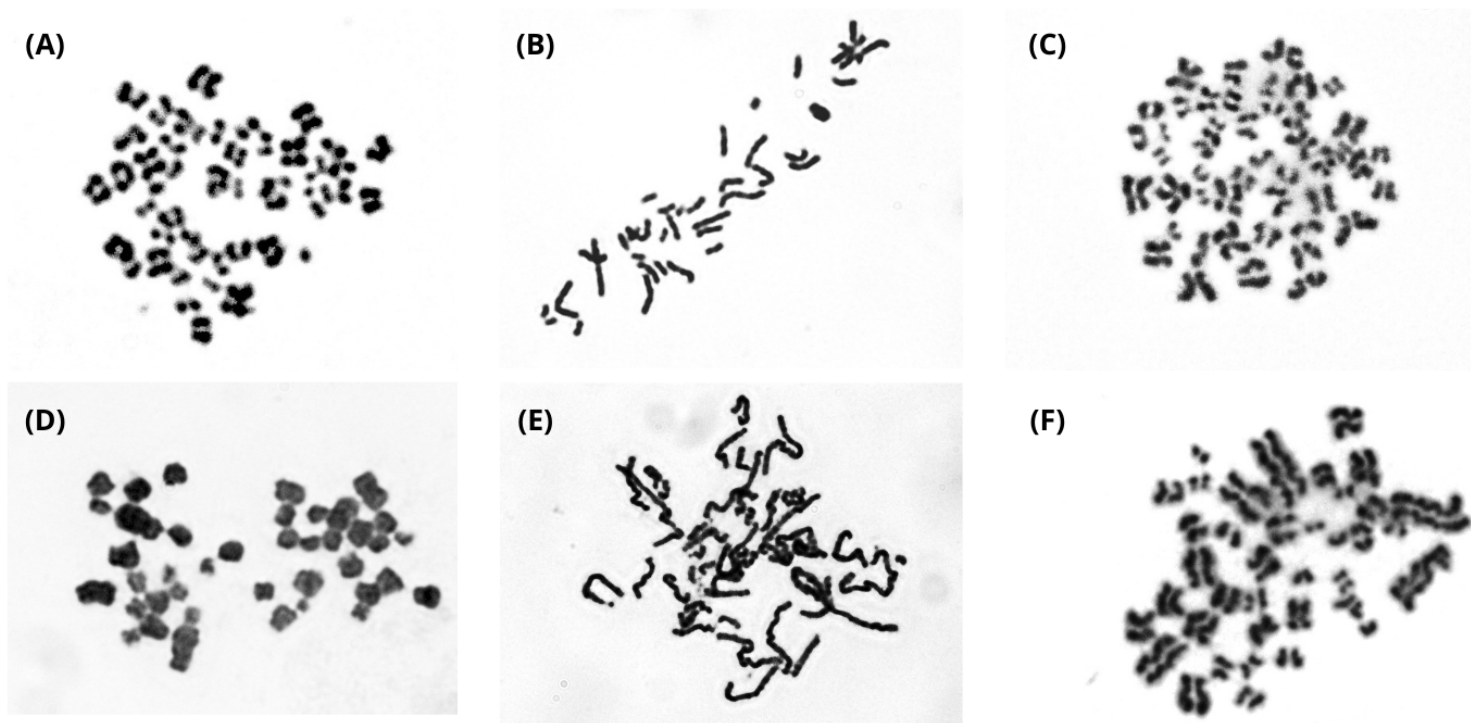
Figura 11 - Metáfases com cromossomos classificados como de ‘contração satisfatória’.



As setas vermelhas nas imagens acima indicam os centrômeros visíveis dos cromossomos. As imagens (A), (B) e (C) correspondem a metáfases obtidas de lâminas do grupo 'Controle', enquanto (D), (E) e (F) representam metáfases de lâminas submetidas a 6 Gy. Todas as amostras foram tratadas com Colcemid na concentração de 0,05 µg/mL.

Fonte: Autora.

Figura 12 - Metáfases com cromossomos classificados como de 'contração não satisfatória'.



As imagens (A), (B) e (C) correspondem a metáfases obtidas de lâminas do grupo 'Controle', enquanto (D), (E) e (F) representam metáfases de lâminas submetidas a 6 Gy. Todas as amostras foram tratadas com Colcemid na concentração de 0,05 $\mu\text{g/mL}$.

Fonte: Autora.

Os dados referentes à frequência de metáfases com contração satisfatória (FMCS) apresentaram resultados que, conforme indicado pelo teste de Shapiro-Wilk, sugerem uma distribuição normal. As médias obtidas indicaram que, em todas as amostras analisadas, a FMCS apresentou valores médios da ordem de 60% (**Tabela 5**). Esses valores sugerem que aproximadamente 60% das metáfases em primeira divisão estavam em condições adequadas para análise, o que possibilitou uma contagem precisa dos cromossomos.

Tabela 5 - Médias e desvios padrão da frequência de metáfases com contração satisfatória (FMCS) em função das diferentes doses de irradiação e concentrações de Colcemid, com resultados do teste de normalidade de Shapiro-Wilk indicados.

Irradiação	Concentração (µg/mL)	Média ± D.P (%)	Shapiro-Wilk (p-valor)
Controle	0,05	63,3 ± 7,4	0,389 ^{ns}
	0,1	66,3 ± 8,5	0,126 ^{ns}
6 Gy	0,05	63,1 ± 6,8	0,073 ^{ns}
	0,1	57,5 ± 7,5	0,625 ^{ns}

[s] significativo para $\alpha \leq 0,05$; [ns] não significativo para $\alpha > 0,05$

Fonte: Autora.

A partir desses resultados, foi possível proceder com o teste ANOVA para comparar os três fatores — irradiação, concentração e frequência das metáfases com contração satisfatória. No entanto, os resultados não indicaram diferenças significativas entre as diferentes concentrações e doses de irradiação avaliadas ($p > 0,05$).

A obtenção de valores tão próximos é surpreendente, considerando que, para cromossomos expostos a doses mais elevadas de radiação, é esperado que haja uma redução na qualidade e resolução das metáfases, dificultando a obtenção de metáfases com contração satisfatória. No entanto, na análise realizada, esse fator parece não ter exercido influência significativa (Fernandes; Lloyd; Amaral, 2008; Ferreira-Lucena *et al.*, 2024).

Além disso, embora tenha sido observada uma leve redução na frequência de metáfases com contração satisfatória na amostra irradiada com a concentração de 0,10 µg/mL de Colcemid, o que poderia sugerir que a combinação dos efeitos da radiação e da toxicidade do Colcemid tenha contribuído para o aumento da proporção de metáfases com contração não

satisfatória, os resultados do teste ANOVA indicam que essa redução não foi estatisticamente significativa, não evidenciando diferenças entre os grupos avaliados.

Portanto, a partir desses resultados, pode-se demonstrar a viabilidade de aplicar a menor concentração da metodologia empregada (0,05 µg/mL), uma vez que essa condição também proporcionou resultados satisfatórios na contagem de metáfases, além de minimizar os efeitos tóxicos do Colcemid.

Outro ponto relevante que reforça os achados deste estudo é a quantidade de metáfases com contração satisfatória contabilizadas. Esses resultados podem ser comparados ao estudo recente de Ferreira-Lucena *et al.* (2024), que, sob as mesmas condições de irradiação (6Gy) e cultura prolongada com adição de Colcemid no início do cultivo, mas utilizando uma concentração de 0,01 µg/mL, obteve cerca de 34 metáfases em primeira divisão em uma única lâmina. No presente experimento, com uma concentração maior de 0,05 µg/mL, foi registrada uma média de 53 metáfases em primeira divisão com contração satisfatória. Esse resultado atende às recomendações do manual da IAEA (2011), que sugere a análise de 50 células ou 30 dicêntricos para uma triagem inicial em casos de exposição. Dessa forma, a quantidade média obtida permite realizar a análise a partir de uma única lâmina, otimizando o processo.

Esses achados indicam que o aumento na concentração de Colcemid resultou em um incremento significativo no número de metáfases observadas, sem comprometer sua qualidade. Além disso, a comparação sugere que a concentração de 0,05 µg/mL de Colcemid, dentro dos parâmetros analisados, podem ser mais vantajosas para a obtenção de metáfases adequadas, reduzindo a necessidade de múltiplas lâminas e otimizando o processo ao diminuir o tempo gasto com preparação e coloração.

6 CONCLUSÃO

- A concentração de 0,05 $\mu\text{g/mL}$ de Colcemid demonstrou ser a mais adequada para as condições aplicadas neste experimento. Essa concentração permitiu alcançar bons resultados tanto no índice mitótico, especialmente sob exposição a altas doses, quanto na frequência de metáfases em primeira divisão (FM1), com valores muito próximos aos obtidos com a maior concentração testada (0,1 $\mu\text{g/mL}$). Contudo, a menor concentração apresenta a vantagem de reduzir os efeitos tóxicos associados ao uso do Colcemid, tornando-a mais segura e eficiente;
- A adição do Colcemid no início da cultura foi determinante para obter frequências de metáfases em primeira divisão acima de 90%, independentemente da concentração utilizada. Essa abordagem elimina a necessidade da técnica de coloração FPG, já que os valores de metáfases em segunda divisão (M2) ficaram consistentemente abaixo do limite de 5% estabelecido como critério, problema observado em outros tempos de adição testados;
- A combinação da concentração 0,05 $\mu\text{g/mL}$ com a adição precoce do Colcemid, permitiu superar desafios experimentais importantes, como: (1) o baixo índice mitótico, observado se utilizada uma concentração menor, mesmo que adicionada precocemente, (2) a redução da frequência de M1 em amostras não irradiadas, em culturas prolongadas, e em amostras irradiadas com doses elevadas. Portanto, essa metodologia otimizada demonstrou ser eficaz na captura de metáfases em primeira divisão, além de ser eficiente tanto para amostras irradiadas quanto para não irradiadas, podendo ser aplicada para a estimativa de doses desconhecidas de maneira confiável;
- A qualidade das metáfases pode ser classificada como satisfatória em ambas as condições analisadas, uma vez que aproximadamente 60% das metáfases na primeira divisão apresentaram-se adequadas para análise. Isso se deve à boa condensação dos cromossomos, que possibilitou a observação clara dos centrômeros. Além disso, os valores médios obtidos indicam a viabilidade da análise a partir de uma única lâmina, contribuindo para a otimização do processo.

REFERÊNCIAS

- AKHMANOVA, A.; STEINMETZ, M. O. Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 16, n. 12, p. 711-726, 2015. <https://doi.org/10.1038/nrm4084>
- AKOBENG, A. K. Understanding type I and type II errors, statistical power and sample size. **Acta Paediatrica**, v. 105, n. 6, p. 605-609, 2016. <https://doi.org/10.1111/apa.13384>
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A. D.; LEWIS, J.; MORGAN, D.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.; WILSON, J.; HUNT, T. **Biologia Molecular da Célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- AL-AMMAR, M. A.; ABDULAMEER, S. J. The ideal time to add Colcemid to obtain a division of the lymphocyte cells. **Wasit Journal for Pure Sciences**, v. 2, n. 3, 2023.
- AMARAL, A. Trends in biological dosimetry: an overview. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, p. 119-124, 2002. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132002000500017>
- AMARAL, A. Physical and biological dosimetry for risk perception in radioprotection. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 229-234, 2005. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132005000700034>
- ARSHAM, M. S.; BARCH, M. J.; LAWCE, H. J. **The AGT Cytogenetics Laboratory Manual**. 4. ed. Canadá: John Wiley & Sons, 2017.
- AVERBECK, D.; CANDÉIAS, S.; CHANDNA, S.; FORAY, N.; FRIEDL, A. A.; HAGHDOOST, A.; JEGGO, P. A.; LUMNICZKY, K.; PARIS, F.; QUINTENS, R.; SABATIER, L. Establishing mechanisms affecting the individual response to ionizing radiation. **International Journal of Radiation Biology**, v. 96, n. 3, p. 297-323, 2020. <https://doi.org/10.1080/09553002.2019.1704908>
- BALAJEE, A. S.; HADJIDEKOVA, V. Retrospective cytogenetic analysis of unstable and stable chromosome aberrations in the victims of radiation accident in Bulgaria. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 861, p. 503295, 2021.
- BANERJEE, A. C.; BHATTACHARYYA, B. Colcemid and colchicines binding to tubulin: similarity and dissimilarity. **FEBS Letters**, v. 99, n. 2, 1979.
- BARNUM, K. J.; O'CONNELL, M. J. Cell cycle regulation by checkpoints. **Cell cycle control: mechanisms and protocols**, p. 29-40, 2014. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0888-2_2

BEATON, L. A.; FERRAROTTO, C.; MARRO, L.; SAMIEE, S.; MALONE, S.; GRIMES, S.; MALONE, K.; WILKINS, R. C.. Chromosome damage and cell proliferation rates in in vitro irradiated whole blood as markers of late radiation toxicity after radiation therapy to the prostate. **International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics**, v. 85, n. 5, p. 1346-1352, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2012.09.026>

BENDER, M. A.; GOOCH, P. C. Persistent chromosome aberrations in irradiated human subjects. **Radiation Research**, v. 16, n. 1, p. 44-53, 1962. <https://doi.org/10.2307/3571128>

BRANZEI, D.; FOIANI, M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 9, n. 4, p. 297-308, 2008. <https://doi.org/10.1038/nrm2351>

BRINKLEY, B. R.; STUBBLEFIELD, E.; HSU, T. C. The effects of colcemid inhibition and reversal on the fine structure of the mitotic apparatus of Chinese hamster cells in vitro. **Journal of ultrastructure research**, v. 19, n. 1-2, p. 1-18, 1967. [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(67\)80057-1](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(67)80057-1)

BUSHONG, S. C. Ciência Radiológica Para Tecnólogos. 9ª ed. [Tradução], 728 p. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, abr. 2010.

CANVA. 2025. Disponível em: <https://www.canva.com>. Acesso em: 10 jan. 2025.

CAVANAGH, B. L.; WALKER, T.; NORAZIT, A.; MEEDENIYA, A. C.B. Thymidine analogues for tracking DNA synthesis. **Molecules**, v. 16, n. 9, p. 7980-7993, 2011. <https://doi.org/10.3390/molecules16097980>

CHAO, H. X.; POOVEY, C. E.; PRIVETTE, A. A.; GRANT, G. D.; CHAO, H. Y.; COOK, J. G.; PURVIS, J. E. Orchestration of DNA damage checkpoint dynamics across the human cell cycle. **Cell systems**, v. 5, n. 5, p. 445-459. e5, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2017.09.015>

CHATURVEDI, A.; JAIN, V. Effect of ionizing radiation on human health. **International journal of plant and environment**, v. 5, n. 03, p. 200-205, 2019.

CHEN, D.; ZHANG, C. A simple and convenient method for gaining pure populations of lymphocytes at the first mitotic division in vitro. **Mutation Research Letters**, v. 282, n. 3, p. 227-229, 1992. [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(92\)90100-V](https://doi.org/10.1016/0165-7992(92)90100-V)

CHEN, Y.; YAN, X. K.; DU, J.; WANG, Z. D.; ZHANG, X. Q.; ZENG, F. G.; ZHOU, P. K. Biological dose estimation for accidental supra-high dose gamma-ray exposure. **Radiation measurements**, v. 46, n. 9, p. 837-841, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.radmeas.2011.04.001>

CHOUDHARY, S. Deterministic and stochastic effects of radiation. **Cancer Therapy & Oncology International Journal**, v. 12, n. 2, p. 31-32, 2018. <https://doi.org/10.19080/CTOIJ.2018.12.555834>

CNEN - COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR. NN 3.01: Requisitos básicos de radioproteção e segurança radiológica de fontes de radiação, Resol. CNEN - CNEN 323/24, 18 abr. de 2024.

DA MATTA, M. C.; DÜMPELMANN, M.; LEMOS-PINTO, M. M. P.; FERNADES, T. S.; AMARAL, A. Processamento de imagens em Biodosimetria: Influência da qualidade das preparações cromossômicas. **Scientia Plena**, v. 9, n. 8 (b), 2013.

DECKBAR, D.; JEGGO, P. A.; LÖBRICH, M. Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 46, n. 4, p. 271-283, 2011. <https://doi.org/10.3109/10409238.2011.575764>

DE LEMOS PINTO, M. M. P.; SANTOS, N. F. G.; AMARAL, A. Current status of biodosimetry based on standard cytogenetic methods. **Radiation and environmental biophysics**, v. 49, n. 4, p. 567-581, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00411-010-0311-3>.

DUTHOO, E.; VRAL, A.; BAEYENS, A. An updated view into the cell cycle kinetics of human T lymphocytes and the impact of irradiation. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 7687, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11364-9>

ELGAZZAR, A. H.; KAZEM, N. Biological effects of ionizing radiation. In: **The Pathophysiologic Basis of Nuclear Medicine**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2006. p. 540-548. https://doi.org/10.1007/978-3-540-47953-6_23

ELLEDGE, S. J. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. **Science**, v. 274, n. 5293, p. 1664-1672, 1996. <https://doi.org/10.1126/ciência.274.5293.1664>

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, p. 97-102, 2008. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132008000700016>

FERREIRA-LUCENA, L.R.; XAVIER, A. I. S. F.; NETTO, A. M.; MAGNATA, S. S. L. P.; LIMA, G.; AMARAL, A. Extending culture time to improve mitotic index for cytogenetic dosimetry. **International Journal of Radiation Biology**, v. 100, n. 7, p. 1029-1040, mai. 2024. <https://doi.org/10.1080/09553002.2024.2356545>

FLORIAN, S.; MITCHISON, T. J. Anti-microtubule drugs. **The Mitotic Spindle: Methods and Protocols**, p. 403-421, 2016. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3542-0_25

GNANASEKARAN, T. S. Cytogenetic biological dosimetry assays: recent developments and updates. **Radiation Oncology Journal**, v. 39, n. 3, p. 159, 2021. <https://doi.org/10.3857/roj.2021.00339>

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. de. Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. **Ribeirão Preto: FUNPEC**, v. 201, 2002.

HAGELSTROM, R. T.; ASKIN, K. F.; WILLIAMS, A. J.; RAMAIAH, L.; DESAINTE, C.; GOODWIN, E. H.; ULLRICH, R. L.; BAILEY, S. M. DNA-PKcs and ATM influence generation of ionizing radiation-induced bystander signals. **Oncogene**, v. 27, n. 53, p. 6761-6769, 2008. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.276>

HAN, W.; YU, K. N. Ionizing radiation, DNA double strand break and mutation. **Advances in Genetics research**, v. 4, p. 197-210, 2010.

HAYATA, I.; KAJIMA, J.; OKABE, N. Distinction of metaphases in the first cell cycle for automated system in radiation dosimetry. **International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part C. Radiation Physics and Chemistry**, v. 39, n. 6, p. 517-520, 1992. [https://doi.org/10.1016/1359-0197\(92\)90106-P](https://doi.org/10.1016/1359-0197(92)90106-P)

HEIJINK, A. M.; KRAJEWSKA, M.; VAN VUGT, M. ATM. The DNA damage response during mitosis. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 750, n. 1-2, p. 45-55, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2013.07.003>

HEIMERS, A.; BREDE, HJ.; GIESEN, U.; HOFFMANN, W. Influence of mitotic delay on the results of biological dosimetry for high doses of ionizing radiation. **Radiation and environmental biophysics**, v. 44, p. 211-218, 2005. <https://doi.org/10.1007/s00411-005-0014-3>

HERATE, C.; SABATIER, L. Retrospective biodosimetry techniques: Focus on cytogenetics assays for individuals exposed to ionizing radiation. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 783, p. 108287, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2019.108287>

IAEA - INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies. [S.I: s.n.], 2011.

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

ICRP - INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION (ICRP). Annals of the ICRP - Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP, v.37, n. 2-4, 2007.

JOHNSON, D. G.; WALKER, C. L. Cyclins and cell cycle checkpoints. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 39, n. 1, p. 295-312, 1999. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.39.1.295>

JORDAN, M. A. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. **Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents**, v. 2, n. 1, p. 1-17, 2002. <https://doi.org/10.2174/1568011023354290>

JORDAN, M. A.; WILSON, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. **Nature reviews cancer**, v. 4, n. 4, p. 253-265, 2004. <https://doi.org/10.1038/nrc1317>

KANDA, R.; JIANG, T.; HAYATA, I.; KOBAYASHI, S. Effects of Colcemid concentration on chromosome aberration analysis in human lymphocytes. **Journal of Radiation Research**, v. 35, p. 41-47, 1994. <https://doi.org/10.1269/jrr.35.41>

KROKAN, H. E.; BJØRÅS, M. Base excision repair. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 5, n. 4, p. a012583, 2013. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012583>

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. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 182, n. 1, p. 128-138, 2018. <https://doi.org/10.1093/rpd/ncy137>

LEE, Y.; JIN, J. W.; WILKINS, R. C.; JANG S. Validation of the dicentric chromosome assay for radiation biological dosimetry in South Korea. **Journal of Radiation Research**, v. 60, n. 5, p. 555-563, 2019. <https://doi.org/10.1093/jrr/rrz039>

LEMOS PINTO, M. M. P.; AMARAL, A. Análise Citogenética na Investigação de Incidentes Radiológicos. **NewsLab**, v. 18, n. 10, p. 76-86, 2011.

LEMOS-PINTO, M. M.P.; CADENA, M.; SANTOS, N.; FERNANDES, T. S.; BORGES, E.; AMARAL, A. A dose-response curve for biodosimetry from a 6 MV electron linear accelerator. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [s. l.], v. 48, n. 10, p. 908–914, 2015. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20154470>

LEUNG, Y. Y.; HUI, L. L. Y.; KRAUS, V. B. Colchicine—update on mechanisms of action and therapeutic uses. In: **Seminars in arthritis and rheumatism**. WB Saunders, 2015. p. 341-350. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2015.06.013>

LI, L.; STORY, M.; LEGERSKI, R. J. Cellular responses to ionizing radiation damage. **International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics**, v. 49, n. 4, p. 1157-1162, 2001.

LLOYD, D. C.; PURROTT, R. J. Chromosome aberration analysis in radiological protection dosimetry. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 1, n. 1, p. 19-28, 1981. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.rpd.a079952>

LLOYD, D. C.; EDWARDS, A. A.; MOQUET, J. E.; GUERRERO-CARBAJAL, Y. C.. The role of cytogenetics in early triage of radiation casualties. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 52, n. 5, p. 1107-1112, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0969-8043\(00\)00054-3](https://doi.org/10.1016/S0969-8043(00)00054-3)

MATTHEWS, H. K.; BERTOLI, C.; DE BRUIN, R. AM. Cell cycle control in cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 23, n. 1, p. 74-88, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00404-3>

MAVRAGANI, I. V.; NIKITAKI, Z.; KALOSPYROS, S. A.; GEORGAKILAS, A. G. Ionizing radiation and complex DNA damage: from prediction to detection challenges and biological significance. **Cancers**, v. 11, n. 11, p. 1789, 2019. <https://doi.org/10.3390/cancers11111789>

MU, H.; SUN, J.; LI, L.; YIN, J.; HU, N.; ZHAO, W.; DING, D.; YI, L. Ionizing radiation exposure: hazards, prevention, and biomarker screening. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 15294-15306, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2097-9>

NATARAJAN, A. T. Chromosome aberrations: past, present and future. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 504, n. 1-2, p. 3-16, 2002.

OBE, G.; PFEIFFER, P.; SACAGE, J.R.K.; JOHANNES, C.; GOEDECKE, W.; JEPPESEN, P.; NATARAJAN, A.T.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, W.; FOLLE, G.A.; DRETS, M.E.. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 504, n. 1-2, p. 17-36, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(02\)00076-3](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(02)00076-3)

OBRADOR, E.; SALVADOR-PALMER, R.; VILLAESCUSA, J. I.; GALLEGU, E.; PELLICER, B.; ESTRELA, J. M.; MONTORO, A. Nuclear and Radiological Emergencies: Biological Effects, Countermeasures and Biodosimetry. **Antioxidants**, v. 11, n. 6, p. 1098, 2022. <https://doi.org/10.3390/antiox11061098>

O'DONNELL, M.; LANGSTON, L.; STILLMAN, B. Principles and concepts of DNA replication in bacteria, archaea, and eukarya. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 5, n. 7, p. a010108, 2013. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010108>

OKUNO, E. Efeitos biológicos das radiações ionizantes: acidente radiológico de Goiânia. **Estudos avançados**, v. 27, p. 185-200, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0103-40142013000100014>

PERNOT, E.; HALL, J.; BAATOUT, S.; BENOTMANE, M. A.; BLANCHARDON, E.; BOUFFER, S.; EL-SAGHIRE, H. Ionizing radiation biomarkers for potential use in epidemiological studies. **Mutation Research**, v. 751, n. 2, p. 258-286, out./dez. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2012.05.003>

POUGET, J.P.; MATHER, S. J. General aspects of the cellular response to low-and high-LET radiation. **European journal of nuclear medicine**, v. 28, p. 541-561, 2001. <https://doi.org/10.1007/s002590100484>

POWELL, S.; MCMILLAN, T. J. DNA damage and repair following treatment with ionizing radiation. **Radiotherapy and Oncology**, v. 19, n. 2, p. 95-108, 1990. [https://doi.org/10.1016/0167-8140\(90\)90123-E](https://doi.org/10.1016/0167-8140(90)90123-E)

PUJOL-CANADELL, M.; PERRIER, J. R.; CUNHA, L.; SHURYAK, I.; HARKEN, A.; GARTY, G.; BRENNER, D. J. Cytogenetically-based biodosimetry after high doses of radiation. **PLoS one**, v. 15, n. 4, p. e0228350, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228350>

PURROTT, R. J.; VULPIS, N.; LLOYD, D. C. Chromosome dosimetry: the influence of culture media on the proliferation of irradiated and unirradiated human lymphocytes. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 1, n. 3, p. 203-208, 1981. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.rpd.a079977>

RIEDER, C. L.; PALAZZO, R. E. Colcemid and the mitotic cycle. **Journal of cell science**, v. 102, n. 3, p. 387-392, 1992. <https://doi.org/10.1242/jcs.102.3.387>

RIS, H. CIL:35370, Homo sapiens, cervical carcinoma. University of Wisconsin, Madison, WI, 2011. **CIL. Dataset**. Disponível em: <https://doi.org/doi:10.7295/W9CIL35370>. Acesso em: 19 dez. 2024.

RØNNE, I. Chromosome preparation and high resolution banding techniques. A review. **Journal of dairy science**, v. 72, n. 5, p. 1363-1377, 1989. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(89\)79243-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79243-2)

ROY, L.; GRÉGOIRE, E.; GRUEL, G.; ROCH-LEFEVRE, S.; VOISIN, PA.; BUSSET, A.; MARTIN, C.; VOISIN, PH. Effect of lymphocytes culture variations on the mitotic index and on the dicentric yield following gamma radiation exposure. **Radiation protection dosimetry**, v. 151, n. 1, p. 135-143, 2012. <https://doi.org/10.1093/rpd/ncr460>

RYAN, T. L.; PANTELIIAS, A. S.; TERZOUID, G. I.; PANTELIIAS, G. E.; BALAJEE, A. S. Use of human lymphocyte G0 PCCs to detect intra-and inter-chromosomal aberrations for early radiation biodosimetry and retrospective assessment of radiation-induced effects. **PLoS One**, v. 14, n. 5, p. e0216081, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216081>

SAKAMOTO-HOJO, E. T. Lessons from the accident with ¹³⁷Cesium in Goiania, Brazil: Contributions to biological dosimetry in case of human exposure to ionizing radiation. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 836, part. A, p. 72-77, dez. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.05.019>

SANTIVASI, W. L.; XIA, F. Ionizing radiation-induced DNA damage, response, and repair. **Antioxidants & redox signaling**, v. 21, n. 2, p. 251-259, 2014. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5668>

SPEIT, G. Considerations on the mechanism of differential Giemsa staining of BrdU-substituted chromosomes. **Human genetics**, v. 67, p. 264-269, 1984. <https://doi.org/10.1007/BF00291353>

STEWART, C. C.; CRAMER, S. F.; STEWARD, P. G. The response of human peripheral blood lymphocytes to phytohemagglutinin: determination of cell numbers. **Cellular Immunology**, v. 16, n. 2, p. 237-250, 1975. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(75\)90115-X](https://doi.org/10.1016/0008-8749(75)90115-X)

SWARTZ, H. M.; WILLIAMS, B. B.; NICOLALDE, R. J.; DEMIDENKO, E.; FLOOD, A. B. Overview of biodosimetry for management of unplanned exposures to ionizing radiation. **Radiation Measurements**, v. 46, n. 9, p. 742-748, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.radmeas.2011.03.011>

SWARTZ, H. M.; WILLIAMS, B. B.; FLOOD, A. B. Overview of the principles and practice of biodosimetry. **Radiation and environmental biophysics**, v. 53, p. 221-232, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00411-014-0522-0>

TAUHATA, L.; SALATI, I. P. A.; DI PRINZIO, R.; DI PRINZIO, A. R. Radioproteção e dosimetria: fundamentos. 10^a revisão, p. 345. Rio de Janeiro: IRD/CNEN, abr. 2014.

VANHAVERE, F; VAN HOEY, O. Advances in personal dosimetry towards real-time dosimetry. **Radiation Measurements**, v. 158, p. 106862, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.radmeas.2022.106862>

VINNIKOV, V. A.; AINSBURY, E. A.; MAZNYK, A.; LLOYD, D. C.; ROTHKAMM, K. Limitations associated with analysis of cytogenetic data for biological dosimetry. **Radiation research**, v. 174, n. 4, p. 403-414, 2010. <https://doi.org/10.1667/RR2228.1>

VINNIKOV, V. A.; MAZNYK, N. A. Cytogenetic dose-response in vitro for biological dosimetry after exposure to high doses of gamma-rays. **Radiation protection dosimetry**, v. 154, n. 2, p. 186-197, 2013. <https://doi.org/10.1093/rpd/ncs200>

VINNIKOV, V.; BELYAKOV, O. Clinical applications of biological dosimetry in patients exposed to low dose radiation due to radiological, imaging or nuclear medicine procedures. In: **Seminars in Nuclear Medicine**. WB Saunders, 2022. p. 114-139.

VOISIN, P. Standards in biological dosimetry: A requirement to perform an appropriate dose assessment. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 793, p. 115-122, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.06.012>

WALCZAK, C. E.; CAI, S.; KHODJAKOV, A. Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 11, n. 2, p. 91-102, 2010. <https://doi.org/10.1038/nrm2832>

WEI, YQ.; CEN, X. N.; LIU, HH.; SUN, YH.; SHI, YJ.; LIU, W.; DONG, YJ.; REN, HY. Irradiation of peripheral blood mononuclear cells with 7.5 Gy X-rays prior to donor lymphocyte infusion inhibits proliferation while preserving cytotoxicity, and improves the effectiveness of HSCT in patients with hematological malignancies. **Oncology Letters**, v. 13, n. 6, p. 4101-4108, 2017. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.5966>

WRIGHT, W. D.; SHAH, S. S.; HEYER, W. Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 27, p. 10524-10535, 2018. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.000372>

YAO, B.; JIANG, B. R.; AI, H. S.; LI, Y. F.; LIU, G. X.; MAN, Q. H.; QIU, L. J. Biological dose estimation for two severely exposed patients in a radiation accident in Shandong Jining, China, in 2004. **International Journal of Radiation Biology**, v. 86, n. 9, p. 800-808, 2010. <https://doi.org/10.3109/09553002.2010.481320>

APÊNDICES

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Departamento de Energia Nuclear
Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa **INFLUÊNCIA DO COLCEMID EM ANÁLISES DE DOSIMETRIA CITOGENÉTICA: OTIMIZAÇÃO METODOLÓGICA**, que está sob a responsabilidade do (a) pesquisador (a):

- GIOVANNA SIQUEIRA DE LIMA, Cidade Universitária, Recife - PE, 50740-540, Telefone: (81) 98945-5132, e-mail: giovanna.slima@ufpe.br.

Está sob a orientação de:

- ADEMIR DE JESUS AMARAL, E-mail: ademir.amaral@ufpe.br
- SIMEY DE SOUZA LEÃO PEREIRA MAGNATA, E-mail: simey.pmagnata@ufpe.br

Todas as suas dúvidas podem ser esclarecidas com o responsável por esta pesquisa. Apenas quando todos os esclarecimentos forem dados e você concorde com a realização do estudo, pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

O (a) senhor (a) estará livre para decidir participar ou recusar-se. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema, desistir é um direito seu, bem como será possível retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa, também sem nenhuma penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

DESCRIÇÃO DA PESQUISA:

Esta pesquisa busca investigar a influência de alguns padrões sugeridos para a realização da metodologia de dosimetria citogenética, essa técnica é utilizada na avaliação de dose individual absorvida através de parâmetros biológicos induzidos pela radiação ionizante. Nesta pesquisa não será produzido dados genéticos, e sim a morfologia cromossômica que servirá apenas de indicador da interação da radiação ionizante para dosagem biológica (biodosimetria). Embora a técnica de dosimetria citogenética seja empregada há cerca de 60 anos, o Colcemid, uma substância utilizada no cultivo celular, apresenta uma influência controversa na qualidade das imagens e na avaliação da dose absorvida, sendo ainda objeto de estudos. Nesse contexto, esta pesquisa tem como intuito estudar os parâmetros metodológicos associados à concentração e tempo de adição do Colcemid. Assim como seus reflexos no índice mitótico, na frequência e qualidade das metáfases contabilizadas, a fim de elucidar a técnica e colaborar com outras técnicas voltadas para as análises cromossômicas.

PROCEDIMENTOS PARA A COLETA:

- A coleta será realizada no Laboratório de Modelagem e Biodosimetria Aplicada - LAMBDA, por profissional capacitado para esse processo. Serão coletados 9mL de sangue periférico através de punção da veia do braço;
- A amostra coletada passará por um Analisador Hematológico Automático, para realizar um hemograma, um exame que analisa os tipos e as quantidades dos componentes sanguíneos, com o intuito de averiguar a viabilidade do uso da amostra na pesquisa;
- Apresentando resultados viáveis, essa amostra será irradiada, in vitro, ou seja, fora do seu corpo, você não estará exposto à radiação ionizante em nenhum momento durante a coleta ou após a mesma;
- Após a irradiação, a sua amostra de sangue será cultivada em laboratório, para que as células mantenham-se vivas e em crescimento fora do seu corpo por um período;
- Após o cultivo das células elas serão analisadas através da técnica de citogenética.

Os dados obtidos na análise hematológica e citogenética serão mantidos em sigilo e confidencialidade, assim como todos os registros de imagens adquiridos durante esta pesquisa, serão utilizados apenas para os propósitos descritos neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Mesmo que estes dados sejam utilizados para propósitos de divulgação e/ou publicação científica, sua identidade permanecerá sempre em sigilo.

RISCOS

O risco da coleta de sangue pode ser um hematoma no local da punção, devido ao extravasamento do sangue debaixo da pele, a lesão pode causar desconforto e dor. Podendo ser minimizado seguindo as orientações após o procedimento de coleta.

BENEFÍCIOS

Sua participação na pesquisa contribuirá para:

- Identificar concentrações e tempo de adição de Colcemid que permitam contribuir significativamente para melhoria da qualidade das imagens a serem analisadas em dosimetria citogenética, de sorte a evitar o excesso de condensação cromossômica e que as células passem por mais de um ciclo de divisão celular, proporcionando um alto índice mitótico;
- Contribuir para a consolidação do Laboratório de Modelagem e Biodosimetria Aplicada (LAMBDA), do Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco, como referência Nacional em atividades de pesquisa e desenvolvimento em dosimetria citogenética;
- Fortalecer a participação do LAMBDA-DEN-UFPE na Rede Global de Laboratórios de Biodosimetria (BioDose Net) da Organização Mundial da Saúde (BIODOSE NET-OMS);
- Colaborar com as ações da Agência Internacional de Energia Atômica voltadas para otimização das metodologias em biodosimetria, mais especificamente a dosimetria citogenética de análise de frequência de dicêntricos em linfócitos do sangue periférico irradiado;
- Não haverá benefícios diretos para os voluntários desta pesquisa.

Esclarecemos que os participantes dessa pesquisa têm plena liberdade de se recusar a participar do estudo e que esta decisão não acarretará penalização por parte dos pesquisadores. Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Todos os sujeitos participantes desta pesquisa serão esclarecidos sobre a mesma, inclusive sobre os resultados de suas análises, caso desejem. As lâminas provenientes dessa pesquisa, ficarão armazenadas no Laboratório de Modelagem e Biodosimetria Aplicada - LAMBDA, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Ademir

de Jesus Amaral, no endereço: Laboratório de Modelagem e Biodosimetria Aplicada - LAMBDA, Cidade Universitária, Recife - PE, 50740-540, pelo período de mínimo 5 anos após o término da pesquisa.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, o (a) senhor (a) poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cephumanos.ufpe@ufpe.br).**

(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo INFLUÊNCIA DO COLCEMID EM ANÁLISES DE DOSIMETRIA CITOGENÉTICA: OTIMIZAÇÃO METODOLÓGICA, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Local e data: _____

Assinatura do participante: _____



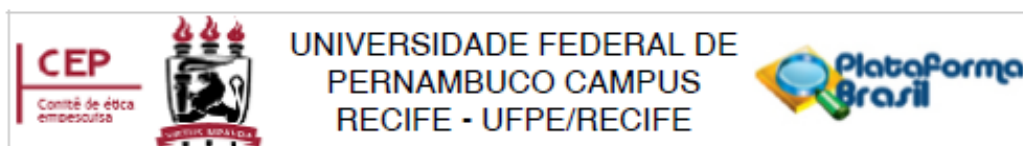
Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Impressão Digital

Nome:	Nome:
Data:	Data:
Assinatura:	Assinatura:

ANEXOS

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 6.837.895

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_CEP_GIOVANNASIQUEIRA.pdf	22/09/2023 10:54:57	GIOVANNA SIQUEIRA DE LIMA	Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA.pdf	22/09/2023 10:45:48	GIOVANNA SIQUEIRA DE LIMA	Aceito
Outros	declaracao_vinculo.pdf	17/07/2023 07:31:03	GIOVANNA SIQUEIRA DE LIMA	Aceito
Outros	lattes_luciano.pdf	17/07/2023 07:29:03	GIOVANNA SIQUEIRA DE LIMA	Aceito
Outros	lattes_giovanna.pdf	17/07/2023 07:28:51	GIOVANNA SIQUEIRA DE LIMA	Aceito
Outros	lattes_simey.pdf	17/07/2023 07:28:39	GIOVANNA SIQUEIRA DE LIMA	Aceito
Outros	lattes_ademir.pdf	17/07/2023 07:28:13	GIOVANNA SIQUEIRA DE LIMA	Aceito
Outros	termo_confidencialidade.pdf	17/07/2023 07:26:44	GIOVANNA SIQUEIRA DE LIMA	Aceito
Outros	carta_de_anuencia.pdf	17/07/2023 07:26:12	GIOVANNA SIQUEIRA DE LIMA	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	17/07/2023 07:24:49	GIOVANNA SIQUEIRA DE LIMA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 02 de Outubro de 2023

Assinado por:

LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador(a))

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-800
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 Fax: (81)2126-3163 E-mail: oephumanos.ufpe@ufpe.br