



CNEN/SP

ipen Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares

AUTARQUIA ASSOCIADA A UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

**DOSIMETRIA BIOLÓGICA EM PROTEÇÃO RADIOLÓGICA:
ELABORAÇÃO DE CURVAS DOSE-RESPOSTA
PARA ^{60}Co e ^{137}Cs**

MÁRCIA AUGUSTA DA SILVA

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear.

Orientador:
Dr. Orlando Rebelo dos Santos

**São Paulo
1997**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

DOSIMETRIA BIOLÓGICA EM PROTEÇÃO RADIOLÓGICA: ELABORAÇÃO DE CURVAS DOSE-RESPOSTA PARA ^{60}Co e ^{137}Cs

MÁRCIA AUGUSTA DA SILVA



Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear.

Orientador:
Dr. Orlando Rebelo dos Santos

São Paulo

1997

"Assim que você pensar que sabe como são realmente as coisas, descubra outra maneira de olhar para elas"

Robin Williams

A minha família, em especial aos meus pais Orlando

(in memoriam) e ao meu irmão Márcio pelo carinho

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Orlando Rebelo dos Santos, pela orientação, confiança, apoio e incentivo dispensados.

À Dra. Kayo Okazaki, pelo constante apoio no desenvolvimento deste trabalho, pela amizade e confiança.

Ao Marcos Xavier, pela atenção dispensada na irradiação das amostras.

Aos amigos Nanci, Lígia, Bete, Johny, Simone, Rute, Paulo, Eric e Érika, pelo auxílio na elaboração do trabalho experimental.

Aos amigos da Coordenadoria de Bioengenharia, especialmente à Marisa Lemes, Miriam F. Suzuki, Ieda R.T. Venâncio e Paulo Cesar de Arruda Paes pela amizade e colaboração sempre presentes.

À Patrícia Alves do Nascimento, pela sincera amizade, confiança e constante apoio.

Ao Dr. Carlos Henrique de Mesquita pela assistência dada nas análises estatísticas dos resultados.

Ao Roberto Vicente pelo auxílio na avaliação dos dados.

As amigas Mônica pelo auxílio na elaboração do laboratório de Cultura Celular, Regina Affonso e Rosangela R. Arkaten pela constante participação e pelas dicas.

Aos amigos do Instituto de Radioterapia Oswaldo Peres, em especial a Dra. Regina, Dra. Vilma, Dra. Mari, Dr. Fernando, Dr. Oswaldo Peres e aos pacientes que permitiram a realização deste trabalho, bem como pela real amizade.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração desta dissertação.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, pela oportunidade de executar este trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro.

DOSIMETRIA BIOLÓGICA EM PROTEÇÃO RADIOLÓGICA: ELABORAÇÃO DE CURVAS DOSE-RESPOSTA PARA ^{60}Co e ^{137}Cs

Márcia Augusta da Silva

RESUMO

Fontes de radiação ionizante para uso pacífico vêm sendo amplamente utilizadas pela sociedade moderna, e com a crescente aplicação dessas fontes tem aumentado a probabilidade de ocorrência de acidentes. As ocorrências de exposição acidental à radiação criaram a necessidade para o desenvolvimento de métodos que fornecessem uma avaliação quantitativa de dose e que essa informação pudesse ser obtida por meio de medida do dano da radiação no indivíduo exposto. Para estimar a dose de radiação em indivíduos expostos pode-se adotar métodos físicos (dosimetria física) contudo, não se deve dispensar os métodos biológicos e dentre estes, o citogenético que utiliza as aberrações cromossômicas (dicêntrico e anel cêntrico) formadas nos linfócitos sanguíneos periféricos (LSP) expostos à radiação ionizante e que relaciona a frequência destas aberrações radioinduzidas com a estimativa de dose absorvida tanto *in vitro* quanto *in vivo*, método denominado **dosimetria citogenética**. Em decorrência dos aperfeiçoamentos nas técnicas de cultivo, na interpretação das aberrações quando da leitura das lâminas por diferentes analisadores e pela adoção de diferentes programas estatísticos para análise dos dados, diferenças significativas são observadas nas curvas dose-resposta (curvas de calibração) entre laboratórios. Assim, a interpretação de dose em indivíduos expostos quando do uso de curvas de calibração de outros laboratórios pode introduzir substanciais incertezas, conseqüentemente, é recomendado pela International Atomic Energy Agency (IAEA) que todos os laboratórios que efetuem dosimetria citogenética estabeleçam suas próprias curvas dose-resposta. Para a execução das curvas dose-resposta, amostras de sangue total coletadas de doadores sadios foram irradiadas em fonte de ^{60}Co (γ) e de ^{137}Cs (γ) com taxa de dose de $5 \text{ cGy} \cdot \text{min}^{-1}$. Seis pontos de dose foram estabelecidos: 20,50,100,200,300,400 cGy e um controle não irradiado. As aberrações analisadas foram do tipo cromossômico, dicêntrico e anel cêntrico. As curvas dose-resposta para dicêntricos foram obtidas por meio das frequências ajustadas pelo modelo matemático linear-quadrático e a equação resultante para ^{60}Co foi: $Y = (3,46 \pm 2,14)10^{-4} \text{ cGy}^{-1} + (3,45 \pm 0,64)10^{-6} \text{ cGy}^{-2}$ e para ^{137}Cs foi: $Y = (7,69 \pm 2,33)10^{-4} \text{ cGy}^{-1} + (1,96 \pm 0,58)10^{-6} \text{ cGy}^{-2}$.

BIOLOGICAL DOSIMETRY IN RADIOLOGICAL PROTECTION: DOSE-RESPONSE CURVES ELABORATION FOR ^{60}Co e ^{137}Cs

Márcia Augusta da Silva

ABSTRACT

Ionizing radiation sources for pacific uses are being extensively utilized by modern society and the applications of these sources have raised the probability of the occurrence of accidents. The accidental exposition to radiation creates a necessity of the development of methods to evaluate dose quantity. This data could be obtained by the measurement of damage caused by radiation in the exposed person. The radiation dose can be estimated in exposed persons through physical methods (physical dosimetry) but the biological methods can't be dispensed, and among them, the cytogenetic one that makes use of chromosome aberrations (dicentric and centric ring) formed in peripheral blood lymphocytes (PBL) exposed to ionizing radiation. This method correlates the frequency of radioinduced aberrations with the estimated absorbed dose, as *in vitro* as *in vivo*, which is called cytogenetic dosimetry. By the introduction of improved new techniques in culture, in the interpretation of aberrations in the different analysers of slides and by the adoption of different statistical programs to analyse the data, significative differences are observed among laboratories in dose-response curves (calibration curves). The estimation of absorbed dose utilizing other laboratory calibration curves may introduce some incertanties, so the International Atomic Energy Agency (IAEA) advises that each laboratory elaborates your own dose-response curve for cytogenetic dosimetry. The results were obtained from peripheral blood lymphocytes of the healthy and no-smoking donors exposed to ^{60}Co and ^{137}Cs radiation, with dose rate of $5 \text{ cGy} \cdot \text{min}^{-1}$. Six points of dose were determined 20,50,100,200,300,400 cGy and the control not irradiated. The analysed aberrations were of chromosomic type, dicentric and centric ring. The dose-response curve for dicentrics were obtained by frequencies weighted in liner-quadratic mathematic model and the equation resulted were for ^{60}Co : $Y = (3.46 \pm 2.14)10^{-4} \text{ cGy}^{-1} + (3.45 \pm 0.64)10^{-6} \text{ cGy}^{-2}$ and for ^{137}Cs : $Y = (7.69 \pm 2.33)10^{-4} \text{ cGy}^{-1} + (1.96 \pm 0.58)10^{-6} \text{ cGy}^{-2}$.

I - INTRODUÇÃO	1
1.1. - <i>DOSIMETRIA CITOGENÉTICA</i>	3
1.1.1. - Histórico	4
1.1.2. - Requisitos básicos para dosimetria citogenética	8
1.1.3. - Situações recomendadas para a utilização da dosimetria citogenética	9
1.2. - <i>FUNDAMENTOS RADIOBIOLÓGICOS</i>	10
1.2.1. - Interação da radiação com a matéria	10
1.2.2. - Unidades e grandezas em radiação	12
1.2.3. - Características físicas e aplicações dos radioisótopos ^{60}Co e ^{137}Cs	13
1.2.4. - Transferência Linear de Energia (LET)	13
1.2.5. - DNA: Dano e reparo	15
1.2.6. - Taxa de dose	18
1.3. - <i>LINFÓCITOS HUMANOS.</i>	19
1.3.1. - Origem, tipos, funções e características morfológicas	19
1.3.2. - Concentração, cinética e tempo de vida dos linfócitos	20
1.3.3. - Linfócitos como sistema indicador de dose de radiação	22
2. - ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS RADIOINDUZIDAS	23
2.1. - Considerações gerais	23
2.2. - Aberrações do tipo cromossômico radioinduzidas em linfócitos	24
2.3. - Formação das aberrações radioinduzidas em linfócitos	26
2.3.1. - Relação dicêntrico/anel e frequência espontânea	28

2.3.2. - Fatores que podem afetar a frequência de aberrações radioinduzidas <i>in vitro</i> ou <i>in vivo</i>	29
2.3.2.1. - Morte intermitótica	29
2.3.2.2. - Retardo mitótico	29
2.3.2.3. - Tempo para amostragem	30
3. - SISTEMA DE CULTIVO DE LINFÓCITOS	31
3.1. - Obtenção da amostra de sangue	31
3.2. - Cultivo de linfócitos	32
3.2.1. - Meio de cultivo	32
3.2.2. - Soro	32
3.2.3. - Estimulação linfocitária	33
3.2.4. - Bromodeoxiuridina (BrdU)	34
3.2.5. - Inibição mitótica	36
3.2.6. - Tubos de cultura e pH	36
3.2.7. - Tipos de cultivo e temperatura de incubação	37
3.3. - Preparação citológica	37
3.3.1. - Solução hipotônica	38
3.3.2. - Fixação do material (apoiada)	38
3.3.3. - Preparo das lâminas	38
3.3.4. - Coloração FPGiemsa convencional	39
3.3.5. - Análise das lâminas	40
3.3.6. - Número de células analisadas	40
4. - CURVA DOSE-RESPOSTA IN VITRO (CURVA DE CALIBRAÇÃO)	41
4.1. - Considerações gerais	41
4.2. - Aspectos biológicos e físicos	41

4.3. - Fundamentos biofísicos, aspectos matemáticos e estatísticos relacionados à geração da curva dose-resposta	43
4.3.1. - Considerações estatísticas	46
4.3.2. - Distribuição de dicêntricos utilizando a estatística de Poisson	48
4.3.2.1. - Probabilidade da distribuição de dicêntricos	48
4.3.2.2. - Testes para avaliação da distribuição de dicêntricos entre as células (testes indicativos de dispersão)	49
II - OBJETIVO	51
III - MATERIAL E MÉTODOS	52
<i>1. - PARTE EXPERIMENTAL</i>	52
1.1. - Obtenção das amostras	52
1.2. - Processo de irradiação	53
1.3. - Cultivo das amostras (fase estéril)	54
1.4. - Preparação citológica (fase não estéril)	55
1.5. - Contagem de plaquetas (plaquetometria)	55
1.6. - Contagem de leucócitos (leucograma)	55
IV - RESULTADOS	57
V - DISCUSSÃO	77
V - CONCLUSÃO	86
VI - BIBLIOGRAFIA	87

I - INTRODUÇÃO

Fontes de radiação ionizante para uso pacífico vêm sendo amplamente utilizadas pela sociedade moderna, e com a crescente aplicação dessas fontes tem aumentado a probabilidade de ocorrência de acidentes (CILLIERS,G.D. & LEVIN,J., 1983; HENDEE,W.R., 1986).

Acidentes com radiação ionizante têm sido uma fonte valiosa de observação dos efeitos da radiação no ser humano e caracterizam-se por campos de radiação elevada, não intencional, ou pela liberação não controlada de grandes quantidades de material radioativo, de tal forma, que sejam capazes de causar sérios danos particularmente aos sistemas hematopoiético, gastrointestinal, cerebral e cardiovascular, podendo levar à morte. Estes acidentes envolvem tanto trabalhadores da Área Nuclear como indivíduos da população (LUCHNIK,N.V. & SEVANKAEV,A.V., 1976).

Na investigação de acidente produzido por radiação ionizante é de suma importância a estimativa de dose equivalente de corpo inteiro (dose absorvida) do indivíduo exposto, com a finalidade de contribuir para uma melhor avaliação e orientação do tratamento médico que é dependente da dose (LLOYD,D.C. & EDWARDS, A.A., 1990; LUSHBAUGH,C. *et al.*, 1991). As ocorrências de exposição acidental à radiação criaram a necessidade para o desenvolvimento de métodos que fornecessem uma avaliação quantitativa de dose e que essa informação pudesse ser obtida por meio de medida do dano da radiação no indivíduo exposto (DOLPHIN,G.W. & LLOYD,D.C., 1974; IAEA, 1986).

Para estimar a dose de radiação em indivíduos expostos pode-se adotar métodos físicos (dosimetria física) contudo, não se deve dispensar os métodos biológicos e dentre estes, o citogenético, que utiliza as aberrações cromossômicas estruturais instáveis (dicêntrico e anel cêntrico) formadas nos linfócitos sanguíneos periféricos (LSP)¹ expostos à radiação ionizante e que relaciona a frequência destas aberrações radioinduzidas com a estimativa de dose absorvida tanto *in vitro* quanto *in vivo*, método denominado **dosimetria citogenética** (LLOYD, D.C.& PURROTT, R., 1981; LLOYD, D.C. *et al.*, 1983; RAMALHO,A.T.*et al.*, 1988).

Em decorrência da introdução de aperfeiçoamentos nas técnicas utilizadas (metodologias de cultivo), da interpretação das aberrações quando da leitura das lâminas por diferentes analisadores e da adoção de diferentes programas estatísticos para análise dos dados, diferenças significativas são observadas nas curvas dose-resposta (curvas de calibração) entre laboratórios (BAUCHINGER, M., 1978; LLOYD, D.C.& PURROTT, R., 1981).

Assim, a interpretação de dose de radiação absorvida por indivíduos expostos quando do uso de curvas de calibração produzidas por outros laboratórios pode introduzir substanciais incertezas, conseqüentemente, é recomendado pela International Atomic Energy Agency (IAEA) que todos os laboratórios que efetuem dosimetria citogenética estabeleçam suas próprias curvas dose-resposta (EVANS,H.J. & LLOYD,D.C., 1978; BAUCHINGER,M., 1978; IAEA, 1986; LITTLEFIELD,L.G., *et al.*, 1990).

¹LSP - linfócitos sanguíneos periféricos - *peripheral blood lymphocytes*

1.1. - DOSIMETRIA CITOGENÉTICA

A dosimetria citogenética é uma técnica biológica muito sensível, que quantifica dose em indivíduos que tenham sido expostos de corpo inteiro ou em pelo menos dois-terços do corpo à radiação ionizante.

A aplicabilidade da dosimetria citogenética está baseada em quatro décadas de pesquisas científicas em radiobiologia, que estabeleceu que a radiação ionizante induz aberrações estruturais nos cromossomos de linfócitos sanguíneos periféricos (LPS) de indivíduos expostos à radiação e que a frequência de aberrações induzidas mostra uma estreita relação com a dose de exposição (LITTLEFIELD, L.G. *et al.*, 1990).

Desde 1962, quando BENDER, M.A. & GOOCH, P.C. sugeriram pela primeira vez que a frequência de aberrações radioinduzidas em linfócitos humanos poderia ser utilizada como um método biológico para detectar e quantificar a exposição à radiação, a dosimetria citogenética tem sido utilizada como complemento da dosimetria física em proteção radiológica. Posteriormente, inúmeros trabalhos foram realizados expondo linfócitos humanos e de animais a várias qualidades e quantidades de radiação, estes trabalhos têm comprovado a utilidade do método citogenético como uma ferramenta dosimétrica e têm definido vários fatores físicos e biológicos que devem ser considerados na estimativa de dose quando da interpretação dos dados relacionados às pessoas expostas (BAUCHINGER, M., 1995).

Durante os últimos 20 anos, a dosimetria citogenética tem sido utilizada para a estimativa de dose de radiação de pessoas expostas em vários acidentes

radiológicos; como por exemplo, os ocorridos: no México, 1984 (^{60}Co) (LITTLEFIELD, L.G., *et al.*, 1990); Chernobyl, 1986 (reator) (IAEA, 1986); Goiânia, 1987 (^{137}Cs) (RAMALHO, A.T. *et al.*, 1988) e em inúmeros casos de exposição real ou suspeita (LLOYD, D.C. *et al.*, 1978, 1983a, 1986 e 1987).

Nestes e em outros casos de exposição acidental, bem como em casos de pacientes submetidos a exposição de corpo inteiro decorrentes de tratamento radioterapêutico por razões médicas, a frequência das aberrações foi demonstrada ser essencialmente a mesma que a induzida pela irradiação *in vitro* (FABRY, L. & LEMAIRE, M., 1985 e 1986).

1.1.1. - Histórico

A década de 30 foi um grande marco para a dosimetria citogenética com os valiosos estudos de SAX, K. sobre a indução de aberrações cromossômicas em *Tradescantia*. Sax elaborou curvas dose-resposta induzidas com raios X e com nêutrons. Seus estudos utilizando exposições fracionadas ou baixas taxas de dose possibilitaram definir a produção de aberrações cromossômicas em termos de cinética de um ou dois *hits*, atualmente mais apropriadamente descritos como uma ou duas trajetórias. De particular significância foi o fato observado que se danos no DNA² estavam envolvidos na produção de aberrações cromossômicas, era possível ocorrer reparo e isto explicava a redução da frequência de aberrações em exposições fracionadas. Também, estabeleceu que os tipos de aberrações e sua frequência eram dependentes do estágio do ciclo celular em que as células foram irradiadas e que as aberrações do tipo cromossômico (onde ambas cromátides estão envolvidas na produção das aberrações) eram induzidas antes da síntese do

²DNA - ácido desoxirribonucléico - *deoxyribonucleic acid*

DNA e as aberrações do tipo cromatídica eram produzidas durante ou após a replicação do DNA.

Em 1942, LEA, D.E. & CATCHESIDE, D.G., trabalhando com *Tradescantia*, observaram que havia uma relação quantitativa entre a frequência de aberrações cromossômicas radioinduzidas e a dose, e relataram o mecanismo de indução de aberrações cromossômicas pela radiação.

Esses conceitos posteriormente foram definidos mais claramente por CATCHESIDE, D.G., LEA, D.E. & THODAY, J.M., (1946) que demonstraram que a relação dose-resposta para aberrações cromossômicas radioinduzidas por raios X era melhor descrita por uma função linear-quadrática, $Y = a + \alpha D + \beta D^2$, onde “a” é a frequência de aberrações espontâneas, “ α ” é o coeficiente linear de dose, “ β ” é o coeficiente quadrático de dose e “D” é a dose. A conceituação do mecanismo de indução de aberrações cromossômicas ajustada a esta função matemática foi fundamentada na teoria que uma aberração cromossômica (por exemplo, um dicêntrico, que envolve uma interação entre dois cromossomos) pode ser produzida por uma ou duas trajetórias, cuja probabilidade depende da quantidade de dose e do tempo de exposição.

O modelo para a produção de aberrações cromossômicas por radiação proveniente desses estudos foi baseado na *teoria da primeira quebra*, isto é, o evento inicial era presumido ser a quebra de cromossomos com subsequente rejuntamento das terminações quebradas. Atualmente essa teoria é bem aceita com algumas modificações relacionadas aos novos conhecimentos referentes ao dano e reparo do DNA.

A primeira citação que as aberrações cromossômicas poderiam ser usadas como dosímetro biológico foi feita em 1954 por CONGER, A.D., utilizando *Tradescantia*. Demonstrou que doses estimadas biologicamente por meio do número de aberrações induzidas por radiação em plantas, coincidia com as doses medidas pelos métodos físicos convencionais.

Entretanto, muitos citogeneticistas acreditavam que os estudos de cinética relacionada a dose-resposta destes experimentos iniciais eram inaplicáveis às células de seres humanos, em decorrência desses trabalhos terem sido efetuados com célula de plantas que possuíam cromossomos grandes e em número reduzido.

Em 1957, TAYLOR, J.H. *et al.* utilizando ^3H -timidina e autorradiografia mostraram que as cromátides-irmãs poderiam sofrer trocas recíprocas.

Em 1960, MOORHEAD, P.S. *et al.* observaram que os linfócitos sangüíneos periféricos humano, um tipo celular que normalmente não se divide, poderiam ser estimulados a se dividir em cultura quando fosse adicionado uma substância obtida do extrato de feijão preto (*Phaseolus vulgaris*) denominada fitohemaglutinina.

Em 1961, RUBINI, J.R. *et al.*, utilizando leucócitos sangüíneos circulantes marcados *in vitro* com ^3H -timidina, mostraram que 99,9% dos linfócitos periféricos humanos encontravam-se na fase G_0 do ciclo celular.

Em 1962, foi sugerido por BENDER, M.A. & GOOCH, P.C. que a produção de aberrações cromossômicas radioinduzidas em linfócitos sangüíneos

periféricos humano poderia formar a base de um dosímetro biológico (DEKNUDT,G.H. & LEONARD,A.,1980; BAUCHINGER,M., 1995).

EVANS, H.J. & SCOTT,D. (1964) e KIHLMAN,B.A. (1966), demonstraram ser necessário que as células passassem pelo estágio de síntese do DNA (fase S) (agentes clastogênicos químicos) para que os danos induzidos no DNA fossem convertidos em aberrações cromossômicas.

No final dos anos 60, CASPERSSON,T. *et al.*(1968) observaram que quando as metáfases eram coradas com mostarda quinacrina e analisadas por meio de microscopia de fluorescência, uma série de bandas fluorescentes (bandas Q) eram vistas. Essas bandas e as interbandas não fluorescentes eram únicas para cada par de cromossomo e permitiam identificar cada cromossomo envolvido em rearranjos específicos.

Após a década de 60, a dosimetria citogenética estabelecida por BENDER,M.A. & GOOCH,P.C. foi padronizada e continua sendo aplicada rotineiramente em todos os casos acidentais de exposição à radiação em todas as partes do mundo. (BREWEN,J.G. *et al.*, 1972; STEPHAN,G., *et al.*, 1983; ROMM,H.& STEPHAN,G., 1990; BARQUINERO,J.F. *et al.*, 1995).

Em 1972, ZAKHAROV,A.F. e EGOLINA,N.A. demonstraram que a bromodeoxiuridina (BrdU) quando incorporada aos cromossomos que passaram por mais de uma fase do ciclo celular, exibem cromátides com um padrão diferencial de coloração que informa a ocorrência de troca entre as cromátides-irmãs.

Em 1973, LATT,S.A. demonstrou que a diferenciação das cromátides-irmãs pode ser observada por meio de microscopia de fluorescência quando estas tiverem a BrdU incorporada e forem coradas com certos compostos fluorescentes, como o Hoechst 33258.

Em 1974, PERRY,P. & WOLFF,S. empregaram a coloração Giemsa após a exposição de preparações coradas com Hoechst 33258 a luz escura (313 nm). Essa técnica de fluorescência mais Giemsa (FPG)³ produz preparações coradas permanentemente e mostram claramente a diferenciação das cromátides-irmãs.

1.1.2. - Requisitos básicos para um sistema dosimétrico citogenético
(DEHOS,A., 1990; MÜLLER W.U.& STREEFER,C.,1991)

- O efeito escolhido para a estimativa de dose deve ser específico para a radiação ionizante;
- O efeito deve ser detectável tão próximo quanto possível do *background* da radiação e apresentar boa resposta para uma série relevante de doses;
- Deve exibir uma relação dose-resposta que possa ser avaliada experimentalmente;
- A relação dose-resposta deve ser detectável após decorrido certo tempo (dias ou semanas) da exposição à radiação;
- As diferentes qualidades de radiação deverão ser analisadas pelo método;

³FPG - Fluorescência mais Giemsa - *Fluorescence plus Giemsa*

- O material biológico que apresenta os efeitos deverá ser acessível, sem utilizar métodos invasivos;
- Deve fornecer estimativa de dose no menor tempo possível

A dosimetria citogenética é o indicador biológico de dose que melhor se enquadra nestes requisitos.

1.1.3 - Situações recomendadas para a utilização da dosimetria citogenética

A dosimetria citogenética foi desenvolvida para ser aplicada como um procedimento em Proteção Radiológica e a sua utilização tem sido recomendada nos casos de exposição acidental à radiação (IAEA, 1986), nas seguintes situações:

- como complemento dos métodos físicos de dosimetria;
- quando os indivíduos radioexpostos não portam sistemas dosimétricos;
- quando a dosimetria física não possui as informações necessárias para estimar a dose;
- quando há suspeita de exposição.

1.2. - FUNDAMENTOS RADIOBIOLÓGICOS

1.2.1. - Interação da radiação com a matéria

Quando a radiação é absorvida por um material biológico pode ocorrer *ionização* ou *excitação*. Se a radiação tiver suficiente energia para ejetar um ou mais elétrons orbitais do átomo ou da molécula, o processo é denominado *ionização*. Se houver somente a elevação do elétron em um átomo ou molécula para um nível superior de energia sem ejeção do elétron, o processo é denominado *excitação*. Os raios X e γ são formas eletromagnéticas de radiação (fótons) que quando penetram no corpo humano são absorvidas pelas células que compõem os tecidos, ocorrendo uma elevada interação de fótons com os átomos das células que resultará na produção de grande número de elétrons rápidos, que por sua vez podem ionizar outros átomos e isto levará a uma cadeia de eventos denominada dano biológico (HALL, E.J., 1994).

Quando alguma forma de radiação - eletromagnética ou particulada - é absorvida por um material biológico, há uma possibilidade que venha a interagir diretamente com o alvo crítico da célula (DNA). Os átomos poderão ser ionizados ou excitados e iniciarem uma cadeia de eventos que levarão às alterações biológicas (**ação direta da radiação**). É o processo dominante para radiações com alta transferência linear de energia (LET)⁴, tais como nêutrons e partículas α . A radiação poderá interagir com outros átomos ou moléculas da célula, principalmente com a água intracelular, produzindo radicais livres que são espécies químicas altamente reativas que se difundem através do meio e danificam moléculas orgânicas como o DNA, proteínas, etc (**ação indireta da radiação**). É dominante para radiações de baixa LET, como os raios X e gama. O efeito indireto é o responsável pela maioria dos danos produzidos no DNA (fig.1). Os

⁴LET - transferência linear de energia - *linear energy transfer*

efeitos biológicos da radiação resultam de danos ocorridos ao DNA que é considerado ser o alvo crítico (UNSCEAR, 1993; HALL, E.J., 1994; WHITMORE, G.F., 1995).

A interação da radiação com a matéria produz vários efeitos radiobiológicos: morte celular, aberrações cromossômicas, mutações, retardo mitótico, etc. Os cromossomos sendo os alvos mais radiosensíveis nas células são facilmente danificados pela radiação (HALL, E.J., 1994).

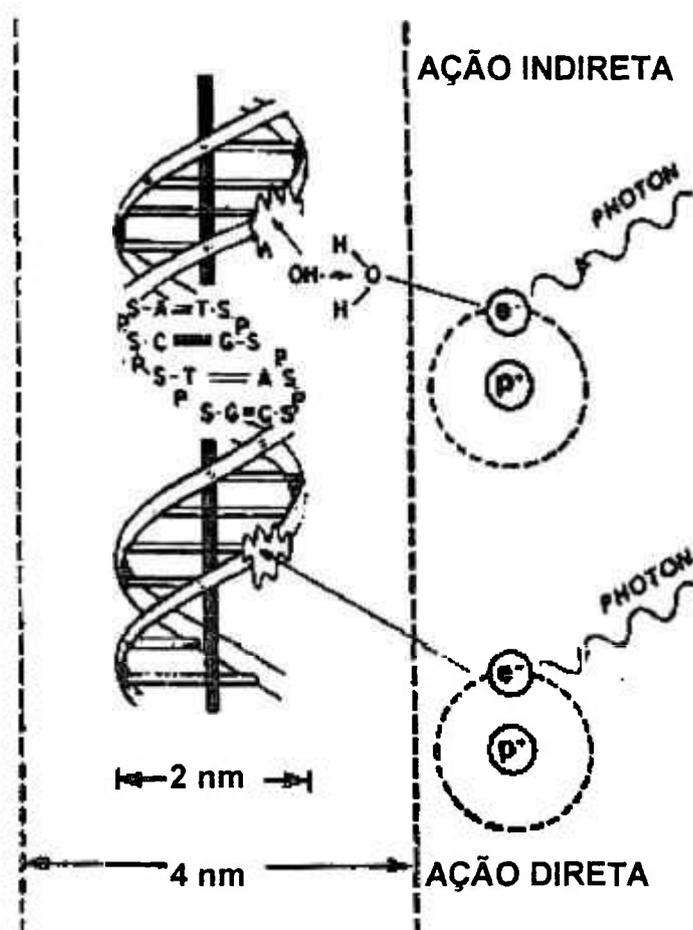


Figura 1. Esquema da interação da radiação com a matéria

1.2.2. - Unidades e grandezas em radiação

As principais grandezas físicas definidas para medir o efeito biológico da radiação são: exposição, dose absorvida e taxa de dose.

A **exposição (X)** é definida para os raios X e gama como sendo o número de ionizações ocorridas em certa massa de ar, é quantificada em Röentgen (R) que equivale a $2,58 \times 10^{-4} \text{ C/kg}^{-1}$ (Quadro I).

A **dose absorvida** é a grandeza física de energia liberada por unidade de massa pela radiação ionizante em um órgão ou tecido de interesse e é independente da exposição. O rad, a antiga unidade oficial para dose absorvida, foi definido para que correspondesse a energia absorvida pelo tecido mole ou água após a exposição de 1R de raios X ou gama, de forma que a razão $\text{rad/R} = 1$. No entanto, para tecidos duros como o tecido ósseo ou mesmo para outros tecidos, essa relação não é verdadeira. A partir de 1985, a unidade adotada passou a ser o gray (Gy), que no Sistema Internacional de Unidades corresponde a um J/kg^{-1} . O Gy equivale a 100 rad. Com a utilização dos submúltiplos do Gray, a centésima parte (cGy) é igual a 1 rad .

O rem (röntgen equivalent man) é uma unidade equivalente de dose utilizada para expressar comparativamente os efeitos de dose absorvida das diferentes qualidades de radiação no homem. O rem é a dose absorvida em rad multiplicada pelo fator de qualidade do tipo de radiação. Em 1985 o rem foi substituído por uma unidade denominada Sievert (Sv), onde 1 Sv é igual a 100 rem (Quadro I).

Quadro I: Unidades

	nova nomenclatura e símbolo	outra unidade do Sistema Internacional	unidade antiga e símbolo	fator de conversão
Exposição	-	Ckg^{-1}	röntgen (R)	$1\text{Ckg}^{-1} \sim 3876\text{R}$
dose absorvida	Gray (Gy)	Jkg^{-1}	rad (rad)	$1\text{Gy} = 100 \text{ rad}$
dose equivalente	Sievert (Sv)	JKg^{-1}	rem (rem)	$1\text{Sv} = 100 \text{ rem}$

A taxa de dose tem grande importância na produção do efeito biológico e é definida como sendo a quantidade de radiação liberada em um intervalo de tempo.

1.2.3. - Características físicas e aplicações dos radioisótopos ^{60}Co e ^{137}Cs

Os radioisótopos ^{60}Co e ^{137}Cs são emissores β - γ com meias vidas físicas de 5,17 anos e 30,15 anos, respectivamente. O ^{60}Co possui energia gama média de 1,25 MeV (1,17 e 1,33 MeV) e o ^{137}Cs possui energia gama de 0,662 MeV. São utilizados para esterilização de materiais cirúrgicos e laboratoriais, esterilização de alimentos para a sua conservação, irradiação de sementes (agricultura), em fontes de radioterapia (medicina), entre outras aplicações.

1.2.4. - Transferência Linear de Energia (LET)

A indução de aberrações em linfócitos sanguíneos periféricos (LSP) não varia somente em função da dose, mas também da LET.

A deposição de energia quando a radiação passa através da matéria é denominada **transferência linear de energia (LET)**, varia diretamente com a

massa e carga e inversamente com a *energia* da radiação. Assim, a radiação que possui massa e carga grandes e energia baixa produz um número maior de ionizações ao longo de sua trajetória.

Por causa da qualidade da radiação determinar diferentes LET, a eficácia biológica em induzir aberrações varia consideravelmente se a exposição à radiação for com baixa LET ou com alta LET.

A LET é também importante quando consideramos a *distribuição* das aberrações cromossômicas em linfócitos de indivíduos expostos.

Quando indivíduos são expostos uniformemente de corpo inteiro à radiação de baixa LET, todos os linfócitos possuem probabilidade igual e aleatória de serem atravessados por uma ou várias trajetórias de radiação *esparsa*. Assim, admitindo-se que haja igual probabilidade para que algumas quebras sejam convertidas em aberrações, estas serão distribuídas aleatoriamente nas células (FABRY, L. *et al.*, 1985; BILBAO, A. 1992). Portanto, a proporção relativa das metáfases de linfócitos que apresentarem 0,1,2 ou mais aberrações dependerá da *dose* de corpo inteiro e a *dispersão* de aberrações entre estas células estará em conformidade com a distribuição de Poisson (IAEA, 1986).

Inversamente, após exposição *in vivo* a dose similar de algum tipo de radiação de alta LET (partículas α), poucos linfócitos serão atravessados por trajetórias ionizantes e aqueles que o forem, provavelmente receberão excessiva deposição de energia. Isto ocorre porque com radiação *densa*, a deposição de energia se faz em pacotes descontínuos e não é distribuída aleatoriamente nas células. Como resultado da excessiva dispersão, muitas metáfases apresentarão

múltiplas aberrações cromossômicas e poucas com uma aberração, neste caso não há conformidade com a distribuição de Poisson (IAEA, 1986; BENDER, M.A. *et al.*, 1988).

1.2.5. - DNA: Dano e reparo

O núcleo celular coordena e dirige a atividade da célula, e portanto é muito vulnerável para os efeitos da radiação. É constituído essencialmente por uma mistura entrelaçada de longas estruturas filiformes denominadas cromossomos e envoltas por uma membrana nuclear. Os cromossomos são constantes em número e tipo para cada espécie em particular e carregam o material genético que é transmitido de uma geração celular para a próxima no processo de auto-duplicação (replicação) e a divisão é conhecida como mitose.

O material genético está representado por um conjunto de cromossomos em uma série de genes que são distribuídos linearmente no cromossomo.

Os genes são compostos de macromoléculas de DNA e contêm as informações requeridas para iniciar e controlar os processos metabólicos normais da célula. Essa informação é codificada na seqüência de bases nitrogenadas (adenina, timina, guanina e citosina) dentro de longa dupla hélice de macromoléculas de DNA. A duplicação exata de cada macromolécula de DNA, ocorre antes da divisão celular e permite a distribuição precisa da informação genética de células parentais para as células-filhas (BENDER, M.A. *et al.*, 1988).

Quando as células são expostas à radiação ionizante, o DNA que é um componente essencial do cromossomo pode ser danificado. O dano ao DNA

resulta na produção de mutações envolvendo alterações na estrutura do gene ou induzindo aberrações cromossômicas (danos na estrutura ou no número de cromossomos).

Para células diferenciadas, que não se dividem ou que raramente se dividem, como as do rim, do músculo ou os neurônios, a morte pode ser definida como a perda de uma função específica ou uma lise celular. Esta modalidade de morte é denominada morte interfásica ou morte não mitótica (COOGLE, J.E., 1971).

Para células proliferativas, como as precursoras do sistema hematopoiético ou células em cultura, a morte consiste na perda da capacidade das células irradiadas em promover divisões ilimitadas, embora morfológica, fisiológica e metabolicamente elas possam parecer normais. Esta perda da integridade reprodutiva é denominada *morte reprodutiva ou morte mitótica*, pois a célula pode estar fisicamente presente e aparentemente intacta, mas ela é incapaz de se reproduzir (COOGLE, J.E., 1971).

A radiação ionizante pode induzir diferentes tipos de danos no DNA e estes podem ser classificados como:

- ↳ quebra de fita única (SSB)⁵
- ↳ quebra de fita dupla (DSB)⁶
- ↳ danos nas bases (BD)⁷

⁵SSB - quebra de fita única - *single strand break*

⁶DSB - quebra de fita dupla - *double strand break*

⁷BD - danos nas bases - *basis damage*

Tem sido sugerido que a aberração não é o resultado da ação direta entre o mutagênico e o DNA celular, sua produção envolve um processo de reparo. Os danos primários induzidos pelos mutagênicos são transformados em danos secundários. Em geral, após a indução de uma quebra de fita dupla do DNA, o processo enzimático poderá ou não reparar o dano. A restituição pode conduzir a uma restauração da configuração original do cromossomo com alguma perda de parte do cromossomo, alterar ou formar pares de bases extras, mas essas trocas não serão visíveis na próxima metáfase (SACHS, R.K. & BRENNER, D.J., 1993). Os mecanismos de reparo normalmente eliminam a maior parte dos danos causados ao DNA pela radiação, de modo que somente uma fração resulta em aberração (CHADWICK, K.H. & LEENHOUTS, H.P., 1981; NATARAJAN A.T. 1982, PRESTON, R.J., 1982; BENDER, M.A. *et al.*, 1988).

Se uma certa quantidade de danos se acumula para expressar um efeito e a recuperação se inicia tão logo o dano é produzido, muitos dos danos iniciais serão reparados. Assim sendo, quanto maior o tempo de exposição à radiação, maior será o tempo para qualquer mecanismo biológico de reparo atuar, embora a energia total transferida ao sistema seja a mesma (BAUCHINGER, M., 1995).

Estes efeitos são explicados por dois processos que ocorrem separadamente.

a) reparo do dano subletal produzido pela radiação durante exposição prolongada;

b) renovação das células que ocorre como resultado da divisão celular durante exposições prolongadas.

As lesões induzidas no DNA de linfócitos podem ser reparadas em alguns minutos ou em até algumas horas (2 ou mais). PREMPEE, T & MERZ, T (1969) observaram que o reparo se completa entre 60 e 90 minutos após a irradiação. PURROTT, R.J. & REEDER, E. (1976) determinaram um tempo de 120 minutos. WOLFF, S. (1972) entretanto estimou que para células na fase G_0 o tempo de reparo é cerca de 5 horas.

1.2.6. - Taxa de dose

A **taxa de dose** - quantidade de radiação liberada em um intervalo de tempo - é um fator físico que pode influenciar a frequência de aberrações.

Para radiações ionizantes de baixa LET, como raios X e gama, a taxa de dose é um dos principais fatores que determina as conseqüências biológicas de uma dose absorvida. Quando a taxa de dose é baixa, portanto o tempo de exposição é prolongado, o efeito biológico de uma dada dose é reduzido. A taxa de dose quando é baixa permite que ocorra o reparo do dano subletal durante a irradiação e que haja proliferação de células não danificadas.

Se as duas lesões necessárias para induzir um dicêntrico são produzidas por trajetórias separadas e se a taxa de dose for baixa, existe a probabilidade que a lesão produzida pela 1ª trajetória seja reparada antes que o alvo seja atravessado pela 2ª trajetória (LEA, D.E. & CATCHESIDE, D.G., 1942; BAUCHINGER, M., 1995).

Para radiações de baixa LET quando a taxa de dose diminui, a frequência de dicêntricos também diminui por unidade de dose. Uma frequência maior de

aberrações é observada em linfócitos após exposição aguda (única) à radiação X ou gama em altas taxas de dose, que em exposições fracionadas ou mesmo em exposição aguda com baixas taxas de dose.

É importante saber se a dose recebida pelo radioexposto foi aguda, fracionada ou crônica e se foi em baixas ou altas taxas de dose.

1.3.- LINFÓCITOS HUMANOS

1.3.1. - Origem, tipos, funções e características morfológicas

Dois tipos principais de linfócitos podem ser distinguidos: linfócitos T e B. Ambos se originam ontogeneticamente de células primordiais *stem cells* imunologicamente incompetentes do saco vitelínico que eventualmente se fixa na medula óssea. Tais células indiferenciadas migram para o timo, multiplicam-se e muito provavelmente, por mutações somáticas, tornam-se linfócitos T imunocompetentes, responsáveis pela imunidade celular. Em mamíferos, os linfócitos B se originam das *stem cells* indiferenciadas que migram para a bursa equivalente, que em mamíferos é considerada ser a medula óssea e são responsáveis pela imunidade humoral (NATARAJAN, A.T. & OBE,G., 1982).

Os linfócitos podem ser divididos em muitas subpopulações com base em seus diferentes marcadores de superfície (receptores) e nas diferentes funções dentro do complexo sistema imune (DEHOS,A., 1990).

Os linfócitos T e B possuem diferentes propriedades na superfície celular e podem ser facilmente distinguidos pelo uso de anticorpos específicos. Os linfócitos B representam 30% do *pool* de linfócitos circulantes e possuem na superfície receptores para antígenos que se tornam ativados quando expostos à antígenos apropriados (BENDER, M.A. *et al.*, 1988; EDWARDS, A.A. *et al.*, 1989; DEHOS, A., 1990).

Os pequenos linfócitos possuem um núcleo denso com pouco citoplasma envolvendo-o. A maioria tem um nucléolo pequeno em forma de anel, indicando baixa síntese de RNA⁸. Apresentam um diâmetro aproximado de 6 μm e o volume pode ser estimado em cerca de 170 μm^3 (IAEA, 1986).

1.3.2. - Concentração, cinética e tempo de vida dos linfócitos

A concentração dos linfócitos no sangue periférico é variável. Em recém-nascido é cerca de 5500/mm³ (intervalo de 2000-11000/mm³); em crianças com 6 meses é em média de 7300/mm³ (intervalo de 4000 - 13500/mm³) e em adulto com idade de 21 anos a contagem média é estimada ser de 2500/mm³ de sangue (intervalo de 1000-4800/mm³). Normalmente até 90% dos linfócitos periféricos são pequenos linfócitos; 5% são de tamanho médio e até 15% são células linfóides grandes. No sangue periférico de adultos 70% dos linfócitos são do tipo T e 30% são do tipo B. O conteúdo de linfócitos T e B no sangue periférico são dependentes da idade: em indivíduos idosos parece haver diminuição de células T. Há também variações diurna e estacional na razão de linfócitos T e B. O número total de linfócitos em adultos jovens saudáveis é estimado ser de aproximadamente 500 x 10⁹. Somente 2% (2 x 10⁹) destes estão presentes no sangue periférico, o restante localiza-se nos tecidos, com particular concentração

no timo, nódulos linfáticos, amígdalas, tecidos linfáticos do intestino, baço e medula óssea (IAEA, 1986).

O tempo de vida dos linfócitos não é fixo. Mais de 90% são de vida longa, com vida média de 3 anos incluindo alguns com duração de vida de várias décadas. Os 10% restante têm vida média de 1 a 10 dias. Os linfócitos B parecem ter vida mais curta do que os linfócitos T. A taxa média de renovação dos linfócitos no corpo pode ser estimada de 2 a 5% ao dia.

Para a interpretação das aberrações cromossômicas e de mutações no homem é de grande importância que os linfócitos periféricos (pelo menos 80%) pertençam ao fluxo de redistribuição (*redistributional pool*). Eles deixam o sangue e passam pelo baço, nódulos linfáticos e outros tecidos e novamente entram na circulação sangüínea. Estas células recirculantes são pequenos linfócitos do tipo T de vida longa. O tempo médio que um dado linfócito do fluxo de redistribuição permanece no sangue periférico é cerca de 3 minutos. Estima-se que cerca de 80% (400×10^9) dos linfócitos pertençam ao fluxo de redistribuição e que o tempo de recirculação seja de 12 horas (IAEA, 1986; CARRANO A.V. & NATARAJAN, A.T., 1987).

Isto significa que os linfócitos com mutações ou aberrações induzidas nas várias partes do corpo estarão presentes no sangue periférico, desse modo, não somente as aberrações induzidas nos linfócitos sangüíneos poderão ser detectadas, mas também aquelas induzidas em linfócitos distribuídos em diferentes órgãos do corpo (BENDER, M.A. & GOOCH, P.C., 1962; IAEA, 1986).

1.3.3. - Linfócitos como sistema indicador de dose de radiação

São muitas as vantagens para o uso de linfócitos sangüíneos periféricos como indicador de dose de radiação:

- Estão distribuídos por todo o corpo, circulam em todos os tecidos e grande proporção tem vida longa, o que permite integrar a dose e fornecer a estimativa de dose equivalente de corpo inteiro;
- As aberrações radioinduzidas em linfócitos são do tipo cromossômico e estes são altamente radiosensíveis quanto a qualidade e quantidade da radiação;
- A frequência espontânea de aberrações do tipo dicêntrico e anel cêntrico é muito baixa, o que permite estimar o efeito da radiação mesmo para dose baixa;
- Apresentam danos cromossômicos estruturais tanto *in vivo* como *in vitro*;
- Os pequenos linfócitos do sangue periférico estão no mesmo estágio (G_0) da intérfase e não desenvolvem mitose comportando-se como células sincronizadas;
- Possuem sensibilidade uniforme à radiação;
- Podem ser estimulados por agentes mitogênicos a desenvolver mitose em cultura (células blásticas) em tempo muito curto (46 horas), fornecendo rápida fonte de células em divisão para a contagem das aberrações cromossômicas;

- São relativamente fáceis de serem obtidos, poucos mililitros de sangue periférico contêm elevado número de células ($1-3 \times 10^6$ pequenos linfócitos/mL). (EVANS, H.J. & O'RIORDAN, M.L., 1975; DEHOS, A., 1990; MÜLLER, W.U. & STREFFER, C., 1991).

2. - ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS RADIOINDUZIDAS

2.1. - Considerações gerais

Sabe-se que diferentes tipos de danos podem ser induzidos no DNA celular por agentes físicos (radiação ionizante) ou químicos. Muitos desses danos podem ser reparados rapidamente e reverterem à configuração original pelo reparo celular com a participação de vários tipos de enzimas. Somente uma pequena quantidade de danos não reparados ou com erros darão origem a aberrações cromossômicas.

Uma variedade complexa de quebras e rearranjos cromatídicos e cromossômicos podem ser observados após exposição à radiação ionizante. Os tipos de aberrações que são induzidos diretamente ou derivados na segunda mitose pós-radiação, dependem do estágio do ciclo celular no qual a exposição ocorreu.

Duas classes principais de aberrações são reconhecidas e dependem se uma ou ambas cromátides estejam envolvidas na aberração: aberrações do tipo cromossômico e do tipo cromatídico.

A *aberração do tipo cromossômico* ocorre quando a célula é irradiada no estágio G_0 ou G_1 do ciclo celular (antes do estágio sintético -S- do DNA) e envolve ambas cromátides-irmãs (MOORE,R.C. & BENDER,M.A., 1993).

A *aberração do tipo cromatídico* ocorre quando a célula é irradiada no estágio G_2 do ciclo celular (após estágio S) e envolve somente uma cromátide-irmã (CARRANO,A.V. & NATARAJAN,A.T., 1987).

2.2. - *Aberrações do tipo cromossômico radioinduzidas em linfócitos*

Como os linfócitos sangüíneos periféricos compreendem uma população de células geralmente homogênea em interfase - estágio pré-mitótico do ciclo celular (G_0) - somente aberrações do tipo cromossômico serão induzidas pela radiação ou seja, em cromossomos não duplicados.

As aberrações cromossômicas radioinduzidas são classificadas como:

1) **aberrações instáveis (assimétricas)**

- **deleção terminal:** fragmentos de cromátides pareados resultantes de uma quebra simples e não possuem centrômeros;
- **minuto:** pares de fragmentos acêntricos com tamanho menor do que as deleções terminais e semelhantes a esferas de cromatina;
- **anel acêntrico:** fragmentos de cromátides pareados, sem centrômero e que ao se unirem formam um anel;

- **anel cêntrico:** estrutura em forma de anel contendo um centrômero. O anel cêntrico é facilmente distinguido do anel acêntrico, e é geralmente acompanhado por um fragmento acêntrico;

- **dicêntrico (policêntrico):** aberração produzida por quebras ocorridas em dois ou mais cromossomos, de tal modo que estas regiões quebradas dos cromossomos ao se unirem formam uma estrutura dicêntrica ou policêntrica com fragmentos acêntricos associados

2) **aberrações estáveis (simétricas)**

- **translocação recíproca:** ocorre quando há quebra de dois cromossomos e trocas recíprocas de segmentos quebrados entre os cromossomos;

- **inversão paracêntrica:** ocorre quando os pontos de quebra e de ligação situam-se no mesmo braço do cromossomo;

- **inversão pericêntrica:** ocorre quando os pontos de quebra e inversão situam-se no lado oposto do centrômero.

As aberrações utilizadas em dosimetria citogenética são as do tipo dicêntrico e anel cêntrico pela sua alta frequência em relação aos outros tipos de aberrações e pela baixa incidência em controles não irradiados (PURROT, R.J. & REEDER, E., 1976; BILBAO, A., 1992). As aberrações do tipo dicêntrico possuem uma morfologia característica (dois centrômeros) e são acompanhadas por deleção terminal (pares de fragmentos) que fornece uma informação adicional facilitando a sua identificação. Os dicêntricos representam cerca de 60% de todas

as aberrações instáveis (PURROTT, R.J. & REEDER, E, 1976; BENDER, M.A. *et al.*, 1988).

Aberrações instáveis (assimétricas), usualmente dicêntricos e anéis cêntricos, podem ser analisadas com maior eficácia (> 95%) que outros tipos de aberrações. Para tais determinações, um tricêntrico é assumido ser equivalente a dois dicêntricos (DOLPHIN, G.W., 1971).

2.3. - Formação das aberrações radioinduzidas em linfócitos

As aberrações cromossômicas - dicêntricos, anéis cêntricos e fragmentos acêntricos - denominadas **aberrações instáveis** podem ser perdidas durante a divisão celular, dando início a morte celular. A morte celular ocorre porque a troca assimétrica pode impedir a célula de se dividir ou resultar em fragmentos cromossômicos que se perdem na divisão celular.

Para produzir uma **aberração do tipo dicêntrico**, o dano no DNA deve ser induzido em dois cromossomos não replicados, com isso, os cromossomos danificados podem realizar trocas. Essa troca pode ser resultado de um erro de reparo nas fitas quebradas de DNA induzidas pela radiação ou como resultado de um erro de reparo durante a excisão do dano nas bases danificadas, portanto, durante a exposição à radiação, uma ou mais trajetórias de radiação podem induzir quebras em dois cromossomos da mesma célula. Se as extremidades quebradas estiverem localizadas em uma distância espacial (zona de interação) pequena, geralmente menor que 0,1 μm e ocorrerem dentro de um intervalo finito de tempo, as extremidades quebradas poderão rejuntar formando uma configuração anormal: um *cromossomo dicêntrico* acompanhado de fragmentos (Fig.2A). Mais raramente três ou mais cromossomos podem estar envolvidos. (SACHS, R.K. & BRENNER, D.J., 1993; EDWARDS, A.A. *et al.*, 1996).

Os dicêntricos por serem formados por um mecanismo de dupla quebra são pouco induzidos por baixas doses agudas de radiação de baixa LET (PURROTT,R.J. & LLOYD,D.C., 1972).

O **anel cêntrico** é formado quando uma ou duas trajetórias de radiação induzem quebras nas duas extremidades do mesmo cromossomo e estas extremidades ao se rejuntarem originam uma estrutura em anel que é acompanhada de fragmento (fig.2B).

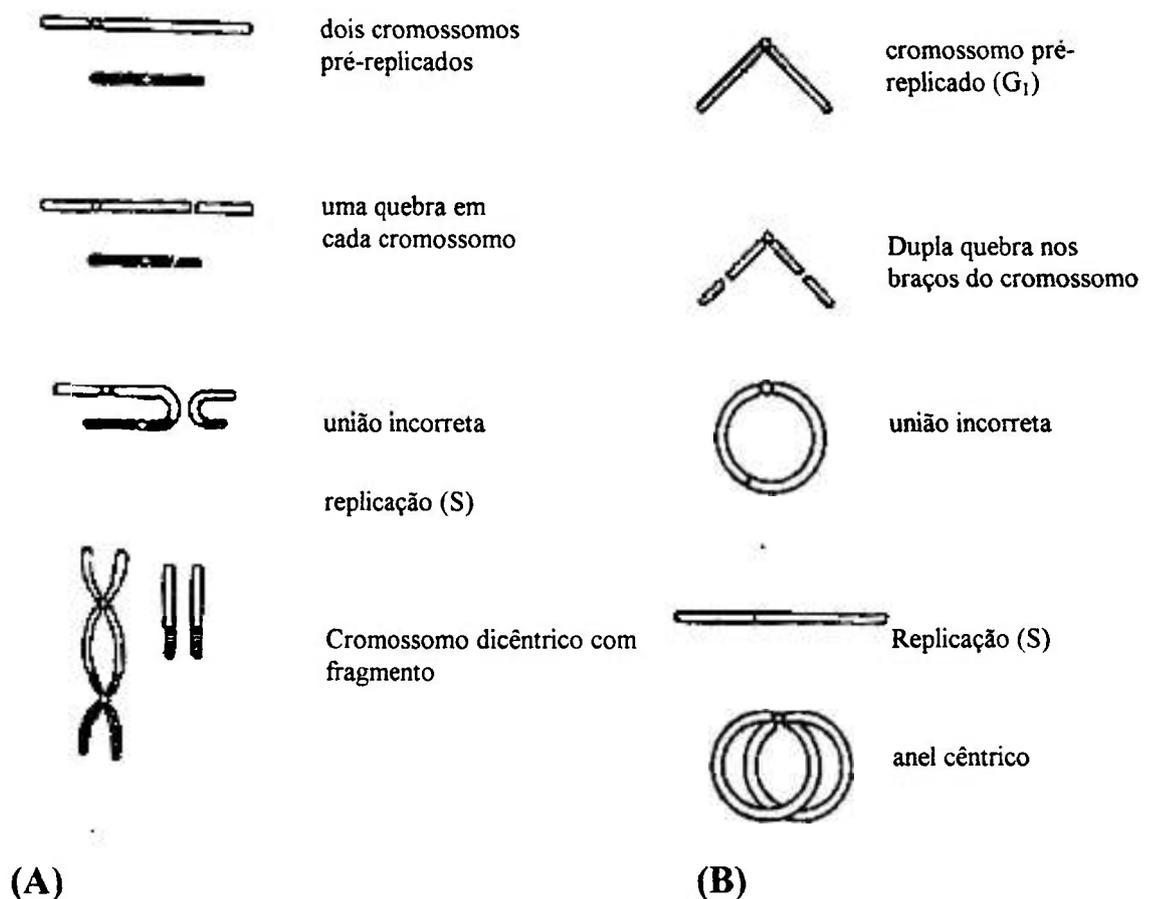


Figura 2.

(A) Formação de dicêntrico em cromossomos pós-irradiados. A quebra é produzida separadamente em dois cromossomos.

(B) Formação de anel cêntrico em cromossomo pós-irradiado. A quebra ocorre em cada um dos braços de um mesmo cromossomo (HALL,E.J, 1994).

As translocações recíprocas e as inversões não apresentam dificuldade mecânica na divisão celular e são chamadas de **aberrações estáveis** por permanecerem por várias gerações (CARRANO,A.V.& NATARAJAN,A.T., 1987; BENDER, M.A. *et al.*, 1988).

2.3.1. - Relação dicêntrico/anel e frequência espontânea

A relação de indução de aberrações instáveis do tipo dicêntrico e anel cêntrico é de aproximadamente 1:10 a 1:20 (LLOYD,D.C.& EDWARDS, A.A.,1983b; BAUCHINGER,M., *et al.*, 1983).

Segundo LLOYD,D.C. *et al.*(1980), as aberrações do tipo dicêntrico são facilmente identificadas, sua frequência espontânea é de aproximadamente 0,055% ($0,55 \times 10^{-3}$) para os dicêntricos, isto é, 1 dicêntrico/2000 células e 0,37% ($3,7 \times 10^{-3}$) para as aberrações acêntricas e são raramente induzidas por clastogênicos químicos (FABRY,L. & LEMAIRE,M.,1986; EDWARDS,A.A. *et al.*, 1989; BAUCHINGER,M., 1995).

Se aberrações do tipo cromatídico forem observadas, pode ser assumido que estas não tenham sido induzidas pela radiação, mas produzidas *in vitro* durante a primeira fase de síntese de DNA como resultado de erros de replicação ou de erro no DNA danificado por eventos não radioativos. A frequência das aberrações do tipo cromatídico pode ser considerada como contribuinte da frequência das aberrações cromossômicas espontâneas (IAEA,1986) que é de aproximadamente 0,055% ($0,55 \times 10^{-3}$) para os dicêntricos (FABRY,L. & LEMAIRE,M. 1986) e $3,7 \times 10^{-3}$ para as aberrações acêntricas (LLOYD,D.C. *et al.*, 1980).

Por estas razões, o dicêntrico é considerado ser o mais sensível indicador de dose em indivíduos expostos recentemente à radiação.

2.3.2. - Fatores que podem afetar a frequência de aberrações radioinduzidas “in vitro” ou “in vivo”.

2.3.2.1. - Morte intermitótica

Se ocorrer morte seletiva de linfócitos portadores de grande quantidade de danos cromossômicos durante o cultivo e antes de atingirem a primeira mitose, isto poderá afetar a forma da curva dose-resposta. Entretanto, tem sido observado que as aberrações cromossômicas são distribuídas aleatoriamente entre as células e que seguem a distribuição de Poisson, sendo um indicativo que estas células não são seletivamente mortas na intérfase (DOLPHIN, G.W., 1978; EVANS H.J. & LLOYD D.C., 1978). LLOYD *et al.*(1973) estimaram a quantidade de células mortas por radiação na intérfase e aplicaram uma equação exponencial que relaciona a morte intermitótica com a dose. Concluíram, utilizando esta equação que para dose de 50 cGy, 90% das células eram capazes de atingir a 1ª metáfase e 11% quando a dose era de 700 cGy.

2.3.2.2. - Retardo mitótico

O retardo mitótico tem sido observado em cultivo de células irradiadas (VULPIS, N. & LLOYD, D.C., 1980) e se houver retardo seletivo das células que contêm elevados danos nos cromossomos isto poderá afetar as frequências de aberrações observadas em vários tempos de cultivo.

Experimentos têm demonstrado que:

- células contendo danos não estão em desvantagem seletiva para passar através do ciclo mitótico, em cultivo de 48 horas;
- células contendo dicêntricos permanecem constante em culturas até 52 h.;
- algumas células contendo dicêntricos poderão passar mais lentamente através do 1º ciclo mitótico que células sem aberrações (DOLPHIN, G.W., 1978; EVANS, H.J. & LLOYD, D.C., 1978).

LLOYD, D.C. e DOLPHIN, G.W. (1977), investigaram os efeitos do retardo mitótico e concluíram que em cultivos de células em tempos variando de 36 a 120 horas o número de dicêntricos com fragmento permanece constante no intervalo de 36 a 52 horas e após esse período ocorre redução no número de dicêntricos.

2.3.2.3. - Tempo de amostragem

Com o aumento do tempo de amostragem após exposição *in vivo* à radiação, o número de linfócitos irradiados variará em decorrência do seu tempo de vida e da sua eliminação da corrente sanguínea e resultará numa população não homogênea de linfócitos.

As estimativas de dose em indivíduos radioexpostos de corpo inteiro a dose aguda têm demonstrado um decréscimo de aberrações instáveis após 5 a 6 semanas decorridas da exposição (BENDER, M.A. & GOOCH, P.C., 1963; BREWEN, J. *et al.*, 1972; GUEDENEY, G. *et al.*, 1988).

Acompanhamentos realizados utilizando radioexpostos mostraram uma redução de 40% das aberrações instáveis no primeiro ano e menor declínio nos anos seguintes após a exposição (BUCKTON, K.E. *et al.*, 1978 e 1983).

3. - SISTEMA DE CULTIVO DE LINFÓCITOS

3.1. - Obtenção da amostra de sangue

A amostra de sangue, deve ser obtida até 24 horas após a exposição, por punção venosa, coletada em seringa plástica descartável ou tubo vacutainer estéril contendo 10-100 IU/mL de heparina sódica. As amostras obtidas até 24 horas não são significativamente diferentes daquelas obtidas antes. É indicado para casos acidentais à radiação, se for possível, que a amostra seja coletada 12 horas após o acidente, para que os linfócitos circulantes e extravasculares atinjam o equilíbrio (IAEA, 1986).

Para propósitos de geração de curva dose-resposta as amostras deverão ser obtidas de doadores saudáveis, ambos os sexos, não fumantes e com idades entre 20 - 40 anos.

3.2. - Cultivo de linfócitos

3.2.1. - Meio de cultivo

Há vários meios de cultivo que podem ser utilizados. Meios de cultivo como RPMI-1640 e F-10 parecem estimular um crescimento mais rápido que MEM e TC-199. Embora, o número de células metafásicas em segundo ciclo mitótico (M_2) possa ser determinado pela coloração fluorescência mais Giemsa (FPG), é interessante utilizar um procedimento de cultivo que produza um número mínimo de células M_2 em 48 horas.

Antibióticos são freqüentemente incluídos no cultivo: penicilina (100 IU/mL) e estreptomicina (100 μ g/mL) são utilizados por muitos laboratórios (IAEA, 1986).

3.2.2. - Soro

Soro fetal bovino ou soro de recém-nascido são utilizados em cultivos rotineiros de linfócitos. Não há necessidade do uso de soros de custo elevado.

Por ser o soro o mais variável dos constituintes do cultivo é recomendado que cada laboratório teste e escolha o tipo de soro preferido. Como pode haver consideráveis variações entre os lotes de soro, testes deverão ser realizados para avaliar a sua habilidade na estimulação do crescimento celular.

O soro fetal bovino é utilizado como suplemento do meio na proporção de 10 a 20% (IAEA, 1986).

3.2.3. -Estimulação linfocitária

A maior parte dos linfócitos periféricos encontra-se no estágio G₀ do ciclo celular. Estas células podem ser estimuladas *in vitro* a desenvolver divisões mitóticas por meio de substâncias mitogênicas (lectinas vegetais).

As lectinas mitogênicas estimulam a síntese de DNA e a divisão celular pela ligação que fazem aos receptores de glicoproteínas da superfície dos linfócitos e não necessitam de nenhuma sensibilização prévia. Esta propriedade é utilizada para estimular o linfócito em cultura para análise cromossômica (DEKNUDT, G.H., *et al.*, 1980). Durante as últimas décadas, várias lectinas têm sido utilizadas como mitogênicos:

- **Fito hemaglutinina (PHA)** é uma proteína derivada do feijão preto *Phaseolus vulgaris*, que reage com N-acetil-D-galactosamina e estimula um amplo espectro de linfócitos T transformando-os em células blásticas. No período de 48 horas, após a adição de PHA, o linfócito sofre uma transformação de volume celular, citoplasmático e nuclear de aproximadamente 5 vezes ao de seu volume inicial (DEKNUDT, G.H. *et al.*, 1980; IAEA, 1986; BENDER, M.A. *et al.*, 1988). Dependendo das condições fisiológicas do doador, a frequência de linfócitos circulantes ativados por PHA é de aproximadamente 1%. Cerca de 98% destes, são ativados dentro de 12 horas. As células em divisão atingem cerca de 0,1% em 24 horas, aumentando para 1% em 48 horas. (PETRZILKA, G.E. & SCHROEDER, E.H., 1979)
- **Concavalina-A (Con-A)** é uma proteína extraída da *Canavalia ensiformis*, que se liga aos resíduos α -D manosil e α -D-glicosil da superfície celular e estimula os linfócitos T e B ;

- **Pokeweed (PWM)** é uma proteína extraída da *Phytolacca americana* e estimula os linfócitos T e B. Os linfócitos B produzem imunoglobulinas em resposta ao PWM;
- Lectina de lentilha de *Lens culinaris*;
- extrato de *Wistaria floribunda*, entre outros (DEKNUDT,G.H. & LEONARD,A., 1980, IAEA nº 260, 1986; DEHOS,A., 1990).

O mitogênico mais largamente utilizado é a fitohemaglutinina (PHA)⁹ (NOWELL,P.C., 1960).

3.2.4. - Bromodeoxiuridina (BrdU)

Visto que a presença de BrdU em meio de cultura não afeta a frequência dos danos radioinduzidos em cromossomos de linfócitos cultivados (BIANCHI,N.O. *et al.*, 1979), muitos laboratórios que trabalham com citogenética relacionada à radiação têm adotado o protocolo de adição de 5-bromo-2'deoxiuridina (BrdU) ao meio, no início do cultivo a fim de permitir a execução da coloração FPG (fluorescência mais Giemsa) (PERRY,P. & WOLFF,S., 1974).

A técnica baseia-se no fornecimento do análogo da timidina (BrdU) as células, e este é incorporado ao DNA quando da replicação. Mantendo-se o fornecimento do análogo às células durante dois ciclos de replicação, o cromossomo apresentará uma cromátide cujo DNA tenha incorporado BrdU

⁹PHA - fitohemaglutinina - *phytohaemagglutinin*

substituindo a timidina nas duas hélices e uma cromátide contendo DNA formado por uma hélice molde e uma com BrdU.

Quando a BrdU que substitui a timidina nos cromossomos de linfócitos que efetuaram o 1º ciclo mitogênico é combinada com a técnica de coloração (FPG) observa-se um efeito denominado “harlequim” nas metáfases que estão em segunda ou posteriores divisões. Esta técnica torna possível selecionar para análise somente aquelas células em metáfase que tenham replicado uma única vez durante o período da cultura *in vitro*. Este procedimento evita os problemas relacionados com a análise de metáfases de linfócitos que tenham replicado duas ou mais vezes *in vitro* e conseqüentemente tenham perdido uma proporção de aberrações radioinduzidas, o que leva a uma redução na avaliação de dose.

Experimentos utilizando BrdU têm mostrado que a porcentagem de células em 2ª divisão é relativamente baixa em amostras de sangue não irradiado cultivadas durante 46 horas (VULPIS, N. & LLOYD, D.C., 1980).

Resultados divulgados mostram que somente cerca de 50% de dicêntricos e 12% dos anéis cêntricos são transferidos para o segundo ciclo mitótico (MÜLLER, W.U. & STREFFER, C., 1991).

Por ser a BrdU sensível à luz, os cultivos devem ser preparados sob luz de segurança (por exemplo: luz de segurança amarela) e incubadas no escuro.

É usual a adição de BrdU ao meio de cultivo em uma concentração que no final da mistura não exceda 50 µM (15,4 µg/mL). Acima desta concentração

existe a possibilidade da BrdU causar retardo mitótico. A maior parte dos laboratórios utilizam-na em concentração de 5 a 10 µg/mL (IAEA, 1986).

3.2.5. - Inibição mitótica

São utilizados como agente inibidor, colchicina ou democolcina (colcemid), sendo este último o preferido pela maioria dos laboratórios. Solução estoque contendo 25 µg/mL de colcemid em solução salina, preparada assepticamente e estocada a 4°C poderá ser mantida por 6 meses. Após 46 horas de incubação, a adição de 0,1 mL desta solução em cada tubo de cultivo proporcionará um número suficiente de metáfases. Problemas de toxicidade celular poderá ocorrer com concentrações mais elevadas.

A colchicina é uma substância que impede a formação do fuso mitótico, despolimerizando os microtúbulos que unem as cromátides aos centríolos, localizados nos pólos da célula, causando o desaparecimento do fuso mitótico e impedindo o deslocamento das cromátides para o pólo da célula (IAEA, 1986).

3.2.6. - Tubos de cultura e pH

Os tubos ou frascos de cultura podem ser de vidro autoclaváveis ou de plástico descartável. Para culturas de 5 mL, o volume do frasco deverá ser de no mínimo 10 mL.

O pH do cultivo deverá estar entre 6,8 e 7,2 . Bicarbonato poderá ser adicionado para aumentar a alcalinidade ou 5% de CO₂ em ar poderá ser adicionado para aumentar a acidez (IAEA, 1986).

3.2.7. - Tipos de cultivo e temperatura de incubação

Os métodos de cultivo são baseados na técnica originalmente publicada por MOORHEAD, P.S. *et al.*, 1960 e HUNGERFORD, D.A., 1965 ou modificadas. Os métodos são de 3 tipos: macrocultura, minicultura e microcultura.

O método mais utilizado pelos laboratórios é o da microcultura, que utiliza amostras pequenas de sangue (1 a 2 mL). Embora, o número de metáfases resultantes por lâmina seja menor que o dos outros métodos, a velocidade e a facilidade no manuseio dos cultivos é a grande vantagem deste método.

O procedimento inclui a adição de 0,3 mL de sangue total, 0,1 mL de PHA em tubo contendo 4 mL de meio e 1 mL de soro e incubação a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Temperaturas mais baixas resultarão em rendimento escasso de metáfases após 46 horas. Em temperatura alta (39°C) as células progredirão mais rapidamente através do ciclo e ocorrerá um excessivo número de metáfases em segunda divisão após 46 horas (IAEA, 1986). Quando a BrdU for adicionada ao cultivo, os tubos deverão ser encubados no escuro ou envoltos em papel alumínio.

3.3. - Preparação citológica

Os cultivos deverão ser centrifugados por 3 a 5 minutos a 600 g, o sobrenadante removido por aspiração e adicionada solução hipotônica (KCl 0,075M e Citrato de Sódio a 1%) a 37°C (IAEA, 1986).

3.3.1. - Solução hipotônica

Desde a introdução do pré-tratamento hipotônico de células mitóticas, a solução hipotônica mais largamente utilizada é a de cloreto de potássio a 0,075 M (HUNGERFORD,D.A.,1965). É indicado usá-la a 37°C e deve ser mantida no cultivo por 15-20 minutos, como alternativas podem ser utilizadas: sacarose 0,1M, Cloreto de Sódio 0,95% ou solução de Hanks diluída 1:4 em água destilada (IAEA, 1986).

3.3.2. - Fixação do material (amostra)

Os tubos deverão ser centrifugados, a solução hipotônica removida e o precipitado ressuspenso em solução fixadora. A solução fixadora utilizada é composta de metanol e ácido acético na proporção de 3:1, recém preparada.

O fixador (5 a 10 mL) deverá ser adicionado suavemente, em proporção constante, enquanto o tubo é agitado com um "vortex mixer". Isto assegura que as células fiquem dispersas em uma suspensão uniforme. As células deverão ser centrifugadas e ressuspensas três vezes no fixador. Na última lavagem o fixador deverá ser removido, deixando-se uma quantidade suficiente (0,25/0,50 mL) para a preparação das lâminas (IAEA, 1986).

3.3.3. - Preparo das lâminas

Em lâminas limpas, secas ou geladas, o precipitado deverá ser homogeneizado e gotejado (duas ou três gotas) com pipeta Pasteur. O gotejamento deverá ser efetuado de uma altura de pelo menos 10 cm. O número de lâminas

poderá variar entre 2 e 10. Antes do preparo de todas as lâminas, uma lâmina teste deverá ser feita e a concentração de metáfases avaliada. As lâminas deverão ser secas ao ar ou em chapa aquecida (IAEA, 1986).

3.3.4. - Coloração FPG e Giemsa convencional

O corante Hoechst 33258 (0,5 µg/mL em tampão fosfato - pH 6,8) deve ser colocado nas lâminas e estas devem ser cobertas com lamínulas, sem bolhas de ar. As lâminas devem ser expostas a luz UV de 20W com comprimento de onda de 254 ou 310 nm por 0,5 hora ou com 30W por 1,5 horas.

Para a coloração convencional com Giemsa, as lâminas devem ser imersas por 15 minutos em corante Giemsa a 2% em tampão fosfato - pH 6,8, lavadas em tampão, rapidamente lavadas em água destilada e secas. Podem ser montadas com lamínulas (IAEA, 1986).

Para análises cromossômicas, a técnica de Fluorescência mais Giemsa (FPG) é a mais valiosa na remoção de fontes de erro em dados de dose-resposta, particularmente para doses baixas.

A frequência de aberrações radioinduzidas, particularmente quando utilizadas para a elaboração de curvas dose-resposta, deve ser obtida por meio da avaliação dos linfócitos sanguíneos periféricos em sua primeira mitose (BAUCHINGER, M., 1979).

3.3.5. - Análise de lâminas

É necessário que a avaliação de toda lâmina seja feita sob pequeno aumento (10 X), sem levar em consideração a possível presença de aberração, para analisar a qualidade e quantidade das metáfases para posterior contagem. Para iniciar a contagem dos dicêntricos localize uma metáfase e altere o aumento para 100 X. Com a utilização da coloração FPG, a metáfase que apresentar o efeito “harlequin” deverá ser rejeitada pois indica que a célula não está no 1º ciclo mitótico (IAEA, 1986).

3.3.6. - Número de células analisadas

Para produzir uma estimativa de dose com baixa incerteza estatística há necessidade da análise de um grande número de células (metáfases) principalmente nos casos de doses baixas.

Após dose alta (4 Gy), o número de linfócitos deverá estar muito baixo e isto indica baixo número de metáfases, entretanto, neste caso o número de aberrações/célula será alto, o que permitirá uma estimativa razoável de dose.

Para a estimativa de dose deve-se analisar cerca de 500 a 1000 células, ou 100 dicêntricos. Em situações específicas, o número de células analisadas deve ser estendido para 1000 ou 5000 metáfases (IAEA, 1986; MÜLLER, W.U & STREFFER, C., 1991).

4. - CURVA DOSE-RESPOSTA "IN VITRO" (CURVA DE CALIBRAÇÃO)

4.1. - Considerações Gerais

O método dosimétrico depende do estabelecimento de uma relação entre a frequência (produto) de aberrações cromossômicas observadas na amostra dos linfócitos cultivados e a dose de radiação; e por meio desta curva de calibração será derivada a dose equivalente de corpo inteiro dos indivíduos envolvidos em acidentes (DuFRAIN,R.J. *et al.*, 1980; FABRY,L.& LEMAIRE,M., 1986).

Está estabelecido que se uma irradiação é homogênea as frequências de aberrações relacionadas com a dose absorvida são comparáveis, independentemente se a exposição ocorreu *in vivo* ou *in vitro* (LLOYD, D.C. & PURROTT, 1981; LLOYD, D.C. *et al.*, 1983; FABRY,L.& LEMAIRE,M., 1985 e 1986).

4.2. - Aspectos biológicos e físicos

Para a execução da curva dose-resposta alguns aspectos biológicos e físicos devem ser observados:

- 1) A amostra de sangue venoso fresco heparinizado deve ser mantida à temperatura corpórea (37°C) durante a irradiação *in vitro* e em todo o procedimento de cultivo;

2) Não deve ser adicionado meio de cultura nem mitogênico (PHA) ao sangue que será irradiado, pois a frequência de aberrações poderá ser alterada;

3) O cultivo da amostra deverá ser idêntico ao método padronizado que será utilizado na estimativa de dose de amostras de indivíduos radioexpostos;

4) O sangue deve ser cultivado somente durante dois dias. Linfócitos cultivados por tempos mais prolongados desenvolvem vários ciclos celulares que reduzem a frequência de dicêntricos;

5) A adição de 5-bromodeoxiuridina (BrdU) deve ser adotada para a identificação de metáfases em primeira ou subseqüentes divisões;

6) A coloração deve ser rotineiramente acompanhada da técnica de fluorescência mais Giemsa (FPG) no caso das células que incorporam BrdU;

7) A irradiação da amostra deverá apresentar dose uniforme com diferença de no máximo 2% entre a parte frontal e traseira do tubo;

8) O material do tubo que contém a amostra deverá ter composição atômica adequada, para evitar ao máximo o espalhamento;

9) Deve ser utilizado um sistema que movimente a amostra contida nos tubos, simulando a circulação do sangue.

4.3. - Fundamentos biofísicos, aspectos matemáticos e estatísticos relacionados à geração de curva dose-resposta

Tem sido demonstrado experimentalmente que dicêntricos radioinduzidos por uma única trajetória têm uma frequência proporcional à função linear de dose (αD) e esta frequência é independente da taxa de dose, enquanto que dicêntricos induzidos por duas trajetórias têm uma frequência proporcional ao quadrado da dose (βD^2) (um componente de dose sendo necessário para cada dano) (fig.3).

A relação dose-resposta mais apropriada e que tem significância biológica é obtida por meio da equação linear-quadrática (propriamente denominada, quadrática): $Y = C + \alpha D + \beta D^2$, onde Y é a frequência de aberrações observadas; C é a frequência de aberrações espontâneas; D é a dose; α e β são os coeficientes de regressão que determinam a forma e a inclinação da curva, sendo α o coeficiente de regressão linear e β o coeficiente de regressão quadrático da dose (Fig.3) (CATCHESIDE, D.G *et al.*, 1946; BAUCHINGER, M. *et al.*, 1983; MERCKLE, W., 1983; FABRY, L. *et al.*, 1985; BENDER, M.A. *et al.*, 1988; HALL, E.J., 1994; EDWARDS A.A. *et al.*, 1996).

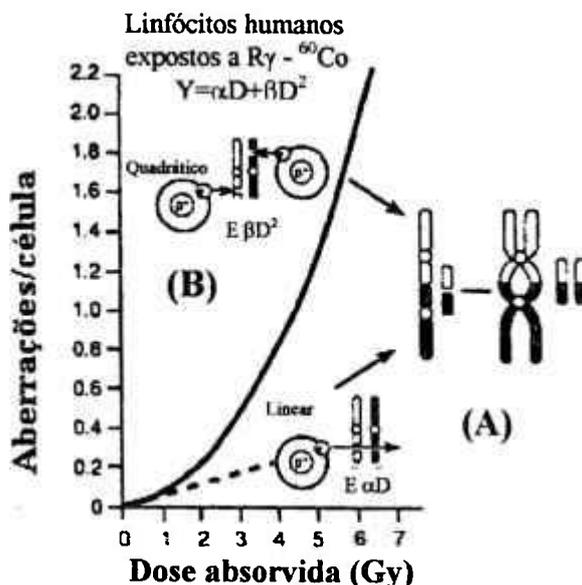


Figura 3. Formação de aberrações cromossômicas induzidas por uma trajetória (A) ou por duas trajetórias (B) (HALL, E.J., 1994).

Uma das propriedades desta equação é que a razão dos valores dos coeficientes (α/β) representa a dose na qual os danos induzidos por uma trajetória (componente linear) e os danos induzidos pela interação de duas trajetórias (componente quadrático) contribuem igualmente para a formação de dicêntricos, tendo como razão o valor 1. A relativa contribuição de αD aumenta com a LET elevada. Em doses pequenas de radiação de baixa LET as quebras requeridas para a formação de dicêntrico serão produzidas pela passagem de uma única trajetória de radiação ionizante, podendo se presumir que quando o componente β for muito pequeno, o produto das aberrações deixará de ser afetado pela taxa de dose. Assim, em doses muito baixas o coeficiente linear predomina, enquanto que em doses elevadas o coeficiente quadrático é o predominante (FABRY, L *et al.*, 1985; BAUCHINGER, M., 1995).

A frequência das aberrações radioinduzidas depende da dose que está diretamente relacionada com a distribuição de energia depositada pela radiação (LET). A LET é um importante parâmetro para determinar a forma da curva dose-resposta, a eficácia relativa de diferentes tipos de radiação na indução de aberrações cromossômicas e a distribuição de danos cromossômicos em células afetadas. Assim, a curva dose-resposta obtida por meio da frequência de dicêntricos induzidos por radiação de baixa LET será composta por uma combinação de eventos produzidos por uma e duas trajetórias; sendo que com uma trajetória, o dicêntrico produzido será mais freqüente para doses baixas e com duas trajetórias será mais freqüente para doses altas.

Para doses pequenas (menor que 50 cGy) de baixa LET, a probabilidade que duas trajetórias atravessem um alvo é extremamente baixa e os dicêntricos serão produzidos quase que exclusivamente por uma trajetória e com frequência baixa.

Para radiações de alta LET, acima de 20 keV/ μm , a curva dose-resposta será linear (IAEA, 1986).

Outro fator envolvido na relação dose-resposta citogenética é a taxa de dose, que é importante para radiações de baixa LET mas não para muitas radiações de alta LET. Na equação linear-quadrática o componente βD^2 é dependente da taxa de dose porque é suposto ser o resultado de uma interação de eventos e por consequência mais baixo quando os eventos são temporalmente distanciados. O período de tempo para tais interações é limitado em aproximadamente 2 horas, uma redução da taxa de dose resulta no decréscimo da frequência dos dicêntricos e concomitantemente, em decréscimo do termo quadrático da dose (βD^2) (BAUCHINGER, M., 1995).

Quando as células são expostas à radiação de baixa LET com taxa de dose muito baixa, o termo βD^2 atinge valores próximo de zero. Nestas condições estima-se que o dano nos cromossomos seja determinado por uma trajetória e consequentemente, a relação linear (αD) expressa melhor a frequência de dicêntricos.

É recomendado quando da construção de curva dose-resposta sejam utilizados 6-8 pontos de dose no intervalo de 25 - 400 cGy e que um esforço deva ser feito para reduzir a incerteza estatística associada ao produto (Y) do coeficiente α , para isto 3 a 4 doses devem estar no intervalo de 25-100 cGy e se for possível, obter dados com doses abaixo de 25 cGy. Para doses elevadas a contagem deverá encontrar 100 dicêntricos para cada dose, mas isto não poderá

ser obtido para doses baixas, neste caso, várias centenas de células deverão ser contadas (IAEA, 1986).

Opiniões variam em como tratar o nível de aberrações espontâneas quando do ajuste da curva. Assim, como o produto de dicêntricos em células não irradiadas é usualmente muito baixo ($\pm 0,55 \times 10^{-3}$) ou nenhum, a medida do produto na dose zero, é zero. Alguns pesquisadores resolvem este problema ignorando os dados do ponto de dose zero e constróem a curva passando pela origem (LLOYD, D.C. & EDWARDS, A.A., 1983b; IAEA, 1986).

4.3.1. - Considerações estatísticas

Para propósitos de calibração, uma análise estatística apropriada das funções dose-resposta deve ser executada.

Estudos radiobiológicos têm mostrado que os eventos de deposição de energia, que resultam em aberrações cromossômicas, são aleatórios em células expostas à radiação. Por causa dessa aleatoriedade - natureza quântica dos eventos - a dispersão dos danos cromossômicos nas células é adequadamente tratada por meio da distribuição de Poisson na qual a variância é igual a média (DuFRAIN, R.J., *et al.*, 1980; MERKLE, W., 1983; FROME, E.L. & DuFRAIN, R.J., 1986).

Análise de 50.000 metáfases de linfócitos humanos irradiados mostrou que a distribuição de Poisson trata adequadamente a dispersão de dicêntricos para baixa LET e para algumas formas de radiação de alta LET (EDWARDS, A.A., *et al.*, 1979).

A avaliação de 200 a 500 metáfases é normalmente suficiente para a estimativa de dose em casos de exposição acidental. Para a obtenção da curva dose-resposta *in vitro* é fundamental o número de metáfases que deverá ser analisado. Para a relação dose-resposta *in vitro*, a determinação das doses a serem avaliadas e do número de células por dose variam dependendo dos níveis de dose de interesse e da qualidade da radiação (LLOYD, D.C., *et al.*, 1978).

Análises de regressão de Poisson deverão ser usadas para estimar os parâmetros α e β que determinam a forma e a inclinação da curva dose-resposta (FROME, E.L. & DuFRAIN, R.J.; 1986).

Algumas técnicas matemáticas/estatísticas são indicadas para o ajuste do modelo linear-quadrático de dose-efeito quando da elaboração de curvas de calibração. O objetivo do ajuste da curva é determinar quais valores dos coeficientes, α e β melhor se ajustam aos pontos de dose.

Uma das técnicas mais comuns é a de minimizar a soma das diferenças quadráticas entre os valores observados e os ajustados. Contudo, a técnica recomendada para a determinação de coeficientes com melhor ajuste é o da *probabilidade máxima* “maximum likelihood” (PAPWORTH, D.G., 1975), que deve ser feita por meio da maximização da probabilidade das observações, assumindo a distribuição de Poisson e utilizando o método dos *mínimos quadrados repesados iterativamente* (iteratively re-weighted least square- IRLS) (IAEA, 1986; BILBAO, A., 1992). Assim, o erro padrão (SE- standard error) dos coeficientes α e β e os valores ajustados deverão ser baseados na distribuição de Poisson.

Se os dados mostram uma tendência de σ^2/Y com a dose, então essa tendência deve ser usada. Caso contrário deveremos dividir todos os pesos Poisson pela média dos valores de σ^2/Y .

4.3.2. - Distribuição de dicêntricos utilizando a estatística de Poisson

4.3.2.1. - Probabilidade da distribuição de dicêntricos

Considerando que as interações da radiação de baixa LET com as células sejam eventos aleatórios, a distribuição dos dicêntricos nas células obedece a distribuição de Poisson, assim, a probabilidade das células terem “n” dicêntricos ($P_{(n)}$) é dada por:

$$P_{(n)} = \frac{e^{-Y} \cdot Y^n}{n!}$$

onde Y é a frequência (dicêntricos/célula) e n é o número de dicêntricos observados por ponto de dose.

Considerando que na distribuição de Poisson, a variância é igual a frequência ($\text{Var}=Y$), o erro padrão (standard error) é dado por:

$$SE = \sqrt{\frac{\text{Var}}{Y}}$$

4.3.2.2. - Testes para avaliação da distribuição de dicêntricos entre as células (testes indicativos de dispersão)

Alguns testes de dispersão são recomendados para avaliação da distribuição dos dicêntricos na estatística de Poisson: **teste do X^2 , variância relativa (VR) e índice de dispersão “U” de Papworth.**

O teste de X^2 por ser de execução fácil é usualmente utilizado, contudo em muitas avaliações tem se mostrado pouco sensível.

A **variância relativa (VR)** baseia-se na distribuição de Poisson, na qual a variância é igual a média, assim, é dada por:

$$VR = \frac{\sigma^2}{Y}$$

onde, σ^2 é a variância e Y é a frequência. Na distribuição de Poisson, a variância relativa (VR) é esperada ser 1.

O **índice de dispersão “U” de Papworth** (PAPWORTH,D.G., 1975) compara as diferenças entre a variância (σ^2) e a frequência de dicêntricos/célula (Y).

Para a execução do índice de dispersão “U”, inicialmente calcula-se o coeficiente de dispersão (CD) por meio da fórmula (1):

$$CD = \frac{\sigma^2(N-1)}{Y} \quad (1)$$

onde, σ^2 é a variância, N é o número total de células analisadas e Y é a frequência de dicêntricos/célula.

Em seguida, aplica-se a fórmula do índice de dispersão “U”(2):

$$U = \frac{\frac{\sigma^2(N-1)}{Y} - (N-1)}{\sqrt{2(N-1)(1-1/NY)}} \quad (2)$$

Para a interpretação do índice de dispersão “U” devemos considerar que se na distribuição de Poisson a variância dividida pela média é igual a 1, o esperado para o índice de dispersão “U” será igual a zero. Assim, se “U” for maior que 1,96, a distribuição mostra-se significativamente dispersa. EDWARDS, *et al.* (1979), relataram que se o valor absoluto de “U” for maior que 1,96 (valores positivo ou negativo) a dispersão é significativa, pois há somente 5% de probabilidade que “U” exceda 1,96 quando a distribuição é Poisson. Se ocorrer super-dispersão, a variância aumentará, a variância relativa (VR) será maior que 1 e resultará em um valor positivo para “U”. Se por outro lado, a distribuição apresentar sub-dispersão, a variância mostrar-se-á reduzida, a variância relativa será menor que 1 e produzirá um valor negativo para “U” (DOGGETT, N. A & MCKENZIE, W.H., 1983).

II - OBJETIVO

O presente projeto tem por finalidade fornecer fundamentos básicos sobre dosimetria citogenética e elaborar curvas dose-resposta (curvas de calibração) para ^{60}Co e ^{137}Cs com taxa de dose de $5 \text{ cGy}\cdot\text{min}^{-1}$, com o intuito de estimar dose em indivíduos acidentalmente expostos a esses radionuclídeos.

1. - PARTE EXPERIMENTAL

1.1. - Obtenção das amostras

As amostras foram obtidas por punção venosa, com seringa plástica descartável. O volume total coletado para cada experimento foi de 25 mL.

As amostras foram coletadas de 4 doadores sadios, com idade entre 20 e 35 anos, não fumantes, de ambos os sexos (2 do sexo feminino e 2 do sexo masculino) e que não estavam ingerindo qualquer tipo de medicamento.

O sangue total foi transferido assepticamente para sete seringas estéreis, previamente heparinizadas com Lique mine (Roche) -10-100 IU/mL de sangue, - na proporção de 3 mL para cada seringa. O restante foi transferido para um frasco contendo EDTA (sal dissódico ou dipotásico do ácido etilenodiaminotetracético) para contagem de plaquetas (plaquetometria) e 1 mL de sangue não heparinizado, foi utilizado para a confecção de leucograma global.

Todas as amostras foram mantidas antes, durante e após o processo de irradiação em temperatura de 37°C por meio de banho de água termostaticado e em estufa.

1.2. - Processo de irradiação

As amostras obtidas dos doadores voluntários foram irradiadas em fonte de ^{60}Co (γ) (FLEXARAY) ou em fonte de ^{137}Cs (γ) (CESAPAM-M), ambas com taxa de dose de $5 \text{ cGy} \cdot \text{min}^{-1}$. Seis pontos de dose foram estabelecidos no intervalo entre 20 e 400 cGy. Os pontos de dose foram 20, 50, 100, 200, 300 e 400 e uma amostra controle (0) que não recebeu irradiação.

O campo de irradiação foi calibrado por meio de dosímetros TLD (Dosímetro de tetrafluoreto de lítio). A taxa de exposição foi medida no ar por meio de câmara de ionização e as exposições foram convertidas para doses absorvidas em tecidos moles ($1\text{R} = 0,98 \text{ cGy}$).

Para que as amostras irradiadas *in vitro* tivessem as condições mais próximas possíveis do *in vivo*, foi desenvolvido um dispositivo que consiste de uma caixa de acrílico contendo água destilada mantida a 37°C por meio de um aquecedor com termostato. No interior da caixa há um disco giratório de acrílico com 20 cm de diâmetro, preso a um eixo acionado por um motor que movimentava o disco a 20 rpm onde são presas as seringas contendo as amostras (fig.4). Na irradiação utilizou-se um feixe que abrangia todas as amostras e procedeu-se a retirada de cada seringa assim que a dose requerida fosse completada.

As amostras após a irradiação foram deixadas em repouso por pelo menos uma hora a 37°C para permitir que ocorresse o processo de reparo das lesões.

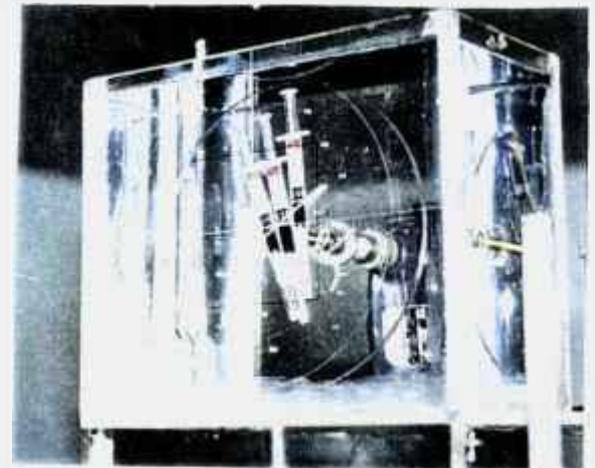
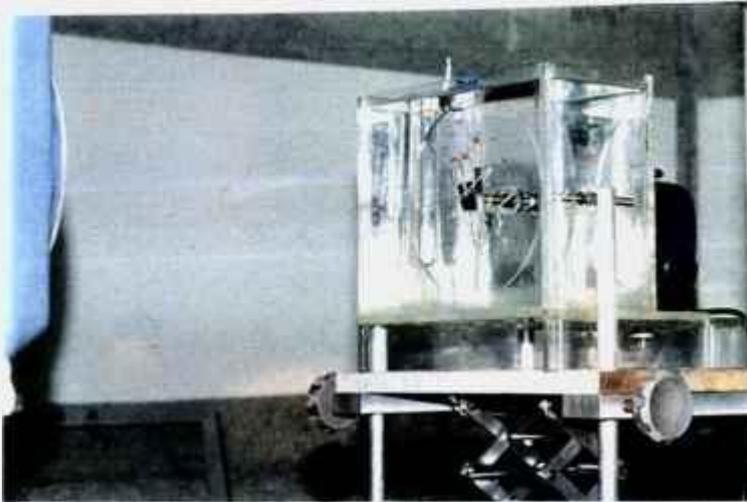


Figura 4- Dispositivo de irradiação das amostras

1.3. - Cultivo das amostras (fase estéril)

O cultivo foi efetuado em tubos de cultura estéril. As amostras foram homogeneizadas e 0,5 mL de sangue total de cada amostra foi gotejado em tubo contendo 8,0 mL de meio MEM (Cultilab) suplementado com 20% de soro fetal bovino (Cultilab), fitohemaglutinina (5 $\mu\text{g/mL}$ - Sigma) e BrdU (5 $\mu\text{g/mL}$ - Sigma). Os cultivos foram incubados por 46 horas em estufa a 37°C e, colchicina (0,1 $\mu\text{g/mL}$ - Sigma) foi adicionada. A incubação foi mantida por mais duas horas (método de MOORHEAD modificado) (MOORHEAD, P.S. *et al.*, 1960).

1.4. - Preparação citológica (fase não estéril)

Ao término do período de cultivo, as células foram hipotonizadas com solução KCl 0,075 M e Citrato de Sódio a 1% (3:1) por 15 minutos e fixadas com solução de metanol e ácido acético (3:1). Após a última centrifugação o material dos tubos foi gotejado em lâminas histológicas, as quais foram lavadas com Hoechst 33258, incubadas em placa aquecida a 60°C sob luz UV (254 nm) e cobertas com tampão Mc Ilvaine (0,5 mL - pH 8,0). Após duas horas as lâminas foram lavadas em água destilada e coradas com Giemsa (técnica de fluorescência mais Giemsa - FPG) (PERRY, P.; WOLFF, S., 1974).

1.5. - Contagem de plaquetas (plaquetometria)

Das amostras de sangue total obtidas por punção venosa de cada doador, mantidas em frasco contendo EDTA, foram retirados 100 µL e adicionados a 1900 µL de uma solução anticoagulante de oxalato de amônia a 1% previamente preparada (1g de oxalato de amônia em 100 mL de água destilada). A contagem das plaquetas foi efetuada na parte reticulada central da câmara de Neubauer (HENRI, J.B., 1983).

1.6. - Contagem de leucócitos (leucograma)

Das amostras de sangue total obtidas por punção venosa de cada doador, 1mL de sangue não heparinizado foi utilizado para a contagem global de leucócitos (leucograma global).

Para determinar o número total de leucócitos por mm^3 de sangue, foi utilizado o líquido de Türk que é composto de 2 mL de ácido acético, 1 mL de solução de violeta de Genciana e 100 mL de água destilada. Adiciona-se a esta solução 100 μL de sangue na proporção 1:20 e preenche-se a câmara de Neubauer (HENRI, J.B., 1983).

Para a contagem diferencial, procedeu-se a extensão com sangue em EDTA. Para a coloração das lâminas, a extensão foi fixada por 3 minutos em álcool metílico e corada com Giemsa durante 20 minutos.

Para a obtenção de curvas dose-resposta, amostras de sangue total coletadas de doadores sadios, com idade entre 20 e 35 anos, não fumantes, de ambos os sexos (2 do sexo masculino e 2 do sexo feminino) e que não estavam ingerindo qualquer tipo de medicamento foram irradiadas em fonte de ^{60}Co (γ) e de ^{137}Cs (γ) com taxa de dose de $5 \text{ cGy} \cdot \text{min}^{-1}$. Seis pontos de dose foram estabelecidos, 20, 50, 100, 200, 300 e 400 cGy e um controle não irradiado.

Experimento 1. Curva dose-resposta para ^{60}Co

A frequência e o número de dicêntricos radioinduzidos em linfócitos sangüíneos humano observados por ponto de dose nas amostras de 2 doadores é apresentado na Tabela I.

A distribuição de dicêntricos e anéis cêntricos radioinduzidos das amostras analisadas é mostrada na Tabela II.

Os dados agrupados das 2 amostras analisadas, os resultados dos testes de dispersão relacionados com a distribuição de Poisson e a frequência (Y) ajustada pela equação $Y = \alpha D + \beta D^2$ são apresentados na Tabela III.

A curva dose-resposta para dicêntricos obtida por meio das frequências ajustadas pelo modelo matemático linear-quadrático e os valores dos coeficientes α e β são mostrados na Figura 5.

A distribuição dos dicêntricos em função da dose nas 2 amostras analisadas é apresentada sob a forma de histograma na Figura 6.

Dados experimentais e coeficientes α e β obtidos por diversos autores e os deste experimento são relacionados na Tabela IV.

Curvas dose-resposta para dicêntricos radioinduzidos em linfócitos sanguíneos humano expostos *in vitro*, relatadas por diversos autores e a deste trabalho, em diversas taxas de dose, são mostradas na Figura 7.

Tabela I. Frequência de dicêntricos radioinduzidos em linfócitos sanguíneos humano expostos *in vitro* ao ^{60}Co

Dose (cGy)	n ^o . células analisadas	dicêntricos	freqüência de dic./cél. (Y)
DOADOR JEO			
sexo M - 32 anos			
0	500	2	0.0040
20	592	6	0.0101
50	500	11	0.0220
100	500	35	0.0700
200	500	92	0.1840
300	501	205	0.4092
400	463	344	0.7430
DOADOR EPA			
sexo F - 26 anos			
0	500	0	0.0000
20	500	10	0.0200
50	500	27	0.0540
100	500	57	0.1140
200	500	128	0.2560
300	500	154	0.3080
400	502	352	0.7012

Tabela II. Distribuição de dicêntricos e anéis cêntricos radioinduzidos em linfócitos sangüíneos humano expostos *in vitro* ao ^{60}Co

Dose (cGy)	0 <i>dicêntrico</i>	1 <i>dicêntrico</i>	2 <i>dicêntricos</i>	3 <i>dicêntricos</i>	4 <i>dicêntricos</i>	<i>anel</i> <i>cêntrico</i>
DOADOR JEO						
0	498	2	0	0	0	0
20	586	6	0	0	0	0
50	489	11	0	0	0	0
100	466	33	1	0	0	0
200	411	84	4	0	0	1
300	326	144	26	3	0	2
400	202	177	60	13	2	9
DOADOR EPA						
0	500	0	0	0	0	0
20	490	10	0	0	0	0
50	473	27	0	0	0	0
100	444	53	2	0	0	1
200	383	101	12	1	0	3
300	375	96	26	2	0	1
400	230	194	58	14	0	6

Tabela III. Frequência e distribuição de dicêntricos radionduzidos em linfócitos sanguíneos periféricos humanos expostos *in vitro* ao ^{60}Co com taxa de dose $5 \text{ cGy} \cdot \text{min}^{-1}$. Dados agrupados das amostras analisadas

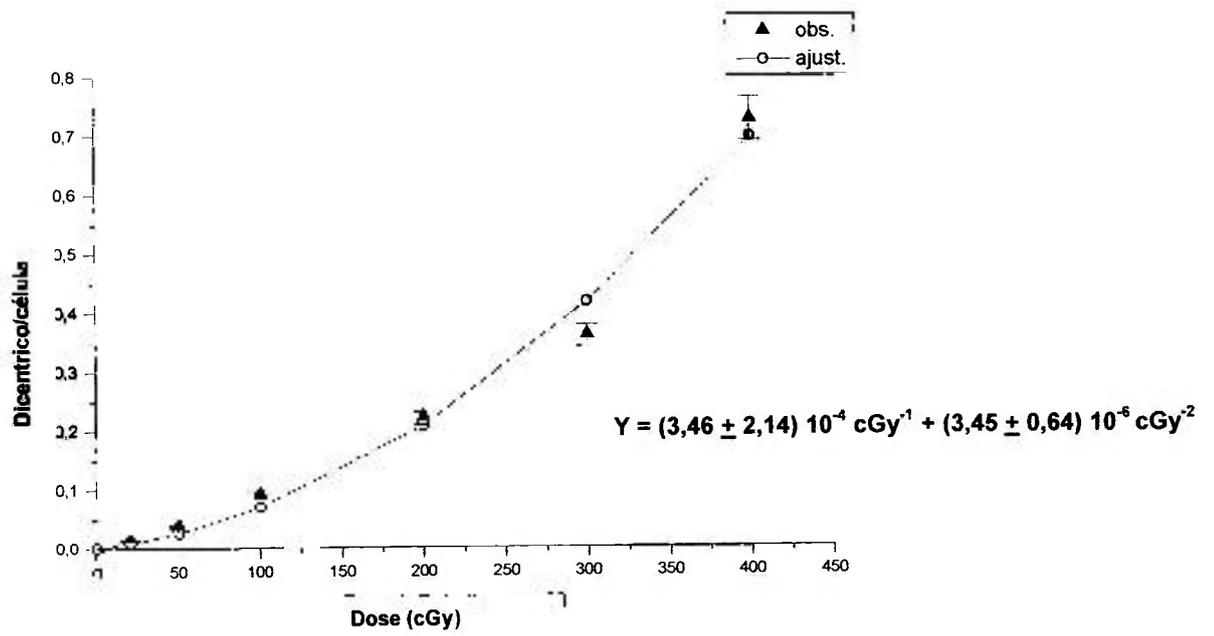
Dose (cGy)	n° células analisadas	Dicêntricos	Anéis Cêntricos	Dicêntricos/célula (Y)	Y ajustado \pm SE ⁽¹⁾	distribuição de dicêntricos				σ^2/Y^2	U ⁽³⁾	
						0	1	2	3			4
0	1000	2	0	0.0020	0 \pm 0	998	2	0	0	0	1.00	0.00
20	1092	16	0	0.0146	0.0083 \pm 0.0027	1076	16	0	0	0	0.99	-0.24
50	1000	38	0	0.0380	0.0260 \pm 0.0051	962	38	0	0	0	0.96	-0.84
100	1000	92	1	0.0920	0.0692 \pm 0.0083	910	86	3	0	0	0.97	-0.59
200	1000	220	4	0.2200	0.2074 \pm 0.0144	794	185	16	1	0	0.95	-1.04
300	1001	359	3	0.3586	0.4148 \pm 0.0203	701	240	52	5	0	1.02	0.35
400	965	696	15	0.7212	0.6912 \pm 0.0267	432	371	118	27	2	0.89	-2.50

(1) SE: Poisson Standard Error

(2) relação variância com a média

(3) teste U de Papworth (Papworth, D. G., 1975)

ERRATA PÁGINA 62



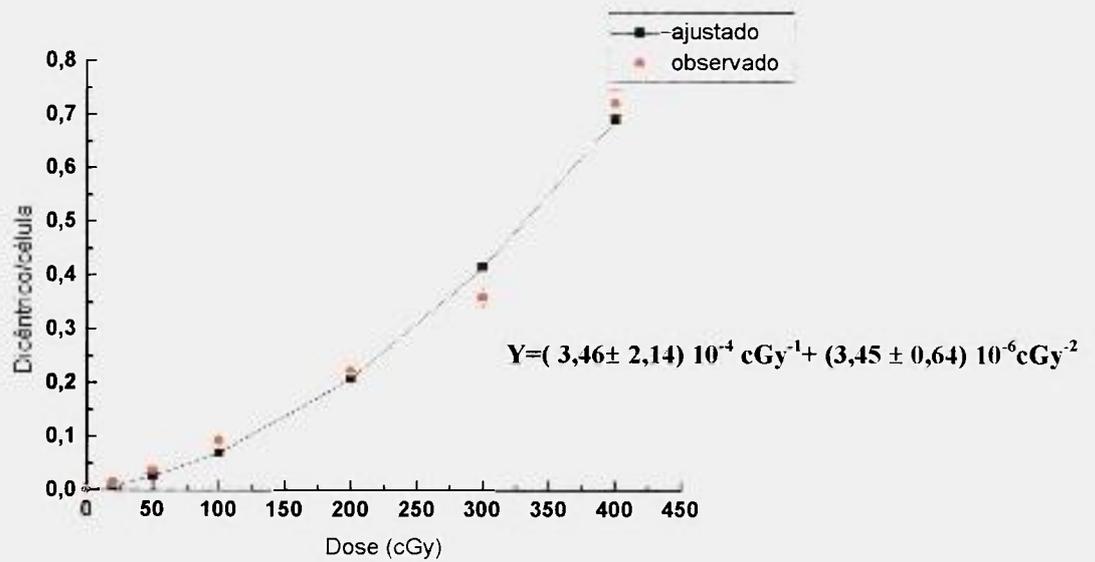


Fig.5. Curva dose-resposta para dicêntricos induzidos em linfócitos sanguíneos humano exposto *in vitro* ao ^{60}Co com taxa de dose de 5 cGy.

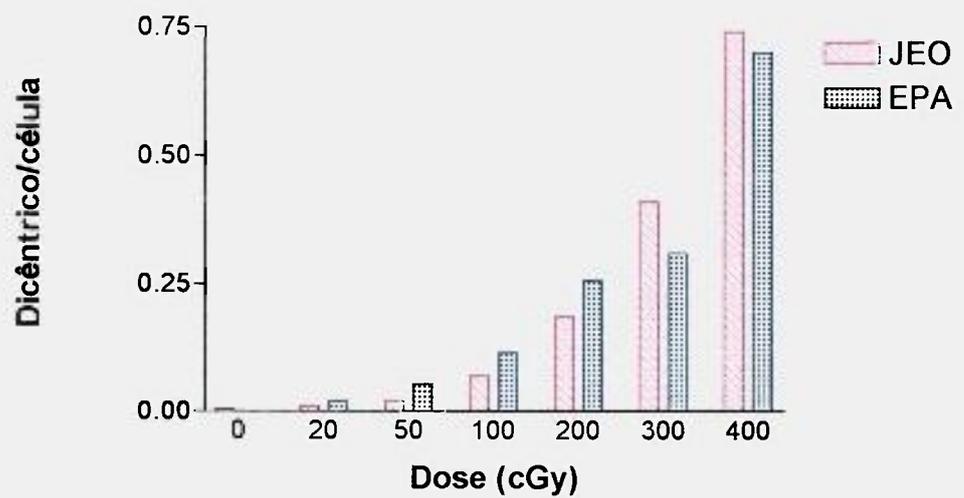


Figura 6. Histograma da distribuição de dicêntricos em função da dose de radiação em amostras sanguíneas humanas expostas *in vitro* ao ^{60}Co

Tabela IV. Dados experimentais e coeficientes α e β obtidos por meio da equação $Y=\alpha D + \beta D^2$ relatados para ^{60}Co por diversos autores

Taxa de dose (cGy.min ⁻¹)	Intervalo de doses (cGy)	Temperatura durante a exposição (°C)	Tempo de cultivo (h)	Método BrdU-Giemsa	Tipo de aberração	α (10 ⁻⁴ cGy ⁻¹)	β (10 ⁻⁶ cGy ⁻²)	α/β cGy	Autores
1.7	25 - 400	37	48	não	dic.	2.7 ± 0.8	3.04 ± 0.4	0.88	Bauchinger, M. <i>et al.</i> , 1979b
12	20 - 400	37	46	não	dic.	2.7 ± 1.03	2.20 ± 0.49	1.23	Ramalho, A.T. <i>et al.</i> , 1988
35	0 - 400	37	45	sim	dic.	0.938 ± 0.0225	5.91 ± 0.169	0.16	Bilbao, A., 1992
50	25 - 400	37	48	não	dic.	2.7 ± 0.7	4.75 ± 0.34	0.56	Bauchinger, M. <i>et al.</i> , 1979b
78	0 - 500	37	48	não	dic.	2.746 ± 0.289	6.604 ± 0.170	0.41	Zhicheng, D., 1989
5	0 - 400	37	46	sim	dic.	3.46 ± 2.14	3.45 ± 0.64	1.0	presente trabalho

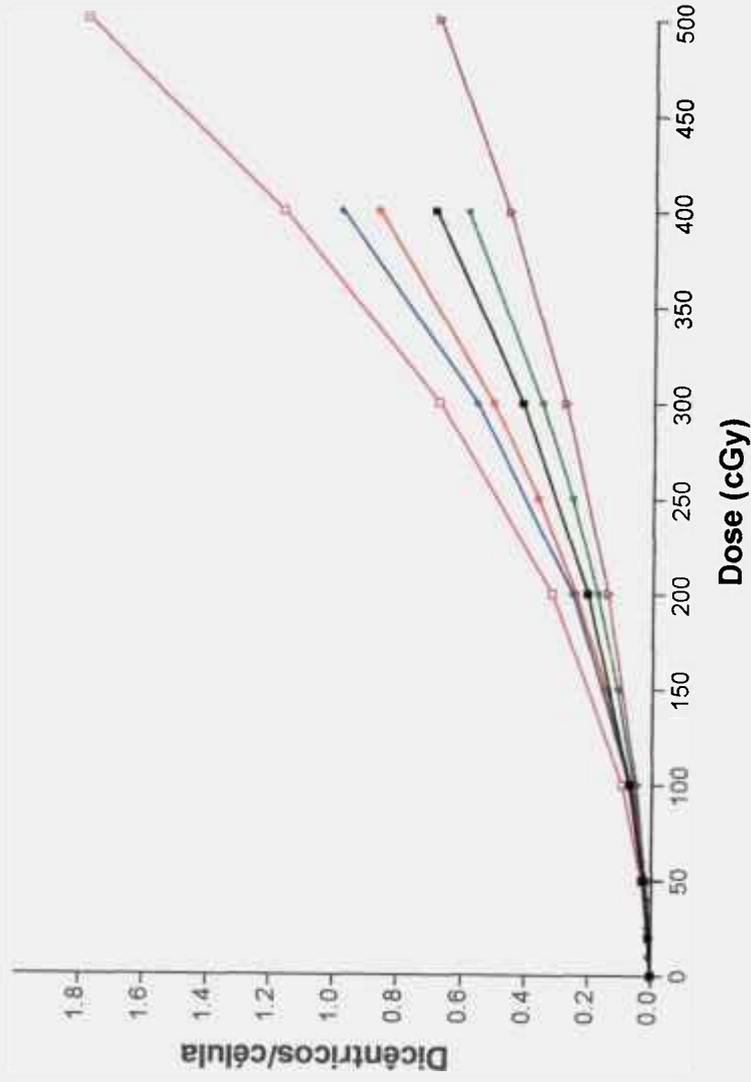


Fig. 7. Curvas dose-resposta para dicêntricos induzidos em linfócitos sanguíneos humanos expostos *in vitro* ao ⁶⁰Co em diversas taxas de dose

Experimento 2. Curva dose-resposta para ^{137}Cs

A frequência e o número de dicêntricos radioinduzidos em linfócitos sanguíneos humano observados por ponto de dose nas amostras de 2 doadores é apresentado na Tabela V.

A distribuição de dicêntricos e anéis cêntricos radioinduzidos das amostras analisadas é mostrada na Tabela VI.

Os dados agrupados das 2 amostras analisadas, os resultados dos testes de dispersão relacionados com a distribuição de Poisson e a frequência (Y) ajustada pela equação $Y = \alpha D + \beta D^2$ são apresentados na Tabela VII.

A curva dose-resposta para dicêntricos obtida por meio das frequências ajustadas pelo modelo matemático linear-quadrático e os valores dos coeficientes α e β são mostrados na Figura 8.

A distribuição dos dicêntricos em função da dose nas 2 amostras analisadas é apresentada sob a forma de histograma na Figura 9.

Dados experimentais e coeficientes α e β obtidos por diversos autores e os deste experimento são relacionados na Tabela VIII.

Curvas dose-resposta para dicêntricos radioinduzidos em linfócitos sanguíneos humano expostos *in vitro*, relatadas por diversos autores e a deste trabalho, em diversas taxas de dose, são mostradas na Figura 10.

Tabela V. Frequência de dicêntricos radioinduzidos em linfócitos sanguíneos humanos expostos *in vitro* ao ^{137}Cs .

Dose (cGy)	n ^o . células analisadas	dicêntricos	frequência de dic./cél. (Y)
DOADOR LEMFD			
sexo F - 35 anos			
0	500	0	0.0000
20	560	14	0.0250
50	590	56	0.0949
100	500	62	0.1240
200	500	116	0.2320
300	500	155	0.3100
400	498	298	0.5984
DOADOR EKMU			
sexo M - 25 anos			
0	500	0	0.0000
20	602	10	0.0166
50	600	28	0.0466
100	600	51	0.0850
200	500	146	0.2920
300	500	230	0.4600
400	500	345	0.6900

Tabela VI. Distribuição de dicêntricos e anéis cêntricos radioinduzidos em linfócitos sangüíneos humano expostos *in vitro* ao ^{137}Cs .

Dose (cGy)	0	1	2	3	4	anel
	<i>dicêntrico</i>	<i>dicêntrico</i>	<i>dicêntricos</i>	<i>dicêntricos</i>	<i>dicêntricos</i>	<i>cêntrico</i>
DOADOR LEMFD						
0	500	0	0	0	0	0
20	546	14	0	0	0	0
50	535	54	1	0	0	0
100	444	43	8	1	0	4
200	395	94	8	2	0	1
300	370	108	19	3	0	0
400	266	167	46	13	0	6
DOADOR EKMU						
0	500	0	0	0	0	0
20	592	10	0	0	0	0
50	575	22	3	0	0	0
100	554	41	5	0	0	0
200	369	116	15	0	0	0
300	298	174	28	0	0	0
400	202	248	44	3	0	3

Tabela VII. Freqüência e distribuição de dicêntricos radionduzidos em linfócitos sanguíneos humano expostos *in vitro* ao ^{137}Cs com taxa de dose $5 \text{ cGy} \cdot \text{min}^{-1}$. Dados agrupados das amostras analisadas

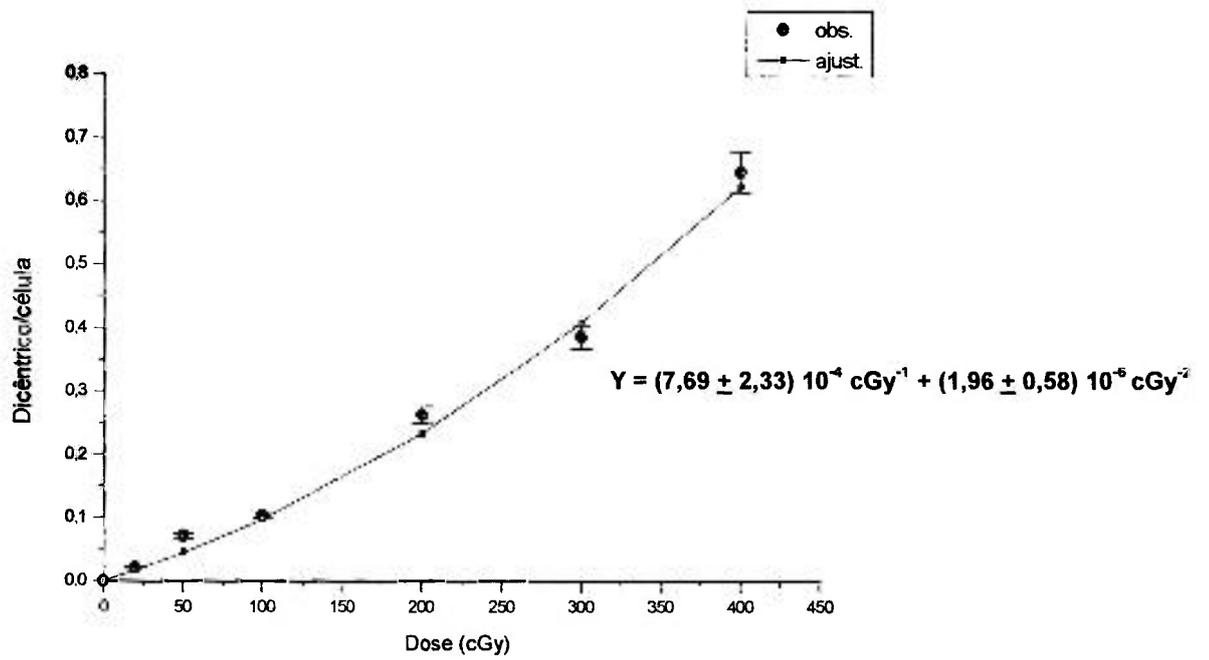
Dose (cGy)	n° células analisadas	Dicêntricos	Anéis Cêntrico	Dicêntricos/célula (Y)	Y ajustado \pm SE ⁽¹⁾	distribuição de dicêntricos				$\sigma^2/Y^{(2)}$	U ⁽³⁾	
						0	1	2	3			4
0	1000	0	0	0.0000	0 \pm 0	1000	0	0	0	0	0.00	
20	1162	24	0	0.0206	0.01616 \pm 0.0037	1138	24	0	0	0	0.98	-0.48
50	1190	84	0	0.0706	0.04335 \pm 0.0060	1110	76	4	0	0	1.02	0.63
100	1100	113	4	0.1027	0.09650 \pm 0.0093	998	84	13	1	0	1.18	4.29
200	1000	262	1	0.2620	0.23220 \pm 0.0152	764	210	23	2	0	0.96	-0.89
300	1000	385	0	0.3850	0.40710 \pm 0.0201	668	282	47	3	0	0.91	-2.09
400	998	643	9	0.6443	0.62120 \pm 0.0249	468	415	90	16	0	0.79	-0.10

(1) SE: Poisson Standard Error

(2) relação variância com a média

(3) teste U de Papworth (Papworth, D.G., 1975)

ERRATA PÁGINA 69



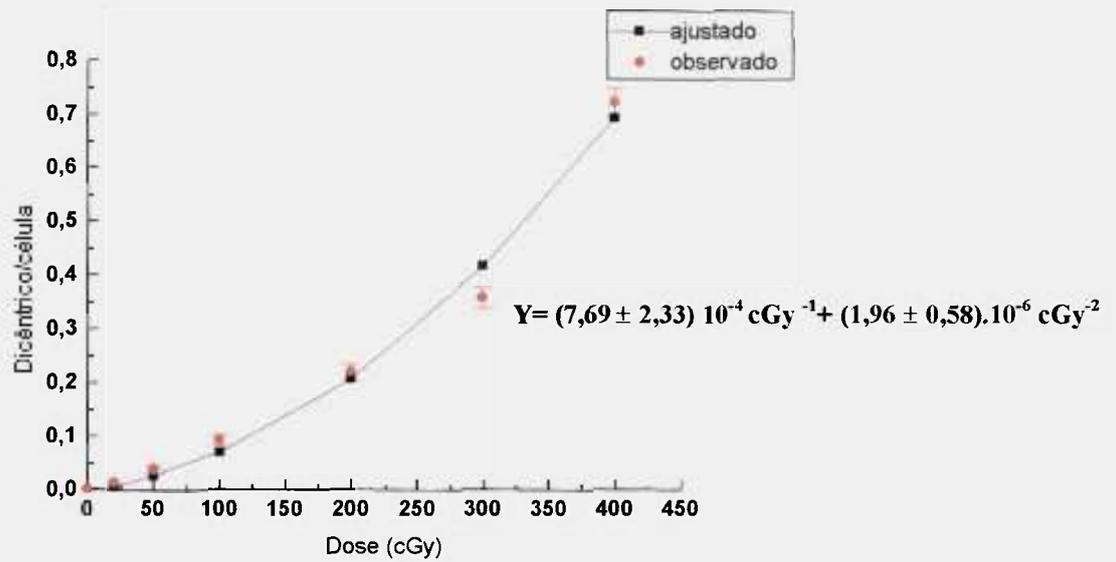


Fig.8. Curva dose-resposta para dicêntricos induzidos em linfócitos sanguíneos humano exposto *in vitro* ao ^{137}Cs com taxa de dose de 5 cGy.

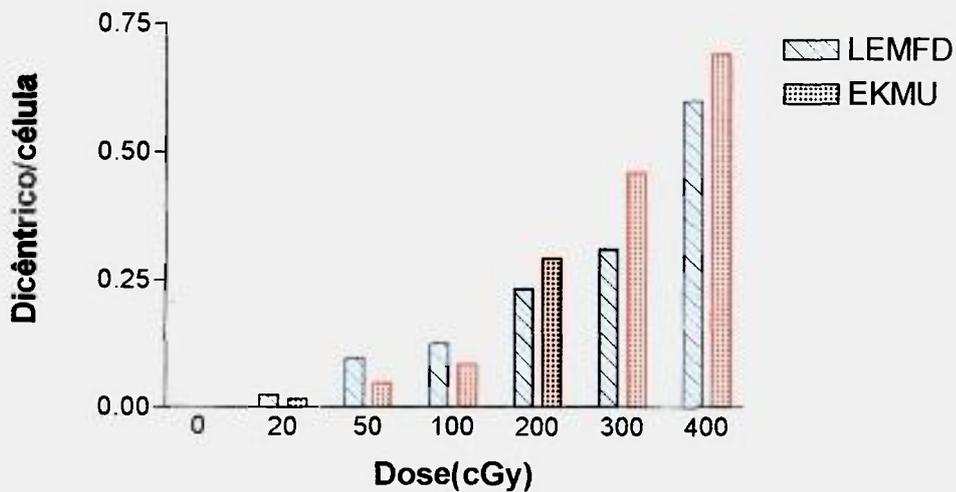


Fig.9. Histograma da distribuição de dicêntricos em função da dose de radiação em amostras sanguíneas humanas expostas *in vitro* ao ^{137}Cs .

Tabela VIII. Dados experimentais e coeficientes α e β obtidos por meio da equação $Y = \alpha D + \beta D^2$ relatados para ^{137}Cs por diversos autores

Taxa de dose (cGy.min ⁻¹)	Intervalo de doses (cGy)	Temperatura durante a exposição (°C)	Tempo de cultivo (h)	Método	Tipo de aberração	α (10 ⁻⁴ cGy ⁻¹)	β (10 ⁻⁶ cGy ⁻²)	α/β cGy	Autores	Observações
10.0	100 - 600	24 ± 2	45	não	dic.	20.1 ± 3.8	1.89 ± 0.75	10.6	Doggett, N.A. & Mckenzie, W.H., 1983	Temperatura de irradiação/ Não tem doses baixas
0.07 - 0.44	105 - 628	33 - 35	52	não	dic. + anel	6.8 ± 1.0	0.68 ± 0.23	10.0	Brewen, J.G. & Luippold, H.E., 1971	Temperatura de irradiação/ Não tem doses baixas
49.6	0 - 400	37		sim	dic.	2.45 ± 0.58	5.03 ± 0.48	0.49	Takahashi, E. <i>et al.</i> , 1979 e 1982	Coeficientes (α e β) reajustados pelo método da probabilidade máxima por Lloyd, D.C. & Edwards, A.A., 1983
5.0	0 - 400	37		sim	dic.	7.6 ± 2.33	1.96 ± 0.58	3.90	presente trabalho	

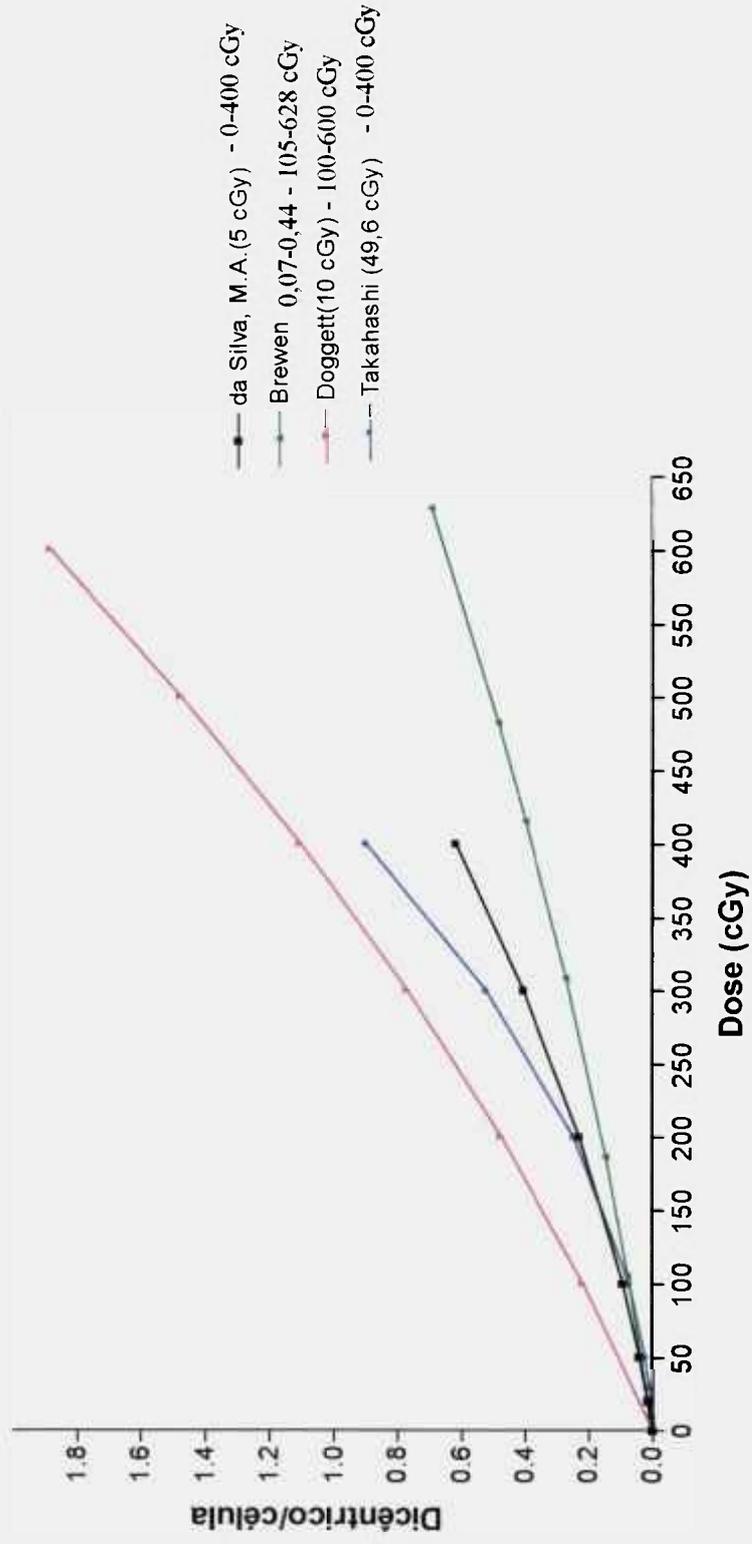


Fig.10. Curva dose-resposta para dicêntricos induzidos em linfócitos sanguíneos humanos expostos *in vitro* ao ^{137}Cs em diferentes taxas de dose

Dados Complementares

O número e a frequência de dicêntricos por ponto de dose, observados em linfócitos sangüíneos humano expostos ao ^{60}Co e ao ^{137}Cs nas 4 amostras analisadas são apresentados na tabela IX.

As tabelas X, XI e XII apresentam dados hematológicos: leucograma e plaquetometria das 4 amostras analisadas.

Metáfases contendo aberrações cromossômicas radioinduzidas em linfócitos sangüíneos humanos são mostradas nas figuras 11-15.

Tabela IX . - Número e frequência de dicêntricos por dose observados em linfócitos sanguíneos humano expostos ao ^{60}Co e ^{137}Cs nas amostras analisadas.

FONTE	DOADORES	DOSES						
		0	20	50	100	300	400	
DICÊNTRICOS (Nº DE CÉLULAS) E FREQUÊNCIA DE DICÊNTRICOS/CÉLULA								
^{60}Co	JEO	2(500)-	6(592)-	11(500)-	35(500)-	92(500)-	205(501)-	344(463)-
	EPA	0(500)-	10(500)-	27(500)-	57(500)-	128(500)-	154(500)-	352(502)-
	LEMFD	0(500)-	14(560)-	56(590)-	62(500)-	116(500)-	155(500)-	298(498)-
^{137}Cs	EKMU	0(500)-	10(602)-	28(600)-	51(600)-	146(500)-	230(500)-	345(500)-

Tabela X. Contagem de leucócitos

Doador	Resultados obtidos
EKMU	4.450
EPA	7.000
JEO	5.700
LEMFD	5.250

Valores Normais: 5.000 a 10.000/mm³ sangue

Tabela XI. Contagem de plaquetas

Doador	Resultados obtidos
EKMU	200.000
EPA	200.000
JEO	270.000
LEMFD	350.000

Valores Normais: 200.000 a 350.000/mm³ sangue

Tabela XII. Contagem diferencial de leucócitos

Doador	EKMU		EPA		JEO		LEM FD	
Contagem global	4.450 leuc./mm ³		7.000 leuc./mm ³		5.750 leuc./mm ³		5.250 leuc./mm ³	
Diferencial de leucócitos	Valor relativo (%)	valor absoluto (cél/mm ³)	Valor relativo (%)	valor absoluto (cél/mm ³)	Valor relativo (%)	valor absoluto (cél/mm ³)	Valor relativo (%)	valor absoluto (cél/mm ³)
Neutrófilo	44.83%	1.995	59.20%	4.144	47.77%	2.723	57.10%	2.998
Segmentado	42.78%	1.904	53.6%	3.752	45.21%	2.577	55.42%	2.910
Bastonete	0.45%	20	1.01%	71	0.40%	23	0.45%	24
Metamielócito	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0
Eosinófilo	0.65%	29	1.22%	86	1.66%	95	1.48%	78
Basófilo	0.49%	22	0.37%	26	1.19%	68	0.34%	18
Linfócito	46.08%	2.051	40.99%	2.870	49.16%	2.803	40.71%	2.138
Monócito	9.52%	424	2.78%	195	2.35%	134	1.56%	82

valor Normal	5.000-10.000 leuc./mm ³	
Diferencial de leucócitos	Valor relativo (%)	valor absoluto (cél/mm ³)
Neutrófilo	55-76%	2.750-7.600
Segmentado	55-70%	2.750-7.000
Bastonete	0-5%	0-500
Metamielócito	0-1%	0-100
Eosinófilo	1-4%	50-400
Basófilo	0-1%	0-100
Linfócito	20-35%	1.000-3.500
Monócito	4-8%	200-800

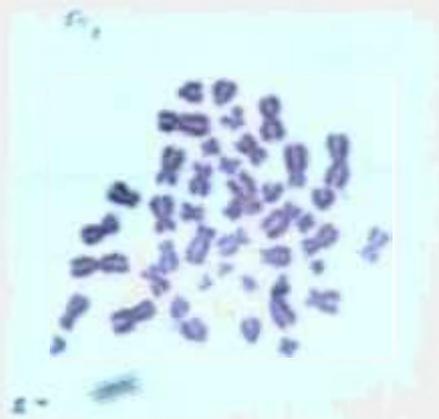


Fig.11



Fig.12

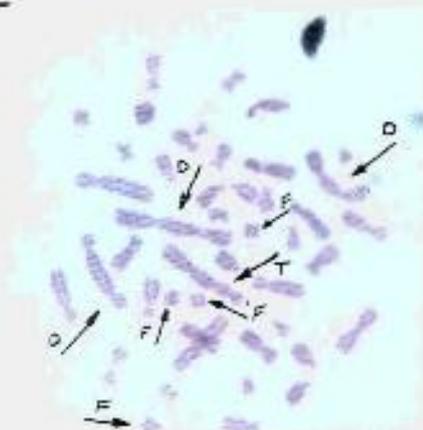


Fig.13

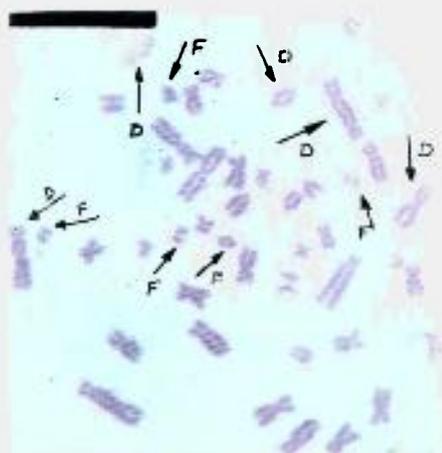


Fig.14

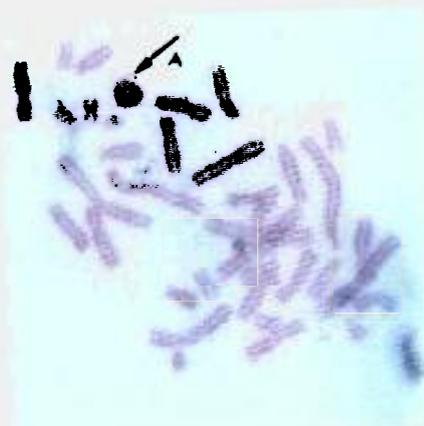


Fig.15

Figuras 11 a 15 - Fotomicrografias de metáfases de linfócitos humanos. **Fig.11.** Metáfase normal; **Fig.12.** Metáfase contendo 2 dicêntricos; **Fig.13.** Metáfase contendo 3 dicêntricos e 1 tricêntrico; **Fig.14.** Metáfase contendo 5 dicêntricos e fragmentos; **Fig.15.** Metáfase contendo anel cêntrico. As notações indicam: Dicêntrico (D) Fragmento acêntrico (FA) Anel cêntrico (A) Tricêntrico (T)

Em 1962, BENDER & GOOCH sugeriram o uso da frequência de aberrações cromossômicas em linfócitos sanguíneos humano como um indicador biológico quantitativo de exposição à radiação.

Na investigação de acidente produzido por radiação ionizante é de suma importância a estimativa de dose equivalente de corpo inteiro (dose absorvida) do indivíduo exposto, com a finalidade de contribuir para uma melhor avaliação e orientação do tratamento médico.

Para estimar a dose de radiação em indivíduos expostos pode-se adotar métodos físicos (dosimetria física), entretanto, em um grande número de casos de exposições acidentais à radiação há pouca informação sobre o acidente, nestes casos a dosimetria citogenética é o único método.

Em casos de exposição acidental, bem como em casos de pacientes submetidos a tratamento radioterápico, a frequência de aberrações foi estimada ser a mesma que a induzida pela irradiação *in vitro*.

A facilidade na obtenção de células sanguíneas e na contagem de dicêntricos associada ao fato que a exposição à radiação ionizante resulta em aumento de aberrações relacionadas com a dose, tem levado ao uso das aberrações como medida prática para a avaliação de exposição à radiação.

Para a estimativa de dose em indivíduos expostos, a dosimetria citogenética utiliza curvas dose-resposta (curvas de calibração) que são obtidas por meio da irradiação *in vitro* de amostras sangüíneas de doadores saudáveis.

As curvas dose-resposta são utilizadas derivando a relação da frequência estimada *in vitro* com a obtida na amostra analisada do radioexposto.

Em decorrência da introdução de modificações na técnica de cultivo, da interpretação das aberrações quando da leitura das lâminas por diferentes analisadores (BIANCHI, M. *et al.*, 1982; GARCIA, O, F. *et al.*, 1995) e da adoção de diferentes programas estatísticos para análise dos dados, diferenças significativas são observadas nas curvas dose-resposta (curvas de calibração) entre laboratórios, conseqüentemente, é recomendado pela International Agency Energy Atomic (IAEA) que cada laboratório deva estabelecer suas próprias curvas de calibração (IAEA, 1986).

Fatores importantes como o tempo de cultivo, não mais que 52 h, sendo 46-48 h o melhor intervalo; temperatura de 37°C durante a irradiação e no cultivo; introdução do método de coloração fluorescência mais Giemsa (FPG) para garantir que as metáfases analisadas estejam em 1ª divisão, devem ser considerados quando da elaboração da curva dose-resposta (LLOYD, D. C. *et al.*, 1975; IAEA, 1986).

Para a obtenção das curvas de calibração para ^{60}Co e ^{137}Cs com taxa de dose 5 cGy.min.⁻¹, foram adotados todos os parâmetros referidos e recomendados pela IAEA e pela literatura mais recente.

As amostras foram irradiadas a 37 °C em banho termostaticado, mantidas em movimento constante em 20 rpm, cultivadas por 46 h. e utilizando-se o método de coloração fluorescência mais Giemsa (FPG).

Ao analisar as metáfases dos linfócitos das amostras coletadas, as aberrações observadas foram fundamentalmente do tipo cromossômico - dicêntrico e anel cêntrico. Isto ocorre porque os linfócitos se encontram de maneira sincronizada na fase G₀ do ciclo celular, estando compostos por uma cromátide. As quebras produzidas pela radiação ionizante quando da duplicação do material genético possibilitam o aparecimento das aberrações do tipo cromossômico. As tabelas I para ⁶⁰Co e V para ¹³⁷Cs, mostram por doador, o número de dicêntricos observados por ponto de dose e a relação de dicêntricos pelo número de células analisadas (frequência).

Doses baixas de radiação ionizante produzem pequeno número de dicêntricos e observa-se em cada metáfase que com a elevação da dose os dicêntricos aumentam em número, e mostram uma maior distribuição por metáfase (tabelas II para ⁶⁰Co e VI para ¹³⁷Cs).

Para que ocorra uma aberração do tipo dicêntrico, o dano no DNA deve ser induzido por uma ou mais trajetórias em dois cromossomos não replicados do mesmo núcleo celular, possibilitando a troca. Se as extremidades quebradas estiverem localizadas em uma distância espacial pequena (1µm) e ocorrerem dentro de um intervalo finito de tempo (± 2h.) as extremidades quebradas poderão rejuntar formando um dicêntrico acompanhado de fragmento ou se a quebra induzida por uma ou duas trajetórias ocorrer nas duas extremidades do mesmo

cromossomo e estas extremidades se rejuntarem originam uma estrutura em anel acompanhada de fragmento (figuras 13-17).

O tratamento matemático/estatístico é um importante aspecto na construção de curva dose-resposta para propósito dosimétrico biológico.

O modelo matemático mais apropriado e utilizado em curvas dose-resposta para cromossomos dicêntricos em linfócitos sanguíneos humano irradiados *in vitro* com doses cumulativas de 10-500 cGy de radiação ionizante, que tem significância biológica e que melhor descreve a relação entre a frequência de dicêntrico e a dose de radiação gama é a equação linear quadrática ($Y = c + \alpha D + \beta D^2$), onde Y é a frequência de aberrações observadas; c é a frequência de aberrações espontâneas; D é a dose; α e β são os coeficiente de regressão que determinam a forma e a inclinação da curva, sendo α o coeficiente de regressão linear e β o coeficiente de regressão quadrático da dose, o que permite supor que dicêntricos radioinduzidos por uma única trajetória têm frequência proporcional à função linear de dose (αD) enquanto que dicêntricos induzidos por duas trajetórias têm frequência proporcional ao quadrado da dose (βD^2).

Uma das propriedades da função quadrática é que o quociente α/β tem a dimensão de cGy e é a dose na qual o número de dicêntricos radioinduzidos por trajetórias únicas e duplas é igual. Abaixo dessa dose os dicêntricos devem ser produzidos em sua maioria por trajetórias únicas e, como tais danos são produzidos quase simultaneamente pela passagem das radiações ionizantes pelo núcleo, o termo linear (αD) independe do fracionamento ou da taxa de dose. Quando a taxa de dose é baixa os valores do componente quadrático (βD^2) da

equação torna-se reduzido, enquanto que o componente linear permanece sem alteração.

A forma da curva dose-resposta depende da qualidade da radiação. Radiação de baixa LET a curva é nitidamente curvilínea com a frequência de aberrações aumentando aproximadamente ao quadrado nas doses mais elevadas, mas será aproximadamente linear em doses baixas. Assim, a forma da curva é dependente da taxa de dose; exposições em tempo prolongado, isto é, com taxa de dose baixa, a frequência de aberrações será baixa em decorrência do processo de reparo do dano (EVANS, H.J., 1987).

Na construção da curva de calibração as frequências observadas deverão ser ajustadas por programas de cálculos matemáticos, o objetivo do ajuste da curva é o de determinar quais valores dos coeficientes α e β se ajustarão melhor às frequências observadas.

O método recomendado para determinar o melhor ajuste é o da probabilidade máxima, assumindo a distribuição de Poisson e utilizando o método dos mínimos quadrados repesados.

Experimento 1 - Curva dose-resposta para ^{60}Co .

Para a obtenção da curva dose-resposta as amostras analisadas foram agrupadas.

As frequências foram ajustadas pelo método da probabilidade máxima e os erros padrão (SE) foram derivados da distribuição de Poisson (Tabela III).

A distribuição dos dicêntricos observados nas células, nas várias doses utilizadas, foi avaliada pelos testes de dispersão: variância relativa (VR) e índice “U” de Papworth. A variância relativa apresentou valores aproximados ao valor 1 que é característico de uma distribuição de Poisson. Os valores de “U” para os dados obtidos variaram no intervalo de -2,50 a 0,35, com valor médio de -0,71. Das seis doses administradas somente uma (400 cGy) excedeu ao valor de 1,96. Assim, não há razão para rejeitar o postulado que propõe que as aberrações do tipo dicêntrico obedecem a distribuição de Poisson. Os valores obtidos apresentaram boa concordância com os publicados por EDWARDS, A.A. *et al.*, 1979 e BAUCHINGER, M. *et al.*, 1979b.

Os valores obtidos para os coeficientes α e β são apresentados juntamente com a curva dose-resposta (Fig.6). A figura também mostra as freqüências observadas experimentalmente por ponto de dose.

Na tabela IV, os dados experimentais e os coeficientes α e β relatados por diversos autores, utilizando diferentes taxas de dose são apresentados, bem como, os coeficientes obtidos neste experimento e mostrados por meio de representação gráfica na figura 8.

Analisando-se comparativamente os valores para os coeficientes α e β relatados para os experimentos com taxa de dose baixa (1,7 e 12 cGy.min.⁻¹) podemos constatar que a curva obtida com 5 cGy. min.⁻¹ em nosso experimento está em boa concordância com os valores descritos por BAUCHINGER, M *et al.*, 1979b e RAMALHO, A.T. *et al.*, 1988. O quociente α/β destas curvas também demonstram esta concordância.

As curvas obtidas com taxas de dose elevadas (35, 50 e 78 cGy) referenciadas na tabela IV e Figura 8 relatadas por BILBAO,A., 1992; BAUCHINGER,M. *et al.*, 1989 e ZHICHENG,D., 1989, demonstram que a inclinação da curva é dependente da taxa de dose e é influenciada pelo parâmetro quadrático (βD^2) que é produzido por dicêntricos formados por 2 trajetórias.

Experimento 2 - Curva dose-resposta para ^{137}Cs .

Para a obtenção da curva dose-resposta as amostras analisadas foram agrupadas.

As freqüências foram ajustadas pelo método da probabilidade máxima e os erros padrão (SE) foram derivados da distribuição de Poisson (Tabela VII).

A distribuição dos dicêntricos observados nas células, nas várias doses utilizadas, foi avaliada pelos testes de dispersão: variância relativa (VR) e índice "U" de Papworth. A variância relativa apresentou valores aproximados ao valor 1 que é característico de uma distribuição de Poisson. Os valores de "U" para os dados obtidos variaram no intervalo de -2,09 a 4,29, com valor médio de 0,23. Das seis doses administradas duas (100 e 300 cGy) excederam ao valor de 1,96. A distribuição dos dicêntricos na dose de 100 cGy mostrou super-dispersão, enquanto que na dose de 300 cGy houve sub-dispersão, indicando que para estas doses a distribuição dos dicêntricos não obedeceu a distribuição de Poisson. Uma possível explicação para estes casos é que a energia distribuída não foi homogênea. Contudo, isto não invalida o postulado que propõe que as aberrações do tipo dicêntrico obedecem a distribuição de Poisson. O conjunto de valores

obtidos apresentaram boa concordância com os publicados por DOGGETT, N.A. & MCKENZIE, W.H., 1983.

Os valores obtidos para os coeficientes α e β são apresentados juntamente com a curva dose-resposta (Fig.9). A figura também mostra as frequências observadas experimentalmente por ponto de dose.

Na tabela VIII, os dados experimentais e os coeficientes α e β relatados por diversos autores, utilizando diferentes taxas de dose são apresentados, bem como, os coeficientes obtidos neste experimento e mostrados por meio de representação gráfica na figura 11.

Analisando-se comparativamente os valores para os coeficientes α e β relatados em experimentos com taxa de dose baixa (0,07/ 0,44 (variável) e 10 cGy.min.⁻¹) podemos constatar que a curva obtida em nosso experimento está em boa concordância com os valores descritos por BREWEN, J.G. & LUIPPOLD, H.E., 1971 e DOGGETT, N.A. & MCKENZIE, W.H., 1983. Os quocientes α/β destes experimentos mostram boa concordância, entretanto, o coeficiente α relatado por DOGGETT, N.A. & MCKENZIE, W.H. é extremamente elevado e dissimilar aos obtidos em nosso experimento e no relatado por BREWEN, J.G. & LUIPPOLD, H.E. Os quocientes α/β relatados por esses autores são semelhantes, embora os valores para α e β sejam diferentes, e não estão em concordância com o obtido em nosso experimento. A possível explicação para estas discrepâncias talvez resida nas diferenças observadas na metodologia de irradiação (temperatura durante a irradiação), a não utilização de doses baixas e por não terem utilizado o método de fluorescência mais Giemsa (BrdU).

A curva obtida com taxa de dose elevada ($49,6 \text{ cGy} \cdot \text{min}^{-1}$) referenciada na tabela VIII e figura 11 relatada por TAKAHASHI, E. *et al.*, 1979 e 1982, demonstra que a inclinação da curva é dependente da taxa de dose e é influenciada pelo parâmetro quadrático (βD^2) que é produzido por dicêntricos formados por 2 trajetórias.

Dados complementares

A tabela IX apresenta o número e a frequência de dicêntricos por dose observados em linfócitos expostos ao ^{60}Co e ao ^{137}Cs nas amostras analisadas. Podemos observar uma variação no número de dicêntricos entre os doadores. Esta variabilidade tem sido relatada por LLOYD, D.C. *et al.*, 1988 e 1992; HELLIN, H. *et al.*, 1990 e BARQUINERO, J.F. *et al.*, 1995. Estas diferenças podem ser causadas pela variabilidade interindividual (KAKATI, S. *et al.*, 1986), efeitos intradadores relacionados com o período da amostragem e variações experimentais desconhecidas (LLOYD, D.C. *et al.*).

Para van BUUL, P.W. & NATARAJAN, A.T., experimentos efetuados separadamente com 8 diferentes doadores, 4 destes mostraram variações quando das amostragens em diferentes tempos. Isto mostra que a contagem de aberrações nas células em M_1 ou corrigidas pelo uso de BrdU não remove toda variabilidade. A variabilidade provavelmente seja causada pela diferente proporção de subpopulações de linfócitos com diferentes radios sensibilidades (van BUUL, P.P.W. & NATARAJAN, A.T., 1980).

As tabelas X, XI e XII apresentam dados hematológicos das 4 amostras analisadas. Estes exames foram realizados para observar se havia alguma alteração substancial nas amostras que seriam utilizadas para obtenção das frequências de dicêntricos que estabeleceriam as curvas. Estes exames também fazem parte integrante do relatório de avaliações de exposição acidental à radiação.

VI - CONCLUSÃO

Sendo o objetivo deste trabalho fornecer fundamentos básicos e metodológicos utilizados pela dosimetria citogenética e o de contribuir neste campo elaborando curvas dose-resposta para a estimativa de dose de indivíduos expostos à radiação, concluímos que:

- Doses baixas de radiação ionizante produzem pequeno número de dicêntricos e que com a elevação da dose ocorre aumento em número e há uma maior distribuição por metáfase;
- A distribuição dos dicêntricos observados nas células expostas ao ^{60}Co e ao ^{137}Cs não apresentou dispersão, mostrando obedecer a distribuição de Poisson;
- O coeficiente α da curva de calibração para ^{137}Cs com taxa de dose baixa mostrou-se elevado quando comparado com o do ^{60}Co ;
- A curva dose-resposta para ^{60}Co com taxa de dose de $5 \text{ cGy} \cdot \text{min}^{-1}$ obtida em nosso experimento está em boa concordância com as curvas relatadas na literatura, tendo sido melhor ajustada por meio de uma equação linear-quadrática. A equação resultante foi:

$$Y = (3,46 \pm 2,14) 10^{-4} D + (3,45 \pm 0,64) 10^{-6} D^2$$

- A curva dose-resposta para ^{137}Cs com taxa de dose de $5 \text{ cGy} \cdot \text{min}^{-1}$ obtida em nosso experimento está em boa concordância com as curvas relatadas na literatura, tendo sido melhor ajustada por meio de uma equação linear-quadrática. A equação resultante foi:

$$Y = (7,69 \pm 2,33) 10^{-4} D + (1,96 \pm 0,58) 10^{-6} D^2$$

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARQUINERO, J.F.; BARRIOS, L.; CABALLÍN, M. R.; MIRÓ, R.; RIBAS, M.; SUBIAS, A.; EGOZCUE, J. Establishment and validation of a dose-effect curve for γ -rays by cytogenetic analysis. *Mutat. Res.*, v. 326, p.65-69, 1995.
- BAUCHINGER, M. Chromosome aberrations in human lymphocytes as a quantitative indicator of radiation exposure. In: EVANS, H.J.; LLOYD, D.C.(eds). **Mutagen-induced chromosome damage in man**. New Haven, Yale University, 1978, p.9-13.
- BAUCHINGER, M. Biological indicators of radiation effects in man. **International Meeting of investigators**, 10-11 dec, Munich - Neuherberg, 1979.
- BAUCHINGER, M.; SCHMID, E.; DRESP, J. Calculation of the dose-rate dependence of the dicentric yield after Co - γ - irradiation of human lymphocytes. *Int.J.Radiat.Biol.*, v.35, n.3, p., 229-233, 1979b.
- BAUCHINGER, M.; SCHMID, E.; STRENG, S.; DRESP, J. Quantitative analysis of the chromosome damage at first division of human lymphocytes after ^{60}Co γ irradiation. *Radiat. Environ. Biophys.*, v.22, p.225-229, 1983.
- BAUCHINGER, M. Quantification of low-level radiation exposure by conventional chromosome aberration analysis. *Mutat. Res.*, v.339, p.177-189, 1995.

BENDER, M.A.; GOOCH, P.C. Types and rates of X-ray induced chromosome aberrations in human blood irradiated *in vitro*. *Proc. Nat. Acad. Sci (USA)*, v.48, p. 522-532, 1962.

BENDER, M.A.; GOOCH, P.C. Persistent chromosome aberrations in irradiated human subjects. *Radiat. Res.*, v. 18, p. 389-396, 1963.

BENDER, M.A.; AWA, A.A.; BROOKS, A.L., EVANS, H.G., GROER, P.GJ.; LITTLEFIELD, L.G.; PEREIRA, C.; PRESTON, R.J.; WACHHOLZ, B.W. Current status of cytogenetic procedures to detect and quantify previous exposures to radiation. *Mutat. Res.*, v.196, p.103-159, 1988.

BIANCHI, N.O.; BIANCHI, M.S.; LARRAMENDY, M. Kinetics of human lymphocyte division and chromosomal radiosensitivity. *Mutat. Res.* v. 63, p.317-324, 1979.

BIANCHI, M.; BIANCHI, N.O.; BREWEN, J.G.; BUCKTON, K.E.; FABRY, L.; FISCHER, P.; GOOCH, P.C.; KUCEROVA, M.; LÉONARD, A.; MUKHERJEE, R.N.; MUKHERJEE, U.; NAKAI, S.; NATARAJAN, A.T.; OBE, G.; PALITTI, F.; POHL-RÜLING, J.; SCWARZACHER, H.G.; SCOTT, D.; SHARMA, T.; TAKAHASHI, E.; TANZARELLA, C.; van BUUL, P.P.W. Evaluation of radiation-induced chromosomal aberrations in human peripheral blood lymphocytes *in vitro*. Results of an IAEA coordinated programme. *Mutat. Res.*, v.96, p.233-242, 1982.

- BILBAO, A. Dicentrics, biological dosimeters of exposure to gamma rays from Cobalt-60. In: CIEMAT (ed). **International Conference on implications of the new ICRP recommendations on radiation protection practices and interventions**. Held in Salamanca Madrid (Spain), 26-29 nov., 1991, v.2, p.401-408, 1992.
- BREWEN, J. G; LUIPPOLD, H.E Radiation-induced human chromosome aberration: *in vitro* dose rate studies. *Mutat. Res.* ,v. 12, p. 305-314, 1972.
- BREWEN, J. G.; PRESTON, R.J.; LITTLEFIELD, L.G. Radiation-induced human chromosome aberration yields following an accidental whole-body exposure to ^{60}Co γ -rays. *Radiat. Res.* ,v. 49, p. 647-656, 1972.
- BUCKTON, K. E.; HAMILTON, G.E.; PATON, L.; LANGLANDS, A. G. Chromosome aberrations in irradiated *ankylosing spondylitis* patients. In: EVANS, H.; LLOYD, D. C.(eds). **Mutagen-induced chromosome damage in man**. Edinburgh, University Press, 1978, p. 142-150.
- BUCKTON, K, E. Chromosome aberrations in patients treated with X-irradiation for ankylosing spondylitis, In: ISHIHARA, T.; SASAKI, M.S.(eds). **Radiation induced chromosome damage in man**. Alan R. Liss, New York, 1983, p. 491-511.
- CARRANO A.V.; NATARAJAN, A.T. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. In: CARRANO A.V.; NATARAJAN, A.T.(eds). **International commission for protection against environmental mutagens and carcinogens**, ICP EMC pub.14, 1987, p.1-28.

- CASPERSSON, T.; FARBER, S.; FOLEY, G.E.; KUDYNOWSKY, J.; MODEST, E.J.; SIMONSSON, E.; WACH, U.; ZECH, L. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp. Cell Res.*, v.49, p.219-222, 1968.
- CATCHESIDE, D.G.; LEA, D.E.; THODAY, J.M. The production of chromosomal structural changes in *Tradescantia* microspores in relation to dosage, intensity, and temperature. *J. Genet.*, v.47, p.137, 1946.
- CHADWICK, K.H.; LEENHOUTS, H.P. **The molecular theory of radiation biology**. Berlin- Heidelberg, Springer-Verlag, 1981.
- CILLIERS, G.D. ; LEVIN, J. Radiation exposure: biological monitoring. *Nucl. Act.*, v.28, p.26-28, 1983.
- CONGER, A.D. Radiobiological studies with *Tradescantia* at nuclear test detonations. *Am. Nat.*, v.88, p.215-224, 1954.
- COOGLE, J.E. *Biological effects radiation*. London, Wykeham, 1971.
- DEHOS, A. Haematological and immunological indicators for radiation exposure. *Kernteknik*, v.55, n.4, p.211-218, 1990.
- DEKNUDT, G.H.; LEONARD, A. Stimulation of irradiated human lymphocytes by different mitogens. *Int. J. Radiat. Biol.*, v.38, n.3, p.361-364, 1980.

- DOGGETT, N.A.; MCKENZIE, W.H. An analysis of the distribution and dose response of chromosome aberrations in human lymphocytes after exposure to ¹³⁷ Cesium gamma irradiation. *Radiat. Environ. Biophys.*, v.22, p.33-51, 1983.
- DOLPHIN, G.W. Chromosome aberration analysis as a biological dosimeter. In: KIDRIC, B (ed). *Radiation Dosimetry*, Belgrado, 1971, p.245.
- DOLPHIN, G.W.; LLOYD, D.C. The significance of radiation-induced chromosome abnormalities in radiological protection. *J. Med. Genet.*, v.11, p.181-189, 1974.
- DOLPHIN, G.W. A review of *in vitro* dose-effect relationships. In: EVANS, H.J.; LLOYD, D.C. (eds). **Mutagen-induced chromosome damage in man**. New Haven, Yale University, 1978, p.1-13.
- Du FRAIN, R.J.; LITTLEFIELD, L.G.; JOINER, E.E.; FROME, E.L. *In vitro* human cytogenetics dose-response systems. In: HÜBNER, K.F.; FRY, S.A. (eds). **The medical basis for radiation accidents preparedness**. Amsterdam, Elsevier North-Holland, 1980, p. 357-374.
- EDWARDS, A.A.; LLOYD, D.C.; PURROTT, A.J. Radiation induced chromosome aberrations and the Poisson distribution. *Radiat. Environ. Biophys.*, v.16, p.89-100, 1979.

- EDWARDS, A.A.; LLOYD, D.C.; PROSSER, J.S. Chromosome aberrations in human lymphocytes. A radiobiological review, In: TAYLOR, FRANCIS (eds). **Chromosome aberrations in human lymphocytes**. L.H. Gray Conference. Oxford (UK) - 11-15 sept., London (UK), 1989, p.423-432.
- EDWARDS, A.A.; MOISEENKO, V.V.; NIKJOO, H. On the mechanism of the formation of chromosomal aberrations by ionising radiations. *Radiat. Environ. Biophys.*, v.35, p.25-30, 1996.
- EVANS, H.J.; SCOTT, D. Influence of DNA synthesis on the production of chromatid aberrations by X-rays and maleic hydrazide in *vicia faba*. *Genetics*, v.49, p.17-38, 1964.
- EVANS, H.J., O'RIORDAN, M.L. Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. *Mutat. Res.*, v.31, p.135-148, 1975.
- EVANS, H.J.; LLOYD, D.C. **Mutagen-induced chromosome damage in man**. In: EVANS, H.J.; LLOYD, D.C (eds). - New Haven, Yale University, 1978.
- EVANS, H.J. Cytogenetic damage: threshold effects and sensitivities. In: JONES, R.R., SOUTHWOOD, R. (eds). **Radiation and Health**. Wiley & Sons, 1987, p.179-189.
- FABRY, L.; LEMAIRE, M. Aberrations chromosomiques produites dans les lymphocytes humains par irradiation *in vivo* et *in vitro*. *C. R. Soc. Biol.*, v. 179, p. 236-42, 1985.

FABRY,L., LEONARD, A.; WAMBERSIE, A. Induction of chromosome aberrations in G₀ human lymphocytes by low doses of ionizing radiations of different quality. *Radiat. Res.*, v.103, p.122-134, 1985.

FABRY,L ; LEMAIRE,M. Dose response relationships for radiation induced chromosome aberrations in human lymphocytes in vivo and in vitro. *Strahlentherapie*, v.162, n.1, p.63-67, 1986.

FROME, E.L.; Du FRAIN. R.J. Maximum likelihood estimation for cytogenetic dose-response curves. *Biometrics*, v.42, p.73-84, 1986.

GARCIA, O.F.; RAMALHO,A.T.; GIORGIO,M.D.; MIR, S.S.; ESPINOZA, M.E.; MANZANO, J.; NASAZZI, N.; LÓPES, I. Intercomparison in cytogenetic dosimetry among five laboratories from Latin America. *Mutat.Res.*,v.327, p.33-39, 1995.

GUEDENEY, G.; GRUNDWALD, D.; MALACBER, J.L.; DOLOY, M.T. Time dependence of chromosomal aberrations induced in human and monkey lymphocytes by acute and fractionated exposures to ⁶⁰Co. *Radiat. Res.*, v. 116, p. 254-62, 1988.

HALL, E.J. *Radiobiology for the radiologist*. Philadelphia, J.B.Lippincott, 1994, cap.1, p.1-13.

- HELLIN,H.; PAULSEN,A.; LISKIEN,H.;DECAT,G.; WAMBERSIE,A.; LÉONARD,A.; BAUGNET-MAHIEU,L. Chromosome aberrations induced *in vitro* in human lymphocytes by monoenergetic 2.5 MeV neutrons and ⁶⁰Co gamma rays. **Strahlenther.Onkol.**, v.166, n.8, p.549-553, 1990.
- HENDEE, W.R. Management of individual accidentally exposed to radiation or radioactive materials. **Sem. Nucl. Med.**, v.16, n. 3, p.203-210, 1986.
- HENRY, J.B. **Diagnósticos e conduta terapêutica para exames laboratoriais.** São Paulo, Manole, 1983,16 ed. v.1 e 2.
- HUNGERFORD, D.A. Leukocytes cultured from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl. **Stain Technol.**, v.40, n.6, p.333-339, 1965.
- INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Biological dosimetry chromosomal aberration analysis for dose assessment. Technical Report Series nº 260, Vienna, IAEA, 1986 STI/PUB/10/260.
- KAKATI,S.; KOWALCZYK, J.R.; GIBAS,Z.; SANDBERG,A.A..Use of radiation induced chromosomal damage in human lymphocytes as a biological dosimeter is questionable. **Cancer Genet.Cytogenet.**,v.122, p.137-141, 1986.
- KIHLMAN, B.A. **Actions of chemicals on dividing cells.** Prentice-Hall, Englewood, NJ, 1966.

LATT, S.A. Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosome. **Proc. Natl. Acad. Sci (USA)**, v. 70, p.3395-3399, 1973.

LEA, D.E.; CATCHESIDE, D.G. The mechanism of the induction by radiation of chromosome aberrations in *Tradescantia*. **J. Genet.**, v.44, p.216-245, 1942.

LITTLEFIELD, L.G.; JOINER, E.E.; HÜBNER, K.F. Cytogenetic techniques in biological dosimetry: Overview and example of dose estimation in ten persons exposed to gamma radiation in the 1984 Mexican ⁶⁰Co accident. In: METTLER, F.A.JR; KELSEY, C.A.; RICKS, R.C (eds). **Medical Management of radiation Accidents**. Boca Raton, CRC Press, 1990, cap.8, p.109-126.

LLOYD, D.C.; PURROTT R.J, DOLPHIN .G.W. Chromosome aberration dosimetry using human lymphocytes in simulated partial body irradiation. **Phys. Med Biol**, v. 18, p. 421-431, 1973.

LLOYD, D.C.; DOLPHIN, G.W. Radiation induced chromosome damage in human lymphocytes. **Br. J. Med.**, v. 34, p.261-73, 1977.

LLOYD,D.C.; PURROTT, R.J., PROSSER, J.S.; EDWARDS,A.A.; DOLPHIN, G.W.; WHITE, A.D.; REEDER, E.J.; WHITE, C.M.; COOPER, S.J.; STEPHENSON,B.D.; TIPPER, P.A.: Doses in radiation accidents investigated by chromosome aberration analysis. VIII. A review of cases investigated: 1977. **National Radiological Protection Board**, Harwell, Didcot, Oxon, NRPB-R70, 1978.

- LLOYD,D.C.; PURROTT,R.J.; REEDER,E.J. The incidence of unstable chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes from unirradiated and occupationally exposed people. *Mutat. Res.* ,v.72, p. 523-532, 1980.
- LLOYD,D.C.; PURROTT, R. Chromosome aberration analysis in radiological protection dosimetry. *Radiat. Prot. Dosim.*, v.1, p.19-28, 1981.
- LLOYD, D.C.; PROSSER, J.S.; MOQUET, J.E.; MALOWANY, D.J. Doses in radiation accidents investigated by chromosome aberration analysis. XIII: A review of cases investigated, 1982. **National Radiological Protection Board**, NRPB - R148, Chilton, Didcot, Oxon, 1983.
- LLOYD, D.C.; EDWARDS, A.A. Chromosome aberrations in human lymphocytes effects of radiation quality, dose and dose-rate. In: ISHIHARA,T.; SASAKI, M.S.(eds). **Radiation induced chromosome damage in man**. New York, Alan R. Liss, 1983b, p. 23-49.
- LLOYD, D.C.; EDWARDS, A.A.; PROSSER, J.S.; MOQUET, J.E.; FINNON, P. Doses in radiation accidents investigated by chromosome aberration analysis. XVI: A review of cases investigated, 1985. **National Radiological Protection Board**, NRPB - R192,Chilton, Didcot, Oxon, 1986.
- LLOYD, D.C.; EDWARDS, A.A.; PROSSER, J.S.; MOQUET, J.E.; FINNON, P. Doses in radiation accidents investigated by chromosome aberration analysis. XVII: A review of cases investigated, 1986. **National Radiological Protection Board**, NRPB - R207, Chilton, Didcot, Oxon, 1987.

LLOYD, D.C.; EDWARDS, A.A.; LÉONARD,A.; DEKNUDT,G.; NATARAJAN,A.; OBE,G.; PALITTI,F.; TANZARELLA,C.; TAWN, E.J. Frequencies of chromosomal aberrations induced in human blood lymphocytes by low doses of X-rays. *Int.J.Radiat.Biol.*, v.53, n.1, p.49-55, 1988.

LLOYD, D.C. & EDWARDS, A.A. Biological dosimetry after radiation accident. In: OBE, G. & NATARAJAN, A.T.(eds). **Chromosomal aberrations**. Heidelberg, Germany, Spring-Verlag, p. 212-223, 1990.

LUCHNIK, N.V.; SEVANKAEV, A.V. Radiation-induced chromosomal aberrations in human lymphocytes I. Dependence on the dose of gamma-rays and anomaly at low doses. *Mutat. Res.*, v. 36, p. 363-378, 1976.

LUSHBAUGH, C.; EISELE, G.; BURR, W.; HÜBNER, K.; WACHHOLZ, B. Current status of biological indicators to detect and quantify previous exposures to radiation. *Health Phys.*, v.60, Suppl.1, p.103-109, 1991.

MERKLE,W. Statistical methods in regression and calibration analysis of chromosome aberration data. *Radiat. Environ. Biophys.*, v.21, p.217-233, 1983.

MOORE, R.C.; BENDER,M.A. Time sequence of events leading to chromosomal aberration formation. *Environ. Mol. Mutag.* ,v.22 , p.208-213, 1993.

MOORHEAD,P.S.; NOWELL, P.C.; MELLMAN,W.J.; BATTIPS,D.M.; HUNGERFORD,D.A. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Experim. Cell Res.*, v.20, p.613-616, 1960.

- MÜLLER, W.U. ; STREFFER, C. Biological indicators for radiation damage. *Int. J. Radiat. Biol.*, v.59, n.4, p. 863-873, 1991.
- NATARAJAN, A.T. Mechanisms for chromosomal aberrations in mammalian cells. *Mutat. Res.*, v.95, p.1, 1982.
- NATARAJAN, A.T.; OBE, G. Mutagenicity testing with cultured mammalian cells: cytogenetic assays. In: HEDDLE, J.A. (ed). **Mutagenicity - new horizons in genetic toxicology**. New York, Academic, cap.7, 1982, p.171-213,
- NOWELL, P.C. Phytohemagglutinin.-An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res.*, v. 20, p. 462-466, 1960.
- PAPWORTH, D.G. Curve fitting by maximum - likelihood. Appendix. In: SAVAGE, J.R.K. **Radiation induced chromosomal aberrations in plants *Tradescantia*: Dose-response curves**. *Radiat. Bot.* ,v.15, p. 87-140, 1975.
- PERRY, P.; WOLFF,S. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature,(London)*, v.251, n.13, p. 156-158, 1974.
- PETRZILKA, G.E.; SCHROEDER, E.H. Activation of human T-lymphocytes. A kinetic and stereological study. *Cell Tissue Res.*, v. 201, p. 101-127, 1979.
- PREMPREE,T.; MERZ,T. Radiosensitivity and repair time. The repair time of chromosome breaks produced during the different stages of the cell cycle. *Mutat. Res.*, v.7, p.441-451, 1969.

- PRESTON,R.J. DNA repair and chromosome aberrations interactive effects of radiation and chemicals. In: NATARAJAN, A.T., OBE,G.; ALTMANN, H. (eds). **DNA repair Chromosome Alterations and Chromatin Struture**, Amsterdam, Elsevier, 1982, p.25-35.
- PURROTT, R.J.; LLOYD, D.C. The study of chromosome aberration yield in human lymphocytes as an indicator of radiation dose. I. Tecniques. Harwell, England, **National Radiological Protection Board**, 1972 (NRPB-82).
- PURROTT, R.J.; REEDER,E. The effect of changes in dose rate on the yield of chromosome aberrations in human lymphocytes exposed to Gamma radiation. *Mutat. Res.*, v.35, p. 437-444, 1976.
- RAMALHO, A.T.; NASCIMENTO, A.C.H.; NATARAJAN, A.T. Dose Assessments by cytogenetic analysis in the Goiania (Brazil) radiation accident. *Radiat. Prot. Dosim.*, v.25, n.2 , p.97-100, 1988.
- ROMM, H.; STEPHAN, G. Chromosome analysis - a routine method for quantitative radiation dose assessment. *Kernteknik*, v. 55, n. 4, p. 219-225, 1990.
- RUBINI, J.R.; BOND,V.P.; KELLER,S.; FLIEDNER,T.M.; CRONKITE,E.P. DNA synthesis in circulating blood leukocytes labeled *in vitro* with ³H-thymidine. *J. Lab. Clin. Med.*, v.58, p.751, 1961.

- SACHS, R.K.; BRENNER, D.J. Effect of LET on chromosomal aberration yield. I - Do long-lived, exchange-prone double strand breaks play a role? *Int. J. Radiat. Biol.*, v.64, n.6, p. 677-688, 1993.
- SAX, K. Chromosome aberrations induced by X rays. *Genetics*, v.23, p.494-516, 1938.
- SCOTT, D.; LYONS, C.Y. Homogeneous sensitivity of human peripheral blood lymphocytes to radiation induced chromosome damage, *Nature*, v.278, p. 756-758, 1979.
- STEPHAN, G.; HADNAGY, W.; HAMMERMAIER, C.; IMHOF, U. Biologically and physically recorded doses after an accidental exposure to ^{60}Co . *Health Phys.*, v. 44, n. 4, p. 409-411, 1983.
- TAKAHASHI, E.; HIRAI, M.; TOBARI, I.; NAKAI, S. Dose-response relations for dicentric yield in ^{60}Co lymphocytes of man and crab-eating monkey following acute and chronic γ irradiation. *Mutat. Res.*, v.60, p. 357-365, 1979.
- TAKAHASHI, E.; HIRAI, M.; TOBARI, I.; UTSUGI, T.; NAKAI, S. Radiation-induced chromosome aberrations in lymphocytes from man and crab-eating monkey: the dose-response relationships at low doses. *Mutat. Res.*, v.94, p.115-123, 1982.
- TAYLOR, J.H.; WOODS, P.S.; HUGHES, W.L. The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labelled thymidine. *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)*, v.43, p 122-128, 1957.

UNSCEAR. I. Biological Effects of ionizing radiation. In: United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Report: **Sources and effects of ionizing radiation**. New York, 1993, p. 5-12.

van BUUL, P.P.W.; NATARAJAN, A.T. Chromosomal radiosensitivity of human leucocytes in relation to sampling time. *Mutat. Res.*, v.70, p.61-69, 1980

VULPIS, N.A.; LLOYD, D.C. The use of harlequin staining to measure delay in the human lymphocytes cell cycle induced by *in vitro* X-irradiation, *Mutat. Res.*, v. 69, p. 275, 1980.

WHITMORE, G.F. One hundred years of X-rays in biological research. *Radiat. Res.*, v.144, p.148-159, 1995.

WOLFF, S. The repair of X-ray induced chromosome aberrations in stimulated and unstimulated human lymphocytes. *Mutat. Res.*, v.15, p.435-444, 1972.

ZAKHAROV, A.F.; EGOLINA, N.A. Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes. I. BUdr-revealed differentiation in Chinese hamster chromosomes. *Chromosoma*, v. 38, p. 341-365, 1972.

ZHICHENG, D. Chromosome aberrations analysis in case of protracted exposures and overexposures. Final report for the period 1 January - 31 december, 1989. *Report nº IAEA-R-4085-F*, p.1-11, 1989.