

37:095876



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO BIOLÓGICO DA RADIAÇÃO BETA
DO ⁹⁰Sr EM CÉLULAS SANGÜÍNEAS HUMANAS E
ELABORAÇÃO DE CURVA DOSE-RESPOSTA**

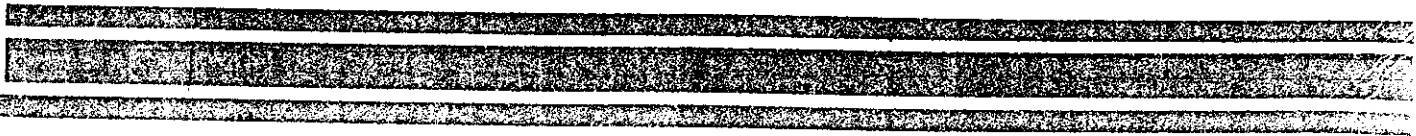
ELAINE MENDES DE OLIVEIRA

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

Orientadora:
Dra. Kayo Okazaki

**São Paulo
2000**

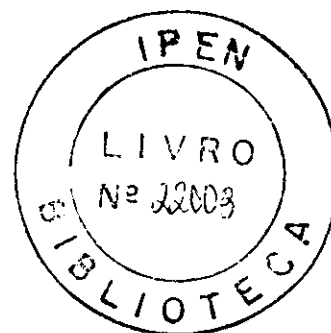
4:



INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**AVALIAÇÃO DO EFEITO BIOLÓGICO DA RADIAÇÃO BETA DO ⁹⁰ Sr
EM CÉLULAS SANGÜÍNEAS HUMANAS E ELABORAÇÃO DE CURVA
DOSE-RESPOSTA**

ELAINE MENDES DE OLIVEIRA



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

Orientadora:
Dr^a . Kayo Okazaki

**São Paulo
2000**

“ O que a lagarta chama de fim do mundo o Mestre chama de borboleta. ”

Richard Bach

***A minha mãe Eda e ao meu pai Elio,
pelo carinho, apoio e respeito.***

***Por suas palavras de conforto e
estímulo, nos momentos de dúvida e
desânimo, sem as quais não teria
conseguido chegar aqui.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço atenciosamente à Dra. Kayo Okazaki, por sua confiança, boa vontade, carinho e competência com que me acolheu, me orientou na realização deste trabalho e sempre me tratou.

Ao serviço de Calibração do IPEN, em especial ao Marcos Xavier pela prontidão e atenção com que realizou as irradiações das amostras das doadoras.

Às doadoras que permitiram a realização deste trabalho.

À minha amiga Márcia por sua ajuda intensa, carinho, broncas providenciais, conversas, paciência e amizade.

À minha amiga Patrícia pela cooperação, carinho, idéias e amizade.

À minha amiga Míriam pela colaboração, carinho e principalmente paciência.

Aos meus amigos Paulo, Cecília, Ieda, Cidinha, Helena, Malvina, Jonhy e Cláudio, pela ajuda, acolhida e pelos momentos de descontração.

Aos meus amigos da Faculdade de Medicina da USP, Dra. Rosa Santos, Regina Nomizo, Rosa Fukui, Dra. Mileni Urish que me ajudaram e orientaram de maneira especial nos primeiros anos da minha experiência na pesquisa científica.

Aos meus pais, pelo apoio e respeito.

À minha família, em especial aos meus irmãos e ao meu cunhado Wagner, pelo incentivo.

Ao meu namorado Fábio que sempre me apoiou e incentivou.

À CNEN e Capes pelo apoio financeiro.

**AVALIAÇÃO DO EFEITO BIOLÓGICO DA RADIAÇÃO BETA DO ⁹⁰Sr
EM CÉLULAS SANGÜÍNEAS HUMANAS E ELABORAÇÃO DE CURVA
DOSE-RESPOSTA**

Elaine Mendes de Oliveira

RESUMO

Dentre vários genotóxicos ambientais, a radiação ionizante tem recebido uma atenção especial, em virtude do seu potencial mutagênico, carcinogênico e teratogênico. Dentro desse contexto, o presente trabalho foi desenvolvido com o intuito de avaliar o efeito da radiação beta de ⁹⁰Sr em células humanas, já que as informações na literatura são escassas. Para tanto, células sangüíneas de cinco doadoras sadias foram irradiadas *in vitro* com doses de 0,2 a 5Gy de ⁹⁰Sr (0,2Gy/min) e foram processadas para a análise de aberração cromossômica e para o ensaio do Cometa. Resultados citogenéticos mostraram que os tipos de aberrações cromossômicas mais freqüentemente encontrados foram os fragmentos acêntricos, *double minute* e dicêntricos. Os valores dos coeficientes α / β obtidos do modelo linear-quadrático utilizado para o ajuste das curvas dose-resposta mostraram que a radiação beta de ⁹⁰Sr foi mais eficiente na indução de lesões por um único evento ionizante que por dois eventos ionizantes independentes na formação de aberrações cromossômicas. Aparentemente, a radiação beta de ⁹⁰Sr não influenciou no número modal de cromossomos em células irradiadas, bem como na cinética do ciclo celular no intervalo de dose analisado. Quanto ao ensaio do Cometa, houve um aumento na migração do DNA em função da dose de radiação, avaliado tanto pelo analisador de imagem (momento da cauda) como pela classificação visual (dano ao DNA), cuja relação dose-resposta se ajustou adequadamente ao modelo de regressão não-linear. As duas técnicas adotadas se mostraram complementares na avaliação do efeito biológico da radiação beta de ⁹⁰Sr em células humanas.

EVALUATION OF BIOLOGICAL EFFECT OF ⁹⁰Sr BETA RADIATION IN HUMAN BLOOD CELLS AND DOSE-RESPONSE CURVE ELABORATION

Elaine Mendes de Oliveira

ABSTRACT

Among several environmental genotoxins, ionizing radiation has been received special attention because of its mutagenic, carcinogenic and theratogenic potential. In this context, the aim of this study was evaluate the effects of ⁹⁰Sr beta radiation in human cells, in view of the scarcity of literature data. For that, blood cells of five healthy donors were irradiated *in vitro* with doses between 0.2 and 5.0 Gy in a ⁹⁰Sr source (0.2 Gy/min) and were processed for chromosome aberration analysis and for comet assay. Cytogenetic results showed that the type of structural chromosome aberrations found more frequently were acentric fragments, double minutes and dicentrics. The values of α and β coefficient of linear-quadratic model used to fit dose-response curves showed that ⁹⁰Sr beta radiation was more efficient in induction of lesions from only one ionizing track than two independent tracks in chromosome aberration formation. Apparently, ⁹⁰Sr beta radiation neither influenced the modal number of chromosome in irradiated cells nor in cell cycle kinetic of analyzed dose interval. Concerning the comet assay, there was an increase in DNA migration in a dose dependent manner, evaluated by either image analysis system (tail moment) or visual classification (DNA damage), which dose-response relation was adequately fitted to non-linear regression model. Both adopted techniques were complement in evaluating the biological effect of ⁹⁰Sr beta radiation in human cells.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Considerações gerais sobre radiação beta.....	2
1.2. Considerações gerais sobre aberrações cromossômicas.....	7
1.3. Considerações gerais sobre dosimetria biológica.....	12
1.4. Considerações gerais sobre o teste do Cometa.....	16
1.4.1. Avaliação do dano.....	17
2. OBJETIVO.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODO.....	21
3.1. Doadores.....	21
3.2. Método.....	22
3.2.1. Obtenção das amostras sangüíneas.....	22
3.2.2. Condição de irradiação.....	22
3.2.3. Técnica de aberrações cromossômicas.....	24
3.2.3.1. Condição de cultivo.....	24
3.2.3.2. Critérios de análise.....	25
3.2.4. Técnica do Cometa ou "Eletroforese de Microgel".....	26
3.2.4.1. Condição de eletroforese.....	26
3.2.4.2. Critérios de análise.....	27
3.2.5. Análise estatística.....	30
4. RESULTADOS.....	32
4.1. Avaliação do dano pela técnica de aberrações cromossômicas.....	32
4.2. Avaliação do dano pela técnica do Cometa.....	47
5. DISCUSSÃO.....	55
6. CONCLUSÕES.....	67
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

1. INTRODUÇÃO

Muitos agentes físicos ou químicos ou produtos consumidos e utilizados pelo homem (por exemplo, corantes e aditivos alimentares, pesticidas organoclorados, fumo, álcool, diversos fármacos e várias fontes de radiação ionizante) podem afetar o patrimônio genético.

Esses agentes em concentrações muito pequenas, porém em doses cumulativas, podem induzir efeitos biológicos significativos, como a morte celular, envelhecimento precoce, doenças genéticas e patologias degenerativas como o câncer.

Considerando o papel desempenhado pelo DNA no controle de diversas funções celulares, torna-se fácil entender que muitas das causas primárias desses efeitos sejam alterações induzidas no DNA pela exposição aos agentes genotóxicos.

Dentre vários genotóxicos ambientais, a radiação ionizante tem recebido uma atenção especial em virtude da sua utilização cada vez maior para as mais diversas finalidades. Conseqüentemente, tem aumentado o risco de exposição e a probabilidade de ocorrência de acidentes, tornando-se necessário, portanto, conhecer melhor a ação da radiação ionizante, para uma avaliação mais acurada dos riscos biológicos envolvidos.

1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE RADIAÇÃO BETA

A radiação ionizante interage com as células do tecido vivo e pode produzir diversos efeitos: citotóxico, mutagênico e carcinogênico. O principal alvo para estes efeitos é a molécula de DNA, que se encontra no núcleo celular.

As principais lesões provocadas pela interação físico-química entre a radiação ionizante e o DNA celular são as quebras na fita simples, quebras na fita dupla, ligações cruzadas DNA-DNA e DNA-proteínas, sítios álcali-lábeis e danos às bases púricas e pirimidínicas (IAEA, 1986; NATARAJAN & OBE, 1983). As células são geralmente capazes de reparar a maioria das lesões induzidas tanto por agentes físicos como químicos, porém acima de um certo nível de exposição, as células podem entrar num processo de morte devido ao dano não reparado ou reparado erroneamente.

A radiação pode interagir com o material biológico por meio de ação direta e indireta. No mecanismo direto, a energia da radiação é transferida diretamente aos alvos intracelulares, como o DNA, enquanto que no mecanismo indireto, aos radicais livres provenientes da radiólise da água que se difundem e atingem os alvos (WOOTON, 1993). Assim sendo, o DNA celular pode ser atingido, direta ou indiretamente pela incidência da radiação em sistemas biológicos, podendo resultar numa série de conseqüências danosas para o organismo.

Basicamente, existem dois tipos de radiação ionizante que podem causar danos ao DNA: eletromagnética (raios X e raios gama) e particulada (partículas alfa, beta e nêutrons).

Esses diferentes tipos de radiação produzem efeitos qualitativamente similares, mas quantitativamente diferentes, o que podem ser traduzidos pelo conceito de transferência linear de energia (LET), definida como uma medida da quantidade média de energia depositada no tecido por unidade de distância percorrida ($\text{keV}/\mu\text{m}$). A LET é afetada pela velocidade, massa e carga da radiação ionizante (HALL & VARMA, 1994).

De modo geral, as radiações de alta LET (radiações particuladas como alfa e fragmentos de fissão) são mais eficazes na produção de danos biológicos que as de baixa LET (raios X, raios gama e partículas beta) por apresentarem uma velocidade mais lenta e, portanto, depositam toda a sua energia numa distância muito curta causando ionização dos átomos do meio por onde atravessam (CASARETT, 1968; LEWINGTON, 1993).

A radiação beta é uma partícula sub-atômica emitida em alguns tipos de decaimentos radioativos. Nesses casos um nêutron é transformado em um próton e um elétron; este é emitido como partícula beta, que é carregada eletricamente e interage com os elétrons de átomos dos quais se aproxima, causando ionização. Uma partícula beta de energia média percorre cerca de 1m no ar, mas seu poder de penetração nos tecidos moles é de 1 a 2mm (WOOTON, 1993).

A radiação beta possui energia suficiente para penetrar a pele e, por isso representa um risco de radiação externa. Emissores beta internos também são considerados perigosos (TURNER, 1992).

É de grande importância o estudo desse tipo de radiação ionizante, tanto sob o aspecto radiobiológico como terapêutico, considerando-se o seu grande uso em medicina nuclear.

Os radionuclídeos emissores de partículas beta como ^{32}P , ^{186}Re , ^{89}Sr , ^{131}I ou ^{90}Y e ^{153}Sm são amplamente utilizados em medicina nuclear como traçadores terapêuticos em virtude do seu pequeno poder de penetração nos tecidos vivos (1-12 mm com $E_{\text{máx}}$ de 0,3 a 2,27 MeV), o que proporciona uma redução considerável de toxicidade aos tecidos sadios circunvizinhos (SINGH *et al.*, 1989; LEWINGTON, 1993,1996; ALLEN & BLAGOYEVIC,1996).

Um estudo desenvolvido por REGULLA (1986) mostra a importância da dosimetria para a radiação beta: cerca de 25% dos locais onde há envolvimento com esse tipo de radiação não existe monitoramento pessoal. Os serviços de monitoramento utilizando dosímetros dos tipos filme ou termoluminescente sensíveis às partículas beta, mostram que há exposições significativas à radiação beta, principalmente nos reatores, na fabricação de elementos combustíveis, nas usinas de reprocessamento e em certas áreas da medicina nuclear, na indústria e na pesquisa.

Apesar de todas as aplicações da radiação beta em diversos campos, os efeitos em nível celular são pouco conhecidos. Dessa forma, o conhecimento dos efeitos biológicos da radiação beta é de grande importância.

O radionuclídeo ^{90}Sr é produzido pela fissão do ^{235}U e tem uma meia vida física de 28 anos (SHAPIRO,1990). O ^{90}Sr decai por emissão beta ($E_{\text{máx}}=0,54\text{MeV}$), transformando-se em ^{90}Y ($E_{\text{máx}}=2,27\text{ MeV}$) que também decai por emissão beta (HARLEY *et al.*,1988). Desta forma, o ^{90}Sr e o ^{90}Y formam um sistema e são, portanto, uma fonte pura de partículas beta altamente energéticas ($E_{\text{máx}} = 2,27\text{MeV}$; $E_{\text{média}} = 1,13\text{MeV}$), sendo que uma partícula beta de ^{90}Sr ,

de energia média tem poder de alcance da ordem de 10mm nos tecidos moles. (UNSCEAR,1977; SHAPIRO,1990).

Pelo fato de ser um produto de fissão do ^{235}U , o ^{90}Sr pode provocar contaminação na atmosfera, resultante de testes de armamentos nucleares e do possível escape durante o reprocessamento de combustíveis nucleares. Quando expelido da instalação nuclear, o ^{90}Sr pode entrar no ciclo da cadeia alimentar terrestre (WILKINS *et al.*, 1984) e representar um risco à saúde das populações.

Em virtude da escassez de dados em humanos, vários estudos foram conduzidos em espécies de animais de laboratório, para obter informações sobre o risco genético induzido pelo ^{90}Sr (NCRP, 1980).

Dados publicados no ICRP (1968) mostram que após a ingestão de radioestrôncio, um quarto da quantidade deste radionuclídeo é absorvido no fluido extracelular e a metade dele é depositado no osso, devido à semelhança química e metabólica entre esse elemento radioativo e o cálcio; sendo que nos casos de inalação, a proporção absorvida aumenta em um terço. Em decorrência da alta energia das partículas beta emitidas pelo sistema $^{90}\text{Sr} / ^{90}\text{Y}$, o ^{90}Sr depositado produz irradiação crônica no osso e na medula óssea adjacente e por conseguinte, das células sanguíneas (NCRP,1980).

Informações sobre o potencial de dano do ^{90}Sr na indução de tumores ósseos, leucemia e efeitos genéticos estão documentadas no UNSCEAR (1977).

Tendo em vista que vários tipos de radiações ionizantes induzem efeitos biológicos significativos ao interagirem com células, há necessidade de desenvolver metodologias sensíveis para a detecção do dano. Entre elas

destacam-se as técnicas citogenéticas como a análise de aberrações cromossômicas (MOORHEAD *et al.*, 1960), micronúcleos (FENECH & MORLEY, 1985), trocas entre cromátides-irmãs (LATT, 1973) e hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) (PIZZEL *et al.*, 1986).

No entanto, nenhum teste isoladamente é capaz de detectar toda a variedade de efeitos genotóxicos e por isso, geralmente, se recorre a uma bateria de testes que inclui ensaios *in vivo* e *in vitro*.

Assim, um dos objetivos básicos dos ensaios de genotoxicidade é o de tornar possível extrapolar os efeitos obtidos *in vitro* para os *in vivo* decorrentes de exposições acidentais e ocupacionais.

1.2. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

Cada cromossomo humano é constituído por uma única molécula de DNA de duplo filamento, longa e linear (THOMPSON *et al.*, 1991).

As principais lesões responsáveis pela formação de mudanças cromossômicas estruturais são as quebras na fita dupla do DNA (BAUCHINGER & SCHMID, 1998). Essas lesões, induzidas por agentes genotóxicos na estrutura cromossômica podem ser reparadas, restabelecendo a configuração original, ou ocorrendo um erro no reparo, resultando em rearranjos cromossômicos ou permanecendo sem reparo, originando uma deleção cromossômica.

Assim, as aberrações cromossômicas resultam do conjunto da ação de um agente clastogênico e dos eventuais erros causados pelos mecanismos de reparo celular (OKAZAKI, 1995). Dessa forma, a presença de aberrações cromossômicas é um indicativo de que as células sofreram dano no DNA decorrente de algum agente indutor.

As aberrações cromossômicas podem ser induzidas em qualquer fase do ciclo celular pela radiação ionizante. No entanto, dependendo do estadio do ciclo celular, diferentes tipos de aberrações podem ser provocados. Se a célula é exposta na fase G_0 ou G_1 do ciclo celular, a aberração resultante será do tipo cromossômico; na fase G_2 , do tipo cromatídico e na fase S, haverá uma mistura dos dois tipos de aberrações (CARRANO & NATARAJAN, 1987).

As aberrações cromossômicas estruturais podem ser classificadas basicamente em dois tipos: instáveis e estáveis.

As aberrações instáveis são representadas pelos fragmentos acêntricos, dicêntricos, *double minute*, anéis cêntricos e acêntricos (Tabela I), pois podem ser perdidas durante a divisão celular. Os fragmentos acêntricos são impossibilitados de se orientarem no fuso mitótico durante a divisão celular, visto que não apresentam centrômero. Já os dicêntricos geralmente resultam na formação de pontes na anáfase, podendo interferir na separação física das duas células-filhas. Dessa forma, esses tipos de aberrações podem ser eliminados seletivamente da população de células proliferativas (BRASELMANN *et al.*, 1986).

Tabela I. Principais tipos de aberrações cromossômicas estruturais do tipo instável induzidas pela radiação ionizante. (MOURA, A. M.S. *et al.*, 1986)

Intérfase							
METÁFASE							
	NORMAL	DELEÇÃO TERMINAL	DELEÇÃO INTERSTIC.	ANEL ACÊNTRICO	ANEL CÊNTRICO + FRAGMENTO ACÊNTRICO	DICÊNTRICO + FRAGMENTO ACÊNTRICO	

Os dicêntricos são decorrentes de danos causados em dois cromossomos não replicados, onde ocorreram rearranjos entre as extremidades quebradas. Se as extremidades quebradas estiverem a uma distância muito pequena (menor que $0,1\mu\text{m}$) e a quebra ocorrer dentro de um intervalo finito de tempo, tais extremidades poderão se unir formando uma configuração anormal, que é o cromossomo dicêntrico, acompanhado de fragmento acêntrico. Em situações mais raras, três ou mais cromossomos podem estar envolvidos (SACHS & BRENNER, 1993; EDWARDS *et al.*, 1996).

Os fragmentos acêntricos são estruturas em pares sem a presença de centrômero, resultantes de uma ou duas quebras no DNA a partir de um único ou de dois eventos ionizantes (SCHMID & BAUCHINGER, 1980).

Os *double minute* são estruturas que se apresentam aos pares, menores que os fragmentos acêntricos e são produzidos por duas quebras ocorridas no mesmo braço de um cromossomo, ou seja, decorrentes de uma deleção intersticial (IAEA, 1986).

Os anéis cêntricos são resultantes de duas quebras ocorridas nos dois braços do mesmo cromossomo, que se unem originando uma estrutura em forma de anel com um centrômero acompanhada por um fragmento acêntrico.

As aberrações estáveis são assim chamadas, porque são tipos de alterações na estrutura cromossômica que não causam dificuldades mecânicas na divisão celular e dessa maneira podem se perpetuar por várias gerações celulares. As aberrações estáveis podem ser representadas por translocações recíprocas e inversões.

A presença de vários tipos de aberrações cromossômicas foi verificada em células tumorais, em células de sobreviventes de bombas nucleares (YUNIS, 1983), de abortos espontâneos e de malformações congênitas (UNSCEAR, 1986).

As aberrações cromossômicas radioinduzidas são geralmente diferentes daquelas induzidas por outros agentes ambientais, pois envolvem todo o cromossomo, enquanto que os clastogênicos químicos afetam somente uma das cromátides do cromossomo (HARRIS, 1991).

Em decorrência do potencial clastogênico da radiação ionizante sobre as células, a análise cromossômica é muito utilizada, principalmente em dosimetria biológica, onde as aberrações cromossômicas servem como um parâmetro sensível na estimativa de dose absorvida em pessoas expostas acidental ou ocupacionalmente à radiação.

A despeito da existência de uma quantidade considerável de trabalhos publicados sobre os efeitos citogenéticos de radiação gama (LLOYD *et al.*, 1994; BARQUINERO *et al.*, 1995; KOKSAL *et al.*, 1995; LINDHOLM *et al.*, 1998) e dos raios X (MATSUOKA *et al.*, 1994; GREINERT *et al.*, 1995; BARQUINERO *et al.*, 1997), existem poucas informações sobre os efeitos das radiações particuladas como alfa (DUFRAIN *et al.*, 1979; SIMMONS *et al.*, 1996) e nêutron (BAUCHINGER, 1984; HUBER *et al.*, 1994) em células humanas.

Alguns trabalhos disponíveis sobre o efeito citogenético da radiação beta referem-se aos resultados obtidos de exposição *in vitro* de linfócitos à água triciada (BOCIAN *et al.*, 1977; PROSSER *et al.*, 1983; VULPIS, 1984; LUCAS *et al.*, 1992; TANAKA *et al.*, 1994; BENO, 1996) ao ^{153}Sm , utilizado em pacientes com câncer metastático para o alívio da dor (da SILVA *et al.*, 1998) e ao ^{131}I (GUTIERREZ *et*

al.,1997). Os trabalhos conhecidos sobre radiação beta de estrôncio e ítrio utilizaram a técnica do micronúcleo como parâmetro de avaliação do dano no material genético (HALL & WELLS,1988; MILL *et al.*,1996). Um único estudo que empregou aberrações cromossômicas induzidas em cultura de linfócitos sanguíneos humanos por ^{90}Sr *in vitro* nas doses de 0,138 a 2,76Gy ($14,1\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$) foi o de VULPIS & SCARPA (1986), onde a fonte de material radioativo foi colocada em contato direto com a amostra sanguínea.

Como exemplos de trabalhos que reportaram efeitos do ^{90}Sr *in vivo*, podemos citar os estudos que mostraram alguns casos de dermatite e incidência aumentada de câncer em um determinado grupo de trabalhadores que manipulavam tintas luminescentes contendo ^{90}Sr e ^{226}Ra . Nesses indivíduos foi observado um aumento significativo de células contendo aberrações cromossômicas tanto estáveis como instáveis, quando comparadas com as de indivíduos não expostos (MÜLLER *et al.*, 1966; TUSCANY & MÜLLER, 1967; WENGER *et al.*, 1968; VOLF,1971).

1.3. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A DOSIMETRIA BIOLÓGICA

As aberrações cromossômicas são manifestações celulares muito sensíveis do dano causado ao DNA. Assim sendo, elas têm sido amplamente utilizadas para diversos fins, como por exemplo em genética toxicológica, biomonitoramento e em dosimetria biológica.

A dosimetria biológica teve início na década de 60 quando MOORHEAD *et al.* (1960) observaram que os linfócitos sangüíneos periféricos humanos entravam em estadio de divisão celular se estimulados pela substância chamada fitohemaglutinina, retirada do extrato de feijão preto. já que, normalmente essas células não se dividem na corrente sangüínea.

BENDER & GOOCH, em 1962 mostraram que a ocorrência de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos poderia servir como um dosímetro biológico, já que era observada uma relação estreita entre o número de aberrações cromossômicas e a dose de radiação utilizada.

Esse período foi considerado um marco para a dosimetria biológica e desde então tem sido utilizada em casos de exposição acidental ou ocupacional e em casos de suspeita de exposição em vários laboratórios do mundo (LLOYD *et al.*, 1978, 1983, 1986, 1987; IAEA, 1986; RAMALHO *et al.*, 1988; LITTLEFIELD *et al.*, 1990).

Os linfócitos sangüíneos periféricos são o tipo celular utilizado na dosimetria biológica por apresentarem uma série de características favoráveis:

- Apresentam uma alta radiosensibilidade;

- encontram-se amplamente distribuídos por todo o corpo;
- a maioria dos linfócitos sanguíneos encontram-se na fase G0 do ciclo celular, constituindo uma população celular naturalmente sincrônica;
- os danos cromossômicos estruturais observados *in vivo* são extrapoláveis *in vitro*;
- são fáceis de serem obtidos (EVANS & O'RIORDAN, 1975; MÜLLER & STREFFER, 1991).

A estimativa de dose se baseia na comparação da frequência de aberrações cromossômicas induzidas pela radiação em linfócitos de indivíduos expostos com a frequência observada em linfócitos irradiados *in vitro* com doses conhecidas.

Por essa razão, há necessidade de se estabelecer curvas dose-resposta para cada tipo de radiação, que servem como padrões de referência para a estimativa de dose absorvida em pessoas expostas, visto que vários tipos de radiação diferem na eficácia em produzir danos biológicos (IAEA, 1986).

As curvas dose-resposta para a indução de aberrações cromossômicas mais freqüentemente encontradas na literatura são para raios X (MATSUOKA *et al.*, 1994; GREINERT *et al.*, 1995; BARQUINERO *et al.*, 1997) ou gama (LLOYD *et al.*, 1994; BARQUINERO *et al.*, 1995; KOKSAL *et al.*, 1995; LINDHOLM *et al.*, 1998). Para tanto são utilizadas frequências de dicêntricos (BARQUINERO *et al.*, 1995; LINDHOLM *et al.*, 1998) ou dicêntricos mais anéis cêntricos (TANAKA *et al.*, 1994), que são considerados tipos de aberrações cromossômicas característicos da radiação ionizante (aberrações cromossômicas radioinduzidas), apresentam uma taxa

espontânea relativamente baixa, além de serem facilmente identificados, sem necessitar de uma técnica específica de bandamento cromossômico.

Outros tipos de aberrações cromossômicas como fragmentos acêntricos e *double minute* são pouco utilizados para a construção de curvas dose-resposta para fins dosimétricos, principalmente pelo fato da frequência espontânea ser mais alta que a apresentada por dicêntricos, além de serem produzidos por outros agentes como clastogênicos químicos.

No entanto, autores como BREWEN & LUIPPOLD (1971), pesquisando a frequência de aberrações cromossômicas em amostras irradiadas com raios X e gama, LLOYD *et al.* (1973) em estudos dosimétricos de irradiação parcial do corpo humano com raios X e WAGNER *et al.* (1983) em experimentos relacionados à aplicação de diferentes tipos de coloração de cromossomos para a observação de aberrações cromossômicas induzidas em linfócitos humanos por raios X analisaram o aspecto quantitativo de fragmentos acêntricos em função da dose de radiação.

Poucos dados são encontrados na literatura sobre *double minute* (TANAKA *et al.*, 1994), talvez por não serem os tipos de aberrações cromossômicas mais indicados para o enfoque dosimétrico, o que não diminui a sua importância sob o ponto de vista radiobiológico.

Em muitas situações, por exemplo, quando determinados radionuclídeos são incorporados no organismo, é muito difícil fazer uma estimativa quantitativa de dose equivalente de corpo inteiro pela dosimetria biológica (LLOYD *et al.*, 1984). Muitas vezes, ocorre uma distribuição localizada de nuclídeos em órgãos/tecidos específicos, provocando uma exposição crônica das células circunvizinhas, além

das taxas de dose que diminuem em virtude do decaimento radioativo e da metabolização e excreção. Todavia, há o interesse fundamental crescente sobre os efeitos biológicos desses radionuclídeos em nível celular.

1.4. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O TESTE DO COMETA

Além das técnicas citogenéticas utilizadas para a detecção do dano radioinduzido, outras metodologias têm sido propostas como os métodos bioquímicos. Dentre eles, figuram os gradientes alcalinos de sacarose, eluição alcalina ou neutra, eletroforese alcalina de gel, sedimentação de nucleóide, medidas viscoelásticas de DNA (FAIRBAIRN *et al.*, 1995) e o teste do Cometa, também chamado de eletroforese de microgel (ÖSTLING & JOHANSON, 1984), que permite a visualização direta do dano ao DNA em nível de células individuais.

O teste do cometa se baseia no princípio da eletroforese, onde uma suspensão de células a serem analisadas é colocada numa fina camada de gel de agarose sobre uma lâmina histológica, tratada com a solução de lise para a remoção de proteínas, submetida à eletroforese e corada com um agente fluorescente com afinidade ao DNA. A eletroforese permite que os fragmentos de DNA, que têm carga negativa (-), migrem em direção ao anodo (+). As células resultantes apresentam uma parte mais concentrada e circular, representada pelo DNA não lesado ("cabeça") e filamentos danificados que migram durante a eletroforese formando a "cauda". A distância de deslocamento em direção ao anodo é diretamente relacionada com a intensidade de dano ocorrido no DNA; daí a denominação de "teste do cometa" (ÖSTLING & JOHANSON, 1984).

A técnica originalmente proposta sofreu modificações em 1988 por SINGH *et al.*, e posteriormente em 1989 por OLIVE, que utilizaram condição alcalina em vez de neutra para a lise e eletroforese das células, que permite não só a visualização de quebras duplas no DNA, mas também a detecção de quebras

simples na cadeia do DNA e sítios álcali-lábeis. Assim sendo, a condição alcalina é mais sensível que a neutra.

1.4.1. Avaliação do dano

A avaliação do dano no DNA pela técnica do cometa pode ser feita basicamente por duas maneiras: manualmente ou por análise de imagens utilizando programas de computação.

A análise manual consiste em medir o comprimento do cometa (diâmetro da cabeça mais o comprimento da cauda) ou somente o comprimento da cauda por meio de uma escala calibrada na ocular do microscópio ou de negativo das fotomicrografias (MCKELVEY-MARTIN *et al.*, 1993; VIJAYALAXMI *et al.*, 1992;1993).

Uma outra maneira de avaliar a extensão do dano manualmente é por meio da classificação visual dos cometas baseada no seu aspecto morfológico, desde não danificado ao extremamente danificado, passando por classes intermediárias de lesão (ANDERSON *et al.*, 1994; VISVARDIS *et al.*, 1997; JALOSZYNSKI *et al.*, 1997).

A análise computadorizada de imagem permite obter dados como o valor do momento da cauda ("tail moment") e outros parâmetros como a área total do cometa, comprimento total, comprimento da cauda, diâmetro da cabeça e porcentagem de DNA da cabeça e da cauda (BÖCKER *et al.*, 1997).

O momento da cauda é considerado por vários pesquisadores como um parâmetro quantitativo mais apropriado para a avaliação do dano ao DNA, pois leva em conta a migração do material genético bem como a quantidade relativa

de DNA na cauda. Este parâmetro associa em um único valor as duas medidas de migração do DNA: o comprimento da cauda e a quantidade de fragmentos de DNA, representada pela intensidade de fluorescência na cauda. Este parâmetro é fornecido pelo analisador de imagens, sendo importante salientar que cada programa de análise de imagens possui sua própria definição de momento da cauda. No caso do programa Casys (SYNOPTICS), por exemplo, o valor é definido como o produto da intensidade total pela distância entre o centro óptico de massa da cauda e o centro da cabeça do cometa na direção da corrente aplicada. Já no programa "Interactive Image Analysis System Comet Assay II" (PERCEPTIVE), o momento da cauda é calculado como o produto do comprimento da cauda pela intensidade de fluorescência na cauda.

A técnica do cometa é de boa sensibilidade, capaz de detectar dano ao DNA induzido pela radiação de baixa LET, da ordem de 0,05Gy em linfócitos sanguíneos periféricos irradiados *in vitro* (MENDIOLA-CRUZ & MORALES-RAMIREZ, 1999). É aplicada na genética toxicológica, nos estudos de dano e reparo do DNA, da apoptose e no biomonitoramento (WOJEWÓDZKA *et al.*, 1998).

Trata-se de uma técnica inovadora que consiste numa forma relativamente rápida, simples e sensível de medir o dano ao DNA induzido pelos mutagênicos (COLLINS *et al.*, 1997): permite a análise da integridade do DNA em células individuais, possibilitando a identificação de diferentes subpopulações dentro de uma mesma amostra (WOODS *et al.*, 1999) e não requer proliferação celular. Além disso, esse ensaio possui a vantagem de avaliar a heterogeneidade na resposta à radiação e a capacidade de reparo das células, característica relevante na oncogênese (FAIRBAIRN *et al.*, 1995).

No entanto, a técnica do Cometa apresenta algumas desvantagens em relação à técnica citogenética convencional, pois não oferece todas as informações que uma análise de aberrações cromossômicas permite, como a identificação de cromossomos ou partes de cromossomos envolvidos, alterações numéricas, bem como a avaliação da cinética do ciclo celular.

2.OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho consistiu em analisar os efeitos da partícula beta do ^{90}Sr em linfócitos periféricos humanos irradiados *in vitro* com diferentes doses, por meio das técnicas de aberrações cromossômicas e de eletroforese de microgel (método do Cometa), dando enfoque nos seguintes aspectos:

- análise de aberrações cromossômicas numéricas e estruturais;
- elaboração de curvas dose-resposta para a indução de dicêntricos, fragmentos acêntricos e *double minute*;
- elaboração de curvas dose-resposta para a migração de DNA.

3.MATERIAIS E MÉTODO

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, CNEN-SP, sob nº 006/CEP-IPEN/SP em 12 de novembro de 1998.

O desenvolvimento de todo o trabalho foi realizado na Supervisão de Radiobiologia (TBR), Departamento de Bioengenharia do IPEN/CNEN- SP.

3.1. DOADORES

Foram utilizadas amostras sanguíneas de cinco indivíduos sadios (A, B, C, D, E), do sexo feminino, com idades de 25, 38, 23, 37 e 41 anos, respectivamente, não fumantes, sem história de irradiações e sem ingestão de qualquer medicamento na ocasião da coleta do sangue.

Todas as doadoras assinaram uma declaração (Anexo I) concordando em participar da pesquisa e responderam ao questionário para a obtenção de informações adicionais pertinentes à pesquisa.

3.2. MÉTODO

3.2.1. Obtenção das Amostras Sangüíneas

Foram coletados 10ml de sangue periférico de cinco doadoras, por punção venosa em seringas plásticas descartáveis previamente heparinizadas.

Todas as amostras sangüíneas coletadas foram submetidas às duas metodologias: técnica de aberrações cromossômicas e técnica do cometa.

3.2.2. Condição de Irradiação

As amostras sangüíneas foram irradiadas *in vitro* com partículas beta de uma fonte de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ (Emáxima = 2,27MeV; Emédia = 1,13MeV) (AMERSHAM BUCHLER), com taxa de dose de $0,2 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$, nas doses de 0,2; 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0Gy, à temperatura ambiente e na presença de oxigênio molecular.

A adaptação da fonte de ^{90}Sr , a montagem do sistema, bem como a dosimetria física da fonte para a irradiação das amostras em condições estéreis foram feitas pelo Departamento de Metrologia das Radiações do IPEN/CNEN – SP. A calibração da fonte foi feita utilizando-se uma câmara de extrapolação 23391(PTW-FREIBURG).

O aparato utilizado para a irradiação das amostras, ilustrado na Figura 1, foi confeccionado em acrílico, pois esse material apresenta densidade próxima à da água e semelhante à do tecido, além de possuir baixo número atômico, o que impede a produção de raios X a partir da incidência de radiação beta. Além

disso, foi levado em consideração o baixo poder de penetração dessas partículas.

O aparato consistiu de uma parte para o encaixe da fonte de ^{90}Sr e uma gaveta na parte inferior, onde as amostras acondicionadas em dispositivos próprios foram colocadas, de maneira que no momento da irradiação, estas eram posicionadas exatamente abaixo da fonte, sendo a distância entre elas de 41,6mm (Figura1). O alcance da partícula beta de ^{90}Sr no ar é de cerca de 8,7m (SHAPIRO, 1990).

As amostras sanguíneas coletadas das doadoras foram fracionadas em seis lotes e colocadas em dispositivos confeccionados em "nylon", medindo 7mm de altura e 25mm de diâmetro, formando uma fina camada de sangue (cerca de 1mm). Este procedimento foi utilizado para ambas as técnicas, citogenética e cometa.

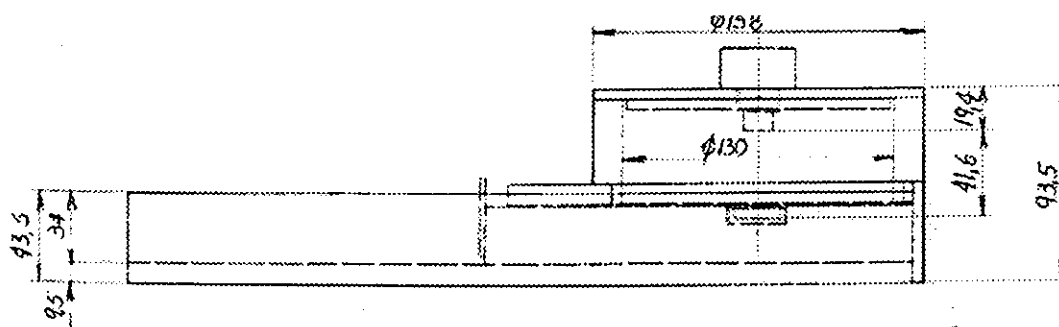


Figura 1. Esquema do aparato utilizado para a irradiação da amostra sanguínea usando uma fonte de ^{90}Sr (medidas em mm) (vista transversal).

3.2.3. Técnica de Aberrações Cromossômicas

3.2.3.1. Condição de Cultivo

Para a observação dos danos cromossômicos foi efetuada a cultura de linfócitos sangüíneos segundo a técnica descrita por MOORHEAD *et al.* (1960) com algumas modificações. Cerca de 0,5ml de sangue total de cada doadora foi gotejado em tubo de cultura estéril contendo 4,5ml de meio MEM (CULTILAB), suplementado com 10% de soro fetal bovino (CULTILAB), 100µl de fitohemaglutinina (5µg/ml) (GIBCO) para estimular a divisão celular e 60µl de BrdU (5µg/ml) (SIGMA) para detecção de metáfases nos diferentes ciclos celulares após a irradiação. Os tubos contendo o material, foram incubados por 48 horas no total, a 37°C. Trinta microlitros de colchicina (0,1µg/ml) (SIGMA) foram adicionados 46 horas após o início do cultivo para a obtenção de um maior número de metáfases para a análise de aberrações cromossômicas numéricas e estruturais. A cultura foi mantida por mais duas horas nas mesmas condições de incubação. Após esse período, as células foram hipotonizadas com uma mistura de solução de 0,075M KCl e 1% citrato de sódio (MERCK) numa proporção de 3:1, fixadas com solução de metanol e ácido acético (MERCK) na proporção de 3:1 por três vezes e então, gotejadas em lâminas histológicas pré-aquecidas a 65°C e em atmosfera úmida. Após 24 horas, as lâminas foram coradas com Hoescht 33258 (SIGMA), cobertas com tampão Mc Ilvaine (0,5 ml; pH8,0) e expostas à luz UV (245nm) sobre uma placa aquecida a 60°C, por 40 minutos. A seguir, as lâminas foram lavadas em água destilada, secas ao ar e coradas com 5% de Giemsa (SIGMA) em tampão fosfato.

3.2.3.2. Critérios de Análise

Para a análise microscópica das preparações foram levadas em consideração cerca de 100-360 metáfases por dose para cada doadora observando-se as aberrações estruturais e numéricas, utilizando a objetiva de imersão de 100X . Foram analisadas somente células contendo até $2n - 2$ cromossomos. Para a identificação de diferentes tipos de aberrações cromossômicas estruturais foram utilizados critérios adotados por BUCKTON & EVANS (1973). Numa mesma metáfase contendo fragmentos acêntricos e aberrações de rearranjo, somente um fragmento acêntrico foi considerado para cada rearranjo e os outros fragmentos foram contados separadamente. As metáfases obtidas foram classificadas segundo três critérios básicos:

- a) número de centrômeros;
- b) presença de aberrações cromossômicas estruturais e
- c) se pertencem à primeira, à segunda ou à terceira divisão mitótica.

As metáfases foram fotografadas ao microscópio óptico CARL ZEISS, no aumento de 1000X, utilizando filme KODAK ASA400, colorido.

3.2.4. Técnica do Cometa ou "Eletroforese de Microgel"

3.2.4.1. Condição de Eletroforese

Para o estudo de danos no DNA pela técnica bioquímica, foi utilizado o método do cometa ou eletroforese de microgel, versão alcalina, descrito por SINGH *et al.* (1988) com algumas modificações.

Imediatamente após as irradiações, as amostras sangüíneas foram mantidas no gelo para a avaliação do dano inicial.

As lâminas utilizadas foram preparadas com um dia de antecedência. O preparo consistiu em mergulhar as lâminas histológicas em solução de 1,5% de agarose "normal melting" (SIGMA) em tampão PBS livre de cálcio e magnésio, a uma temperatura de 65°C, formando uma fina camada de gel. As lâminas foram deixadas na posição horizontal "overnight" à temperatura ambiente para uma secagem perfeita (em duplicata para cada dose). Sobre essa camada de gel foi adicionada uma mistura de 5µl de amostra sangüínea em 90µl de agarose "low melting" (0,5% de agarose em tampão PBS livre de cálcio e magnésio) (SIGMA) a 37°C, colocando-se uma lamínula sobre essa camada e levadas em seguida, a 4°C por 5 minutos para solidificação do gel. Então, as lamínulas foram retiradas delicadamente e as lâminas foram mergulhadas numa solução de lise gelada (2,5M de NaCl; 100mM de EDTA; 10mM de Tris; 1% de sarcosinato de sódio pH10; 1% de Triton X-100; 10% de DMSO) por 2 horas a 4°C, para a remoção de proteínas.

Em seguida, as lâminas foram retiradas da solução de lise e arranjadas lado a lado numa cuba de eletroforese horizontal (17x20cm-PERMATRON) cobertas com tampão alcalino, pH13 (1mM de EDTA; 300mM de NaOH), por 30 minutos para a expressão de quebras na fita simples e de sítios álcali-lábeis do DNA, e então submetidas à corrida eletroforética (25V, 300mA- fonte PHARMACIA) por mais 30 minutos a 4°C.

Após essa etapa, as lâminas foram lavadas 3 vezes por cinco minutos com tampão neutralizador (0,4M de Tris: pH7,5), fixadas em etanol absoluto (MERCK) por 10 minutos para a preservação das lâminas conforme descrito por Woods *et al.* (1999) e então, coradas com 40µl de brometo de etídio (20µg/ml) (SIGMA). Os cometas resultantes foram observados ao microscópio de fluorescência (CARL ZEISS) no aumento de 400X , equipado com filtro de excitação de 515 - 560nm e filtro de barreira de 590nm.

3.2.4.2. Critérios de Análise

As células foram analisadas por dois métodos: pelo analisador de imagens Casys (SYNOPTICS) e pela classificação visual (JALOSZNSKI *et al.*, 1997).

O programa de análise por imagem Casys oferece vários parâmetros de avaliação do dano ao DNA, mas foi utilizado somente o momento da cauda ("tail moment"), por ser considerado como o parâmetro quantitativo mais apropriado para a avaliação de indução de dano ao DNA, pois leva em conta a migração do material genético, bem como a quantidade relativa de DNA na cauda (HELLMAN *et al.*, 1995). O momento da cauda (*tail moment*) foi calculado multiplicando-se a

intensidade total pela distância calibrada entre o centro óptico de massa da cauda e o centro da cabeça na direção da corrente aplicada, segundo especificações do fabricante.

O dano causado ao DNA pela radiação, segundo o método do cometa está diretamente relacionado à extensão de migração dos fragmentos de DNA visualizadas como a cauda do cometa.

A extensão de dano ao DNA foi avaliada também pela análise visual dos cometas de acordo com os critérios adotados por JALOSZYNSKI *et al.* (1997). Os cometas foram classificados em cinco categorias (0 - 4) de acordo com a extensão de migração do DNA. Os que se apresentavam somente como uma figura arredondada, brilhante e sem cauda aparente foram designados como sendo da categoria 0 (células não danificadas). Já os cometas com uma cabeça muito pequena e com cauda longa e difusa foram incluídos na categoria 4, isto é, células extremamente danificadas. Cometas com aspectos intermediários foram divididos e classificados, segundo seu aspecto como sendo das classes 1, 2 ou 3. A estimativa quantitativa do dano ao DNA (DD) foi feita segundo a fórmula descrita por JALOSZYNSKI *et al.* (1997):

$$DD = (N1 + 2.N2 + 3.N3 + 4.N4) / (\Sigma/100).$$

Onde, DD é o dano ao DNA em unidade arbitrária (ua) e N1 – N4 é o número de cometas nas categorias 1- 4 e Σ é a soma de todos os cometas contados, inclusive os da categoria 0.

Foram analisados cerca de 50 – 60 cometas para cada dose de radiação e para cada doadora, tanto para a avaliação do DD, como para a determinação do momento da cauda.

Os cometas foram fotografados no microscópio de fluorescência CARL ZEISS, usando filme KODAK T-MAX ASA 400, preto e branco.

3.2.5. Análise Estatística

As curvas dose-respostas obtidas para indução de dicêntricos, *double minute* e fragmentos acêntricos foram ajustadas pelo modelo linear-quadrático.

$$Y = C + \alpha D + \beta D^2, \text{ onde}$$

Y = frequência da aberração por célula;

C = frequência de aberração espontânea;

D = dose (Gy);

α = coeficiente de regressão linear;

β = coeficiente de regressão quadrático da dose;

A frequência de fragmentos acêntricos em função da dose foi também ajustada pelo modelo linear, segundo a fórmula:

$$Y = C + \alpha D, \text{ onde}$$

Y = frequência de fragmentos acêntricos por célula;

C = frequência de fragmentos acêntricos espontânea;

α = coeficiente de regressão linear;

D = dose (Gy).

As curvas dose-respostas obtidas para a migração do DNA foram ajustadas pelo modelo de regressão não-linear (*one phase exponential decay*), segundo a equação:

$$Y = A \cdot e^{(-K \cdot D)} + B, \text{ onde}$$

Y = dano ao DNA ou momento da cauda em unidade arbitrária (ua);

A, K e B = constantes do modelo;

D = dose (Gy).

Toda a análise estatística foi desenvolvida pelo programa de computação *GraphPad Prism*.

4. RESULTADOS

4.1. AVALIAÇÃO DO DANO PELA TÉCNICA DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

A análise citogenética de linfócitos irradiados com várias doses de ^{90}Sr de cinco doadoras (A, B, C, D e E) mostrou a presença de vários tipos de aberrações cromossômicas estruturais. As mais freqüentes foram os dicêntricos, fragmentos acêntricos e *double minute* (Figura 2). Não foram encontradas aberrações cromossômicas do tipo anel acêntrico.

A Tabela II mostra a freqüência de diferentes tipos de aberrações cromossômicas estruturais encontrados em amostras sanguíneas irradiadas com doses de 0,2 a 5,0 Gy de cinco doadoras individualmente e a média. A amostra de sangue irradiada com 5,0 Gy da doadora E não foi levada em consideração em virtude do número insuficiente de metáfases.

Pode-se observar que houve um aumento na freqüência de todos os tipos de aberrações cromossômicas em função da dose de radiação beta, em todas as doadoras analisadas. A doadora A apresentou uma taxa espontânea de dicêntrico relativamente alta. Os tipos de aberrações cromossômicas estruturais mais freqüentemente encontrados foram os *double minute*, os dicêntricos e, principalmente os fragmentos acêntricos.

As relações dose-resposta para a indução de dicêntricos, *double minute*, fragmentos acêntricos e para a indução de fragmentos acêntricos mais *double minute* para cada uma das doadoras individualmente estão expressas

graficamente nas Figuras 3, 4, 5, 6 e 7 respectivamente. O modelo que melhor se ajustou aos dados obtidos com radiação beta do ^{90}Sr foi o linear-quadrático. Para a indução de fragmentos acêntricos, tanto o modelo linear como o linear-quadrático foram utilizados.

Os valores dos coeficientes α , alfa e beta, com seus respectivos erros padrões (SE) utilizados para o ajuste das curvas e os coeficientes de ajuste do modelo (r^2) estão expressos na Tabela III. Os valores de r^2 mostram que os modelos se ajustaram adequadamente aos dados obtidos ($r^2 > 0,95$) para cada uma das curvas.

Os valores dos parâmetros α , alfa e beta, da relação dose-resposta para a indução de dicêntricos e aberrações acêntricas (*double minute* + fragmentos acêntricos + anéis acêntricos) pela radiação gama, beta e raios X obtidos da literatura para comparação, levando-se em consideração, taxa de dose e condições de cultivo celular similares estão apresentados nas Tabelas IV e V, respectivamente.

A Tabela VI apresenta as freqüências de metáfases com número modal e hipomodal de centrômeros, observados em linfócitos irradiados *in vitro* com diferentes doses de ^{90}Sr das doadoras A, B, C, D e E, individualmente. Aparentemente, não houve influência da radiação ionizante na freqüência de células com número modal de cromossomos bem como na cinética do ciclo celular.

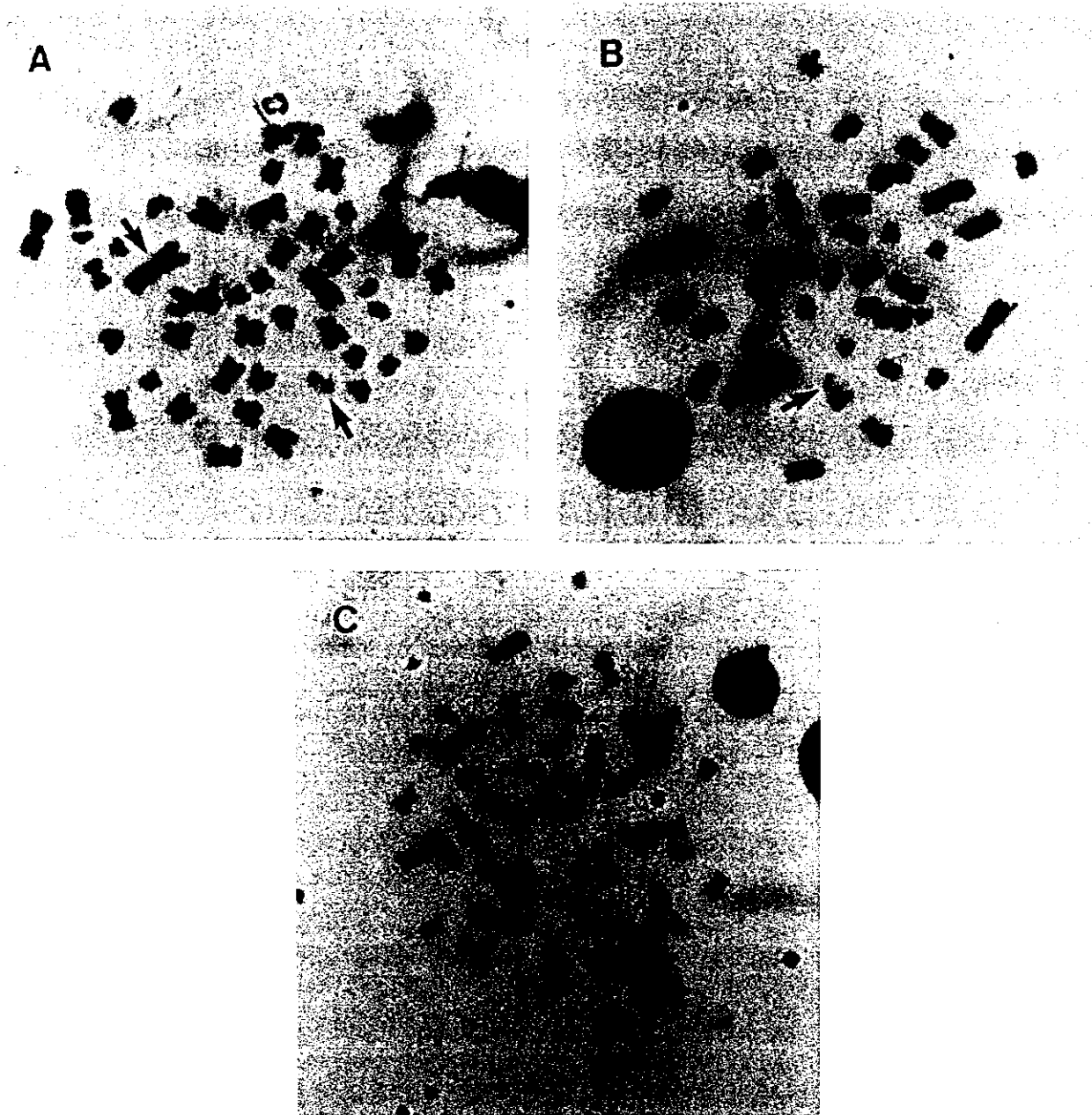


Figura2. Fotomicrografias de metáfase mostrando um dicêntrico + fragmento acêntrico (setas) (A), *double minute* (seta) (B) e (C) metáfase na segunda divisão celular mitótica após a irradiação com ^{90}Sr (1250X)

Tabela II. Frequências de aberrações cromossômicas radioinduzidas encontradas em linfócitos periféricos das doadoras A, B, C, D e E irradiados *in vitro* com várias doses de ^{90}Sr .

Doador	Dose (Gy)	N° células analisadas	Dic.	Anel cent.	Ace.	dm	gap	Total de aberrações	N° Dic./ célula	N° Ace/ célula	N°dm/ célula	N°Aberração /célula
A	0	309	02	0	0	02	02	06	0,01	0	08	0,02
	0,2	175	0	0	01	01	0	02	0	0,01	0,01	0,01
	0,5	221	0	0	06	01	0	07	0	0,03	0	0,03
	1,0	300	02	0	10	05	01	18	0,01	0,03	0,02	0,06
	3,0	265	10	0	20	37	07	74	0,04	0,08	0,14	0,28
	5,0	117	15	04	56	47	02	124	0,13	0,50	0,40	1,06
B	0	319	0	0	0	03	01	04	0	0	0,01	0,01
	0,2	314	0	0	0	06	0	06	0	0	0,02	0,02
	0,5	302	01	01	04	05	02	13	0	0,01	0,02	0,04
	1,0	368	02	0	10	02	0	16	0	0,03	0,05	0,04
	3,0	210	12	03	34	26	02	77	0,06	0,20	0,12	0,40
	5,0	152	05	0	56	25	01	87	0,03	0,40	0,16	0,60
C	0	305	0	0	01	0	0	01	0	0	0	0
	0,2	303	0	0	02	0	0	02	0	0,01	0	0,01
	0,5	303	0	0	04	01	0	05	0	0,01	0	0,02
	1,0	149	01	0	06	01	0	08	0,01	0,04	0,01	0,05
	3,0	187	13	0	43	21	0	77	0,07	0,23	0,11	0,40
	5,0	108	26	02	73	17	01	119	0,24	0,68	0,16	1,10
D	0	309	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0,2	304	0	0	0	01	02	03	0	0	0	0,01
	0,5	301	01	0	19	04	01	25	0	0,06	0,01	0,08
	1,0	155	01	0	07	02	02	12	0,01	0,04	0,01	0,08
	3,0	100	12	0	17	16	07	52	0,12	0,17	0,16	0,52
	5,0	109	29	01	57	13	0	100	0,27	0,52	0,12	0,92

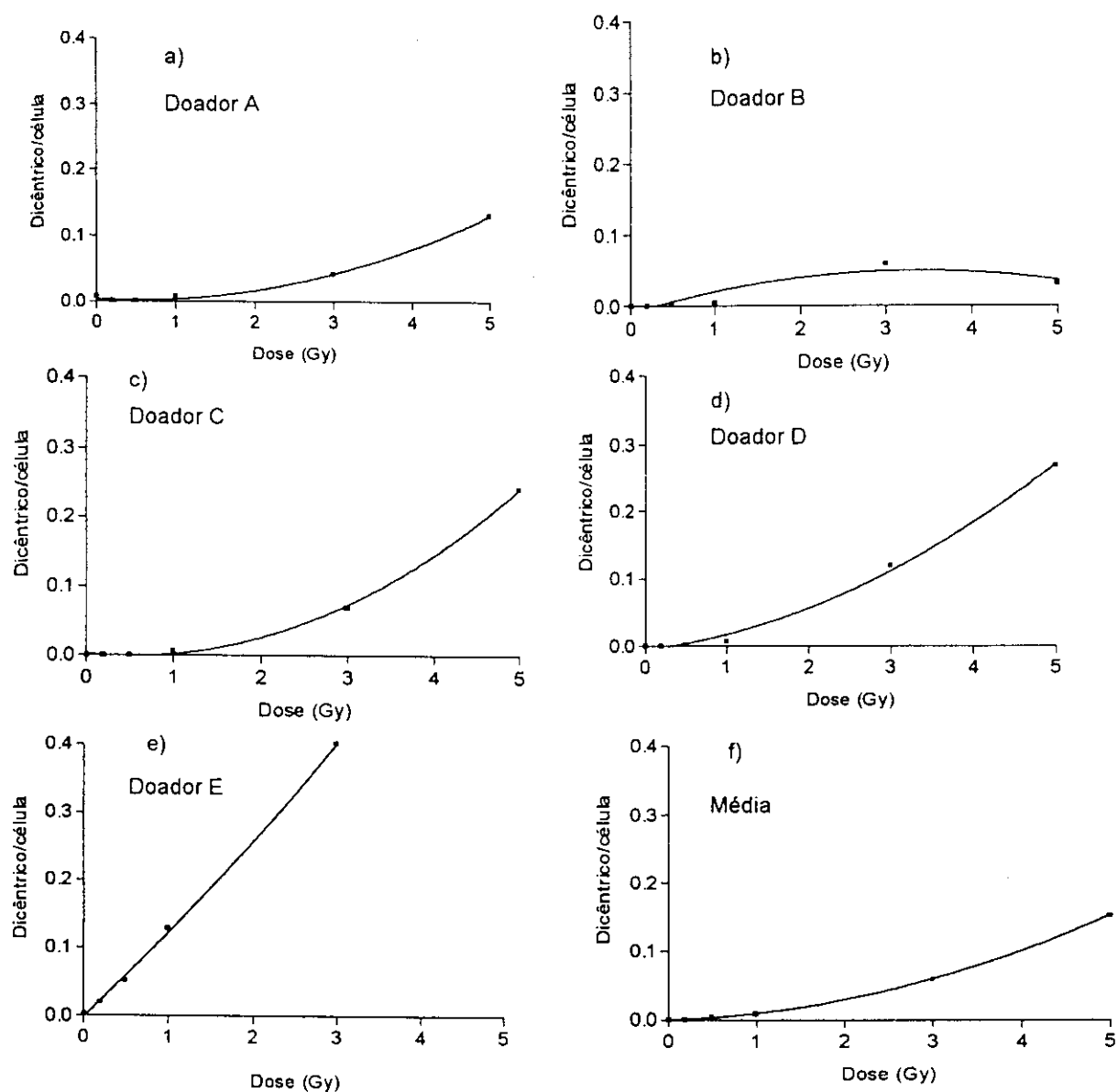


Figura 3. Curvas dose-resposta individuais (a – e) e média (f) ajustadas para indução de dicêntricos obtidas de amostras sanguíneas de doadoras A, B, C, D e E, irradiadas com várias doses de ^{90}Sr .

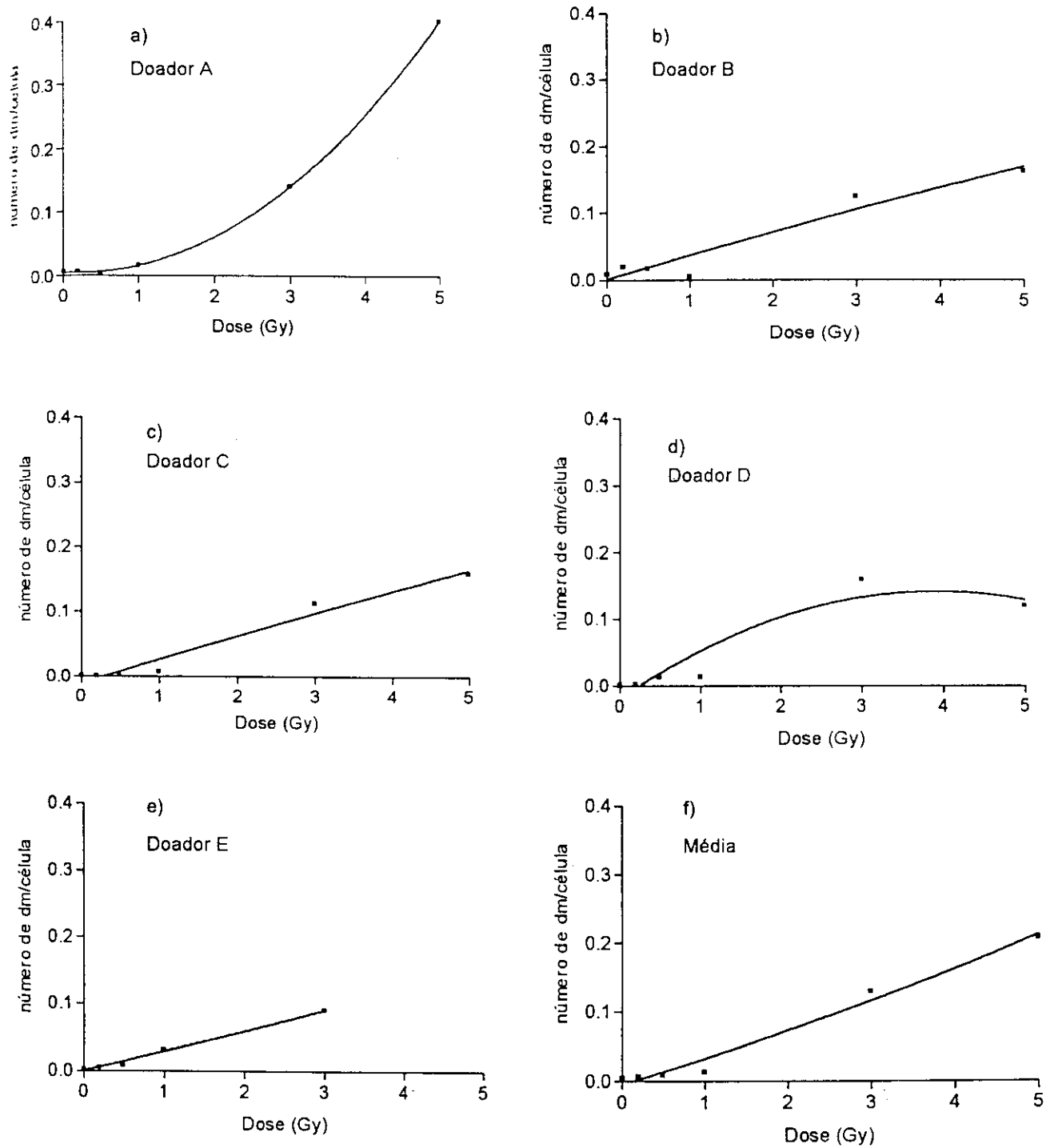


Figura 4. Curvas dose-resposta individuais (a – e) e média (f) ajustadas para indução de *double minute* (dm) obtidas de amostras sanguíneas de doadoras A, B, C, D e E, respectivamente, irradiadas com várias doses de ^{90}Sr .

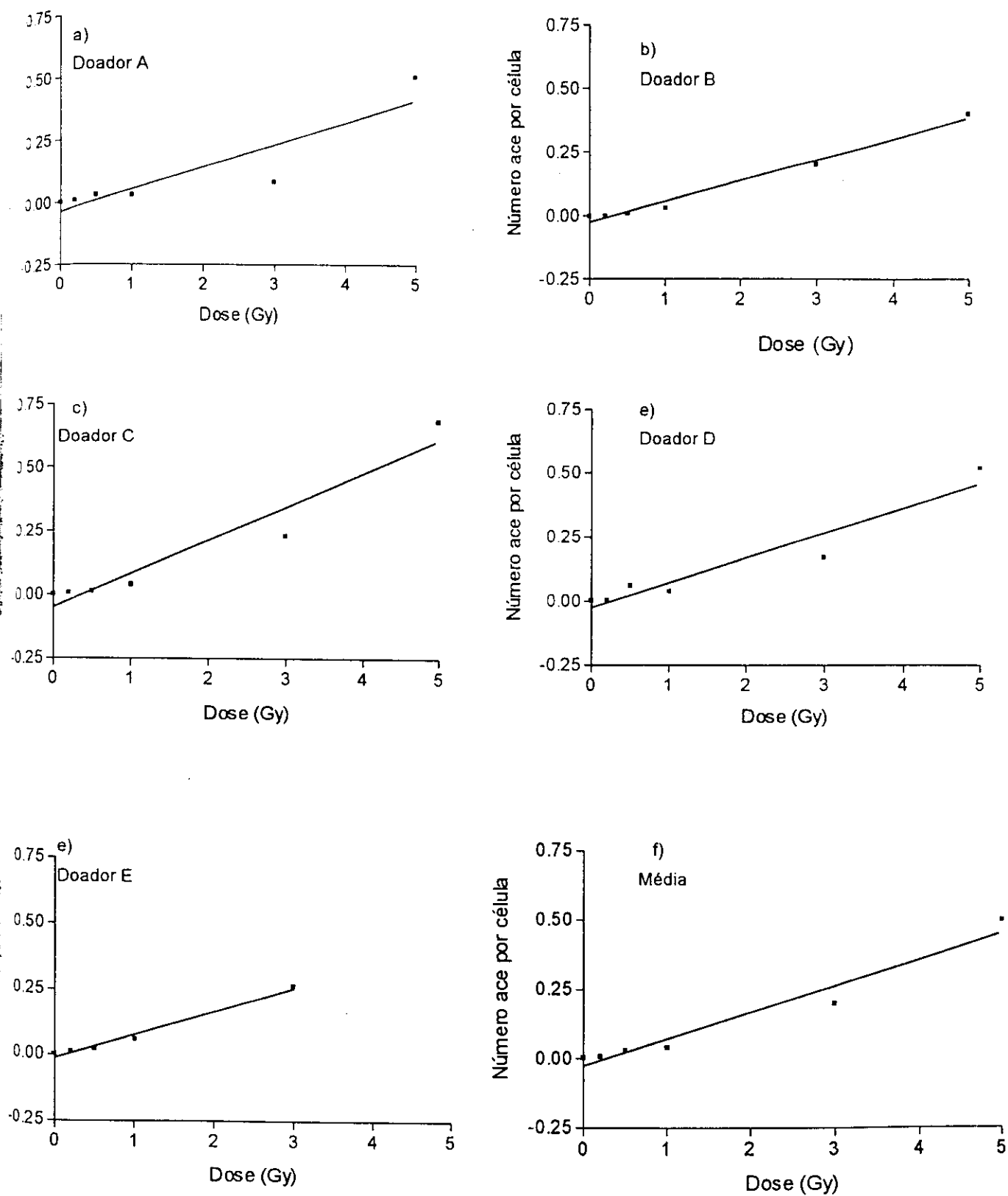


Figura 5. Curvas dose-resposta individuais (a – e) e média (f) ajustadas para indução de fragmentos acêntricos (ace) pelo modelo linear, obtidas de amostras sanguíneas de doadoras A, B, C, D e E, irradiadas com várias doses de ^{90}Sr .

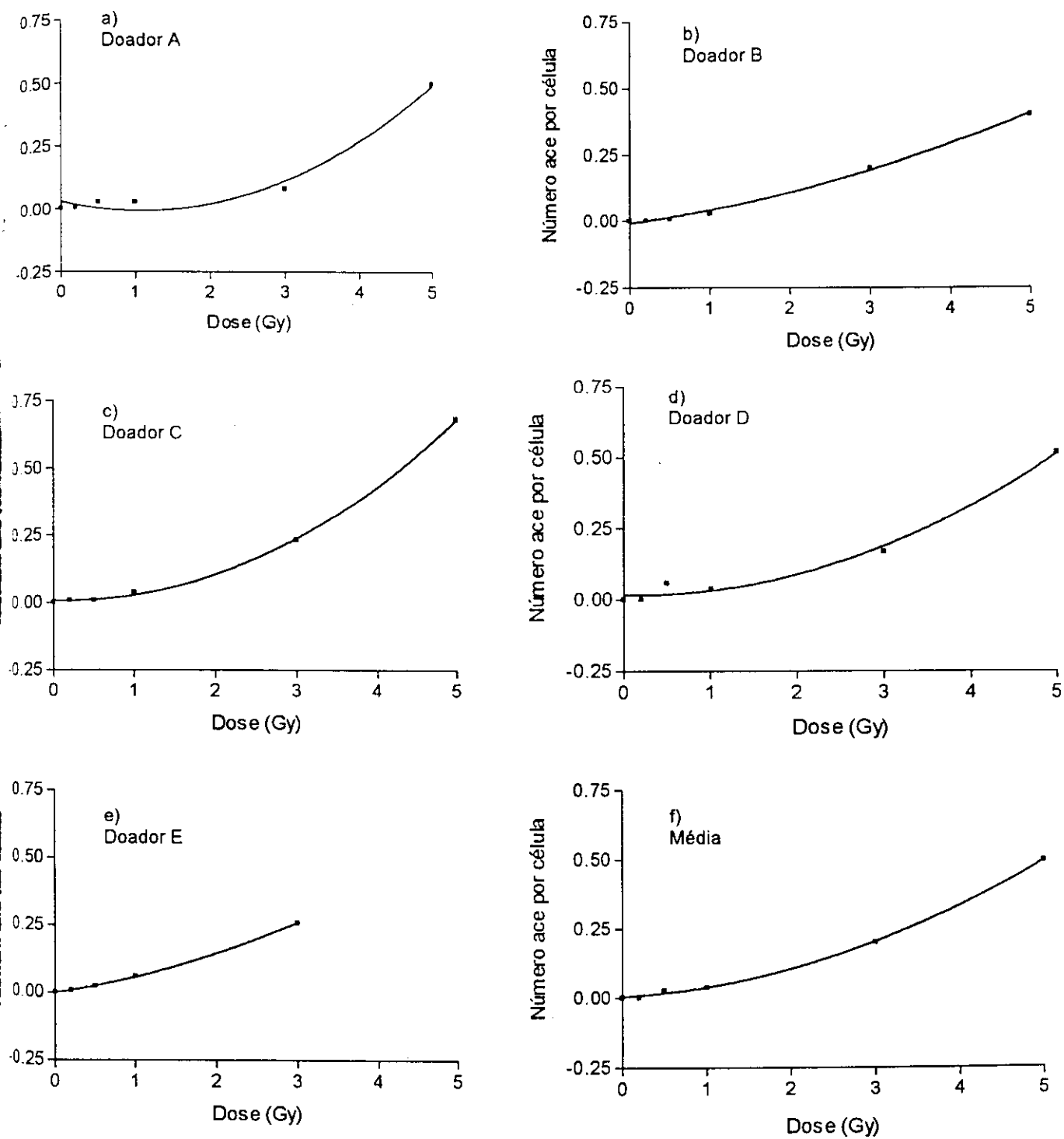


Figura 6. Curvas dose-resposta individuais (a – e) e média (f) ajustadas para indução de fragmentos acêntricos (ace) pelo modelo linear-quadrático, obtidas de amostras sanguíneas de doadoras A, B, C, D e E, irradiadas com várias doses de ^{90}Sr .

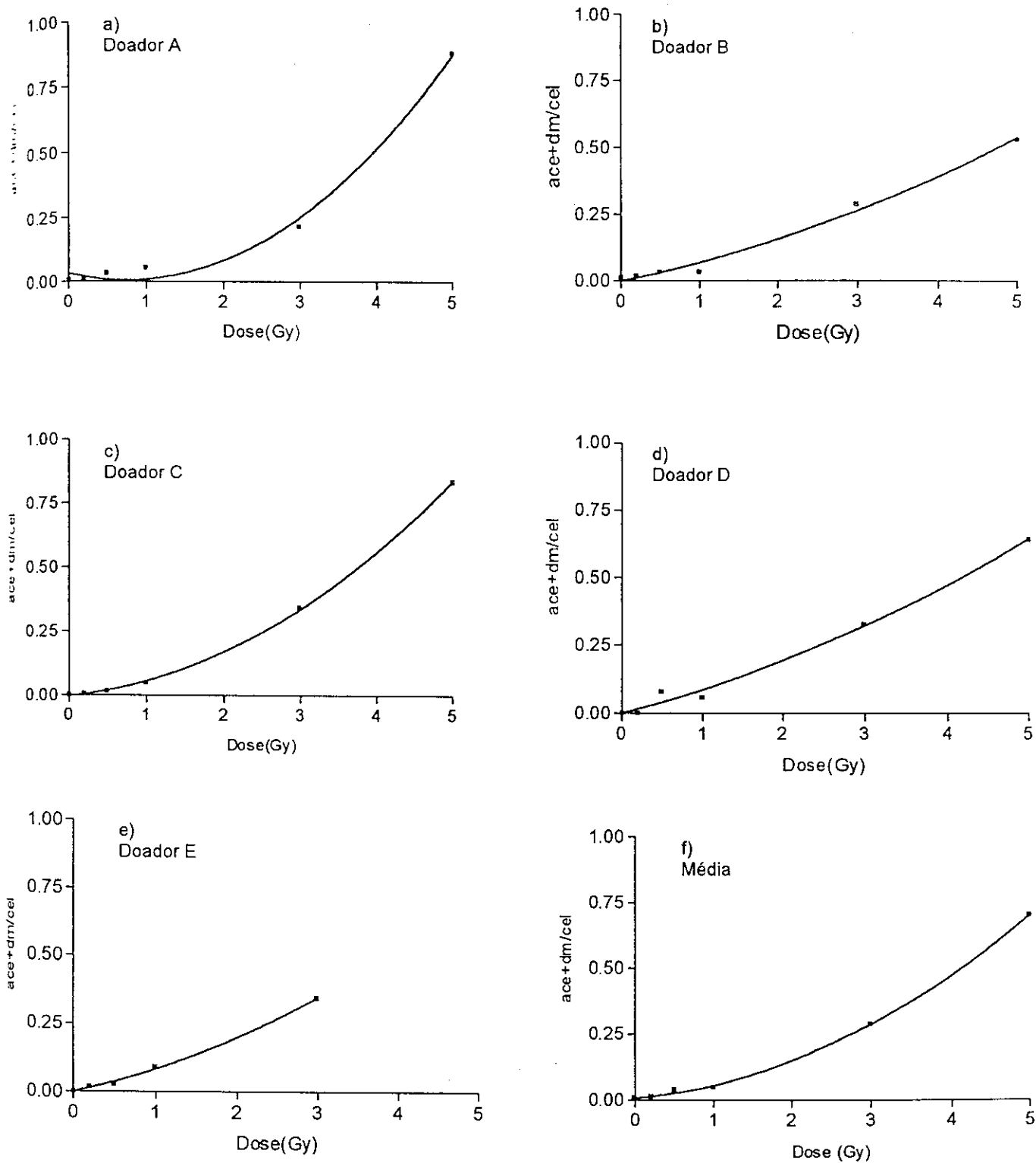


Figura 7. Curvas dose-resposta individuais (a – e) e média (f) ajustadas para a indução de fragmentos acêntricos (ace) mais *double minute* (dm) pelo modelo linear-quadrático, obtidas de amostras sangüíneas de doadoras A, B, C, D e E, irradiadas com várias doses de ^{90}Sr .

Tabela III. Estimativas dos parâmetros da relação dose-resposta para a indução de aberrações cromossômicas pela radiação beta de ^{90}Sr .

Tipo de aberração cromossômica	Modelo	$\alpha (\pm \text{SE}) \cdot 10^{-2}$	$\beta (\pm \text{SE}) \cdot 10^{-2}$	r^2	$\alpha / \beta \text{ (Gy)}$
Dicêntrico	linear-quadrático	$0,3570 \pm 0,0434$	$0,5416 \pm 0,0086$	1,00	0,65
Double minute	linear-quadrático	$3,545 \pm 1,419$	$0,1661 \pm 0,2812$	0,98	21,34
Fragmento acêntrico	linear-quadrático	$1,7500 \pm 0,7787$	$1,6230 \pm 0,1543$	0,99	1,0
	linear	$9,7020 \pm 0,9950$	-	0,95	
Fragmento acêntrico + Double minute	linear-quadrático	$2,3480 \pm 0,7205$	$2,3280 \pm 0,1428$	0,99	1,0

Tabela IV. Valores dos coeficientes α e β do modelo linear-quadrático com respectivos erros padrões (SE) para a indução de dicêntricos pelas radiações γ , β e raios X.

Radionuclídeo	Tipo de radiação	Taxa de dose (Gy/min)	Intervalo de dose (Gy)	α (\pm SE).10 ⁻²	β (\pm SE).10 ⁻²	Referência
¹³⁷ Cs	γ	0,05	0,2-4,0	7,69 \pm 2,33	1,96 \pm 0,58	da SILVA, 1997
¹³⁷ Cs	γ	0,49		4,33 \pm 1,50	4,31 \pm 0,42	TAKAHASHI <i>et al.</i> , 1982
⁶⁰ Co	γ	0,05	0,2 - 4,0	3,46 \pm 2,14	3,45 \pm 0,64	da SILVA, 1997
⁶⁰ Co	γ	0,12	0,5 - 7,0	3,37 \pm 1,63	5,23 \pm 0,55	RAMALHO <i>et al.</i> , 1988
¹⁹² Ir	γ			3,20 \pm 1,80	6,10 \pm 0,70	LITTLEFIELD <i>et al.</i> , 1980
¹⁹² Ir	γ	0,12	0,5 - 4,0	3,18 \pm 1,80	6,09 \pm 0,72	DUFRAIN <i>et al.</i> , 1980
-	RX	0,50		4,10 \pm 0,50	2,60 \pm 0,40	LLOYD <i>et al.</i> , 1984
-	RX	0,35	0,05 - 7,0	1,80 \pm 0,48	5,47 \pm 0,46	VULPIS, 1984
³ H	β	0,02	0,1 - 2,0	15,60	11,40	TANAKA <i>et al.</i> , 1994
³ H	β	0,01-0,05	0,25 - 7,0	12,80 \pm 1,38	5,78 \pm 0,614	VULPIS, 1984
⁹⁰ Sr	β	0,13	0,138 - 2,76	8,22 \pm 1,72	8,81 \pm 1,14	VULPIS & SCARPA, 1986
⁹⁰ Sr	β	0,20	0,2 - 5,0	0,35 \pm 0,04	0,54 \pm 0,01	Presente trabalho

Tabela V. Valores dos coeficientes α e β do modelo linear-quadrático com respectivos erros padrões (SE) para a indução de aberrações acêntricas (fragmentos acêntricos + *double minute* + anéis acêntricos) pelas radiações γ , β e raios X.

Radionuclídeo	Tipo de radiação	Taxa de dose (Gy/min)	Intervalo de dose (Gy)	$\alpha (\pm SE) \cdot 10^2$	$\beta (\pm SE) \cdot 10^{-2}$	Referência
-	RX	0,16	0,05 - 0,5	9,90 \pm 0,74	0,20 \pm 1,86	WAGNER <i>et al.</i> , 1983
-	RX	0,5	0,25 - 4,0	10,37 \pm 0,62	2,20 \pm 0,07	SCHMID & BAUCHINGER, 1980
-	RX		0,03 - 3,0	2,99 \pm 1,66	0,20 \pm 5,45	LLOYD <i>et al.</i> , 1988
-	RX	1	0,50 - 7,0	4,80 \pm 0,80	4,60 \pm 0,30	LLOYD <i>et al.</i> , 1973
^{60}Co	γ	0,5	0,25 - 8,0	2,30 \pm 0,69	3,90 \pm 0,36	LLOYD <i>et al.</i> , 1975
^{60}Co	γ	0,003	0,25 - 8,0	2,64 \pm 0,68	1,36 \pm 0,27	LLOYD <i>et al.</i> , 1975
^{90}Sr	β	0,2	0,20 - 5,0	2,34 \pm 0,72	2,32 \pm 0,14	Presente trabalho

Tabela VI. Frequências de metáfases com número modal e hipomodal de centrômeros, observadas em linfócitos periféricos das doadoras A, B, C, D e E irradiados *in vitro* com várias doses de ^{90}Sr .

Doador A						
Dose (Gy)	Nº de células analisadas	Nº centrômeros(%)			Ciclo celular (%)	
		46	45	44	1º	2º
0	317	313 (98,7)	01 (0,3)	03 (0,9)	304 (95,9)	13 (4,1)
0,2	175	174 (99,4)	0 (0)	01 (0,6)	175 (100)	0 (0)
0,5	221	220 (99,5)	01 (0,4)	0 (0)	221 (100)	0 (0)
1,0	300	300 (100)	0 (0)	0 (0)	300 (100)	0 (0)
3,0	265	265 (100)	0 (0)	0 (0)	265 (100)	0 (0)
5,0	117	112 (95,7)	02 (1,7)	03 (2,6)	117 (100)	0 (0)
Doador B						
Dose (Gy)	Nº de células analisadas	Nº centrômeros (%)			Ciclo celular (%)	
		46	45	44	1º	2º
0	319	319 (100)	0 (0)	0 (0)	300 (94)	19 (0,6)
0,2	314	314 (100)	0 (0)	0 (0)	273 (87)	41 (13)
0,5	302	300 (99,3)	0 (0)	02 (0,7)	302 (100)	0 (0)
1,0	368	368 (100)	0 (0)	0 (0)	300 (81)	68 (18)
3,0	210	205 (97,6)	01 (0,5)	04 (1,9)	207 (99)	03 (1)
Doador C						
Dose (Gy)	Nº de células analisadas	Nº centrômeros (%)			Ciclo celular (%)	
		46	45	44	1º	2º
0	300	300 (100)	0 (0)	0 (0)	300 (100)	0 (0)
0,2	303	300 (100)	0 (0)	0 (0)	300 (100)	3 (0)
0,5	303	300 (99,0)	01 (0,3)	02 (0,7)	303 (100)	0 (0)
1,0	149	147 (98,6)	0 (0)	02 (1,3)	149 (100)	0 (0)
3,0	187	183 (97,8)	03 (1,6)	01 (0,5)	187 (100)	0 (0)
5,0	108	107 (99,1)	0 (0)	01 (0,9)	108 (100)	0 (0)

Tabela VI(Continuação). Frequências de metáfases com número modal e hipomodal de centrômeros, observadas em linfócitos periféricos das doadoras A, B, C, D e E irradiados *in vitro* com várias doses de ^{90}Sr . 46

Doador D						
Dose (Gy)	Nº de células analisadas	Nº centrômeros (%)			Ciclo celular (%)	
		46	45	44	1º	2º
0	309	309 (100)	0 (0)	0 (0)	300 (97,1)	9 (2,9)
0,2	304	300 (96,7)	4 (1,3)	0 (0)	304 (100)	0 (0)
0,5	301	301 (100)	0 (0)	0 (0,7)	300 (99,7)	01 (0,3)
1,0	155	154 (99,4)	01 (0,6)	0 (0)	155 (100)	0 (0)
3,0	100	87 (87)	08 (8)	05 (5)	100 (100)	0 (0)
5,0	109	107 (98,2)	01 (0,9)	01 (0,9)	107 (98,2)	02 (1,8)
Doador E						
Dose (Gy)	Nº de células analisadas	Nº centrômeros (%)			Ciclo celular (%)	
		46	45	44	1º	2º
0	304	300 (98,7)	01 (0,3)	03 (1,0)	304 (100)	0 (0)
0,2	187	176 (94,1)	05 (2,7)	06 (3,2)	187 (100)	0 (0)
0,5	229	223 (97,5)	04 (1,6)	02 (0,9)	229 (100)	0 (0)
1,0	125	122 (97,6)	02 (1,6)	01 (0,8)	125 (100)	0 (0)
3,0	101	101 (100)	0 (0)	0 (0)	100 (99,0)	01 (1,0)
5,0*						
Média						
Dose (Gy)	Nº de células analisadas	Nº centrômeros (%)			Ciclo celular (%)	
		46	45	44	1º	2º
0	1549	1541 (99,5)	02 (0,1)	06 (0,4)	1508 (97,3)	41 (2,7)
0,2	1283	1267 (98,8)	09 (0,7)	07 (0,5)	1239 (96,6)	44 (3,4)
0,5	1356	1344 (99,2)	06 (0,4)	06 (0,4)	1355 (99,9)	01 (0,1)
1,0	1097	1091 (99,4)	03 (0,3)	03 (0,3)	1029 (93,8)	68 (6,2)
3,0	863	841 (97,4)	12 (1,4)	10 (1,2)	859 (99,5)	04 (0,5)
5,0	486	475 (97,8)	04 (0,8)	07 (1,4)	484 (99,6)	02 (0,4)

4.2. AVALIAÇÃO DO DANO PELA TÉCNICA DO COMETA

As células sangüíneas tratadas pela técnica de eletroforese de microgel logo após as irradiações apresentaram um aspecto de cometa com uma cabeça brilhante e fluorescente e uma cauda, cujo comprimento e a intensidade da fluorescência variou em função da dose de radiação beta.

A Figura 8 mostra os diferentes aspectos dos cometas, resultantes de células sangüíneas irradiadas com várias doses de radiação beta e processadas eletroforeticamente.

Os resultados obtidos de cinco doadoras utilizando dois parâmetros, o momento da cauda (MC) segundo o programa Casys (SYNOPTICS) e o dano ao DNA (DD) pela análise visual estão sumarizados na Tabela VII.

Em todas as doadoras, tanto o MC como o DD aumentaram em função da dose de radiação beta de ^{90}Sr .

As porcentagens de cometas pertencentes às diversas categorias de dano (classes 0-4) de acordo com a classificação visual para cada dose de radiação estão expressos na Tabela VIII. Verifica-se que há uma substituição de células menos danificadas a mais danificadas com o aumento da dose de radiação beta.

As Figuras 9 e 10 mostram as relações dose-resposta ajustadas para migração de DNA avaliada pelo MC e DD, respectivamente, para cada uma das doadoras analisadas.

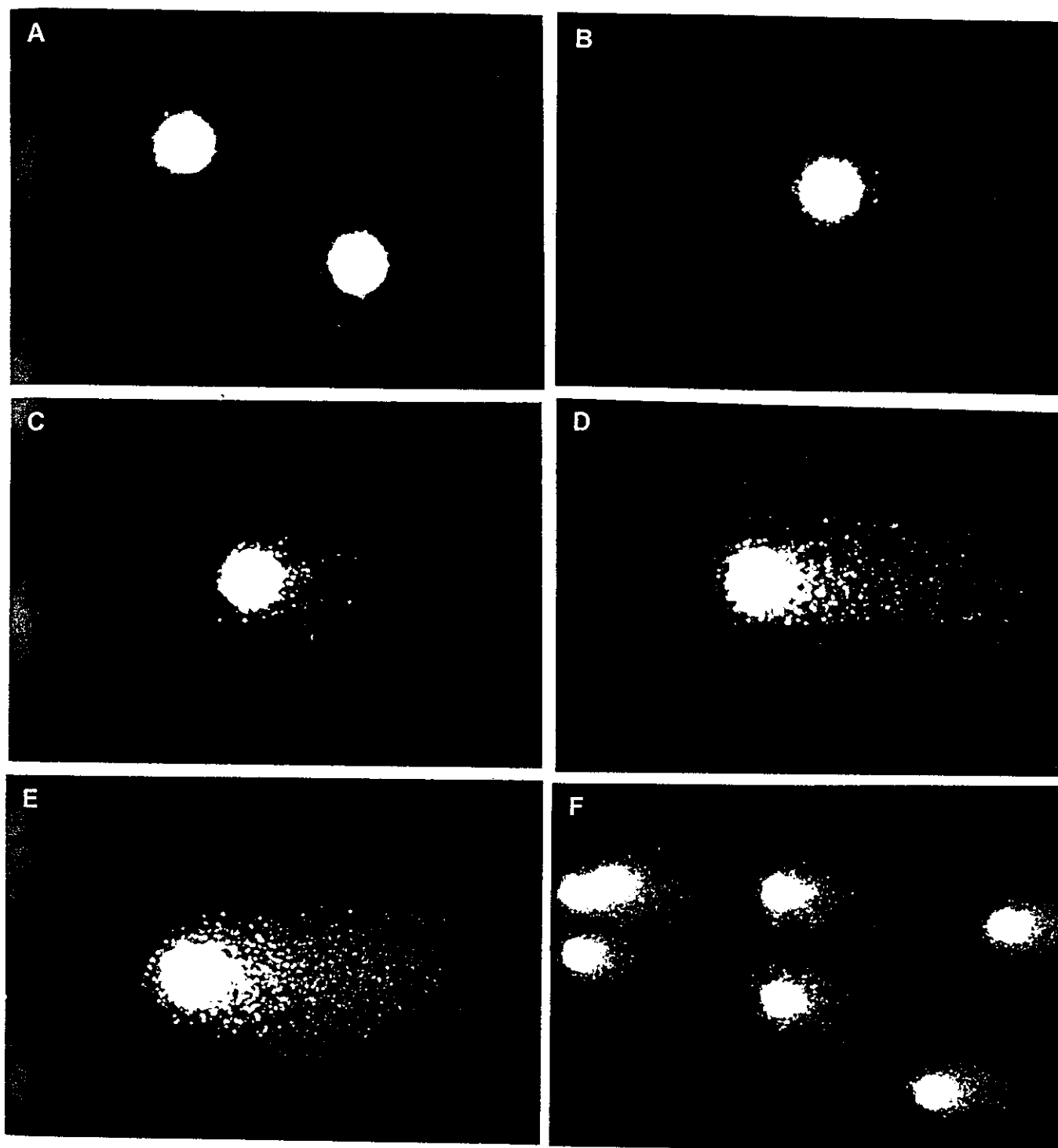


Figura 8. Fotomicrografias de células sanguíneas irradiadas com ^{90}Sr e tratadas pela técnica do Cometa. (A) células sem migração do DNA (tipo 0); (B) e (C) células com pouca migração do DNA (tipos 1 e 2); (D) células muito danificadas (tipo 3); (E) célula extremamente danificada (tipo 4) (450x); (F) aspecto de vários cometas mostrando caudas longas (225x).

Tabela VII. Valores de momento da cauda (MC) e dano ao DNA (DD) encontrados em amostras sanguíneas das doadoras A, B, C, D e E, irradiadas com várias doses de ^{90}Sr , por meio da técnica do cometa.

Doador	Dose (Gy)	Nº células analisadas	MC (ua)	DD(ua)	Células sem migração de DNA(%)	Células com migração de DNA(%)
A	0	52	0,01	9,60	90,40	9,60
	0,2	52	0,03	98,10	7,70	92,30
	0,5	52	0,03	136,50	0	100
	1,0	52	0,04	236,50	0	100
	3,0	52	0,10	296,10	0	100
	5,0	52	0,15	375,00	0	100
B	0	52	0,01	5,80	94,20	5,80
	0,2	52	0,02	90,40	13,50	86,50
	0,5	52	0,04	217,30	0	100
	1,0	52	0,04	250,00	0	100
	3,0	52	0,07	326,90	0	100
	5,0	52	0,08	400,00	0	100
C	0	52	0,01	7,70	92,30	7,70
	0,2	52	0,02	94,20	1,90	98,10
	0,5	52	0,03	173,10	0	100
	1,0	52	0,05	211,50	0	100
	3,0	52	0,12	359,60	0	100
	5,0	52	0,13	398,10	0	100
D	0	52	0,01	-	-	-
	0,2	52	0,01	-	-	-
	0,5	52	0,01	-	-	-
	1,0	52	0,03	-	-	-
	3,0	52	0,11	-	-	-
	5,0	52	0,13	-	-	-
E	0	52	0,01	9,60	90,40	9,60
	0,2	52	0,01	101,90	11,50	88,50
	0,5	52	0,02	170,20	1,90	98,10
	1,0	52	0,03	232,70	0	100
	3,0	52	0,10	300,00	0	100
	5,0	52	0,13	353,80	0	100
Média	0	260	0,01	8,20	91,80	8,20
	0,2	260	0,02	96,10	8,70	91,30
	0,5	260	0,02	170,20	0,50	99,50
	1,0	260	0,04	232,70	0	100
	3,0	260	0,10	320,60	0	100
	5,0	260	0,13	381,70	0	100

Tabela VIII. Porcentagens de células encontradas nas diversas categorias de dano de acordo com a análise visual para as amostras sanguíneas das doadoras A, B, C e E irradiadas com ^{90}Sr .

	<i>Dose (Gy)</i>	<i>Nº células</i>	<i>Tipo 0</i>	<i>Tipo 1</i>	<i>Tipo 2</i>	<i>Tipo 3</i>	<i>Tipo 4</i>
A	0	52	90,4	9,6	0	0	0
	0,2	52	7,7	86,5	5,8	0	0
	0,5	52	1,9	63,5	36,5	0	0
	1,0	52	0	0	63,5	36,5	0
	3,0	52	0	0	11,5	80,8	7,7
	5,0	52	0	0	0	25	75
B	0	52	94,2	5,8	0	0	0
	0,2	52	13,5	82,7	3,8	0	0
	0,5	52	0	0	82,7	17,3	0
	1,0	52	0	0	50	50	0
	3,0	52	0	0	0	73,1	26,9
	5,0	52	0	0	0	0	100
C	0	52	92,3	7,7	0	0	0
	0,2	52	1,9	94,2	3,9	0	0
	0,5	52	0	30,8	69,2	0	0
	1,0	52	0	0	88,5	11,5	0
	3,0	52	0	0	1,9	36,6	61,5
	5,0	52	0	0	0	1,9	98,1
E	0	52	90,4	9,6	0	0	0
	0,2	52	11,5	75	13,5	0	0
	0,5	52	1,9	42,3	55,8	0	0
	1,0	52	0	0	67,3	32,7	0
	3,0	52	0	0	0	100	0
	5,0	52	0	0	0	46,1	53,9
Média	0	208	91,8	8,2	0	0	0
	0,2	208	8,7	84,6	6,7	0	0
	0,5	208	0,5	34,1	61,1	4,3	0
	1,0	208	0	0	67,3	32,7	0
	3,0	208	0	0	3,4	72,6	24,0
	5,0	208	0	0	0	18,3	81,7

Tabela IX. Estimativas dos parâmetros do modelo utilizado para o ajuste das curvas e os coeficientes de ajuste do modelo (r^2) para o MC e DD.

tipo de radiação	Parâmetro de avaliação do dano	Coefficientes	Estimativa	Erro padrão	r^2
β (^{90}Sr)	MC	A	-0,17	$\pm 0,03$	0,99
		B	0,18	$\pm 0,03$	
		K	0,24	$\pm 0,08$	
β (^{90}Sr)	DD	A	-340,40	$\pm 25,79$	0,98
		B	361,50	$\pm 20,12$	
		K	1,03	$\pm 0,22$	

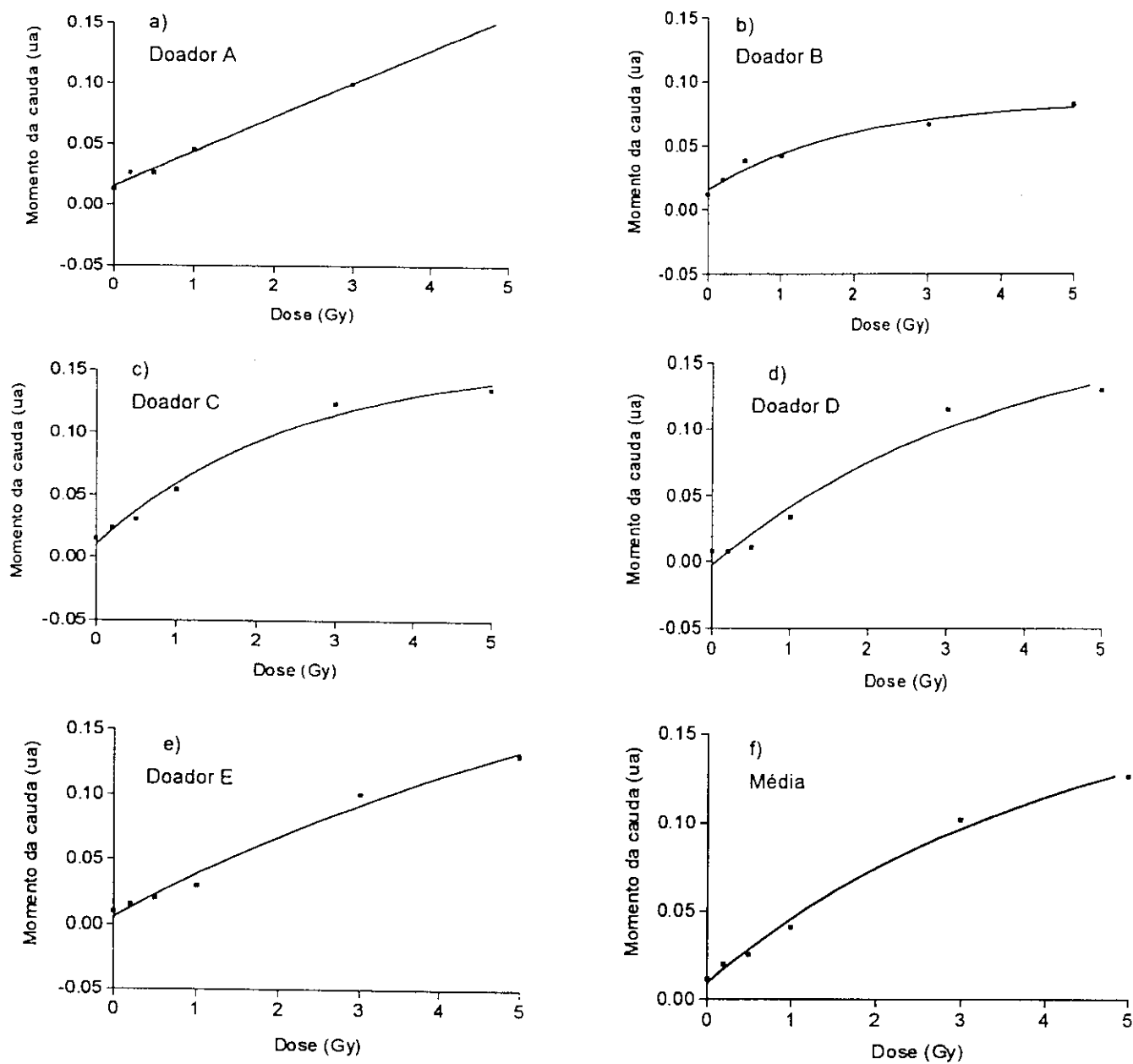


Figura 9. Curvas dose-resposta individuais (a – e) e média (f) ajustadas para momento da cauda obtidas de amostras sanguíneas de doadoras A, B, C, D e E, irradiadas com ^{90}Sr .

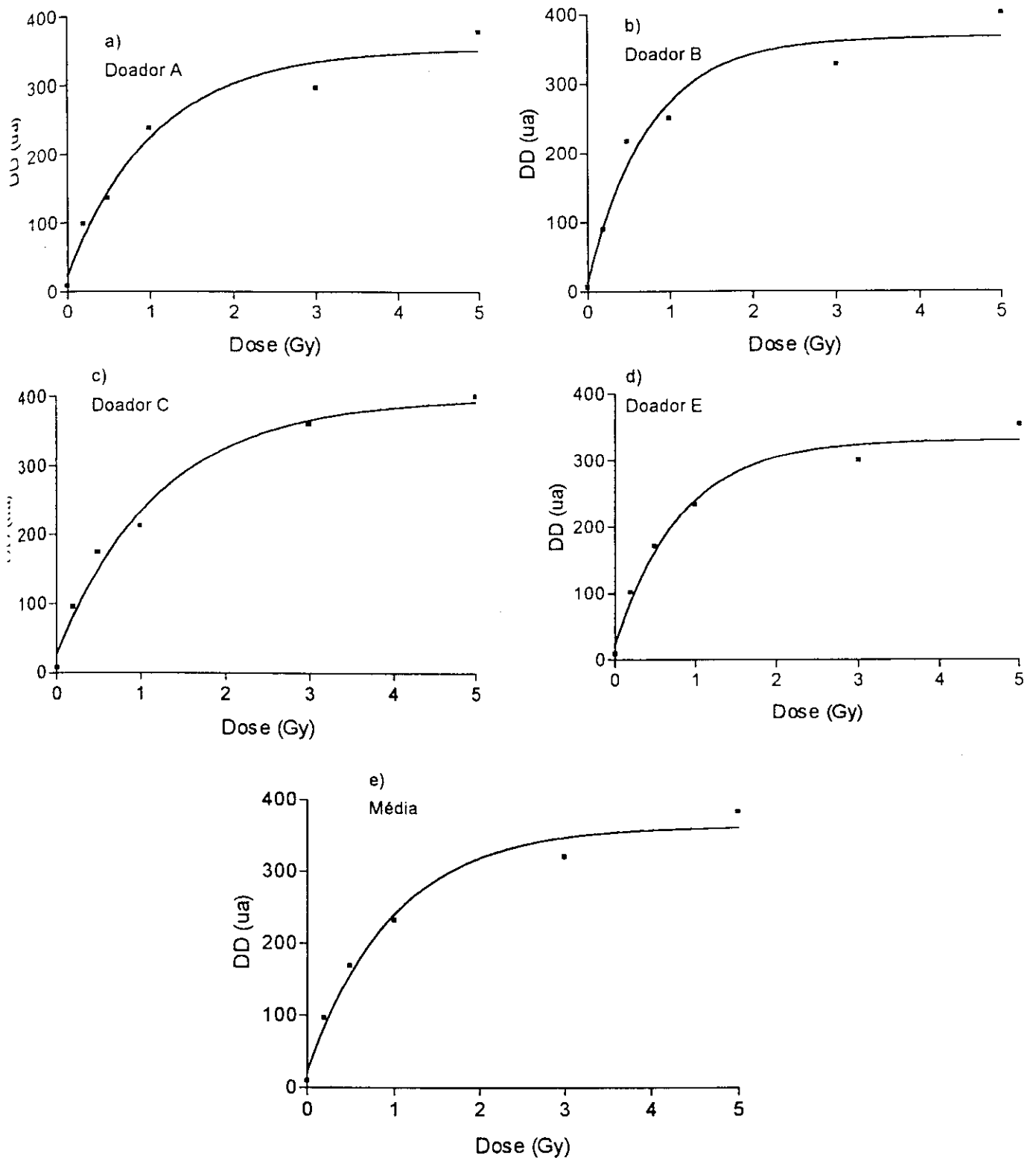


Figura 10. Curvas dose-resposta individuais (a – d) e média (e) para indução de dano ao DNA (DD) obtidas de amostras sanguíneas de doadoras A, B, C e E, irradiadas com ^{90}Sr .

5. DISCUSSÃO

A comparação dos efeitos de diferentes tipos de radiação em sistemas biológicos tem sido muito utilizada para um melhor conhecimento do seu potencial mutagênico ou carcinogênico em casos de exposição acidental ou ocupacional à radiação. Assim, os efeitos biológicos da radiação podem ser analisados empregando-se diferentes metodologias para a comparação de vários parâmetros.

O objetivo desse trabalho foi o de avaliar o dano causado em células, mais especificamente ao DNA, pela irradiação *in vitro* de amostras sanguíneas de indivíduos sadios, utilizando radiação beta de ^{90}Sr . Para tanto, foram aplicadas duas metodologias: a técnica citogenética de aberrações cromossômicas e o teste do cometa.

A análise de células sanguíneas irradiadas com ^{90}Sr mostrou vários tipos de aberrações cromossômicas estruturais, entre os quais dicêntricos, anéis, fragmentos acêntricos e *double minute*. Os mesmos tipos de aberrações cromossômicas foram encontrados também com outros tipos de radiações, por exemplo, raios X (VULPIS, 1984), gama (KOKSAL *et al.*, 1995), nêutrons (EDWARDS *et al.*, 1990) e alfa (DUFRAIN *et al.*, 1979), o que corrobora a observação de que os efeitos de diferentes tipos de radiação são qualitativamente similares em nível cromossômico.

No entanto, a frequência de aberrações cromossômicas induzidas depende de vários fatores: do tipo de radiação, da dose, da taxa de dose, da temperatura e da concentração de oxigênio (LLOYD & EDWARDS, 1983).

Os tipos de aberrações estruturais mais frequentemente encontrados foram os fragmentos acêntricos, seguidos pelos *double minute* e dicêntricos.

Uma relação quantitativa entre a frequência desses tipos de aberrações cromossômicas e a dose de radiação foi avaliada usando o modelo linear-quadrático ($Y = \alpha D + \beta D^2$), função que melhor se ajustou aos dados obtidos.

A representação física dessa função é a indução de algumas aberrações por uma única trajetória ionizante (componente linear α) e outras, pela interação de duas trajetórias independentes (componente quadrático β). Em outras palavras, o termo linear representa dano causado por uma simples trajetória ionizante que pode induzir uma ou duas quebras cromossômicas. O termo αD independe da taxa de dose e corresponde à faixa de doses mais baixas da curva dose-resposta, enquanto que o termo quadrático βD^2 depende da taxa de dose e equivale ao intervalo de doses mais altas. Assim, a razão α / β de dois coeficientes é igual à dose na qual os componentes linear e quadrático contribuem igualmente na indução de dano ou na formação de aberrações cromossômicas (LLOYD *et al.*, 1975).

Os dicêntricos são considerados como os melhores indicadores de dano por radiação em virtude da sua facilidade de identificação e baixa

freqüência espontânea. Os anéis cêntricos, por sua vez não são freqüentemente induzidos pela radiação em linfócitos humanos e sua freqüência gira em torno de 5-10% da taxa de dicêntricos (BAUCHINGER, 1995).

Os dicêntricos requerem duas lesões para a sua formação e podem ser produzidos por uma ou duas trajetórias ionizantes independentes. O coeficiente α / β obtido para o dicêntrico foi 0,65 Gy, o que significa que, doses abaixo desse valor na curva dose-resposta estão relacionadas com dicêntricos produzidos predominantemente por um único evento ionizante que induz duas quebras e, acima dessa dose, com dicêntricos produzidos por dois eventos ionizantes independentes.

Os fragmentos acêntricos são também encontrados freqüentemente em células irradiadas tanto pelos raios X, gama ou beta. No entanto, tem sido dada menos ênfase ao estudo quantitativo como indicadores de dano por radiação em virtude da incerteza sobre a sua formação, menos prontamente identificados, além de apresentarem uma incidência espontânea relativamente alta devido aos efeitos que confundem com outros mutagênicos que não sejam radiações (EVANS, 1970).

Muitos autores têm agrupado como fragmentos acêntricos todo o conjunto de aberrações decorrentes de deleção terminal, deleção intersticial (*double minute*) e anéis acêntricos (aberrações acêntricas) (BREWEN & LUIPPOLD, 1971; LLOYD *et al.*, 1973, 1975; SCHMID & BAUCHINGER, 1980; WAGNER *et al.*, 1983).

No presente trabalho, todavia, estas aberrações acêntricas foram analisadas de duas maneiras: separadamente e agrupadas em fragmentos acêntricos mais *double minute*.

Para tanto, foram utilizados dois modelos para o ajuste das curvas: modelo linear (para fragmentos acêntricos) e o modelo linear-quadrático (para *double minute*, fragmentos acêntricos, *double minute* mais fragmentos acêntricos) que se ajustaram adequadamente aos dados obtidos.

Conforme apresentados na Tabela III, os valores dos coeficientes α / β obtidos para fragmentos acêntricos (1 Gy), *double minute* (21 Gy) e fragmentos acêntricos mais *double minute* (1 Gy) foram mais altos que o obtido para dicêntricos (0,65 Gy), o que sugere que as aberrações acêntricas provocadas por uma trajetória ionizante predominam nas doses mais altas em relação aos dicêntricos. Isto provavelmente reflete a proporção apreciável de fragmentos acêntricos induzidos por uma simples trajetória de radiação ou resultantes de deleções terminais, induzidas por um único evento ionizante que produz uma quebra associado ao termo linear αD .

A técnica convencional de coloração com Giemsa não permite a detecção do processo de formação de fragmentos acêntricos: o acêntrico pode ser oriundo, além da deleção terminal envolvendo somente uma quebra, de rearranjo intracromossômico entre dois braços diferentes ("interarm exchange") ou no mesmo braço cromossômico (*intra-arm exchange*), envolvendo duas quebras (HAHNFELDT *et al.*, 1995). Todavia,

BAUCHINGER & GOTZ (1979), utilizando bandamento G em linfócitos irradiados com raios X, observaram que muitos fragmentos acêntricos são originários de deleções terminais.

Entre todos os tipos de aberrações analisados, o *double minute* apresentou o coeficiente α mais alto ($3,545 \pm 1,420$), porém coeficiente β mais baixo ($0,166 \pm 0,281$).

O *double minute* é resultante de duas quebras ocorridas no mesmo braço de um cromossomo (deleção intersticial). O predomínio de *double minute* induzido por uma simples trajetória ionizante se estende para doses mais altas ($\alpha / \beta = 21\text{Gy}$). Isto pode ser decorrente de uma fração significativa de *double minute* que são aberrações cromossômicas de um simples "hit" e assim, associado ao termo αD . É possível que as duas quebras muito próximas no mesmo braço cromossômico sejam resultantes de uma única trajetória de elétrons, se levar em consideração a estrutura altamente enovelada e compacta do cromossomo em células de eucarioto.

Os dicêntricos "a priori" são aberrações intercromossômicas enquanto que os acêntricos e *double minute*, intracromossômicas, e provavelmente esses ocorrem mais freqüentemente que os processos envolvendo mais de um cromossomo. Nesse caso, as diferentes distâncias de interação entre as quebras primárias também podem ser responsáveis para a formação de dicêntricos (SCHMID & BAUCHINGER, 1980).

Estes dados permitem supor que nas doses baixas, onde a freqüência de aberrações está relacionada predominantemente com o termo linear (αD),

a probabilidade de lesões produzidas independentemente pela radiação de se combinarem e de formarem um dicêntrico é reduzida ; as lesões se não são reparadas podem resultar em aberrações acêntricas.

Assim sendo, as freqüências de aberrações cromossômicas, como dicêntricos, *double minute* e fragmentos acêntricos, podem mudar com o intervalo de dose na curva dose-resposta (LLOYD *et al.*, 1975).

Com base nessas informações, pode-se dizer que a radiação beta de ^{90}Sr nas nossas condições de irradiação foi mais eficiente na indução de uma ou de duas lesões por um simples evento ionizante na formação de aberrações cromossômicas.

TANAKA *et al.*(1994) discriminaram as aberrações acêntricas em *double minute* e em fragmentos acêntricos para o estudo da eficácia biológica relativa e do efeito da taxa de dose da radiação beta de água triciada (HTO) em linfócitos e em células da medula óssea humana. Os autores encontraram uma freqüência mais alta de *double minute* induzido pela partícula beta de ^3H em relação ao acêntrico e que a freqüência de ambos os tipos de aberrações foram mais altos do que os encontrados no presente trabalho na faixa de doses equivalentes. Essa diferença pode ser explicada pelas diferentes condições de exposição das amostras sangüíneas. A água triciada em contato direto com as amostras provavelmente induziu mais danos às células, enquanto que, no presente trabalho, a irradiação com partículas beta foi feita a alguns milímetros das amostras.

Os dados obtidos sobre a frequência de aberrações acêntricas pela radiação beta do ^{90}Sr do presente trabalho foram comparados com os reportados na literatura com raios X e gama de ^{60}Co (Tabela V). De modo geral, os coeficientes α do modelo linear-quadrático para raios X foram mais altos que os apresentados para gama de ^{60}Co que se mostraram similares com os do presente trabalho. Isso significa uma maior eficiência dos raios X na indução de aberrações acêntricas nas doses mais baixas.

Comparando os dados referentes à indução de dicêntricos obtidos com alguns dados da literatura (Tabela IV), levando-se em consideração taxas de dose e condições similares de cultivo, observou-se que os coeficientes α e β foram mais baixos em relação àqueles encontrados para radiação gama de ^{137}Cs , ^{60}Co e ^{192}Ir (DA SILVA, 1997; TAKAHASHI *et al.*, 1982, RAMALHO *et al.*, 1988; LITTLEFIELD *et al.*, 1980; DUFRAIN *et al.*, 1980).

Do mesmo modo, comparando os resultados obtidos no presente trabalho com os de VULPIS & SCARPA (1986) sobre a eficiência da partícula beta de ^{90}Sr na indução de dicêntrico foi possível verificar que os coeficientes α e β encontrados por estes autores foram mais altos. Essa diferença encontrada com ^{90}Sr pode ser explicada pelas diferentes condições de irradiação adotadas nos dois trabalhos. VULPIS & SCARPA (1986) irradiaram as amostras sangüíneas utilizando uma fonte de radioestrôncio em contato direto com a amostra. Já no presente trabalho foi empregada uma irradiação externa.

Igualmente, os dados apresentados por VULPIS (1984) e por TANAKA *et al.* (1994) com a radiação beta de ^3H foram mais altos que os encontrados no presente trabalho. Essas diferenças podem também ser atribuídas às condições de irradiação das amostras, o que pode ter influenciado nos resultados.

Quando se compararam as curvas obtidas de ^{90}Sr com as de raios X (LLOYD *et al.*, 1984; VULPIS, 1984), esses apresentaram valores mais altos (coeficientes α e β) em relação aos obtidos no presente trabalho. Os raios X foram mais eficazes que as partículas beta de ^{90}Sr quando se empregaram condições similares de exposição, ocorrendo o processo inverso quando se comparou os dados de VULPIS & SCARPA (1986), onde a fonte foi introduzida diretamente na amostra sangüínea. Resultados similares foram obtidos por Hall & Wells (1988) e por Mill *et al.* (1996) que analisaram a indução de micronúcleo pela radiação beta de ^{90}Sr (1-1,6 Gy/min) na faixa de dose de 0,3 a 3Gy em linfócitos humanos. Os autores verificaram que a irradiação externa com partículas beta foi menos efetiva que os raios X (0,5 – 2Gy/min) na indução de micronúcleos.

Além das condições distintas de irradiações, as diferenças entre os raios X e beta de ^{90}Sr podem ser decorrentes de diferenças no espectro de LET entre estes dois tipos de radiações: os raios X foram mais eficientes na produção de duas lesões tanto por uma como por duas trajetórias ionizantes do que os elétrons produzidos pelo ^{90}Sr (EDWARDS, 1997).

A interpretação sobre a relação dose-resposta para a indução de aberrações cromossômicas por diferentes tipos de radiação ionizante é difícil em virtude da complexidade de fatores envolvidos. Uma quantidade significativa de trabalhos publicados sobre a indução de dicêntricos por raios X, gama ou nêutrons em linfócitos humanos mostraram que há consideráveis variações interlaboratoriais. Alguns fatores têm sido apontados para estas diferenças como variabilidade dos doadores, diferença no modelo experimental, métodos de cultivo celular e técnicas de ajuste das curvas (LLOYD & EDWARDS, 1983).

No entanto, com base nos dados apresentados na Tabela IV, pode-se dizer, de uma forma geral, que as partículas beta de ^{90}Sr foram menos eficientes na indução de dicêntricos que a radiação gama de ^{60}Co , ^{137}Cs e ^{192}Ir e raios X, quando se emprega uma fonte externa de irradiação. Quanto à indução de aberrações acêntricas, o efeito do ^{90}Sr foi similar ao de ^{60}Co .

As curvas dose-resposta para radiação beta são particularmente importantes no biomonitoramento de pacientes submetidos à terapia com radiofármacos como $^{153}\text{Sm-EDTMP}$, $^{131}\text{I-BDP3}$ e outros emissores beta (SINGH *et al.*, 1989). São de grande valia também em casos de exposição acidental ou ocupacional, pois permitem uma inferência para o risco genético. O ^{90}Sr é gerado no reprocessamento de combustíveis nucleares e, quando ingerido ou inalado, deposita-se em grande parte na medula óssea, causando ionizações em células sanguíneas.

Os dados mostraram também que não houve diferença digna de nota quanto ao número de centrômeros, bem como quanto à frequência de células

na primeira ou na segunda divisão mitótica após a exposição com várias doses de radiação. Estas observações sugerem que a radiação beta não influenciou o número modal de cromossomos em células irradiadas bem como na cinética do ciclo celular no intervalo de dose analisado.

Quanto ao número de células analisadas, observou-se uma queda no número de metáfases disponíveis nas doses mais altas, inclusive impossibilitando a análise da amostra da doadora E , irradiada com 5 Gy. Uma das possíveis explicações poderia estar relacionada com a morte seletiva de células afetadas pela radiação.

As aberrações encontradas em células irradiadas são muito danificantes e, dessa maneira, elas podem, muitas vezes, levar à morte celular e, portanto, são seletivamente eliminadas da população celular.

No entanto, certas translocações recíprocas e inversões que são tipos de aberrações estáveis, que permanecem viáveis por várias gerações celulares, podem apresentar grandes implicações na gênese de neoplasias humanas (ALBERTS *et al.*, 1994), como por exemplo, a leucemia mielóide crônica e o linfoma de Burkitt . Além disso, muitas células tumorais são cromossomicamente instáveis, apresentando vários tipos de aberrações cromossômicas tanto numéricas como estruturais (YUNIS, 1983).

Vários autores demonstraram que a frequência de translocações recíprocas é similar a de dicêntricos (LUCAS *et al.*, 1996). Em outras palavras, as translocações recíprocas são tipos de dicêntricos estáveis e similarmente, as inversões pericêntricas , de anéis cêntricos (EDWARDS *et al.*,

1989). Embora os tipos estáveis sejam mais difíceis de serem detectados pela coloração convencional, tecnicamente, eles são induzidos pela radiação na proporção de 1:1 com tipos instáveis em linfócitos humanos. Assim, há uma proporcionalidade direta entre formação de aberrações instáveis e câncer.

Quanto à técnica de eletroforese de microgel, uma análise do aspecto morfológico dos cometas obtidos após a irradiação de células sanguíneas com ^{90}Sr mostrou um padrão muito similar ao obtido com a irradiação gama de ^{60}Co (NASCIMENTO, 2000). As caudas dos cometas resultantes da irradiação com ^{90}Sr mostraram uma melhor definição e uma maior intensidade de fluorescência, o que pode ser atribuído a uma fixação prévia das lâminas, antes da coloração com brometo de etídio. Esses resultados corroboram os reportados por Woods *et al.* (1999).

Os dados obtidos mostraram um aumento concomitante na migração do DNA com o aumento da dose de radiação, avaliado tanto pelo analisador de imagem (momento da cauda) como pela classificação visual (DD).

Os valores basais com menos de 10% de células danificadas da categoria 1, isto é, células com pouco dano, mostraram que as amostras sanguíneas foram processadas adequadamente sem a introdução de danos adicionais ao DNA, provenientes de problemas técnicos.

As duas técnicas aqui empregadas mostraram-se bastante sensíveis e reprodutíveis e podem ser utilizadas como ferramentas valiosas para uma melhor compreensão dos fenômenos radiobiológicos em nível celular : a

técnica de aberrações cromossômicas detecta lesões não reparadas do DNA, particularmente as quebras nas fitas duplas, enquanto que a técnica do cometa permite avaliar quantitativamente as lesões ocorridas imediatamente após as exposições em células individuais, como quebras simples e duplas do DNA e sítios álcali-lábeis. Todas essas lesões representam tipos importantes de danos causados ao material genético e estão relacionados com vários efeitos de grande significado biológico.

Nesse sentido, pode-se afirmar que as duas técnicas são complementares: a técnica de aberrações nos fornece a riqueza de informações e a técnica do cometa, por sua simplicidade e rapidez é muito adequado para fins de "screening".

6. CONCLUSÕES

Os dados obtidos sobre a análise qualitativa e quantitativa do efeito da radiação beta de ^{90}Sr (0,2Gy/min) em células sanguíneas de 5 doadoras sadias, irradiadas *in vitro* com doses de 0,2 a 5Gy, utilizando a técnica de aberrações cromossômicas e o ensaio do Cometa, permitiram concluir que:

- os tipos de aberrações cromossômicas mais freqüentemente encontradas foram os fragmentos acêntricos seguidos pelos *double minute* e dicêntricos;
- a radiação beta de ^{90}Sr foi mais eficiente na indução de lesões por um único evento ionizante que por dois eventos ionizantes independentes na formação de aberrações cromossômicas;
- a radiação beta de ^{90}Sr foi menos eficiente na produção de dicêntricos que os raios X e a radiação gama de ^{60}Co , ^{137}Cs , ^{192}Ir , nas condições de irradiação adotadas;
- a eficiência da radiação de ^{90}Sr foi similar à de radiação gama de ^{60}Co na indução de aberrações acêntricas;
- a radiação beta de ^{90}Sr não influenciou no número modal de cromossomos em células irradiadas, bem como na cinética do ciclo celular;

- houve um aumento na migração do DNA em função da dose de radiação beta, avaliado tanto pelo analisador de imagem (momento da cauda), como pela classificação visual (dano ao DNA);
- as duas técnicas empregadas (citogenética e bioquímica) mostraram-se sensíveis e complementares na avaliação do efeito biológico da partícula beta de ^{90}Sr em células humanas.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; BRAY,D., LEWIS,J.; RAFF,M.; ROBERTS,K.; WATSON, J.D.
Cancer in: Molecular Biology of the Cell. **Gerland Publishing**, p.1255-1294, 1994.
- ALLEN, B. J.; BLAGOYEVIC, N. Alpha and beta emitting radiolanthanides in target cancer therapy: the potential role of terbium-147. **Nucl. Med. Communications**, v. 17, p. 40-47, 1996.
- ANDERSON,D.; YU, T.W.; PHILLIPS,B.J.; SCHMEZER,P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the Comet assay. **Mutat. Res.**, v. 307,p.261-271,1994.
- BARQUINERO, J. F.; BARRIOS, L.; CABALLIN, M. R.; MIRÓ, R.; RIBAS, M.; EGOZUE, J. Biological dosimetry in simulated in vitro partial irradiations. **Int. J. Radiat. Biol.**, v. 71,n.4, p. 435-440, 1997.
- BARQUINERO, J. F.; BARRIOS, L.; CALLABIN, M. R.; MIRÓ, R.; RIBAS, M.; SUBIAS, A.; EGOZCUE, J. Establishment and validation of a dose-effect curve for γ rays by cytogenetics analysis. **Mutat. Res.**, v. 326,p. 65-69, 1995.
- BAUCHINGER, M. Cytogenetic effects in human lymphocytes as a dosimetry system. In: Biological Dosimetry. W.G. Eisert; M. L. Mendelsohn (Ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 15-24, 1984.
- BAUCHINGER,M. Quantification of low-level radiation exposure by conventional chromosome aberration analysis. **Mutat.Res.**,v. 339, p.177-189,1995.

- BAUCHINGER, M.; GÖTZ, G. Distribution of radiation induced lesions in human chromosome and dose effect relation analysed with G-banding. *Rad. and Environm. Biophys.*, v. 16, p.355-366, 1979.
- BAUCHINGER, M.; SCHMID, E. LET dependence of radiation-induced intra- and interchromosomal aberrations in human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.*, v.74, n. 1, p.17-25, 1998.
- BENDER, M. A.; GOOCH, P. C. Types and rates of X-ray - induced chromosomae aberrations in human blood irradiated in vitro. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v. 48, p. 522-532, 1962.
- BENO, M. Cytogenetic effects of tritium incorporated into DNA of human lymphocytes. *J. Radiat. Nuc. Chem.*, v.209, p. 341-349, 1996.
- BOCIAN, E. B.; ZIEMBA-ZAK, ROSIEK, O .; SABLINSKI, J. Chromosome aberrations in human lymphocytes exposed to tritiated water in vitro. *Curr. Top. Radiat. Res.*, Q 12, p. 168-181, 1977.
- BÖCKER, W.; BAUCH, T.; MÜLLER, W.U.; STRUFFER, C. Image analysis of comet assay measurements. *Int. J. Radiat. Biol.*, v.72, p.449-460, 1997.
- BRASELMANN, H.; BAUCHINGER, M.; SCHIMID, E. Cell survival and radiation induced chromosome aberrations. I. Derivation of formulate for determination of transmission and survival parameters of aberrations. *Radiat. Environ. Biophys.*, v.25, p.243-251, 1986.
- BREWEN, J. G.; LUIPPOLD, H. E. Radiation-induced human chromosome aberrations: in vitro dose rate studies. *Mutat. Res.*, v.12, p. 305-314, 1971.
- BUCKTON, K. E.; EVANS, H. J. Methods for the analysis of human chromosome aberrations. World Health Organization, Genebra, 1973.

- CARRANO, A.V.; NATARAJAN,A.T. Considerations for populations monitoring using cytogenetic techniques. In: International Commission for protection against environmental mutagens and carcinogens. ICPEMC pub.14,p.1-28,1987.
- CASARETT, A. P. Radiation Biology. Prentice Hall, 1968.
- COLLINS,A.R.; DOBSON,V.L.; DUSINSKA,M.; KENNEDY,G.; STETINA,R. The comet assay: what it really can tell us? *Mutat.Res.*v. 375,p.183-193,1997.
- DA SILVA, M. A.; NASCIMENTO, P. A.; OLIVEIRA, E. M.; SUZUKI, M. F.; ROGERO, J. R.; GUIMARÃES, M.I.C.C.; BUCHPIGUEL, C. A.; OKAZAKI, K. Análise de aberrações cromossômicas induzidas pelo ^{153}Sm -EDTMP em pacientes com metástase óssea. Anais do 44º Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia - SP, 09 a 12 de setembro de 1998, Sociedade Brasileira de Genética, Genet. Mol. Biol., v. 21(3) Suppl., p. 129, 1998.
- DA SILVA, M.A. *Dosimetria biológica em proteção radiológica: elaboração de curvas dose-resposta para ^{60}Co e ^{137}Cs* . São Paulo, 1997. Dissertação (Mestrado)- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.
- DUFRAIN, R. J.; LITTLEFIELD, L. G.; JOINER, E. E.; FROME, E. L. Human cytogenetic dosimetry: a dose-response relationship for alpha particle radiation from ^{241}Am . *Health Phys.*, v. 37, p. 279-289, 1979.

- DUFRAIN, 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**. Amstrdan, Elsevier North-Holland, p.357-374, 1980.
- EDWARDS, A. A.; LLOYD, D.C.; PROSSER, J.S. Chromosome aberrations in human lymphocytes – A radiobiological review. L.H. Gray Conference. Oxford, p.423-432, 1989.
- EDWARDS, A. A.; LLOYD, D.C.; PROSSER, J.S. The induction of chromosome aberrations in human lymphocytes by 24KeV neutron. *Radiat. Prot. Dosim.* v31, p.265-268, 1990
- EDWARDS, A.A. The use of chromosomal aberrations in human lymphocytes for biological dosimetry. *Radiat. Res.*, v.148, p. 39-44, 1997.
- 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.; O'RIORDAN, M. L. Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. *Mutat. Res.*, v.53, p.135-148, 1975.
- EVANS, H.J. Population cytogenetics and environmental factors. In JACOBS, P.A.; PRICE, W.H.; LAW, P. (eds): "Human Population Cytogenetics". Edinburgh University Press, p.192, 1970.
- FAIRBAIRN, D.W.; OLIVE, P.L.; O'NEILL, K.L. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.*, v.339, p.37-59, 1995.

FENECH, M.; MORLEY, A.A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res.*, v. 147, p.29-36, 1985.

GREINERT, R.; DETZLER, E.; VOLKMER, B.; HARDER, D. Kinetics of the formation of chromosome aberrations in X irradiated human lymphocytes: analysis by premature chromosome condensation with delayed fusion. *Radiat. Res.*, v. 144, p. 190-197, 1995.

GUTIERREZ, S.; CARBONELL, E.; GALOFRÉ, P.; CREUS, A.; MARCOS, R. Micronuclei induction by ¹³¹I exposure: study in hyperthyroidism patients. *Mutat. Res.*, v. 373, p. 39-45, 1997.

HAHNFELDT, P.; HLATKY, L.R.; BRENNER, D.J.; SACHS, R.K. Chromosome aberration produced by radiation: the relationship between acentric fragments and dicentrics. *Radiat. Res.*, v. 141, p. 136-152, 1995.

HALL, E. J.; VARMA, M. Na integrated model for radiation induced cancer. *Radiat. Prot. Dosimetry*, v. 52, p. 477-483, 1994.

HALL, S. C.; WELLS, J. Micronuclei in human lymphocytes as a biological dosimeter: preliminary data following beta irradiation in vitro. *J. Radiol. Prot.*, v. 8, p. 97-102, 1988.

HARLEY, J. H.; SCHMIDT, G. D.; SILINI, G. Radionuclides in the food chain. Springer-Verlag, 1988.

HARRIS, C.C. Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990's. *Cancer Res.*, v. 51 (Suppl.), p. 5023s-5044s, 1991.

HUBER, R.; SCHRAUBE, H.; NAHRSTEDT, U.; BRASELMANN, H.; BAUCHINGE R, M. Dose-response relationships of micronuclei in human lymphocytes induced by fission neutrons and by low LET radiations. *Mutat. Res.*, v. 306, p. 135-141, 1994.

IAEA - INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Biological dosimetry: chromosomal aberrations analysis for dose assessment. In: Technical Report Series N° 260, Vienna, 1986.

ICRP - INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION. Evaluation of Radiation Doses to Body Tissues from International Contamination Due to occupational Exposures. ICRP Publication N° 10. Pergamon, 1968.

JALOSZYNSKI, P.; KUJAWSKI, M.; CZUB-SWIERCZECK, M.; MARKOWSKA, J.; SZYFTER, K. Bleomycin-induced DNA damage and its removal in lymphocytes of breast cancer by comet assay. *Mutat. Res.*, v. 385, p. 223-233, 1997.

KÖKSAL, G.; PALA, F. S.; DALCI, D. O. In vitro dose-response curve for chromosome aberrations induced in human lymphocytes by ^{60}Co γ -radiation. *Mutat. Res.*, v. 329, p. 57-61, 1995.

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

LEWINGTON, V. J. Cancer therapy using bone-seeking isotopes. *Phys. Med. Biol.*, v. 41, p. 2027-2042, 1996.

LEWINGTON, V. J. Targeted radionuclide therapy for bone metastases. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 20, p. 66-74, 1993.

- LINDHONM,C.;LUOMAHAARA,S.;KOIVISTOINEN,A.;ILUST,T.;EDWARDS, A.; SALOMA,S. Comparison of dose-response curves for chromosomal aberrations established by chromosome painting and conventional analysis. *Int.J. Radiat. Biol.*,v.74 ,n.1,p.27-34,1998.
- LITTLEFIELD,L.G.; JOINER, E.E.; DuFrain, R.J.; HÜBNER, K.F;BECK,W.L. Cytogenetic dose estimates from *in vitro* samples from persons involved in real or suspected radiation exposures. In: HÜBNER,K.F.; FRY,S.A. (eds). **The medical basis for radiation accidents preparedness**. Amstrdan, Elsevier North-Holland,p.375-390,1980.
- 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 ^{60}Co accident. In: Medical Management of radiation accidents. Boca Raton, CRC Press, p. 109-126, 1990.
- 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,p. 23-49, 1983.
- LLOYD, D. C.; EDWARDS, A. A.; FITZSIMONS, E. J.; EVANS, C. D.; RAILTON, R.; JEFFREY, P.; WILLIAMS, T. G.; WHITE, A. D.; IKEYA, M.; SUMITOMO, H. Death of a classified worker probably caused by overexposure to gamma radiation. *Occup. Environ. Med.*, v. 51,n.10, p. 713-718, 1994.
- LLOYD, D. C.; EDWARDS, A. A.; PROSSER,J.S.;CORP,M.J. The dose response relationship obtained at constant irradiation times for the induction of chromosome aberrations in human lymphocytes by ^{60}Co gamma rays.*Radiat. Environ. Biophys.*,v.23, p.179-189,1984.

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.; LÉONARD, A.; DEKNUDT, Gh.; 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, p. 49-55, 1988.

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.; 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.; PURROT, 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.; PURROT, R.J.; DOLPHIN, G.W. Chromosome aberrations dosimetry using human lymphocytes in simulated partial body irradiation. *Phys. Med. Biol.*, v. 18, n.3, p. 421-431, 1973.

- LLOYD, D. C.; PURROT, R. J.; DOLPHIN, G. W.; BOLTON, D.; EDWARDS, A. A.; CORP, M. J. The relationship between chromosome aberrations and low LET radiation dose to human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 28, n. 1, p. 75-90, 1975.
- LUCAS, J. N.; POGGENSEE, M.; STRAUME, T. The persistence of chromosome translocations in a radiation worker accidentally exposed to tritium. *Cytog. Cell Genet.*, v. 60, p. 255-256, 1992.
- LUCAS, J. N.; CHEN, A. M.; SACHS, R. K. Theoretical predictions on the quality of radiation-produced dicentrics and translocations detected by chromosome painting. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 69, n. 2, p. 145-153, 1996.
- MATSUOKA, A.; TUCKER, J. D.; HAYASHI, M.; YAMAZAKI, N.; SOFUNI, T. Chromosome painting analysis of X-ray-induced aberrations in human lymphocytes in vitro. *Mutagenesis*, v. 9, n. 2, p. 151-155, 1994.
- McKELVEY-MARTIN, V. J.; GREEN, M. H. L.; SCHMEZER, P.; POOLZOBEL, B. L.; DE MÉO, M. P.; COLLINS, A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutat. Res.*, v. 288, p. 47-63, 1993.
- MENDIOLLA-CRUZ, M. T.; MORALEZ-RAMIREZ, P. Repair kinetics of gamma-ray induced DNA damage determined by single cell gel electrophoresis assay in murine leukocytes *in vivo*. *Mutat. Res.*, v. 433, p. 45-52, 1999.
- MILL, A. J.; WELLS, J.; HALL, S. C.; BUTLLER, A. Micronucleus induction in human lymphocytes: comparative effects of X rays, alpha particles, beta particles and neutrons and implication for biological dosimetry. *Radiat. Res.*, v. 145, p. 575-585, 1996.

- 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.
- MOURA, A. M.S.; DOTTAVIANO, E.J.; PINTO Jr., W. Estudo das aberrações cromossômicas como indicadores de dose de radiações ionizantes. *Radiol. Bras.*, v. 19, p.214-221, 1986.
- MÜLLER, J.; KLENER, V.; TUSCANY, R.; THOMAS, J.; BREZICOVA, D.; HOUSKOVA, M. Study of internal contamination with strontium-90 and radium-226 in man in relation to chemical findings, *Health Physics*, v.12, p.993-1006, 1966.
- 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.; OBE, G. Radiation-Induced Chromosomal Damage in Man, p.127-140, 1983.
- NCRP - NATIONAL COUNCIL ON RADIATION PROTECTION AND MEASUREMENTS. Management of Persons Accidentally contaminated with Radionuclides. NCRP Publication Nº 65, 1980.
- OKAZAKI, K. Efeitos da radiação ionizante em células. Noções básicas. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Publicação 399, São Paulo, 1995.
- OLIVE, P. L. Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. *Radiat. Res.*, v. 117, p.79-92, 1989.

- ÖSTLING, O .; JOHANSON, K. L. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.123,p. 291-298, 1984.
- PINKEL,D.; STRAUME,T. GRAY,J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Nat. Aca. Sci. (USA)*, v. 83, p. 2934-2938, 1986.
- PROSSER, J. S.; LLOYD, D. C.; EDWARDS, A. A .; STATHER, J. W. The induction of chromosome aberrations in human lymphocytes by exposure to tritiated water in vitro. *Radiat. Prot. Dosimetry*, v. 4, p. 21-26,1983.
- RAMALHO, A.T.; NASCIMENTO, A.C.H.; NATARAJAN,A.T. Dose assesments by cytogenetic analysis in the Goiania (Brazil) radiation accident. *Radiat. Prot. Dosim.*, v. 25,n.2, p.97-100,1988.
- REGULLA,D.F. Importance of exposure to beta particles in practical radiation protection..*Radiat.Prot.Dos.*,v.14,n. 2,p.95-100,1986.
- SACHS,R.K.; BRENNER,D.J. Effect of LET on chromosomal aberration yeld. I- Do long-lived, exchange-prone double strand breaks play a role? *Int. J. Radiat. Biol.*, v.64,p.677-688,1993.
- SCHMID,E.; BAUCHINGER,M. Analysis of primary processes in the formation of acentric fragments. *Radiat. Environ. Biophys.* V.17, 143-149,1980.
- SHAPIRO, J. Radiation protection.3 ed., Harvard College, 1990.
- SIMMONS, J. A.; COHN, P.; MIN, T. Survival and yields of chromosome aberrations in hamster and human lung cells irradiated by alpha particles. *Radiat. Res.*,v.145,p. 174-180, 1996.

- SINGH, D.; N.P.; HOLMES, R. A.; FARHANGI, M.; VOLKERT, W. A.; WILLIAMS, A.; STRINGHAM, L. M.; KETRING, A. R. Human pharmacokinetics of Samarium-153 EDTMP in metastatic cancer. *J. Nucl. Med.*, v.30, p. 1814-1818, 1989.
- SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, v.175, p. 184-191, 1988.
- 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 relationship at low doses. *Mutat. Res.*, v.94, p. 115-123, 1982.
- TANAKA, K.; SAWADA, S.; KAMADA, N. Relative biological effectiveness and dose rate effect of tritiated water on chromosomes in human lymphocytes and bone marrow cells. *Mutat. Res.*, v. 323, p. 53-61, 1994.
- THOMPSON, M. W.; Mc INNES, R.R.; WILLARD, H. F. *Genética Médica*. 5ª ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 1991.
- TURNER, J.E. *Atoms, radiation and radiation protection*. McGraw Hill, 1992.
- TUSCANY, R.; MÜLLER, J. Chromosomal study of bone marrow and peripheral blood in persons carrying body burdens ^{226}Ra and ^{90}Sr , *Human Radiation Cytogenetics*, North-Holland, Amsterdam, 1967.
- UNSCEAR - UNITED NATIONS SCIENTIFIC COMMITTEE ON THE EFFECTS OF ATOMIC RADIATION. *Sources and Effects of Ionizing Radiation*, New York, 1977.

UNSCEAR - UNITED NATIONS SCIENTIFIC COMMITTEE ON THE EFFECTS OF ATOMIC RADIATION. Genetic and somatic effects of ionizing radiation: report to general assembly on the effects of atomic radiation, New York, 1986.

VIJAYALAXMI; STRAUSS,G.H.S.; TICE,R.R. An analysis of γ -ray-induced DNA damage in human blood leukocytes, lymphocytes and granulocytes. *Mutat. Res.*, v. 292, p. 123-128, 1993.

VIJAYALAXMI; TICE,R.R.; STRAUSS,G.H.S. Assessment of radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single-cell gel electrophoresis technique. *Mutat. Res.*, v.271, p. 243-252, 1992.

VISVARDIS, E.E.; TASSIOU,A.M.; PIPERAKIS,S.M. Study of DNA damage induction and repair capacity of fresh and cryopreserved lymphocytes exposed to H_2O_2 and γ -irradiation with alkaline comet assay. *Mutat. Res.*, v. 383, p. 71-80, 1997.

VOLF,V. Strontium-90 effects in man, Biomedical Implications of Radiostrontium Exposure, Proceedings of a Symposium, Davis, CA, 1971.

VULPIS, N. The induction of chromosome aberrations in human lymphocytes by in vitro irradiation with β particles from tritiated water. *Radiat. Res.*, v. 97, p. 511-518, 1984.

VULPIS, N.; SCARPA, G. Induction of chromosome aberrations by ^{90}Sr β particles in cultured human lymphocytes. *Mutat. Res.*, v.163, p. 277-283, 1986.

WAGNER,R.;SCHMID,E.;BAUCHINGER,M. Application of conventional and FPG staining for the analysis of chromosome aberrations induced by low levels of dose in human lymphocytes. *Mutat. Res.*, v.109, p.65-71, 1983.

WENGER,P.; BENGTTSSON,L.G.; DUDLEY,R.^a; GODFREY, B.E.; KARNIEWICZ,W., LINGER, V. NEWTON,D. Whole-body counting of persons containing ⁹⁰Sr and ²²⁶Ra: an interlaboratory comparison. *Health Physics*,v.14,p.209-222,1968.

WILKINS, B. T.; GREEN, N.; DODD, N. J.; SMITH, D.M. Concentrations of strontium-90 and caesium-137 in milk produced in the channel islands. *Radiat. Prot. Dosimetry*,v.8,p. 253-255, 1984.

WOJEWÓDZKA,M.;KRUSZEWSKI,M.;IWANEŃKO,T.;COLLINS,A.;SZUMIE,I Application of the comet assay for monitoring DNA damage in workers exposed to chronic low-dose irradiation. I. Strand breakage. *Mutat. Res.*,v.416, p.21-35, 1998.

WOODS,J.A., O'LEARY,K.A.; McCARTHY,R.P.;O'BRIEN,N.M. Preservation of comet assay slides: comparison with fresh slides. *Mutat.Res.*,v.429,p.181-187,1999.

WOOTTON, R. Radiation Protection of Patients. Cambridge University, 1993.

YUNIS,J.J. The chromosomal basis of human neoplasia. *Science*, v.221,p.227-236,1983.

ANEXO I



INFORMAÇÕES SOBRE O DOADOR

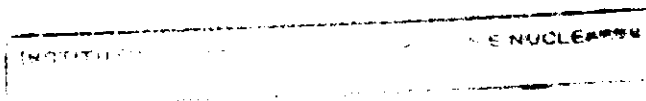
NOME:.....
IDADE:.....anos
PESO:.....kg
FUMANTE: () SIM () NÃO QUANTIDADE/DIA.....
FAZ USO DE ALGUM MEDICAMENTO: () SIM () NÃO

AUTORIZAÇÃO

Eu.....autorizo a coleta de amostras sanguíneas (5 mL) para estudos citogenéticos a serem realizados no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP) Departamento de Radiobiologia, cujos resultados serão utilizados na Dissertação de Mestrado de Elaine Mendes de Oliveira.

São Paulo,de.....de

assinatura.....





M22003



instituto de pesquisas energéticas e nucleares

Travessa "R", nº 400 - Cidade Universitária - Butantã

São Paulo - CEP. 05508-900

Tel.: (011) 3816-9000 - Fax. (011) 212-3546

<http://www.ipen.br>

O ipen é uma autarquia vinculada à Secretaria de Ciência, Tecnologia e Desenvolvimento Econômico do Estado de São Paulo, gerida técnica, administrativa e financeiramente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear e associada à Universidade de São Paulo para fins de ensino de Pós-Graduação.