

# ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS INSTÁVEIS EM LINFÓCITOS HUMANOS IRRADIADOS COM $^{60}\text{Co}$ .

Julyanne C. G. Mendonça<sup>1</sup>, Mariana E. Mendes<sup>1,2</sup>, Neide Santos<sup>2</sup>, Fabiana F. Lima<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Regional de Ciências Nucleares (CRCN-NE/CNEN-PE)  
Av. Professor Luiz Freire, 200  
50740-540 Recife, PE  
[july\\_cgm@hotmail.com](mailto:july_cgm@hotmail.com)  
[mendes\\_sb@hotmail.com](mailto:mendes_sb@hotmail.com)

<sup>2</sup>Departamento de Genética (CCB/UFPE)  
Av. Moraes Rego, 1235  
50670-901 Recife, PE  
[santos\\_neide@yahoo.com.br](mailto:santos_neide@yahoo.com.br)

## RESUMO

Em virtude da extensa utilização da radiação ionizante, seja na área industrial ou em tratamentos médicos, criou-se uma necessidade de desenvolver técnicas que proporcionassem informações quantitativas da dose absorvida pelo organismo, caso ocorresse uma exposição ocupacional ou acidental. Dentre estas técnicas, a dosimetria biológica mostrou-se uma ferramenta confiável, pois se baseia na análise convencional de alterações cromossômicas em sangue periférico humano, na qual pode ser utilizada em situações em que a dose absorvida de corpo inteiro é desconhecida ou incerta. O objetivo do presente estudo foi analisar as frequências das alterações cromossômicas instáveis induzidas por radiação gama proveniente de uma fonte de  $^{60}\text{Co}$  em duas diferentes doses. As amostras foram obtidas a partir de um doador saudável e expostas a fonte de  $^{60}\text{Co}$ (Gammacel 220) localizada no Departamento de Energia Nuclear (-DEN - UFPE -BRASIL) com uma taxa de Kerma no ar de 3,277 Gy/h. As exposições resultaram em doses absorvidas 0,51 Gy e 0,77 Gy. Metáfases mitóticas foram obtidas por cultura de linfócitos para análise cromossômica e as lâminas foram coradas com Giemsa a 5%. Dentre as alterações cromossômicas instáveis foram analisados os cromossomos dicêntricos, os cromossomos em anel e os fragmentos acêntricos. Para o cálculo do nível de significância foi utilizado o teste qui-quadrado, considerando diferenças relevantes entre as frequências quando o valor de  $p < 0,05$ . Os resultados mostraram que houve diferença significativa das frequências de cromossomos dicêntricos (de 0,18 à 0,51 Gy para 0,37 à 0,77 Gy), entretanto não houve diferença estatisticamente significativa entre as frequências dos fragmentos acêntricos (de 0,054 à 0,51 Gy para 0,063 à 0,77 Gy) e dos cromossomos em anel (de 0,001 à 0,51 Gy para 0,003 à 0,77 Gy). O número baixo de anéis encontrados é justificado, tendo em vista que em linfócitos humanos irradiados, sua aparição é considerada rara em relação aos dicêntricos. Os resultados confirmam que dicêntricos são os biomarcadores mais confiáveis na estimativa de dose após exposição à radiação gama. Esses dois pontos irão compor a curva de calibração dose-resposta que está sendo construída para o Laboratório de Dosimetria Biológica do CRCN-NE/CNEN.

## 1. INTRODUÇÃO

As radiações eletromagnéticas ionizantes são ondas de alta energia (raios X ou raios gama) que, ao interagirem com a matéria, desencadeiam uma série de ionizações, transferindo energia aos átomos e moléculas presentes no campo irradiado e

promovendo alterações físico-químicas intracelulares [1]. Estas alterações correspondem aos efeitos biológicos que ocorrem posteriormente a uma exposição e que decorrem em parte do alto poder de penetração deste tipo de radiação em relação às demais.

A resposta do organismo à agressão da radiação pode ocorrer em vários níveis estruturais onde as células encontradas em tecidos de alta atividade mitótica e, conseqüentemente, com alta taxa proliferativa possuem maior sensibilidade. Isso se confirma pelo fato de haver uma relação inversamente proporcional entre a radiosensibilidade e o grau de diferenciação celular. Vários são os parâmetros que podem estar alterados como consequência da interação entre o agente químico e o organismo, porém isso só é possível caso haja uma correlação de intensidade da exposição e /ou efeito biológico da substância.

Ao interagir com um sistema biológico, particularmente com o material genético, a radiação pode agir sobre a molécula de DNA de maneira direta e/ou indireta, através da ação de subprodutos da radiólise da água (radicais livres), levando a quebras simples ou duplas da fita do DNA. Para caracterizar a interação das radiações ionizantes com a matéria é utilizada a transferência linear de energia (LET), que é definida como “a quantidade de energia dissipada por unidade de comprimento da trajetória”[1]. Nas radiações de baixa LET, as alterações cromossômicas serão distribuídas aleatoriamente entre as células, seguindo a distribuição de Poisson [2]. Já nas radiações de alta LET, sabe-se que os danos gerados são caracterizados por apresentar efeitos biológicos relativos quantitativamente maiores.

As ocorrências de exposição acidental à radiação criaram a necessidade para o desenvolvimento de métodos que fornecessem uma avaliação quantitativa de dose e que essa informação pudesse ser obtida por meio de medida do dano da radiação no indivíduo exposto [3]. Decorrente desta necessidade, buscou-se, além de se estimar a dose absorvida em indivíduos expostos através da adoção de métodos físicos (dosimetria física), estimá-la por métodos biológicos (Dosimetria biológica) e dentre estes, o citogenético. Neste método, se utiliza as aberrações cromossômicas estruturais instáveis (dicêntricos e anéis cromossômicos) formadas nos linfócitos sanguíneos periféricos expostos à radiação ionizante, relacionando as frequências destas alterações radioinduzidas com a dose absorvida por meio de curvas de calibração dose-resposta [4].

O método dosimétrico depende do estabelecimento de uma relação entre a frequência (produto) de aberrações cromossômicas observadas na amostra dos linfócitos cultivados e a dose de radiação; e por meio desta curva de calibração será derivada a dose equivalente de corpo inteiro dos indivíduos envolvidos em acidentes [5].

Existem alguns requisitos básicos para que um sistema dosimétrico citogenético seja empregado, como o efeito escolhido para a estimativa de dose deve ser específico para a radiação ionizante, o mesmo deve ser detectável tão próximo quanto possível do “background” da radiação e apresentar boa resposta para uma série relevante de doses, a possibilidade de estimar a dose deve ser rápida, reprodutível e exibir uma relação dose – resposta que possa ser avaliada experimentalmente.

O conhecimento dos efeitos deletérios da radiação ionizante são de grande importância social no que diz respeito a questões como testes de triagem para o câncer, o futuro da energia nuclear, a exposição ocupacional à radiação, e até mesmo o terrorismo radiológico. A demonstração de um baixo nível de alterações cromossômicas, e consequentemente de uma baixa dose absorvida, pode auxiliar consideravelmente os médicos em tranquilizar e aconselhar as pessoas que invariavelmente têm seus medos de vir a desenvolver câncer exagerados..

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Dosimetria Biológica do Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste – CRCN-NE, e faz parte de um projeto aprovado pelo Comitê de Ética CCS da Universidade Federal de Pernambuco sob o número de CAAE 09186813.7.0000.5208 e do parecer consubstanciado 269.483.

### **2.1 Coleta de amostras e Irradiação das amostras**

As amostras de sangue periférico (10 mL) foram coletadas por punção venosa, em seringas estéreis descartáveis contendo heparina sódica na concentração de 5000 U/ mL, de um voluntário saudável e não-fumante, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Cada amostra de sangue foi separada em duas alíquotas de 5 mL, sendo uma, considerada o controle, não irradiada e mantida à temperatura ambiente e outra irradiada num campo de radiação gama.

A irradiação foi realizada no Laboratório do Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco – DEN/UFPE com uma fonte de  $^{60}\text{Co}$  (Irradiador Gammacel 220) com uma taxa de Kerma no ar de 3,388 Gy/h. As amostras foram irradiadas com doses absorvidas de 0,51 Gy e 0,77 Gy.

### **2.2 Cultivo de células**

As preparações citológicas para as análises cromossômicas foram obtidas a partir de cultura de linfócitos, onde foram adicionadas 0,5 mL de sangue total nos frascos de cultura contendo 4 mL de meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 1 mL de soro bovino fetal (Biological Industries) e 0,2 mL de fitohemaglutinina (Biological Industries). Em seguida, os frascos foram mantidos na estufa a 37 °C, por 48 horas. Após 46 horas foi adicionado 0,1 mL de colcemid 0,0016% (Biological Industries). Ao completar 48 horas de cultivo, o material foi centrifugado por 6 minutos a 1800 rpm, o sobrenadante desprezado e adicionado 8 mL de KCL previamente aquecido a 37 °C, para que ocorresse o choque hipotônico. Após a hipotonia, os tubos foram colocados em banho-maria a 37 °C por 15 minutos. Em seguida, os tubos foram novamente centrifugados por 6 minutos a 1800 rpm, o sobrenadante foi retirado e adicionado o fixador metanol:ácido acético (3:1) até completar 8 mL. Para a preparação de lâminas teste foram realizadas tantas centrifugações e trocas de fixador quanto o necessário para que o conteúdo da cultura estivesse transparente.

Após o processo de fixação foram confeccionadas lâminas a partir do precipitado de células ressuspenso em 1 mL de solução fixadora. O precipitado de células ressuspenso foi gotejado em dois pontos na lâmina e esta colocada para secar à temperatura

ambiente durante 24h. Em seguida, as lâminas foram coradas com Giemsa a 5% durante 7 min para posterior análise cromossômica.

### 2.3 Análise Microscópica

A contagem de aberrações cromossômicas foi realizada diretamente no microscópio óptico (Leica DM500). A lâmina foi examinada na sua totalidade e ao menos 1000 metáfases viáveis foram contadas por grupo (controle e irradiado). Entende-se por viáveis aquelas metáfases que não mostram nenhuma sobreposição de cromossomos, com 46 centrômeros.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As alterações cromossômicas observadas em sangue humano periférico resultaram da exposição à feixes gama durante 8 minutos e 30 segundos para a dose de 0,51 Gy e durante 12 minutos e 50 segundos para a dose de 0,77 Gy. Cerca de 1000 metáfases foram analisadas, entretanto, a agência preconiza um valor de 500 metáfases por análise (IAEA, 2001). O número de alterações cromossômicas instáveis encontradas nas amostras e suas frequências está demonstrado na Tabela 1, tanto para o grupo controle quanto para o irradiado.

**Tabela 1. Número e frequência de alterações cromossômicas instáveis para o sangue irradiado a dose de 0,51 Gy e 0,77 Gy em fonte de <sup>60</sup>Co.**

	Dose de 0,51 Gy				Dose de 0,77 Gy			
	<i>Sangue irradiado</i>		<i>Sangue controle</i>		<i>Sangue irradiado</i>		<i>Sangue controle</i>	
<b>Alterações cromossômicas</b>	NA <sup>a</sup>	F <sup>b</sup>	NA <sup>a</sup>	F <sup>b</sup>	NA <sup>a</sup>	F <sup>b</sup>	NA <sup>a</sup>	F <sup>b</sup>
<b>Dicêntricos associados</b>	18	0,0178	2	0,0020	37	0,0370	1	0,0019
<b>Fragmentos acêntricos</b>	54	0,0536	17	0,0170	63	0,0630	15	0,0290
<b>Anéis cromossômicos</b>	1	0,0009	0	0	3	0,0030	0	0
<b>TOTAL DE METÁFASES</b>	1006		1000		1000		501*	

\*NA<sup>a</sup>. Número de alterações celulares. F<sup>b</sup>. Frequência de alterações.

\*Segundo as normas da IAEA, para estimativa de dose é aceita uma análise de cerca de 500 metáfases.

O aumento na frequência de alterações cromossômicas é nitidamente percebido quando se comparam o sangue irradiado e o controle em ambas as doses estudadas. Já no que diz respeito à comparação dos sangues irradiados com 0,51Gy e 0,77Gy entre si, os resultados obtidos a partir do cálculo do nível de significância considerando diferenças relevantes entre as frequências quando o valor de  $p < 0,05$  no teste de qui-quadrado, mostram um aumento significativo na frequência de todas as alterações com o aumento da dose. Observa-se que houve um aumento de 2 vezes (0,0178 a 0,0370) na frequência de dicêntricos e de quase 1,2 vezes (0,0536 a 0,0630) na frequência de fragmentos.

Vale ressaltar que os fragmentos isolados podem ser formados de forma independente das radiações e por isso eles precisam ser associados aos dicêntricos e anéis durante a análise. Por nem sempre possuírem origem conhecida, os fragmentos isolados não são considerados como bioindicador seguro para avaliação da dose absorvida de radiação.

Em relação aos anéis cromossômicos, apesar de um aumento na frequência de 8 vezes com o aumento da dose, observa-se que as frequências são bem mais baixas que as frequências de dicêntricos. Como em linfócitos humanos os anéis cromossômicos são muito mais raros do que dicêntricos, alguns pesquisadores os utilizam somados aos dicêntricos enquanto outros optam por ignorá-los para a estimativa da dose [2].

Diversos estudos foram feitos com a análise das alterações cromossômicas instáveis em amostras de sangue periférico humano também expostas à fonte de  $^{60}\text{Co}$  (Barquinero, 1995; Prassama, 2002; Senthamizchelva, 2006), comparando as doses absorvidas próximas, observamos que existe diferenças entre as frequências de dicêntricos obtidas por esses autores (Tabela 2).

**Tabela 2. Frequência de alterações cromossômicas instáveis para o sangue irradiado com fonte de  $^{60}\text{Co}$  a dose de 0,5 e 0,75 Gy (BARQUINERO, 1995; PRASSANA, 2002); 0,5 Gy e 1,0 Gy (SENTHAMIZHELVA, 2006).**

	BARQUINERO (1995)		PRASSANA (2002)		SENTHAMIZH CHELVA (2006)		ESTE TRABALHO	
	0,5	0,75	0,5	0,75	0,5	1,0	0,51	0,77
<b>Alterações cromossômicas</b>	F <sup>b</sup>	F <sup>b</sup>	F <sup>b</sup>	F <sup>b</sup>	F <sup>b</sup>	F <sup>b</sup>	F <sup>b</sup>	F <sup>b</sup>
<b>Dicêntricos associados</b>	0,0274	0,0540	0,0365	0,0980	0,0660	0,0784	0,0178	0,0370
<b>Taxa de dose</b>	1,2 Gy/min		0,25 Gy/min		1,4 Gy/min		0,06 Gy/min	

\*F<sup>b</sup>. Frequência de alterações.

Estes resultados confirmam o fato de que em radiações ionizantes de baixa LET, como é o caso do feixe gama, a taxa de dose é um dos principais fatores que determina as consequências biológicas de uma dose absorvida. Quando a taxa de dose é baixa, portanto o efeito biológico de uma dada dose é reduzido, pois, o tempo de exposição prolongado permite que ocorra o reparo do dano subletal durante a irradiação e que haja proliferação de células não danificadas. Se as duas lesões necessárias para induzir um

dicêntrico são produzidas por interações distintas e se a taxa de dose for baixa, existe a probabilidade que a lesão produzida pela 1ª interação seja reparada antes que o alvo seja atingido pela 2ª interação [6,7].

#### 4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostram as diferenças nas frequências das alterações cromossômicas instáveis para diferentes doses de uma mesma fonte e diferentes LET's. Exibem ainda a relação diretamente proporcional entre o aumento da LET e das frequências das alterações, pois radiações de alta LET causam mais alterações por unidade de dose. Há ainda a relação com a taxa de dose, que segundo os valores analisados mostraram que baixas taxas de dose apresentam menores frequências de alterações por permitir que ocorra o reparo das células afetadas.

#### REFERÊNCIAS

1. BIRAL, AR. Radiações ionizantes para médicos, físicos e leigos. Florianópolis: Insular; 2002.
2. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment**. Technical Report Series nº 405 (2001).
3. DOLPHIN, G.W.; LLOYD,D.C. The significance of radiation-induced chromosome abnormalities in radiological protection. *J.MedGenet.*, v. 11, p.181-189, 1974.
4. LLOYD,D.C; PURROTT, R. Chromosome aberration analysis in radiological protection dosimetry. *Radiat Prot Dosim*, v.1, p. 19-28, 1981.
5. Du FRAIN, R.J.; LITTLEFIELD, E.G.; JOINER, E.E.; FROME, E.L. *In vitro* human cytogenetics dose-response systems. In: HUBNER, K.F.; FRY,S.A.(eds). **The medical basis for radiation accidents preparedness**. Amsterdam, Elsevier North-Holland , 1980, p. 357-374.
6. BAUCHRINGER,M. **Quantification of low-level radiation exposure by conventional chromosome aberration analysis**. *Mutat Res.*, v.339, p.177-189,1995.
7. LEA, D.E.; CATCHESIDE, D.G. **The mechanism of the induction by radiation of chromosome aberrations in Tradescantia**. *J. Genet*, v.44, p.216-245, 1942.
8. BARQUINERO, J.F.; BARRIOS ,L.; CABALLÍN, M. R.; MIRÓ, R.; RIBAS, M.; SUBIAS, A.; EGOZCUE, J. Establishment and validation of a dose-effect curve for y-rays by cytogenetic analysis. *Mutat Res.*, v. 326, p.65-69, 1995.
9. PRASSANA, P. G. S. AFRRI'S gamma – ray, X-ray, and fission-neutron calibration curves for the lymphocyte Dicentric assay: Application of a metaphase finder system. **Armed forces radiobiology institute**, 2002.
10. SENTHAMIZHELVA. S. Biodosimetry using chromosome aberrations in human lymphocytes. **Radiation Protection Dosimetry**, 2006.
11. RODRIGUES, A. S., OLIVEIRA, N.G., MONTEIRO, O., LÉONARD, A., RUEFF, J. Use of cytogenetic indicators in radiobiology. **Radiation Protection Dosimetry**. 115(1-4): 455-460 (2005).

12. TAHUATA, L. A. Radiações nucleares: Usos e Cuidados. **CNEN-EN**. 02, vol I/IV, 1990.
13. JIN, C. Z. A Comment on Some Aspects of Chromosome Aberration Analysis for Radiation Accident Dosimetry. **Journal of Radiations Resources**. 33(1):258–259 (1992).
14. YAMAGUCHI, H.; WAKER, J.A. A model for the induction of DNA damages by fast neutrons and their evolution into cell clonogenic inactivation. **Journal of Radiation Resources**. 48(4):289-303 (2007).