



Validação da curva dose-resposta do CRCN-NE para ^{60}Co : resultados preliminares.

J. C.G Mendonça^{a,b}; M. E. Mendes^{a, b}; S. F. Hwang^a; N. Santos^b; F. F. Lima^a.

^a *Laboratório de Dosimetria Biológica, Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN-NE/CNEN-PE), 50740540, Recife-PERNAMBUCO, Brasil.*

july_cgm@yahoo.com.br

^b *Departamento de genética, Centro de Ciências Biológicas (CCB/UFPE), 50670-901, Recife- PERNAMBUCO, Brasil.*

RESUMO

As alterações cromossômicas são utilizadas na estimativa de dose absorvida por indivíduos envolvidos em exposição à radiação ionizante a partir da interpretação de uma curva de calibração dose-resposta. O Laboratório de Dosimetria Biológica do Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN-NE/CNEN), estabeleceu a curva de calibração referente à radiação Gama (^{60}Co). Sendo assim, este trabalho objetivou iniciar a validação da referida curva a partir de amostras de sangue de três diferentes doadores que foram irradiadas com uma única dose absorvida conhecida de 1 Gy. As amostras foram expostas à fonte de ^{60}Co (Gammacel 220) localizada no Departamento de Energia Nuclear da UFPE. Após fixação e coloração, as frequências das alterações cromossômicas foram estabelecidas a partir da leitura de 500 metáfases por amostra e as doses foram estimadas pelo programa Dose Estimate. Os resultados obtidos mostraram que, utilizando a curva de calibração dose-resposta para dicêntricos, a dose absorvida estimada para os três indivíduos variou entre 0,891 – 1,089Gy, levando-se em conta o intervalo de confiança de 95% . Ao utilizar a curva dose-resposta para dicêntricos somados a anéis e para o mesmo intervalo de confiança, as doses variaram entre 0,849 – 1,081Gy. Sendo assim, as estimativas englobaram a dose absorvida conhecida para os três indivíduos no intervalo de confiança de 95%. Estes resultados preliminares parecem demonstrar que as curvas de dose-resposta de dicêntricos e de dicêntricos mais anéis estabelecidas pelo CRCN-NE/CNEN são válidas para estimativa de dose em indivíduos expostos. Esta validação continuará com amostras de diferentes indivíduos em diferentes doses.

Palavras-chave: Dosimetria, Citogenética, Validação.

1. INTRODUÇÃO

A Probabilidade da ocorrência de acidentes ocupacionais tem crescido proporcionalmente ao aumento da aplicação de fontes de radiação ionizante [1]. Estes acidentes têm se mostrado significativos como fontes de estudos referentes aos efeitos da radiação no ser humano. Visto que os mesmos podem ser de origem nuclear ou radiológica, torna-se de grande importância a estimativa de dose absorvida por métodos biológicos, seja para confirmação dos dados obtidos pela Dosimetria física ou até mesmo na ausência desta. A estimativa de dose absorvida influencia no tipo de tratamento médico que será adotado no indivíduo exposto [2].

Na Dosimetria Biológica, há uma série de técnicas que podem ser utilizadas na estimativa de dose, porém, atualmente, o ensaio considerado “padrão ouro” refere-se à análise das alterações cromossômicas radioinduzidas. Nesta técnica a dose absorvida é relacionada com a frequência dessas alterações em sangue humano irradiado por diferentes fontes, passando a ser denominada de Dosimetria Citogenética.

A maioria dos incidentes em que ocorrem sobre-exposição à radiação ionizante envolvem fontes de radiação gama, radiações de baixa Transferência Linear de Energia (LET), e, por isso, qualquer dose absorvida pelo indivíduo será randomicamente distribuída entre as células. Como as lesões de DNA se comportam da mesma forma, as alterações cromossômicas são então, distribuídas aleatoriamente entre as células. Tal fato foi demonstrado em irradiações com raios X e gama, onde as alterações genéticas seguem a distribuição de Poisson [3].

Há pré-requisitos básicos para que um sistema dosimétrico citogenético seja empregado: a alteração cromossômica escolhida para a estimativa de dose deve ser específica para a radiação ionizante; este tipo de alteração deve ser detectável para doses absorvidas tão próximas quanto possível dos valores de dose devido a radiação ambiental e apresentar boa resposta para uma série relevante de doses; e o processo para estimar a dose deve ser relativamente rápido, reprodutível e exibir uma relação dose – resposta que possa ser avaliada experimentalmente.

Visando a interpretação da relação entre frequência das alterações cromossômicas nos linfócitos humanos e dose absorvida faz-se necessário a construção de uma curva de calibração dose-resposta, onde a dose absorvida é definida como a quantidade de energia depositada pela radiação ionizante num meio qualquer, por unidade de massa do material absorvedor. No Sistema Internacional de unidades (SI) a unidade utilizada é o J/kg, que é denominada Gray (Gy) [4].

As curvas de calibração são produzidas utilizando diversos protocolos que, por ventura, acabam sendo distintos entre os laboratórios, tanto no momento do cultivo das células quanto na leitura das lâminas por diferentes analisadores. Este fato justifica a convenção de que cada laboratório que preste ou pretende prestar o serviço de dosimetria biológica tenha sua própria curva de calibração, sendo inclusive uma indicação da própria Agência Internacional de Energia Atômica [3].

International Joint Conference RADIO 2014

Gramado, RS, Brazil, August 26-29, 2014

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PROTEÇÃO RADIOLÓGICA - SBPR

O Laboratório de Dosimetria Biológica do CRCN-NE/CNEN em trabalhos prévios desenvolveu sua própria curva de calibração dose-resposta para feixe gama de uma fonte de ^{60}Co . Todavia, tornou-se necessária a validação da referida curva para maior segurança no seu uso posterior, minimizando, assim, possíveis erros.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

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

2.1 Coleta 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 três voluntários selecionados aleatoriamente, 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}Co (Irradiador Gammacel 220) com uma taxa de Kerma no ar de $2,842 \pm \text{Gy/h}$. As três amostras foram irradiadas com a mesma dose absorvida de 1 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 ressuspensas em 1 ml de solução fixadora. O precipitado de células ressuspensas foi gotejado em dois pontos na lâmina e esta colocada para secar a 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 alterações cromossômicas instáveis (dicêntricos, fragmentos acêntricos e anéis) foi realizada diretamente no microscópio óptico (Leica DM500).

A lâmina foi examinada na sua totalidade e ao menos 500 metáfases viáveis foram analisadas. Entende-se por viáveis aquelas metáfases que não mostram nenhuma sobreposição de cromossomos e com 46 centrômeros (Figura 1).

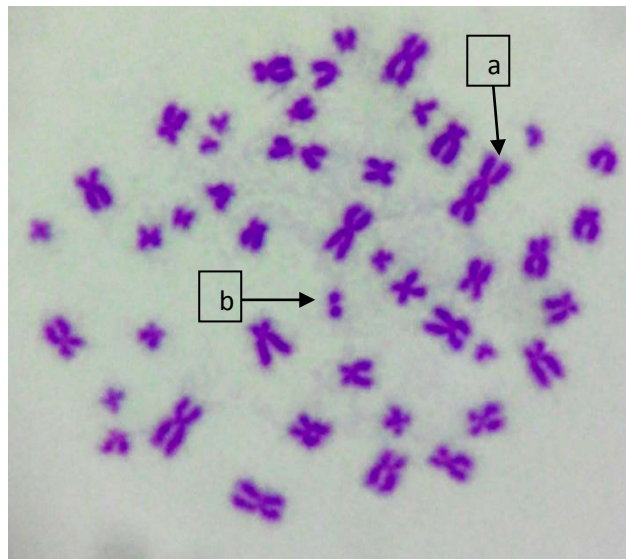


Figure 1. Metáfase observada no microscópio óptico (aumento total: 1600x), mostrando um dicêntrico (seta a) e um fragmento acêntrico (seta b) após o processo de irradiação por campo misto nêutron-gama no microscópio óptico.

Vale ressaltar que a análise microscópica foi realizada por dois observadores, cada um responsável por 250 metáfases de cada amostra irradiada.

2.4 Análise dos dados

A dose absorvida foi estimada por meio dos coeficientes da curva dose-resposta de dicêntricos e dicêntricos somados a anéis para raios gama (^{60}Co) do Laboratório de Dosimetria Biológica do CRCN-NE/CNEN utilizando o software DOSE ESTIMATE [6] que vem sendo usado por grupos de pesquisa em dosimetria biológica, no sentido de uniformizar a análise dos dados e possibilitar melhores intercomparações.

Ambas as curvas foram ajustadas em estudos anteriores no DOSE ESTIMATE pelas equações quadráticas 1 e 2, respectivamente, para dicêntricos e dicêntricos somados a anéis.

$$Y_{\text{Dic}} = 0,0454D^2 + 0,0072D + 0,0015 \quad (1)$$

$$Y_{\text{Dic+Anel}} = 0,0488D^2 + 0,0089D + 0,0013 \quad (2)$$

onde, Y é a frequência de alterações e D é a dose absorvida (Gy).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

As frequências de dicêntricos e dicêntricos somados a anéis observadas e as estimativas de dose absorvida nas três amostras estudadas podem ser vistos nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. Vale ressaltar que as alterações cromossômicas observadas em sangue humano periférico resultaram da exposição a feixes gama durante 19 minutos para se atingir a uma dose absorvida de 1 Gy.

Tabela 1: Dose estimada e intervalo de confiança de 95% nas três amostras estudadas analisando a frequência de dicêntricos por células.

Indivíduo	Dose	Total de metáfases	Número de dicêntricos	Frequência de dicêntricos por célula	Dose estimada	Intervalo de confiança de 95%
Amostra 1	1 Gy	500	22	0,044	$0,891 \pm 0,118$	0,683 - 1,121
Amostra 2	1 Gy	500	27	0,054	$0,999 \pm 0,120$	0,791 - 1,226
Amostra 3	1Gy	500	29	0,058	$1,039 \pm 0,120$	0,831 - 1,265

Observa-se que, usando a curva de calibração dose-resposta de dicêntricos para estimar as doses dos três indivíduos cujo sangue foi irradiado com 1 Gy, os resultados variaram entre 0,891 e 1,039, estando o valor de dose conhecida inclusa no intervalo de confiança de 95% para os três

casos. Os dicêntricos são considerados o “padrão ouro” para a dosimetria citogenética, sendo sua curva a mais utilizada na literatura, devido principalmente a sua elevada radioespecificidade e baixa incidência na população (1-2 dicêntricos/1.000 células) [5].

Tabela 1: Dose estimada e intervalo de confiança de 95% nas três amostras estudadas analisando a frequência de dicêntricos mais anéis por células.

Indivíduo	Dose	Total de metáfases	Número de dicêntricos	Frequência de dicêntricos por célula	Dose estimada	Intervalo de confiança de 95%
Amostra 1	1 Gy	500	22	0,044	$0,849 \pm 0,114$	0,648 - 1,069
Amostra 2	1 Gy	500	28	0,056	$0,971 \pm 0,116$	0,771 - 1,190
Amostra 3	1Gy	500	34	0,068	$1,081 \pm 0,118$	0,882 - 1,298

Quando utilizada a curva dose-resposta para dicêntricos somados a anéis, as doses variaram entre 0,849 – 1,081Gy, sendo, portanto, para todos os três indivíduos uma dose verdadeira dentro do intervalo de confiança de 95%.

Em linfócitos humanos, como os anéis cromossômicos são muito mais raros do que dicêntricos, aumentando assim a margem de erro, alguns pesquisadores utilizam os anéis somados aos dicêntricos enquanto outros optam por ignorá-los para a estimativa da dose absorvida [3].

4. CONCLUSÕES

As curvas de calibração dose-resposta para dicêntricos e para dicêntricos mais anéis, a princípio, são válidas para utilização em estimativas de doses em indivíduos expostos à radiação. Entretanto, serão realizados mais testes com amostras de diferentes indivíduos irradiadas com diferentes doses absorvidas para avaliar a curva em toda a sua extensão.

5. AGRADECIMENTO

Ao Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste – CRCN-NE/CNEN e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq.

REFERÊNCIAS

1. CILLIERS, G.D. ; LEVIN, J. Radiation exposure: biological monitoring. *Nucl. / act*, v.28,p.26-28, 1983.
2. LLOYD, D.C. & EDWARDS, A.A. Biological dosimetry after radiation accident. In: OBE, G. & NATARAJAN, A.T.(eds). **Chromosomal aberrations**. Heidelberg, Germany, Springer-Verlag, p. 212-223, 1990.
3. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment**. Technical Report Series n° 405 (2001).
4. RIGHI, E. et al. Biodosimetric diagnostic profile. **Del nuovo cimento**. Roma, v.2 1, n 01,1997.
5. AMORIM, L.C.A. Biomarkers for evaluating exposure to chemical agents presents in the environment. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. 6:sup 1 (2003).
6. Ainsbury EA and Lloyd DC. (2010). Dose Estimation Software For Radiation Biodosimetry Health Physics Society, 98(2):290-295.
7. MARTINS V, ANTUNES AC and MONTEIRO GIL O (2013). Implementation of a dose-response curve for α -radiation in the Portuguese population by use of the chromosomal aberration assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 750:50-54.
8. TAHUATA, L. A. Radiações nucleares: Usos e Cuidados. CNEN-EM. 02, vol I/IV, 1990.
9. BAUCHRINGER,M. Quantification of low-level radiation exposure by conventional chromosome aberration analysis. *Mutat Res.*, v.339, p.177-189,1995.
10. 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.
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. 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).

International Joint Conference RADIO 2014

Gramado, RS, Brazil, August 26-29, 2014

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PROTEÇÃO RADIOLÓGICA - SBPR

13. 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).
14. VINNIKOV VA, AINSBURY EA, MAZNYK NA, LLOYD DC AND ROTHKAMM K (2010). Limitations Associated with Analysis of Cytogenetic Data for Biological Dosimetry. **Radiation Research Society**, 174(4):403-414.
15. LOUCAS BD, DURANTE M, BAILEY SM and CORNFORTH MN (2013). Chromosome Damage in Human Cells by γ Rays, α Particles and Heavy Ions: Track Interactions in Basic Dose-Response Relationships. **Radiation Research**, 179(1):9-20.
16. CRESPO RH, DOMENE MM and RODRÍGUEZ (2011). Biodosimetry and assessment of radiation dose. **Reports of Practical Oncology and Radiotherapy**, 16:131-137.
17. COSKUN M, TOP A and ORTA T (2000). Biological dosimetry following X-ray irradiation. **Turk J Med Sci**, 30:563-569.