



# ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS EM SANGUE HUMANO IRRADIADO COM FEIXE MISTO DE NÊUTRON-GAMA EM TRÊS DIFERENTES DOSES ABSORVIDAS

Júlio Silva<sup>1</sup>, Fabiana Lima<sup>1</sup>, Mariana Esposito<sup>1,2</sup>, Fabiana Gomes<sup>3</sup>, Laís Melo<sup>1</sup>, Julianne Freires<sup>1</sup>, Alyne Nascimento<sup>1</sup>, Suy Hwang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Dosimetria Biológica, CRCN-NE; <sup>2</sup>Departamento de Genética, UFPE; <sup>3</sup>UNIT  
\*julioxs888@gmail.com

## INTRODUÇÃO

Os raios X e gama ( $\gamma$ ) são radiações eletromagnéticas ionizantes definidas como ondas de alta energia. O poder de ionização dessas radiações é capaz de originar o chamado efeito biológico pós-exposição, através de distúrbios físico-químicos intracelulares (MENDONÇA, et. al. 2013; OKUNO, 2018). Por sua vez, o nêutron é uma partícula subatômica que não possui carga elétrica, e são mantidas no interior dos átomos a fim de manterem seus núcleos estáveis (FOGAÇA, 2018; DEYLLLOT, 2015). Os danos biológicos provocados pelos nêutrons são originados da interação entre estes e os átomos de hidrogênio formando radicais livres, altamente reativos (BRANDÃO, 2009; ECHANIQUE, 2018). O principal efeito biológico das radiações é causado no DNA, que possui várias vias de resposta, entre elas a capacidade de reparo, retomando o estado saudável da célula. Em caso de um reparo mal sucedido a alternativa para manutenção da homeostasia é a apoptose, evitando a formação de um futuro câncer (ALMEIDA, 2007).

Na sociedade moderna, a utilização de fontes de radiação ionizante, inclusive os nêutrons, para o uso em diversas áreas, como medicina, indústria, geração de energia, dentre outras, vem aumentando consideravelmente, e junto a este benefício, o risco de exposição a acidentes ocupacionais e de público aumentam concomitantemente. Os casos ocorridos de exposição acidental à radiação levaram ao desenvolvimento de métodos para analisar de forma quantitativa a dose absorvida pelo indivíduo e, dentre eles, a dosimetria biológica. Esta se utiliza de métodos citogenéticos para analisar as alterações cromossômicas formadas em linfócitos no sangue periférico (DA SILVA, 1997; VALENTE, et al., 2017).

Essas alterações cromossômicas são resultado do mal reparo do DNA, sendo bastante sensíveis à dose absorvida de radiação. Uma das técnicas utilizadas é o ensaio de micronúcleos (MN) com bloqueio da citocinese celular -CBMN - *Cytokinesis-Block Micronucleus* (THIERENS e VRAL, 2009; OLIVEIRA, 2018; IAEA, 2011). Os MNs são pequenas massas nucleares, revestidos por membranas e dispersos no citoplasma linfocitário, separados do núcleo principal. Eles são caracterizados como subprodutos resultantes das alterações cromossômicas instáveis, ou perda de cromossomos inteiros, e a sua quantidade também varia, em relação à dose absorvida pelo indivíduo, bem como a outros agentes clastrogênicos e aneugênicos (FENECH, 2000; FERNANDES, 2005; THIERENS & VRAL, 2009).

Segundo a Agência Internacional de Energia Atômica - IAEA, em casos de acidentes de grande proporção, é de extrema importância realizar uma triagem dos indivíduos expostos a doses absorvidas superiores a 1 Gray (Gy), para que tenham atendimento médico prioritário em relação aos menos expostos. Portanto, faz-se necessário o uso de ensaios biodosimétricos com análise rápida, tal

como o ensaio de MN (IAEA, 2011). A relação entre as frequências de MN e a dose absorvida se faz por meio de uma curva de calibração dose resposta estabelecida previamente por ensaios *in vitro* e a IAEA recomenda que cada laboratório de dosimetria biológica estabeleça suas próprias curvas.

O presente estudo objetiva analisar as frequências de micronúcleos em amostras de sangue após irradiação com um feixe misto nêutron-gama em três diferentes doses absorvidas. Essas relações dose x frequência irão compor a curva de calibração dose resposta para este tipo de radiação do Laboratório de Dosimetria Biológica do Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste CRCN-NE/CNEN.

## 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 para coleta de dados pelo Comitê de Ética envolvendo pesquisas com seres humanos da Universidade Federal de Pernambuco sob o número de CAAE 09186813.7.0000.5208 e do parecer consubstanciado 269.483.

Um voluntário saudável e não fumante foi selecionado, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Segundo critério utilizado por (GAJENDIRAN, et. al. 2001) foi realizada uma anamnese por meio de questionário para verificar se nos últimos seis meses antes da coleta o voluntário havia sido exposto à radiação terapêutica, raios-X diagnóstico, vacinação viral ou consumiu drogas ilícitas. Posterior a este questionário foram coletadas quatro amostras de sangue periférico (10 ml cada), por coleta de sangue a vácuo.

Para esse estudo as amostras foram irradiadas no Reator Argonauta do Instituto de Engenharia Nuclear - IEN/CNEN, no Rio de Janeiro. O Argonauta apresenta vários canais de irradiação e foi escolhido o canal J-9 por estar situado exatamente a meia altura do elemento combustível e ter seu início junto ao tanque de alumínio externo do núcleo (Figura 1).

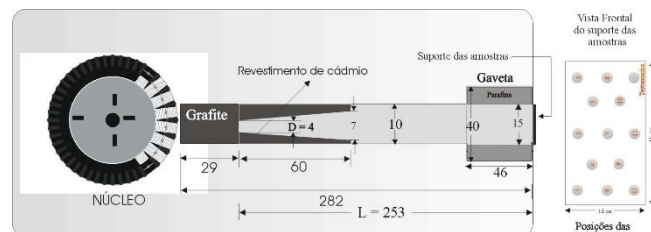


Figura 1. Esquema do canal J-9 do reator Argonauta com o arranjo: bloco moderador e colimador divergente, utilizado na instalação de sistemas para a obtenção de imagens radiográficas com nêutrons térmicos (Souza, 2002).

É o canal mais utilizado tanto para irradiação de amostras como também para realização de experimentos, onde se destacam a técnica de análise por testes não destrutivos, como neutrografia e tomografia computadorizada (SOUZA e FURIERI, 2002; FURIERI e SOUZA, 2002). As amostras do doador foram posicionadas no canal por meio de um aparato formado por Chumbo e Lucite (Figura 2).



Figura 2. Material feito de Chumbo e Lucite para exposição das amostras sanguíneas.

O chumbo tem a função de auxiliar na redução da contribuição da radiação gama na dose absorvida no sangue e o Lucite, de termalizar o nêutron, ou seja, reduzir sua energia, possibilitando a sua interação com o sangue. Logo, a taxa de dose absorvida estimada no Canal J-9 com o aparato para nêutrons foi de 3100 mGy/h e para fótons de 0,9 mGy/h, gerando uma taxa de dose total aproximada de 3,1 Gy/h.

As doses absorvidas selecionadas neste trabalho foram 0,75Gy, 1,0Gy e 1,5Gy, resultando em tempos de irradiação de 14 minutos e 11 segundos, 18 minutos e 48 segundos e 28 minutos e 21 segundos, respectivamente. As preparações citológicas para as análises cromossômicas foram obtidas a partir de cultura de linfócitos. Para tal, foram adicionadas 0,5 ml de sangue total nos frascos de cultura contendo 4 ml de meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 1 ml de soro bovino fetal (Gibco) e 0,1 ml de fitohemaglutinina (Sigma). Em seguida, os frascos foram mantidos na estufa a 37°C, por 68 horas, sendo que, após 24 horas, foi adicionado 0,02 ml de citocalasina B (Sigma). Ao completar 68 horas de cultivo, o material foi centrifugado por 10 minutos a 180 g, o sobrenadante desprezado e adicionado 7 ml de KCl, para que ocorresse o choque hipotônico. Em seguida, os tubos foram novamente centrifugados por 10 minutos a 180 g, o sobrenadante retirado e adicionado o fixador metanol: ácido acético (10:1), diluídos em solução de Ringer (1:1) até completar 7 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 0,5 ml de solução fixadora. O precipitado de células ressuspensas foi delicadamente gotejado em um ponto na lâmina e foi colocada para secar a temperatura ambiente durante 24h. Em seguida, as lâminas foram coradas com Giemsa a 5%, diluídos em tampão fosfato pH 6,8, durante 20 minutos para posterior análise.

A contagem de micronúcleos foi realizada diretamente no microscópio óptico (Leica DM 500). Foram contabilizadas, no mínimo, 3000 células binucleadas (BN) (Figura 3) viáveis para cada dose absorvida.

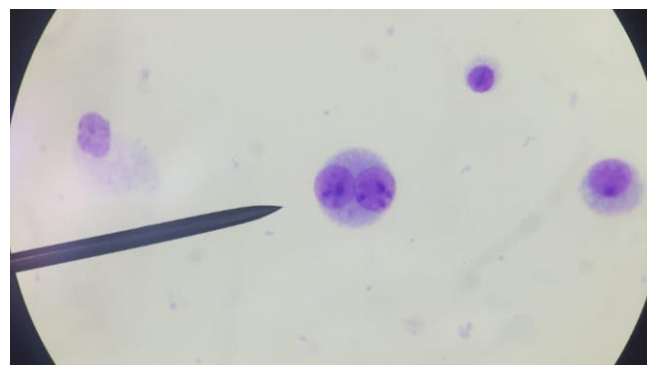


Figura 3. Célula Binucleada com um micronúcleo. (acervo pessoal)

Foram considerados vários critérios para caracterizar uma célula binucleada viável, como: os dois núcleos em uma célula BN devem ter membranas nucleares intactas; devem ter aproximadamente o mesmo tamanho e padrão de intensidade de coloração. Com relação aos MN, devem ter diâmetro de 1/16 a 1/3 do diâmetro médio dos núcleos principais; podem se tocar, mas não sobrepor os principais núcleos; e o limite micronuclear deve ser distinguível do limite nuclear (FENECH, 2007; AIEA, 2011). Os dados obtidos para cada dose absorvida foram testados por meio do teste u de Papworth para avaliar se sua distribuição segue o modelo de dispersão de Poisson (ACHARYA, 2009; AIEA, 2011).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas 15000 células binucleadas viáveis. A frequência de MN para a amostra controle (*background*), conforme observa-se na Tabela 1, está de acordo com o que já foi relatado na literatura, que é uma faixa de frequência entre 0 a 40 MN por 1000 células binucleadas (IAEA, 2011).

Tabela 1. Verificação da frequência e distribuição celular de micronúcleos.

Dos e (Gy)	Total de células	MN	Y	OMN	1M N	2M N	3M N	4M N	5M N	$\sigma^2$	$\sigma^2/y$	u
0*	6000	43	0,007	4956	43					0,007	0,993	0,388
0,75	3000	230	0,077	2787	196	17				0,082	1,072	2,775
1	3000	269	0,090	2731	218	19	1		2	0,110	1,223	8,652
1,5	3000	379	0,126	2674	280	40	5	1		0,151	1,196	7,598

\* referente ao sangue controle, (MN) Número de micronúcleos, (y) frequência, ( $\sigma^2$ ) média, ( $\sigma^2/y$ ) índice de dispersão, (u) teste estatístico.

Foi possível observar a relação entre a dose absorvida e a frequência de MN, confirmando que, com o aumento da dose absorvida, a frequência de MN também aumenta. Esse crescimento demonstrou uma dependência linear (Gráfico 1.) do rendimento de MN com a dose, como visto também no trabalho de Vral et al. (1998) para os nêutrons rápidos.

Além disso, com o aumento da dose é possível observar a presença de células binucleadas com mais de um MN. Na dose de 0,75 Gy, nota-se aparecimento constante de micronúcleos, sendo observados, sua maioria contidos em 1 por célula. Ao contrário do que é mostrado na dose de 1,5 Gy, no qual a quantidade de micronúcleos torna-se aumentada, com aparecimento de até quatro em uma única célula (Tabela 1).

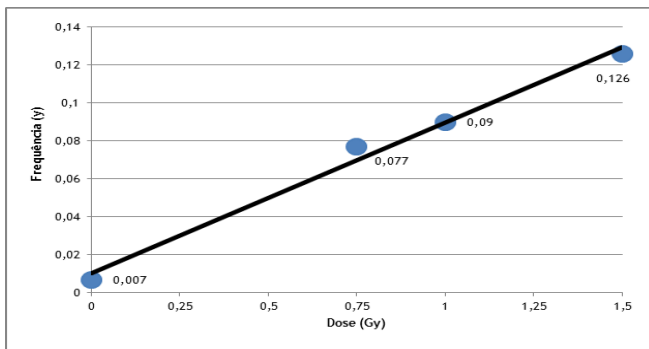


Gráfico 1. Relação dose x frequência de micronúcleos, frente sua dependência linear.

Em todas as doses, foi testada a conformidade da distribuição celular de MN com a distribuição de Poisson, utilizando o índice de dispersão ( $\sigma^2/y$ ) e o teste u (tabela 1). A estatística do teste u é uma unidade normalizada do índice de dispersão onde, para uma distribuição perfeita de Poisson o índice deve ser igual a um. Entretanto, com o intervalo de confiança de 95%, os valores de u podem variar entre  $\pm 1,96$ , onde valores de u superiores a 1,96 indicam sobredispersão e os valores de u  $< -1,96$  indicam a subdispersão (IAEA, 2011). Observando a Tabela 1, percebe-se que em todas as doses houve uma sobredispersão na distribuição. Na literatura, há relatos do comportamento de sobredispersão em todas ou na maioria das distribuições de MN nas doses estudadas, frente à distribuição de Poisson em linfócitos irradiados (KöKSAL, 1996 ; VRAL, et. al., 1998, ; VENKATACHALAM, et. al., 1999, ; VRAL.; FENECH, 2011., THIENS., 2011. ; ANTUNES, et. al., 2014.) Na tabela 2, observa-se a frequência dos MN para exposição a nêutrons relatados na literatura.

Tabela 2. Frequência dos MN para exposição a nêutrons relatados na literatura.

Resultados	Nossos Resultados		Mill et al. 1996	Wuttke et al. 1998
Tipo de radiação:	Campo misto nêutron-gama.		Nêutron - 24 KeV	Nêutron - 6 MeV
Dose (Gy)	MN	Y	Dose (Gy) MN Y	Dose (Gy) MN Y
0	45	0,009	0 50 0,025	0 74 0,017
0,75	230	0,077	0,7 45 0,425	0,5 1097 0,254
1	269	0,090	1 120 1,28	1 2970 0,628
1,5	379	0,126		1,5 4787 1,111

(MN), número de micronúcleos, (Y) frequência das alterações.

Nos trabalhos de Mill et al. (1996) e Wuttke et al. (1998) observamos que as frequências de MN são mais elevadas do que as frequências relatadas em nossos resultados. O que pode explicar isto são as diferentes energias médias utilizadas nos referidos trabalhos. Vale ressaltar também que, na pesquisa de Wuttke et al. (1998), a amostra foi irradiada com nêutrons seguida de outra irradiação com raios x num intervalo de tempo não relatado, sendo a frequência o resultado das duas irradiações.

Outro ponto de divergência é a contribuição na dose absorvida total da energia devido à radiação gama. No trabalho de Wuttke et al (1998) foi de 10%, sendo 90% da energia total depositada devido à nêutrons. Neste trabalho, a contribuição de gama foi menor que 1%, sendo, assim, mais de 99% de energia depositada puramente por interação neutrônica.

A observação maior é que em todos os resultados da Tabela 2, observa-se que o aumento da dose, influencia diretamente no número e na frequência com que os micronúcleos aparecem.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostram haver uma relação entre a dose absorvida e a frequência dos MN. No entanto, o trabalho ainda está em andamento a fim de possibilitar a obtenção de uma curva de calibração dose resposta para esse tipo de radiação para o Laboratório de Dosimetria Biológica do CRCN-NE/CNEN.

## REFERÊNCIAS

- ACHARYA S., SANJEEV G., BHAT N. N., SIDDAPPA K. and NARAYANA Y. The effect of electron and gamma irradiation on the induction of micronuclei in cytokinesis-blocked human blood lymphocytes. *Radiation Environmental Biophys*, 48:197-203, 2009.
- ALMEIDA, P. S.; *Dosimetria Biológica: Avaliação de exposição as radiações ionizantes através de efeitos biológicos induzidos*, 2007.
- ANTUNES, A. C., MARTINS, V., CARDOSO, J., SANTOS, L., and MONTEIRO, G.O., The cytokinesis-blocked micronucleus assay: Dose estimation, and inter-individual differences in the response to  $\gamma$ -radiation. *Mutation Research*, 760:17-22, 2014.
- BRANDÃO, J. O. C., Curva de calibração para dosimetria biológica de campo misto nêutron-gama pelo método citogenético convencional. 2009.
- DA SILVA, M. A. DOSIMETRIA BIOLÓGICA EM PROTEÇÃO RADIOLÓGICA: ELABORAÇÃO DE CURVAS DOSE-RESPOSTA PARA  $^{60}\text{Co}$  e  $^{137}\text{Cs}$ . PhD Thesis. UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 1997.
- DEYLLLOT, M. E. C., Física das radiações : fundamentos e construção de imagens, 1. ed. -- São Paulo : Érica, 2015.
- ECHANIQUE, R. E., DOSIMETRIA RADIOLÓGICA, Edifarm, Primera edición: Quito, 2018.
- FENECH M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, 455:81-95, 2000.
- FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nat. Protoc.* 2, 1084-1104, 2007.
- FERNANDES, T. S. Emprego das aberrações cromossômicas instáveis e micronúcleo no biomonitoramento individual: estudo comparativo [dissertação de mestrado]. *Universidade Federal de Pernambuco. Recife*, 2005.
- FOGAÇA, J. R. V.; Nêutrons, Rev. Redcake alunos on line, 2018. Disponível em: <<https://alunosonline.uol.com.br/quimica/neutrons.html>> acesso em: 11/11/2018.
- FURIERI, R. C. A. A. ; SOUZA, M. I. S. Mapeamento do Fluxo de Nêutrons do Reator Argonauta na Nova Configuração de seu Núcleo, RT-IEN- 11, 2002.
- GAJENDIRAN N., TANAKA K., KUMARAVEL T. S. e KAMADA N. Neutron-Induced Adaptive Response in Go Human Lymphocytes Using the Comet Assay. *Journal of Radiation Research*, (42) 91-101, 2001.
- International Atomic Energy Agency, IAEA *Cytogenetic dosimetry: applications in preparedness for, and response to radiation emergencies*. EPR-Biodosimetry, 2011.
- KöKSAL G, DALCÍ DÖ, and PALA FS. Micronuclei in human lymphocytes: the  $^{60}\text{Co}$  gamma-ray dose-response. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 359(2):151-157, 1996.
- MENDONÇA, J. C., MENDES, M. E., SANTOS, N., & LIMA, F. F., ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS INSTÁVEIS EM LINFÓCITOS HUMANOS IRRADIADOS COM  $^{60}\text{Co}$ , International Nuclear Atlantic Conference - INAC 2013.
- MILL, A. J., WELLS, J., HALL, S. C., & BUTLER, A. Micronucleus induction in human lymphocytes: Comparative effects of X rays, alpha particles, beta particles and neutrons and implications for biological dosimetry. *Radiation research*, 145.5: 575-585, 1996.

MOTTA, A. G. C., **Avaliação Citogenética de Técnicos em Radiologia Expostos Ocupacionalmente à Radiação Ionizante**, Dissertação (mestrado) - Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Genética, Goiânia, 80 f., 2018.

OKUNO, E.; **Efeitos biológicos das radiações ionizantes. Acidente radiológicos de goiânia**, estudos avançados 27 (77), 2013.

OKUNO E.; **Radiação: efeitos, riscos e benefícios**, ed. Oficina de textos, São Paulo, 2018.

OLIVEIRA, L. G., **O papel das duplicações segmentares na formação da variação do número de cópias de novo após a exposição parental a doses baixas de radiação ionizante observadas na geração F1 de indivíduos acidentalmente expostos ao Césio-137** [recurso eletrônico] Dissertação (mestrado) - Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Genética, Goiânia 2018.

POHL-RÜLING, J., **Low level dose induced chromosome aberrations in human blood lymphocytes**. Radiation protection dosimetry, 45(1-4):623-627, 1992.

SOUZA, M. I. S.; FURIERI, R. C. A. A. **Comportamento do Fluxo de Nêutrons Térmicos e Epitérmicos na Saída do Canal J-9 do Reator Argonauta para Obtenção de Imagens Radiográficas**, RT-IEN- 13, 2002.

THIERENS, H., VRAL, A. **The micronucleus assay in radiation accidents**. Annali Dell Istituto Superiore Di Sanita, 45(3):260-264, 2009.

VALENTE, D., COSTA-AMARAL, I. C., CARVALHO, L. V. B. D., SANTOS, M. V. C. D., CASTRO, V. S. D., RODRIGUES, D. D. R. F., ... & MOREIRA, J. C., **Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina**. Revista Brasileira de Saúde Ocupacional, v.42, supl.1, p.1-21, 2017.

VENKATACHALAM, P., SOLOMON, F. P., PRABHU, B. K., MOHANKUMAR, M. N., GAJENDIRAN, N., and JEEVANRAM, R. K. **Estimation of dose in cancer patients treated with fractionated radiotherapy using translocation, dicentric and micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes**. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 429(1):1-12, 1999.

VRAL A., CORNELISSEN M., THIERENS H., LOUAGIE H., PHILIPPÉ J., STRIJCKMANS K., and DE RIDDER, L., **Apoptosis induced by fast neutrons versus <sup>60</sup>Co gamma-rays in human peripheral blood lymphocytes**. Int J Radiat Biol, 73:289-95, 1998.

VRAL A, FENECH M, and THIERENS H **The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionising radiation exposure**. Mutagenesis, 26(1):11-17, 2011.

WUTTKE, Kerstin; MÜLLER, Wolfgang-Ulrich; STREFFER, Christian. **The sensitivity of the in vitro cytokinesis-blocked micronucleus assay in lymphocytes for different and combined radiation qualities**. *Strahlentherapie und Onkologie*, 174.5: 262-268, 1998.