



International Joint Conference Radio 2019

Análise estatística da frequência de micronúcleos em diferentes doses absorvidas de raios gama

Silva¹ L. M., Silva¹ J. C. G., Nascimento^{1,2} A. M., Lima^{1,2} J. C. F., Lima¹ F. F., Mendes¹ M. E., Hwang¹ S.

CRCN/NE, Av. Prof. Luís Freire, 200 - Curado, Recife - PE, 50730-120

UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, 50670-901

fflima@cnen.gov.br

Introdução

Ao atuarem sobre o sistema biológico, as radiações ionizantes alteram o material genético, seja de forma direta, seja de forma indireta através da formação de radicais livres que quebram a fita de DNA (LEMES, 1997). Para a biodosimetria, essas alterações fornecem uma medida do dano e, com isso, tornam-se uma resposta biológica muito sensível à dose absorvida de radiação. A técnica de micronúcleos (MN) com bloqueio da citocinese celular (CBMN - Cytokinesis-Block Micronucleus) é capaz de identificar essas alterações cromossômicas (THIERENS & VRAL, 2009). Os MN são pequenas massas nucleares, revestida por membrana, dispersos no citoplasma linfocitário, separados do núcleo principal. Sua quantidade varia, em relação à dose absorvida pelo indivíduo (FERNANDES, 2005). No caso de acidentes radiológicos em grande escala, estudos realizados por Alexander et al (2007) mostraram real potencial para utilização da técnica de MN em triagem. A frequência de MN encontradas em linfócitos circulantes é convertida em dose absorvida através do uso de curvas de calibração dose-resposta previamente estabelecidas pelo próprio laboratório. Cada ponto da curva de calibração representa uma média da dose absorvida pelos linfócitos irradiados. Isso é aproximado para uma média de dose absorvida de corpo inteiro considerando que os linfócitos são amplamente móveis e distribuídos pelo corpo. Uma vez a curva gerada é estabelecida, é possível estimar a dose absorvida pelo organismo do indivíduo exposto à radiação ionizante (AINSBURY & LLOYD, 2010; ROY et al., 2012). Assim este trabalho propõe a análise estatística das frequências de observadas em pontos que farão parte da curva de calibração dose-resposta de MN para radiação gama do Laboratório de Dosimetria Biológica do Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN/NE).

Metodologia

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. Um voluntário saudável foi selecionado após anamnese, e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Foram coletadas amostras de sangue periférico (10 ml), por coleta de sangue a vácuo. Cada amostra de sangue foi separada em duas alíquotas de 5 ml, sendo uma considerada controle (não irradiada) e mantida à temperatura ambiente do laboratório (20 - 22 °C), e a outra alíquota, considerada amostra irradiada, exposta a uma fonte de ⁶⁰Co (irradiador Gammacel 220) localizada no Departamento de Energia Nuclear (DEN-UFPE) (temperatura da sala de ~22 °C). As amostras foram irradiadas em Kerma no ar e os valores foram convertidos em dose absorvida -através da multiplicação do valor de KERMA no ar por 1,10- a fim de que resulte nas amostras valores de doses de 0,15 a 1,5Gy. Após a irradiação as amostras passaram duas horas em estufa de CO₂ para reparação das células, depois seguiram para a cultura de linfócitos, seguindo as normas descritas no manual da AIEA (2011). O precipitado de células obtido dessa cultura foi ressuspensão e delicadamente gotejado em um ponto na lâmina e 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. A contagem de micronúcleos foi realizada diretamente no microscópio óptico (Leica DM 500). E, ao menos, 2000 células binucleadas viáveis foram contadas. Os

critérios estabelecidos por FENECH (2007) e pela IAEA (2011) foram seguidos a fim de considerar uma célula binucleada como viável. Ao término da contagem das células foram realizados cálculos estatísticos. Como os métodos de ajuste de curva se baseiam em modelos estatísticos de Poisson, se deve verificar se a distribuição de células com MN se ajustam ou não a distribuição de Poisson para cada dose utilizada para compor a curva de calibração por meio do teste u de Papworth (AIEA, 2011; ACHARYA; et. al., 2009). A estatística de teste u é uma unidade normalizada do índice de dispersão (σ^2 / y) onde valores de u superiores a 1,96 indicam sobredispersão significativa e os valores de u < 1,96 indicam a subdispersão significativa (AIEA, 2011).

Resultados

Foram analisadas 18070 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. 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 do rendimento de MN com a dose. Além disso, com o aumento da dose é possível observar a presença de células binucleadas com mais de um MN. Nas doses de 0,15 e 0,5 Gy, nota-se um crescimento na frequência de micronúcleos, sendo observados, ainda em sua maioria 1 por célula. Ao contrário do que é mostrado nas doses de 0,75 e 1,5 Gy, no qual a quantidade de micronúcleos torna-se aumentada, com aparecimento de dois micronúcleos em uma única célula. Na análise estatística do teste u observou-se sobredispersão na maioria das doses testadas de micronúcleos neste trabalho, seguindo os modelos já encontrados na literatura, sendo então o resultado esperado.

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

	Total	MN	Freq	0MN	1MN	2MN	média	SE média	var/méd	SE Var/Med	U
0*	6000	19	0,003	5982	17	1	0,003	0,001	1,1	0,018	5,76
0.15	2000	40	0,020	1961	38	1	0,02	0,003	1,03	0,031	0,977
0.5	2000	94	0,047	1911	84	5	0,047	0,005	1,06	0,031	1,9
0.75	4070	283	0,070	3805	247	18	0,07	0,004	1,06	0,022	2,62
1.5	4000	482	0,121	3554	410	36	0,12	0,005	1,03	0,022	1,3

* referente ao sangue controle, (MN) Número de micronúcleos, (freq) frequência, (SE média) desvio padrão da média, (var/med) índice de dispersão, (SE Var/Med) desvio padrão do índice de dispersão, (U) teste u.

Conclusão

As frequências de micronúcleo relacionadas às doses absorvidas estudadas serão utilizadas na curva de calibração dose-resposta de MN para radiação gama do Laboratório de Dosimetria Biológica do CRCN/NE. A curva será complementada até a dose absorvida de 5Gy.

Referências:

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 γ -radiation. *Mutation Research*, 760:17–22, 2014.

International Atomic Energy Agency, IAEA Cytogenetic dosimetry: applications inpreparedness for, and response to radiation emergencies. *EPR-Biodosimetry*,2011.

KöKSAL G, DALCÍ DÖ, and PALA FS. Micronuclei in human lymphocytes: theCo-60 gamma-ray dose-response. *Mutation Research/Environmental Mutagenesisand Related Subjects*, 359(2):151-157, 1996.

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

VENKATACHALAM, P., SOLOMON, F. P., PRABHU, B. K., MOHANKUMAR, M. N.,GAJENDIRAN, N., and JEEVANRAM, R. K. Estimation of dose in cancer patientstreated with fractionated radiotherapy using translocation, dicentrics andmicronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes. *MutationResearch/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 neutronsversus 60Co 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.