

Como identificar exposições parciais às radiações ionizantes? Proposta de um método citogenético

T. S. Fernandes^{1,2}; E. B. Silva¹, M. M. P. L. Pinto¹, A. Amaral¹, David Lloyd³

¹ Departamento de Energia Nuclear/Laboratório de Modelagem e Biodosimetria Aplicada (LAMBDA), Universidade Federal de Pernambuco, CEP, Recife-PE, Brasil

² Departamento de Biofísica e Radiobiologia/ Laboratório de Biofísica Celular e Molecular / Universidade Federal de Pernambuco, CEP, Recife-PE, Brasil

³ Radiation Protection Division / Health Protection Agency / Chilton, Didcot, OX11 0RQ, UK

thiagosalazar@hotmail.com;

(Recebido em 29 de março de 2013; aceito em 15 de julho de 2013)

Em casos de incidentes radiológicos ou de exposições humanas ocupacionais às radiações ionizantes, a maioria das exposições não é de corpo inteiro, e sim parcial. Neste contexto, se a dosimetria citogenética for empregada, haverá uma subestimação da dose absorvida devido à diluição de células irradiadas com as células não irradiadas. Considerando a exigência normativa da NR 32 – Segurança e Saúde no Trabalho de Serviço de Saúde – que recomenda a dosimetria citogenética na investigação de exposição acidental às radiações ionizantes, faz-se necessário o desenvolvimento de um método que permita a identificação das exposições parciais. Neste sentido, foi simulada uma irradiação parcial do corpo, *in vitro*, na qual 70% da amostra de sangue periférico de um indivíduo saudável foi irradiada com 4 Gy de raios X e misturada com 30% da amostra não irradiada do mesmo doador. Alíquotas das amostras foram cultivadas por 48 e 72 horas. O prolongamento do tempo de cultivo de 48 para 72 horas não alterou significativamente a frequência de dicêntricos. Em contrapartida, quando apenas células em M1 (primeira divisão celular) foram analisadas, observou-se um aumento da frequência de dicêntricos. O prolongamento do tempo de cultura permitiu que as células em atraso mitótico devido à irradiação tivessem tempo suficiente de atingir metáfase, permitindo que os danos fossem visualizados. Os resultados desta pesquisa sugerem o método proposto como ferramenta importante na investigação de exposições individuais, permitindo associar a análise citogenética com o real percentual de células irradiadas, contribuindo significativamente para tomada de decisão em termos de saúde ocupacional.

Palavras-chave: Irradiações parciais, dosimetria citogenética, NR-32.

How to identify partial exposures to ionizing radiation? Proposal for a cytogenetic method

In cases of radiological incidents or in occupational exposures to ionizing radiation, the majority of exposures are not related to the total body, but only partial. In this context, if the cytogenetic dosimetry is performed, there will be an underestimation of the absorbed dose due to the dilution of irradiated cells with non-irradiated cells. Considering the norms of NR 32 – Safety and Health in the Work of Health Service – which recommends cytogenetic dosimetry in the investigation of accidental exposures to ionizing radiations, it is necessary to develop of a tool to provide a better identification of partial exposures. With this aim, a partial body exposure was simulated by mixing, *in vitro*, 70% of blood irradiated with 4 Gy of X-rays with 30% of unirradiated blood from the same healthy donor. Aliquots of this mixture were cultured for 48 and 72 hours. Prolonging the time of cell culture from 48 to 72 hours produced no significant change in the yield of dicentric. However, when only M1 (first division cells) were analyzed, the frequency of dicentric per cell was increased. Prolonging the time of cell culture allowed cells in mitotic delay by irradiation to reach metaphase, and thus provides enough time for the damage to be visualized. The results of this research present the proposed method as an important tool in the investigation of exposed individuals, allowing associating the cytogenetic analysis with the real percentage of irradiated cells, contributing significantly for the decision making in terms of occupational health.

Keywords: Partial irradiations, cytogenetic dosimetry, NR-32.

1. INTRODUÇÃO

A dosimetria citogenética é o padrão-ouro para confirmar suspeitas ou casos reais de exposição ocupacional ou acidental às radiações ionizantes. Diante da importância deste método, a Norma Regulamentadora 32 (NR 32) – Segurança e Saúde no Trabalho de Serviço de Saúde – que estabelece procedimentos a serem seguidos no sentido de garantir a integridade física e mental do trabalhador da área de saúde – recomenda a dosimetria citogenética como uma importante ferramenta na avaliação de exposição individual às radiações ionizantes^{1,2,3}.

Nos ensaios biodosimétricos, a estimativa de dose baseia-se na quantificação de aberrações cromossômicas instáveis (dicêntricos, anéis e fragmentos acêntricos) presentes em linfócitos do sangue periférico, de indivíduos potencialmente irradiados. A dose absorvida é expressa em gray (Gy), sendo geralmente estimada considerando-se uma exposição uniforme ou de corpo inteiro à radiação. Porém, é importante salientar que a maioria dos casos reais de exposições humanas envolve irradiações de partes do corpo. Nas exposições parciais, o indivíduo exposto possui tanto linfócitos irradiados (fração do corpo exposta), quanto não irradiados (fração do corpo não exposta), o que gera uma “diluição” da frequência das aberrações instáveis radioinduzidas⁴.

Sabe-se que os dicêntricos, que são cromossomos que tiveram suas extremidades quebradas pela interação com a radiação ionizante e que se reuniram pelas extremidades adesivas, tendem a se eliminar com o tempo de cultivo celular, devido à passagem dos ciclos celulares⁵. Isso é esperado, pois cada centrômero pode estar orientado para migrar para uma célula-filha diferente, o que geraria uma ponte internucleoplásmica e inviabilizaria a célula. Caso os dois centrômeros apontem para a mesma célula-filha, o dicêntrico é herdado⁶.

Algumas pesquisas evidenciam um aumento da frequência de dicêntricos com o prolongamento do tempo de cultura, principalmente em situações envolvendo irradiações não uniformes ou parciais do corpo. A hipótese mais bem aceita para esse aumento seria a do atraso do ciclo celular por parte das células pertencentes à fração do corpo irradiada^{7,8,9}. Alguns trabalhos relatam um atraso de até 1 hora no processo de divisão celular para cada gray (Gy) de raios X⁸. Esse retardo poderia ser uma resposta ao dano radioinduzido ao DNA, que acarretaria na ativação de processos mediados por vários genes responsáveis pelo controle do ciclo celular, também denominados de pontos de checagem ou “checkpoints”^{9,10}.

Segundo alguns pesquisadores, o atraso mitótico das células irradiadas também poderia ser justificado pela distinta radiosensibilidade (sensibilidade à radiação) que as diferentes populações de linfócitos (Linfócitos T e B) possuem com relação à formação de aberrações cromossômicas^{7,8}. Além do atraso mitótico, metáfases presentes em culturas mais longas tendem a incluir proporcionalmente um número maior de linfócitos B, cuja transformação blastogênica requer a presença dos linfócitos T circulantes que foram inicialmente estimulados pela fitohemaglutinina (PHA)^{8,11}. Há ainda a possibilidade de que haja uma subpopulação dentre os linfócitos T, i.e. CD4 e CD8, que seja mais radiosensível em termos de expressão de aberrações cromossômicas, e mais lenta em resposta a estimulação ao mitógeno, e que, conseqüentemente, seriam visualizados em culturas mais longas contendo os dados radioinduzidos⁸.

De acordo com Hone e colaboradores (2005), essas observações não teriam maiores implicações para a dosimetria citogenética em se tratando de exposições uniformes ou de corpo inteiro. Porém, Heimers e colaboradores (2006) discutem que tais fatores poderiam levar a uma subestimação da dose absorvida em casos de irradiações parciais do corpo. Tendo em vista que exposições não uniformes ou parciais estão associadas à maior parte dos incidentes ocupacionais, torna-se evidente que esse fato deve ser levado em consideração para evitar a subestimação da dose absorvida quando se pretende realizar a dosimetria citogenética³.

Diante disto, nota-se a importância de se avaliar métodos que considerem a diluição das células irradiadas com células provenientes de regiões não irradiadas do corpo, evitando-se assim a subestimação da dose de radiação em casos de irradiações parciais. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a taxa de eliminação dos dicêntricos bem como a possível detecção do real percentual de células irradiadas, após simulação *in vitro* de irradiação parcial de linfócitos humanos, levando em consideração os tempos de cultivo celular de 48 e 72 horas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizada a coleta de 9 mL sangue periférico de um doador saudável por meio de um tubo vacutainer estéril, contendo o anticoagulante heparina (IAEA,2011). As amostragens foram conduzidas com a aprovação do Comitê de Ética para Estudos Voluntários da RPD (Radiation Protection Division) da HPA (Health Protection Agency – Inglaterra) e do Comitê de Ética em Pesquisas Clínicas de Oxfordshire (referência CO2.201).

As amostras foram irradiadas nas instalações do MRC (Medical Research Council) do Campus de Harwell (Chilton, Oxfordshire, Inglaterra). Para as irradiações, foram utilizados raios X obtidos de um acelerador linear da Siemens com taxa de dose de 0,715 Gy/min, 250 kVp e corrente de 14 mA. A dose absorvida foi de 4,0 Gy.

Após a irradiação, as amostras permaneceram num bloco aquecedor a 37 °C por 2 horas no intuito de permitir o tempo fisiológico de reparo celular^{4, 12-15}. A simulação da irradiação parcial foi realizada misturando 70 % da amostra irradiada com dose de 4 Gy com 30 % de uma amostra não irradiada, conforme o esquema da Figura 1.

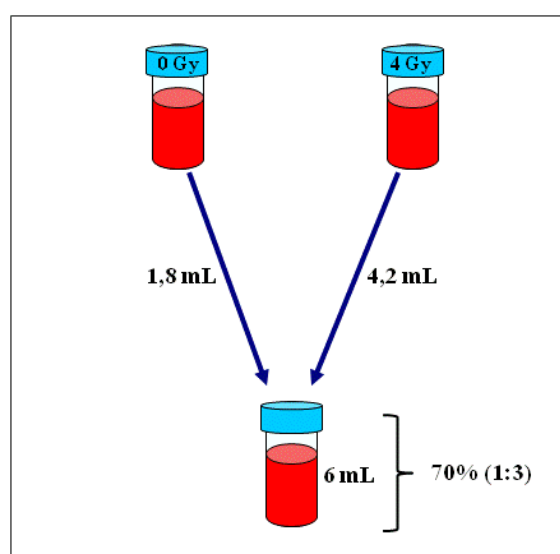


Figura 1: Esquema da simulação de irradiação parcial por meio da mistura das amostras (70% de sangue irradiado com 30% não irradiado).

As amostras foram conduzidas para o Laboratório de Citogenética da RPD/HPA. O meio de cultura utilizado foi o “Meio Essencial Mínimo” (MEM) (Gibco, Reino Unido), contendo 1 mL de solução de antibiótico penicilina e estreptomicina (10.000 µg/mL cada) e 200 mM de L-glutamina. Cada tubo de cultura celular consistiu em 4 mL de meio de cultura MEM, com 20 % (1 mL) de soro fetal bovino e 2 % (0,1 mL) de fitohemaglutinina para estimular a divisão celular (Gibco, EUA). Para a técnica de FPG, que permite a coloração diferencial das cromátides, foi adicionado 5-Bromo-2-dioxiuridina (BrdU) (Sigma, Reino Unido) numa concentração de 20 µM. Em seguida, foram adicionados 0,3 mL de sangue periférico. Por fim, a solução de colcemid (25 µg/mL) em 0,85 % de salina foi acrescida ao meio para a obtenção de células em metáfase (IAEA, 2001). Os tempos de cultura foram 48 e 72 horas, com tempos de adição de colcemid 3 horas antes do término da cultura. As células foram suspensas em meio de cultura por agitação leve e depois transferidas para tubos de centrifuga. Em seguida, as mesmas foram centrifugadas a 300 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspendidas em 6 mL de solução hipotônica de cloreto de potássio (KCl) 0,56%. Em seguida, os tubos foram mantidos por 7 minutos a 37 °C.

Decorrido esse tempo, centrifugou-se novamente as amostras a 300 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células foram suspensas em 6 mL de fixador (metanol:ácido acético 3:1), que foi adicionado lentamente com constante agitação para prevenir que as células formassem grumos.

Os tubos foram novamente centrifugados a 300 x g por 5 minutos e a etapa anterior com o fixador foi repetida mais duas vezes ou até o sedimento se tornar límpido (esbranquiçado), deixando cerca de 1 mL de fixador ao final.

Lâminas envelhecidas por 2 horas em estufa a 60 °C foram coradas pelo método de coloração FPG de acordo com modificações do método descrito por Perry e Wolff (1974), sendo as mesmas lavadas com água destilada e incubadas com 2 a 3 gotas de 0,5 µg/mL de solução Hoechst 33258 (Sigma, Reino Unido). As lâminas foram colocadas sobre uma superfície de folha de alumínio e expostas a lâmpada de ultravioleta (360 nm) por 20 minutos, em câmara escura. As lâminas foram coradas com Giemsa a 5 % em tampão de pH 6,8 por 2,5 a 3 minutos.

O teste t para duas amostras relacionadas foi aplicado, a um nível de significância de 5%, para analisar se as diferenças entre os valores das frequências de aberrações cromossômicas são estatisticamente significativas para cada tempo de cultivo celular avaliado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 2 apresenta as frequências de dicêntricos obtidas para os tempos de cultivo de 48 e 72 horas. A análise estatística (p-valor = 0,43) mostra que não existe diferença significativa, ao nível de 5%, entre as frequências de dicêntricos de M1 e M2, para as culturas de 48 e 72 h (Figura 2A). Em contrapartida, há um aumento de 135 % no número de células em M1 contendo dicêntricos quando a cultura é prolongada de 48 para 72 horas (Figura 2B), fato comprovado pela análise estatística realizada (p = 0,01). Quando não se leva em consideração o número de ciclos celulares pelos quais as células passaram, a análise estatística evidencia não haver diferença estatisticamente significativa (p = 0,26) entre as frequências de dicêntricos nos dois tempos de cultura celular (Figura 2C).

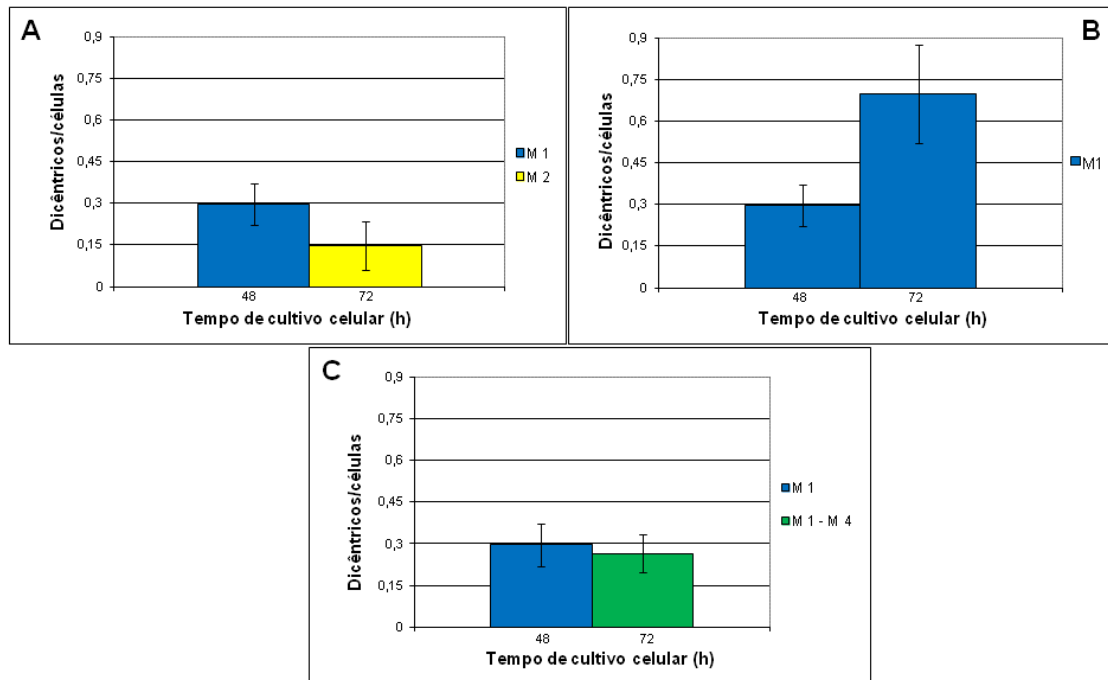


Figura 2: (A) Frequências de dicêntricos em células em M1 e M2; (B) Aumento das frequências de dicêntricos contabilizando apenas células em M1; (C) Frequências de dicêntricos quando contabilizado o 'pool' total de células.

Os resultados dessa pesquisa são compatíveis com estudos prévios da literatura, que evidenciaram uma redução dos dicêntricos a cada ciclo de divisão celular. A explicação para esse fato seria que, para altas doses de radiação (iguais ou superiores a 4 Gy), as células contêm em média 1 dicêntrico e 1 fragmento acêntrico em excesso (além do fragmento associado ao dicêntrico⁵). Isso aumenta a chance de que o fragmento acêntrico seja herdado juntamente com o

dicêntrico. Em dosimetria citogenética, as células em M2 não devem ser contabilizadas, uma vez que “apenas” células em M1 (*i.e.*, com as duas cromátides escuras) são representativas da dose. Essa contaminação da amostra com células pós-M1 em culturas prolongadas foi a maior limitação desse método em particular.

O aumento do número de células em M1 contendo dicêntricos nas culturas de 72 horas está em acordo com os resultados obtidos por de Hone et al. (2005), que demonstraram que as frequências de dicêntricos em células em M1 permanecem constantes até 51 horas, e depois aumentam significativamente após 60 horas. Porém, em termos práticos, percebeu-se na atual pesquisa que este método além de requerer um tempo extra envolvido com a realização da técnica de FPG, requer a procura de células em M1, tornando a análise mais laboriosa, tendo em vista que cerca de 28,47 % das células estavam em M1, 31,12 % em M2, 31,12 % em M3 e 9,27 % em M4. Por outro lado, a vantagem em se detectar o real percentual de células irradiadas justificaria o seu emprego em casos de irradiações parciais.

Quando o número de ciclos celulares não foi levado em consideração na análise citogenética, não foi observada uma redução significativa das frequências de dicêntricos entre os tempos de cultura de 48 e 72 horas. Isto sugere que a redução das frequências de dicêntricos de células em M1 para M2, M3 e M4, é contrabalanceada pelo aumento de células em M1 contendo dicêntricos em culturas prolongadas de 72 horas. Esses resultados confirmam os achados de Boei e colaboradores (1996) e Hone e colaboradores (2005), mas contrariam as observações de Buckton e Pike (1964), Guerrero-Carbajal e colaboradores (1998) e Hoffmann e colaboradores (2002), que verificaram uma diminuição significativa das frequências de dicêntricos quando o número de ciclos celulares não é levado em consideração.

Diante disso, os resultados obtidos nesta pesquisa são consistentes em mostrar que a frequência de aberrações cromossômicas radioinduzidas, quando apenas células em M1 são contabilizadas, aumenta em culturas de 72 horas. Essa influência do tempo de cultura é bem mais acentuada em se tratando de irradiações parciais. Embora o mecanismo molecular não esteja totalmente esclarecido, os dados indicam que nem todas as células em M1 possuem o mesmo peso investigativo nos estudos de exposição às radiações ionizantes⁹.

Estes dados sugerem a necessidade de estabelecer um planejamento estratégico para a avaliação biodosimétrica em casos de irradiações parciais, a partir do prolongamento do tempo de cultivo celular de 48 para 72 horas, com análise exclusiva de células em M1 (Figura 3). Esta proposta metodológica permitiria identificar de forma mais fidedigna o percentual de células irradiadas, por fornecer tempo suficiente para que estas atinjam o estágio de metáfase.

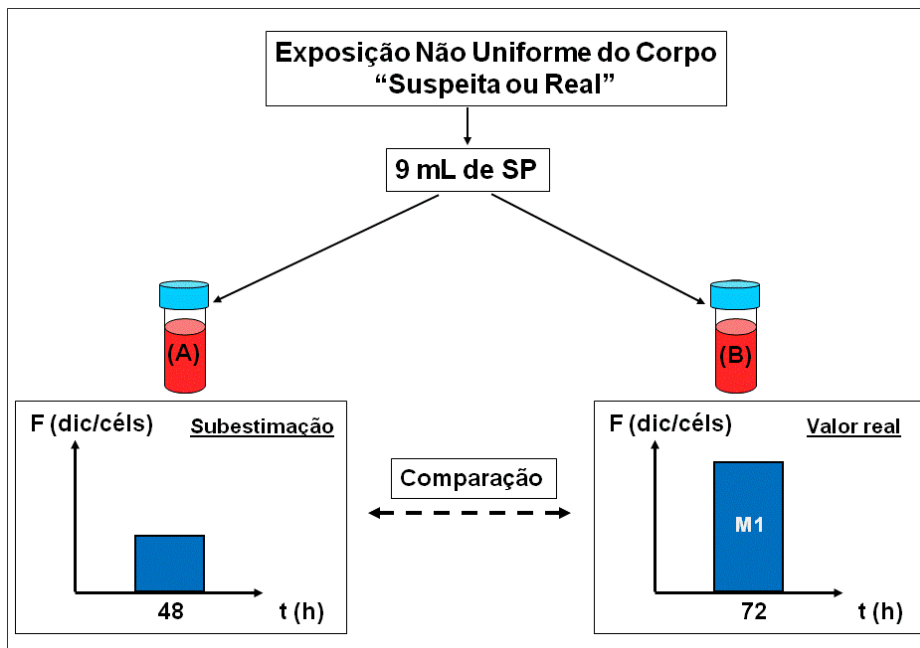


Figura 3: Planejamento estratégico para a identificação de exposições parciais às radiações ionizantes. (F = frequência de dicêntricos por células; t = tempo de cultura em horas).

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesta pesquisa demonstram que, em casos reais ou de suspeita de exposição parcial do corpo humano, a quantificação de dicêntricos em células em primeira divisão (M1) em culturas prolongadas (72 horas) é um método eficaz de detecção da real fração de células irradiadas. Este dado é de grande relevância para o pleno cumprimento da NR 32, tendo em vista que a grande maioria das exposições ocupacionais ocorre de maneira não uniforme ou parcial. Com isso, esta pesquisa fortalece a importância da inclusão de métodos complementares que venham a otimizar a dosimetria citogenética e que forneçam informações acerca de incidentes radiológicos quanto ao tipo de exposição – parcial ou uniforme – objetivando evitar a subestimação da dose absorvida.

5. AGRADECIMENTOS

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro. Ao Departamento de Energia Nuclear (DEN/UFPE) e a Health Protection Agency (HPA), pela disposição dos laboratórios de pesquisa.

-
1. Ministério do Trabalho e Emprego. Portaria GM nº 485. Norma Regulamentadora Nº 32. Segurança e Saúde no Trabalho em Estabelecimentos de Saúde. Diário Oficial da União. Brasília: 11 de novembro de 2005.
 2. PINTO, M. M. P. L.; SANTOS, N. F. G.; AMARAL, A. Current status of biodosimetry based on standard cytogenetic methods. *Radiation Environmental Biophysics*, v. 49, n. 4, 2010.
 3. PINTO, M. M. P. L.; AMARAL, A. Análise citogenética na investigação de incidentes radiológicos. *NewsLab*, ed. 105, 2011.
 4. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA). Cytogenetic dosimetry: applications in preparedness for and response to radiation emergencies. *EPR-Biodosimetry*, 2011.
 5. PALA, F. S.; MOQUET, J. E.; EDWARDS, A. A.; LLOYD, D. C. In vitro transmission of chromosomal aberrations through mitosis in human lymphocytes. *Mutation Research*, v. 474, p. 139-146, 2001.
 6. FENECH, M.; CHANG, W. P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, v. 534, p. 65-75, 2003.
 7. HOFFMANN, G. R.; SAYER, A. M.; LITTLEFIELD, L. G. Higher frequency of chromosome aberrations in late-arising first-division metaphases than in early-arising metaphases after exposure of human lymphocytes to x-rays in G0. *International Journal of Radiation Biology*, v. 78, p. 765-772, 2002.
 8. HONE, P. A.; EDWARDS, A. A.; LLOYD, D. C.; MOQUET, J. E. The yield of radiation-induced chromosomal aberrations in first division human lymphocytes depends on the culture time. *International Journal of Radiation Biology*, v. 81, p. 523-529, 2005.
 9. HEIMERS, A.; BREDE, H. J.; GIESEN, U.; HOFFMANN, W. Chromosome aberration analysis and the influence of mitotic delay after simulated partial-body exposure with high doses of sparsely and densely ionizing radiation. *Radiation and Environmental Biophysics*, v. 45, p. 45-54, 2006.
 10. RIBEIRO, Lucia Regina; SALVADORI, Daisy Maria Fávero; MARQUES, Edmundo Kanan. *Mutagenese Ambiental*. 1. ed. Canoas: Ed. ULBRA, 2003. 355p.
 11. WUTTKE, K.; STREFFER, C.; MÜLLER, W-U. Radiation induced micronuclei in subpopulations of human lymphocytes. *Mutation Research*, v. 286, p. 181-188, 1993.
 12. GUMRICH, K.; VIRSIK-PEUCKERT, R. P.; HARDER, D. Temperature and the formation of radiation-induced chromosome aberrations. I. The effect of irradiation temperature. *International Journal of Radiation Biology*, v. 49, n. 4, p. 665-672, 1986.
 13. VIRSIK-PEUCKERT, R. P.; HARDER, D. Temperature and the formation of radiation-induced chromosome aberrations. II. The temperature dependence of lesion repair and lesion interaction. *International Journal of Radiation Biology*, v. 49, n. 4, p. 673-681, 1986.
 14. KANDA, R.; HAYATA, I. Comparison of the yields of translocations and dicentrics measured using conventional Giemsa staining and chromosome painting. *International Journal of Radiation Biology*, v. 69, n. 6, p. 701-705, 1996.

15. ROY, L.; SOROKINE-DURM, I.; VOISIN, P. Comparison between fluorescence in situ hybridization and conventional cytogenetics for dicentric scoring: a first-step validation for the use of FISH in biological dosimetry. *International Journal of Radiation Biology*, n. 70, p. 665-669, 1996.
16. PERRY, P.; WOLFF, S. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*, v. 258, p. 121-125, 1974.
17. BOEI, J. J. W. A.; VERMEULEN, S.; NATARAJAN, A. T. Detection of chromosomal aberrations by fluorescence in situ hybridization in the first three postirradiation divisions of human lymphocytes. *Mutation Research*, v. 349, p. 127-135. 1996.
18. BUCKTON, K. E.; PIKE, M.C. Time in culture. An important variable in studying in vivo radiation-induced chromosome damage in man. *International Journal of Radiation Biology*, v. 8, p. 439-452, 1964.
19. GUERRERO-CARBAJAL, Y. C.; MOQUET, J. E.; EDWARDS, A. A.; LLOYD, D. C. The persistence of FISH translocations for retrospective biological dosimetry after simulated whole or partial body irradiation. *Radiation Protection Dosimetry*, v. 76, p. 159-168, 1998.