



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE – UFS**

**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA – POSGRAP**

**NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA – NPGFI**

**Dissertação de Mestrado**

**Influência da taxa de dose da radiação beta na *Allium cepa***

por  
Erison Fonseca Dos Santos

São Cristóvão - SE  
Erison Fonseca dos Santos

## **Influência da taxa de dose da radiação beta na *Allium cepa***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Núcleo de Pós- Graduação em Física na Universidade Federal de Sergipe, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Física.

**Orientadora:** Profa. Dra. Susana de Souza Lalic

São Cristóvão - SE  
Janeiro de 2022

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, por me dar forças e discernimento para realizar este trabalho.

À estimada Profa. Dra. Susana Lalic, pela orientação, conselhos e incentivos ao decorrer desta jornada.

À minha avó, Domingas de Oliveira Fonseca, que fez de tudo para que eu pudesse estar aqui hoje, todos familiares (Tias, tios) que tiveram um papel importante na minha formação e a todos familiares que contribuíram de forma motivacional e emocional (mãe, pai e namorada).

À todos os professores da Pós Graduação por me direcionar nas disciplinas cursadas.

A todos os amigos do mestrado, em especial aos da minha turma.

À equipe do Laboratório de Corrosão e Nanotecnologia (LCNT), em especial a Magno Xavier por ajudar a direcionar meus trabalhos e compartilhar seus ensinamentos.

Ao Grupo de Pesquisa Genética e Conservação de Recursos Naturais (GECON).

Aos órgãos de fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Apoio à Pesquisa e à inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (FAPIETC/SE), pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal de Sergipe (UFS), pois sem ela não seria possível a construção deste conhecimento.

E todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente, para minha formação acadêmica.

## RESUMO

Em geral, a estimativa de dose de radiação em indivíduos ocupacionalmente expostos é feita com métodos físicos. Dentre os métodos biológicos para medir a dose de radiação a que um indivíduo foi exposto, está o citogenético. A frequência de aberrações cromossômicas é relacionada com a estimativa de dose absorvida e pode ser realizada tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Estudos com medidas diretas nos seres humanos são inviáveis e o uso de animais também é complicado. Na busca de materiais da biota não humana que forneçam informações sobre efeitos da radiação no meio ambiente e no ser humano surge a cebola (*Allium cepa*). A *Allium cepa* foi escolhida nesse trabalho pois é a planta padrão ouro para a determinação de potenciais agentes químicos genotóxicos. Este trabalho consistiu na irradiação de raízes de cebola (*Allium cepa*) com partículas  $\beta$  de fontes  $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$  com três diferentes taxas de dose ( $7,2 \text{ mGy}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $13,8 \text{ mGy}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $19,5 \text{ mGy}\cdot\text{s}^{-1}$ ) e doses absorvidas de 0,72, 2 e 4 Gy. Todas as três fontes induziram danos nas células com qualquer uma das doses utilizadas, com surgimento de micronúcleos (MN) em número maior do que em células não irradiadas. Taxas de dose diferentes induziram comportamentos diversos na frequência de MN em função da dose absorvida. Amostras que demonstraram um comportamento inesperado, com diminuição da frequência de MN com o aumento da dose, tiveram alterações no Índice Mitótico (IM). Conclui-se que para se usar o comportamento da frequência de MN nas células a *Allium cepa* na avaliação de dose absorvida, é indispensável se analisar também o IM para verificar se não houve morte celular que irá alterar o comportamento gerando falsas avaliações. O aumento da frequência de MN induzidos pela radiação juntamente com a análise de IM dá indícios de que a *Allium cepa* poderá ser usada para demonstrar os efeitos causados por diferentes taxas de dose de radiação beta, podendo contribuir no entendimento de efeitos biológicos induzidos por diferentes taxas de dose, como o que acontece durante o uso da radioterapia flash.

**Palavras-chave:** *Allium cepa*; Biodosimetria; Biota; Micronúcleo; Índice Mitótico

## ABSTRACT

In general, the estimation of radiation dose in occupationally exposed individuals is done with physical methods. Among the biological methods to measure the radiation dose to which an individual has been exposed, there is cytogenetics. The frequency of chromosomal aberrations is related to the estimated absorbed dose and can be performed both in vitro and in vivo. Studies with direct measurements in humans are unfeasible and the use of animals is also quite complicated. In the search for materials from non-human biota that provide information on the effects of radiation on the environment and on humans, the onion (*Allium cepa*) appears. *Allium cepa* was chosen in this work because it is the gold standard plant for the determination of potential genotoxic chemical agents. This work consisted of irradiating onion (*Allium cepa*) roots with  $\beta$  particles from  $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$  sources at three different dose rates ( $7.2 \text{ mGy}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $13.8 \text{ mGy}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $19.5 \text{ mGy}\cdot\text{s}^{-1}$ ) and absorbed doses of 0.72, 2, and 4 Gy. All three sources induced cell damage with any of the doses used, with the appearance of micronuclei (MN) in greater numbers than in non-irradiated cells. Different dose rates induced different behaviors in MN frequency as a function of absorbed dose. Samples that showed an unexpected behavior, with a decrease in the frequency of MN with increasing dose, had changes in the Mitotic Index (MI). It is concluded that to use the behavior of the MN frequency in *Allium cepa* cells in the assessment of absorbed dose, it is essential to also analyze the MI to verify if there was no cell death that will change the behavior generating false assessments. The increase in the frequency of radiation-induced MN together with the MI analysis gives evidence that *Allium cepa* can be used to demonstrate the effects caused by different dose rates of beta radiation, which may contribute to the understanding of biological effects induced by different dose rates, such as what happens during the use of flash radiotherapy.

**Key words:** *Allium cepa*; Biodosimetry; Biota; Micronuclei; Mitotic Index

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> - FLUXOGRAMA PARA ENSAIOS DE LINFÓCITOS. CONDENSAÇÃO CROMOSSÔMICA PREMATURA (PCC), ENSAIO DE ABERRAÇÃO CROMOSSÔMICA DICÊNTRICA DE PROPAGAÇÃO DE METÁFASE (DCA), ENSAIO DE TRANSLOCAÇÃO DE HIBRIDAÇÃO IN SITU DE FLUORESCÊNCIA DE PROPAGAÇÃO DE METÁFASE (FISH) E ENSAIO DE MICRONÚCLEOS DE BLOQUEIO DE CITOCINESE (CBMN). <b>FONTE:</b> ADAPTADA DE UN, 2011. ....	15
<b>FIGURA 2</b> - CÉLULA HUMANA. <b>FONTE:</b> BUSHONG, 2008.....	16
<b>FIGURA 3</b> - FASES DA MITOSE. <b>FONTE:</b> BUSHONG, 2008. ....	17
<b>FIGURA 4</b> – CROMATÍDEOS. <b>FONTE:</b> BUSHONG, 2008.....	18
<b>FIGURA 5</b> – INTERFASE. <b>FONTE:</b> BUSHONG, 2008. ....	19
<b>FIGURA 6</b> – MEIOSE. <b>FONTE:</b> BUSHONG, 2008.....	20
<b>FIGURA 7</b> - CÉLULAS OBSERVADAS EM MICROSCÓPIO ÓPTICO APRESENTANDO MICRONÚCLEOS EM DESTAQUE COM AS SETAS AZUIS. <b>FONTE:</b> O AUTOR. ....	22
<b>FIGURA 8</b> - ESTRUTURA CELULAR. <b>FONTE:</b> TAUHATA ET AL., 2014. ....	23
<b>FIGURA 9</b> - TAXA DE EXPOSIÇÕES A RADIAÇÃO. <b>FONTE:</b> TAUHATA ET AL., 2014. ....	24
<b>FIGURA 10</b> - TIPOS RADIAÇÃO ELETROMAGNÉTICA E ALGUMAS DE SUAS CARACTERÍSTICAS. <b>FONTE:</b> O AUTOR. ....	26
<b>FIGURA 11</b> - INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO COM A MATÉRIA. <b>FONTE:</b> ( <a href="https://opusmedical.com.br/2020/12/09/tipos-de-radiacoes-ionizantes/">HTTPS://OPUSMEDICAL.COM.BR/2020/12/09/TIPOS-DE-RADIACOES-IONIZANTES/</a> , 2021) .....	28
<b>FIGURA 13</b> - CAPELA DE FLUXO LAMINAR UTILIZADA NOS EXPERIMENTOS. <b>FONTE:</b> O AUTOR....	34
<b>FIGURA 14</b> - PLACA DE PETRI COM SEMENTES EM GERMINAÇÃO. <b>FONTE:</b> O AUTOR. ....	35
<b>FIGURA 15</b> - IRRADIADOR SAMARA COM FONTES DE $^{90}\text{Sr}+^{90}\text{Y}$ . <b>FONTE:</b> O AUTOR.....	36
<b>FIGURA 16</b> – RAÍZES CULTIVADAS COLOCADAS EM SUPORTE PARA SEREM IRRADIADAS. <b>FONTE:</b> O AUTOR. ....	37
<b>FIGURA 17</b> - LÂMINAS PREPARADAS COM OS MERISTEMAS APIACAIS (PONTAS DAS RAÍZES) PARA CONTAGEM DE MICRONÚCLEOS. <b>FONTE:</b> O AUTOR.....	40
<b>FIGURA 18</b> -LÂMINAS ARMAZENADAS EM CAIXA APROPRIADA. <b>FONTE:</b> O AUTOR. ....	40
<b>FIGURA 19</b> - LÂMINA PREPARADA COLOCADA NO MICROSCÓPIO ÓPTICO BX51 PARA CONTAGEM DE MICRONÚCLEOS. <b>FONTE:</b> O AUTOR. ....	41

<b>FIGURA 20</b> - FREQUÊNCIA DE CÉLULAS DETECTADAS COM DE MICRONÚCLEOS (MN) NAS AMOSTRAS IRRADIADAS COM A FONTE F2 – EM AZUL COM 1 MN, EM VERMELHO 2 MN, EM LILÁS 3 MN. <b>FONTE:</b> O AUTOR.....	43
<b>FIGURA 21</b> - FREQUÊNCIA DE CÉLULAS DETECTADAS COM MICRONÚCLEOS (MN) NAS AMOSTRAS IRRADIADAS COM A FONTE F3 – EM AZUL COM 1 MN, EM VERMELHO 2 MN, EM LILÁS 3 MN. <b>FONTE:</b> O AUTOR.....	44
<b>FIGURA 22</b> - FREQUÊNCIA DE CÉLULAS DETECTADAS COM MICRONÚCLEOS (MN) NAS AMOSTRAS IRRADIADAS COM A FONTE F1 – EM AZUL COM 1 MN, EM VERMELHO 2 MN, EM LILÁS 3 MN. <b>FONTE:</b> O AUTOR.....	45
<b>FIGURA 23</b> - FREQUÊNCIA DE CÉLULAS COM UM MICRONÚCLEO PARA AS 3 FONTES USADAS. <b>FONTE:</b> O AUTOR.....	52
<b>FIGURA 24</b> - FREQUÊNCIA DE CÉLULAS COM DOIS MICRONÚCLEOS PARA AS 3 FONTES USADAS. <b>FONTE:</b> O AUTOR.....	53
<b>FIGURA 25</b> - NÚMERO DE CÉLULAS COM TRÊS MICRONÚCLEOS PARAAS 3 FONTES USADAS. <b>FONTE:</b> O AUTOR.....	54
<b>FIGURA 26</b> - FREQUÊNCIA DE CÉLULAS DETECTADAS COM MICRONÚCLEOS (MN) NAS AMOSTRAS EM FUNÇÃO DA DOSE DE RADIAÇÃO BETA. <b>FONTE:</b> O AUTOR.....	55
<b>FIGURA 27</b> - SOMA DAS FREQUÊNCIAS DE 1 MN, 2 MN E 3 MN ENCONTRADOS NAS AMOSTRAS IRRADIADAS COM A FONTE F2. <b>FONTE:</b> O AUTOR.....	58
<b>FIGURA 28</b> - SOMA DAS FREQUÊNCIAS DE 1 MN, 2 MN E 3 MN ENCONTRADOS NAS AMOSTRAS IRRADIADAS COM A FONTE F3. <b>FONTE:</b> O AUTOR.....	59
<b>FIGURA 29</b> - SOMA DAS FREQUÊNCIAS DE 1 MN, 2 MN E 3 MN ENCONTRADOS NAS AMOSTRAS IRRADIADAS COM A FONTE F1. <b>FONTE:</b> O AUTOR.....	59

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> - TAXAS DE DOSE DAS FONTES $^{90}\text{Sr}+^{90}\text{Y}$ DO IRRADIADOR SAMARA. AS FONTES FORAM COLOCADAS EM ORDEM CRESCENTE DA SUA TAXA DE DOSE.....	36
<b>TABELA 2</b> - TEMPO DE IRRADIAÇÃO NECESSÁRIO PARA ATINGIR AS DOSES DESEJADAS EM CADA UMA DAS CONFIGURAÇÕES USADAS NO IRRADIADOR SAMARA.....	37
<b>TABELA 3</b> - TESTE TUKEY PARA A FREQUÊNCIA DE 1 MICRONÚCLEOS DAS AMOSTRAS IRRADIADAS COM A F2. CN – CONTROLE NEGATIVO. OS RESULTADOS COM CAMPOS EM DESTAQUE VERMELHO INDICAM QUE HÁ ALTERAÇÕES SIGNIFICATIVAS.....	46
<b>TABELA 4</b> - ÍNDICES MITÓTICOS DAS AMOSTRAS IRRADIADAS COM F2 UTILIZADOS NOS TESTES ANOVA E TUKEY.....	47
<b>TABELA 5</b> - TESTE TUKEY PARA ÍNDICE MITÓTICO DAS AMOSTRAS IRRADIADAS COM A DA F2. CN – CONTROLE NEGATIVO. NENHUM VALOR APARECE EM DESTAQUE, APONTANDO QUE NÃO HÁ DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS AMOSTRAS. ....	47
<b>TABELA 6</b> - TESTE TUKEY PARA A FREQUÊNCIA DE 1 MICRONÚCLEOS DAS AMOSTRAS IRRADIADAS COM A F3. CN – CONTROLE NEGATIVO. OS RESULTADOS COM CAMPOS EM DESTAQUE VERMELHO INDICAM QUE HÁ ALTERAÇÕES SIGNIFICATIVAS.....	48
<b>TABELA 7</b> - ÍNDICES MITÓTICOS DAS AMOSTRAS IRRADIADAS COM F3 UTILIZADOS NOS TESTES ANOVA E TUKEY.....	49
<b>TABELA 8</b> - TESTE TUKEY PARA ÍNDICE MITÓTICO DAS AMOSTRAS IRRADIADAS COM A F3. CN – CONTROLE NEGATIVO. OS RESULTADOS COM CÉLULAS EM DESTAQUE LARANJA INDICAM QUE HÁ ALTERAÇÕES SIGNIFICATIVAS.....	49
<b>TABELA 9</b> - TESTE TUKEY PARA A FREQUÊNCIA DE 1 MICRONÚCLEOS DAS AMOSTRAS IRRADIADAS COM A F1. CN – CONTROLE NEGATIVO. OS RESULTADOS COM CÉLULAS EM DESTAQUE VERMELHO INDICAM QUE HÁ ALTERAÇÕES SIGNIFICATIVAS.....	50
<b>TABELA 10</b> – ÍNDICES MITÓTICOS DAS AMOSTRAS IRRADIADAS COM F1 UTILIZADOS NOS TESTES ANOVA E TUKEY.....	50
<b>TABELA 11</b> - TESTE TUKEY PARA ÍNDICE MITÓTICO DAS AMOSTRAS IRRADIADAS COM A F1. CN – CONTROLE NEGATIVO. ....	51

<b>TABELA 12 - NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA NO TESTE ANOVA PARA O ÍNDICE MITÓTICO DAS AMOSTRAS IRRADIADAS EM CADA UMA DAS FONTES (SE <math>P &lt; 0,05</math> É SIGNIFICANTE).</b> .....	<b>56</b>
--	-----------

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO .....</b>	<b>13</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>14</b>
3.1	CONCEITUANDO A BIODOSIMETRIA .....	14
3.2	ESTRUTURA CELULAR .....	16
3.3	EFEITOS DA RADIAÇÃO IONIZANTE SOBRE A ESTRUTURA CELULAR .....	20
3.4	MICRONÚCLEOS E AVALIAÇÃO DE DANOS CELULARES .....	21
3.5	INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO COM A MATÉRIA .....	24
3.6	CARACTERÍSTICAS DA RADIAÇÃO .....	26
3.7	CONSEQUÊNCIAS DA TAXA DE DOSE .....	28
3.8	DOSIMETRIA BIOLÓGICA ALIADA A DOSIMETRIA FÍSICA .....	29
3.9	MÉTODO DE ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>33</b>
4.1	GERMINAÇÃO.....	33
4.2	IRRADIAÇÃO.....	35
4.3	PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS E CONTAGEM DE MICRONÚCLEOS.....	38
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	42
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>43</b>
5.1	ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS RESULTADOS DAS TRÊS FONTES.....	51
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>61</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os organismos vivos são continuamente expostos a radiações ionizantes, sendo 70% delas de origem natural devido exposição aos raios cósmicos, alimentos, água, ar e o próprio corpo humano (UN, 2011). Apesar dos seres humanos receberem doses diárias de radiações naturais em toda sua existência, está cada vez mais crescente a utilização de outras fontes de radiação ionizante, sejam elas em tratamentos médicos, para gerar energia ou em outras aplicações industriais. Em geral, a estimativa de dose de radiação em indivíduos ocupacionalmente expostos (IOE) é feita com métodos físicos, principalmente usando dosímetros termoluminescentes (TLD) ou de luminescência opticamente estimulada (OSLD). Além da necessidade de se medir constantemente a dose recebida pelos IOE para controle e uso seguro dessas fontes, acidentes podem acontecer e expor pessoas do público que não estão fazendo uso de dosímetros rotineiros. Assim, nessa dosimetria retrospectiva, métodos biológicos também podem ser utilizados, principalmente naqueles que não portavam dosímetros físicos.

A biodosimetria pode ser usada como uma medida da resposta biológica em função da dose de radiação. Desde a ocorrência de acidentes nucleares como o de Fukushima o estudo da biodosimetria foi se tornando cada vez mais importante para se quantificar possíveis doses de radiações, visto que, em grande parte dos casos, as pessoas atingidas pela radiação nem sempre portam um dosímetro físico.

Quando os organismos vivos são expostos a um determinado nível de radiação eles podem ter reações diversas. A princípio, se estivermos tratando de uma radiação não ionizante, são geralmente consideradas menos danosas embora existam controvérsias nesta área, e as pesquisas estão em andamento (BISHT, 2021). Por outro lado, se for um tipo de radiação ionizante, teremos os efeitos mais diversos possíveis. Apesar das radiações ionizantes já serem utilizadas em diversas áreas, ainda não temos um padrão claro do que ocorre com os organismos após uma exposição (RÜHM *et al.*, 2015).

Dentre os métodos biológicos para medir a dose de radiação a que um indivíduo foi exposto, está o citogenético. O método citogenético utiliza as aberrações cromossômicas, que são estruturais instáveis, como dicêntricos e anéis centricos, que são formadas nos linfócitos sanguíneos periféricos que foram expostos á radiação ionizante. Na dosimetria citogenética, a frequência destas aberrações é relacionada com a estimativa de dose absorvida e pode ser realizada tanto *in vitro* quanto *in vivo* (LLOYD e PURROT, 1981; LLOYD *et al*, 1983; RAMALHO *et al.*, 1988, SILVA, 1997, LUDOVICI *et al.*, 2020; LUDOVICI *et al.*, 2021).

Infelizmente, medidas diretas nos serem humanos são bastante complicadas ou inviáveis. O uso de animais também tem sido cada vez mais inibido. A Agência Internacional de Energia Atômica, IAEA (acrônimo do inglês, International Atomic Energy Agency), está em busca de materiais da biota não humana (non-human biota) que forneçam informações sobre efeitos da radiação no meio ambiente e no ser humano (IAEA, 1992).

Apesar da existência de diversos avanços na ciência, o quantitativo de estudos referentes aos efeitos da radiação ionizante no corpo humano é limitado, exatamente pela dificuldade dos experimentos com pessoas. Em via de regra, os dados disponíveis são referentes às estatísticas de acidentes nucleares, que correspondem, na maioria das vezes, a eventos de exposições de grandes doses. Os efeitos de baixas doses são ainda muito controversos com escassez de dados (LUDOVICI *et al.*, 2022).

Alterações biológicas mensuráveis podem ser usadas como bioindicadores em estágios iniciais de uma doença e poderiam ser usados também para avaliar efeitos de baixas doses de radiação. Biomarcadores citogenéticos, por exemplo, são usados na avaliação dos danos às células (GERHARDT, 2002; EL SHAHABY *et al.*, 2003). Há a possibilidade de se utilizar plantas para se determinar alterações ambientais e fazer previsões de risco. Podemos usar seus biomarcadores citogenéticos e correlacioná-los a semelhança com as respostas das biotas humanas.

Atualmente, a cebola (*Allium cepa*) é a planta padrão ouro para a determinação de potenciais agentes químicos genotóxicos, sendo utilizada numa triagem rápida de vários contaminantes ambientais (FISJESJO, 1985; LEME & MARIN-MORALES, 2009). As raízes dessa planta costumam ser cultivadas sob exposição a uma substância de

interesse, proporcionando ao pesquisador um modelo *in vivo* (BOSIO & LAUGHINGHOUSE IV, 2012; SOUZA et al., 2017; MANGALAMPALLI et al., 2018).

A biodosimetria, que é um dos fundamentos desse trabalho, consiste no uso de qualquer alteração biológica identificada em um organismo irradiado que possa ser suficientemente quantificada para indicar a dose de radiação recebida pelo mesmo. Ela se divide em duas grandes áreas, a parte geral que está diretamente ligada as alterações da radiação no DNA (acrônimo do inglês para *DeoxyriboNucleic Acid*) e a citogenética diretamente relacionada as alterações celulares, sendo o foco de estudo desse trabalho a parte citogenética. Estabelecer um padrão de efeitos de baixas doses de radiações é algo complexo até mesmo em biotas, já que cada uma tem sua própria radiosensibilidade que algumas vezes diferem muito do tecido humano. A frequência de micronúcleos (MN) é um dos métodos mais utilizados para quantificar células danificadas. Uma alta frequência de micronúcleos é uma indicação preliminar de um fator de risco (EASTMOND & TUCKER, 1989; IAEA, 2001; IAEA, 2011)

Nesse trabalho optou-se por trabalhar com a biodosimetria utilizando células de cebola (*Allium cepa*) como biota vegetal. Para analisar esses efeitos foi a escolhida pelo fato de ser mais simples e rápida, MN são fáceis de identificar e não requerem um trabalho muito especializado (VAIJAPURKAR et al., 2001) e a *Allium cepa* é indicador universal de efeitos de agentes genotóxicos para o meio ambiente e para a saúde humana com uma resposta de 71,0% a 91,5% concordante com células de mamíferos (GRANT, 1978; GRANT, 1982; GROVER et al., 1990; LEME, MARIN-MORALES, 2009). Isso nos proporciona a oportunidade de fazer testagens das mais diversas com efeitos de radiação sem comprometimento ético do uso de biota animal.

Ao longo deste trabalho haverá mais seis capítulos, sendo eles citados a seguir, sequencialmente: O objetivo, o Referencial teórico contendo a síntese da teoria utilizada para desenvolver esta pesquisa, a Metodologia utilizada para se extrair os resultados, os Resultados obtidos, as Conclusões e, por fim, as Perspectivas que poderão ser incorporadas na continuidade deste trabalho.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desse trabalho foi determinar a frequência de micronúcleos em raízes de cebola (*Allium cepa*) induzidos por fontes emissoras de radiação beta ( $^{90}\text{Sr}+^{90}\text{Y}$ ) e verificar se há uma relação direta entre essa frequência e a dose e/ou taxa de dose da fonte.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Irradiar raízes de *Allium cepa* com diferentes doses e taxas de dose de uma fonte de radiação beta ( $^{90}\text{Sr}+^{90}\text{Y}$ );
- Contar a frequência e verificar possíveis alterações no número de micronúcleos (MN) induzidos nas células de *Allium cepa* após exposição à radiação beta ( $^{90}\text{Sr}+^{90}\text{Y}$ );
- Verificar possíveis alterações do Índice Mitótico (IM) das células de *Allium cepa* causados devido exposição a radiação beta ( $^{90}\text{Sr}+^{90}\text{Y}$ ) e sua influência no comportamento da frequência de MN;
- Comparar os dados obtidos de MN e IM obtidos com diferentes doses e taxas de dose beta ( $^{90}\text{Sr}+^{90}\text{Y}$ ), determinando a possibilidade de usar a *Allium cepa* como um bioindicador para esse tipo de radiação.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 CONCEITUANDO A BIODOSIMETRIA

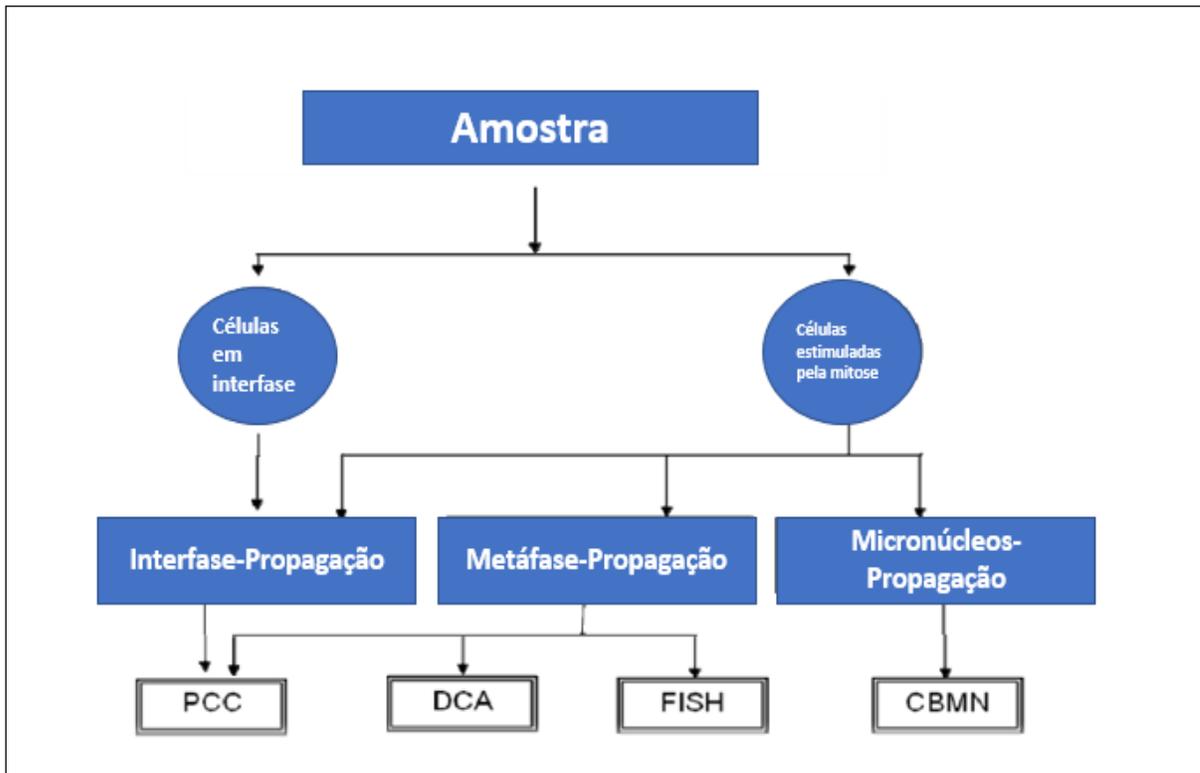
A biodosimetria baseada em análise de cromossomos disentéricos vem sendo utilizada desde os meados de 1960. Os anos seguintes trouxeram evoluções de técnicas sendo utilizadas em programas de proteção contra radiações produzidas por países que produzem e armazenam armas nucleares. A dosimetria biológica utilizando danos cromossômicos ou biomarcadores é muito importante, visto que, ao contrário da medida física da dose, leva em consideração a variação interindividual na suscetibilidade (UM, 2011).

Bem se sabe que a exposição a altas doses de radiação induzem ao aumento de risco de câncer, por outro lado existem questões importantes que precisam ser estudadas quanto a exposições de baixas doses (RÜHM et al., 2015). E esse tem sido o grande foco do estudo da biodosimetria utilizando danos com biomarcadores, dentre eles o que tem levado maior destaque é o citogenético. Esses questionamentos incluem: Os tecidos diferem em sua radiosensibilidade? A relação de resposta a dose em baixas doses? E afeta o risco de câncer e outras doenças? (HALL *et al.*, 2017).

Por muito tempo o ensaio disentérico usando linfócitos sanguíneos era o único método de dosimetria biológica disponível, e ainda hoje é a técnica mais utilizada. As aberrações cromossômicas também podem ser observadas em outras células, como fibroblastos de pele e células epiteliais bucais. No entanto hoje existe uma série de outras técnicas: micronúcleos, translocações e aberrações cromossômicas, que também podem ser analisados em linfócitos (UN, 2011), sendo a técnica de micronúcleos adotada neste trabalho.

A Figura 1 esquematiza as possibilidades atuais para ensaios de uma amostra de linfócitos de sangue periférico. Esses ensaios são a aberração cromossômica citogenética, mais conhecida como condensação cromossômica prematura (PCC), ensaio de aberração cromossômica dicêntrica de propagação de metáfase (DCA), ensaio

de translocação de hibridação *in situ* de fluorescência de propagação de metáfase (FISH) e ensaio de micronúcleos de bloqueio de citocinese (CBMN), que foi desenvolvido neste trabalho de forma equivalente para um bioindicador vegetal, a cebola (*Allium cepa*).

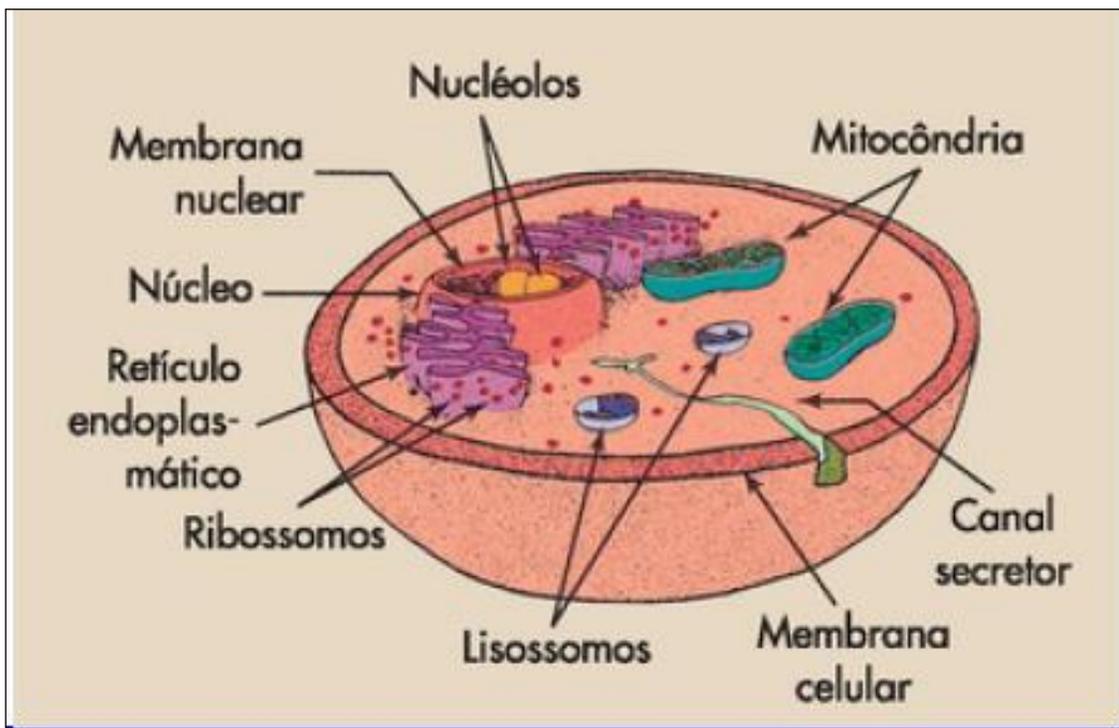


**Figura 1** - Fluxograma para ensaios de Linfócitos. Condensação cromossômica prematura (PCC), ensaio de aberração cromossômica dicêntrica de propagação de metáfase (DCA), ensaio de translocação de hibridação *in situ* de fluorescência de propagação de metáfase (FISH) e ensaio de micronúcleos de bloqueio de citocinese (CBMN). **Fonte:** Adaptada de UN, 2011.

A IAEA vem mantendo um desenvolvimento de longa data na dosimetria biológica. Esta associação vem passando por séries de pesquisas e treinamentos regionais e internacionais, e conseqüentemente, patrocinando pesquisas com oferecimento de bolsas e equipamentos laboratoriais que visem estabelecer o desenvolvimento de pesquisas relacionadas a dosimetria biológica (UN, 2011). A partir desses dados coletados, são construídos manuais de orientação sobre a dosimetria biológica, que vem contribuindo para o desenvolvimento de pesquisas em grandes centros.

### 3.2 ESTRUTURA CELULAR

As células humanas são formadas de combinações de estruturas complexas, que garantem o desenvolvimento e funções celulares adequadas. As duas estruturas principais da célula humana são: o núcleo e o citoplasma. O núcleo é caracterizado pela presença do DNA, o material genético da célula, enquanto o citoplasma forma maior parte da célula com grande quantidade dos compostos moleculares (BITELLI, 2006). A Figura 2 ilustra os principais componentes da célula humana.

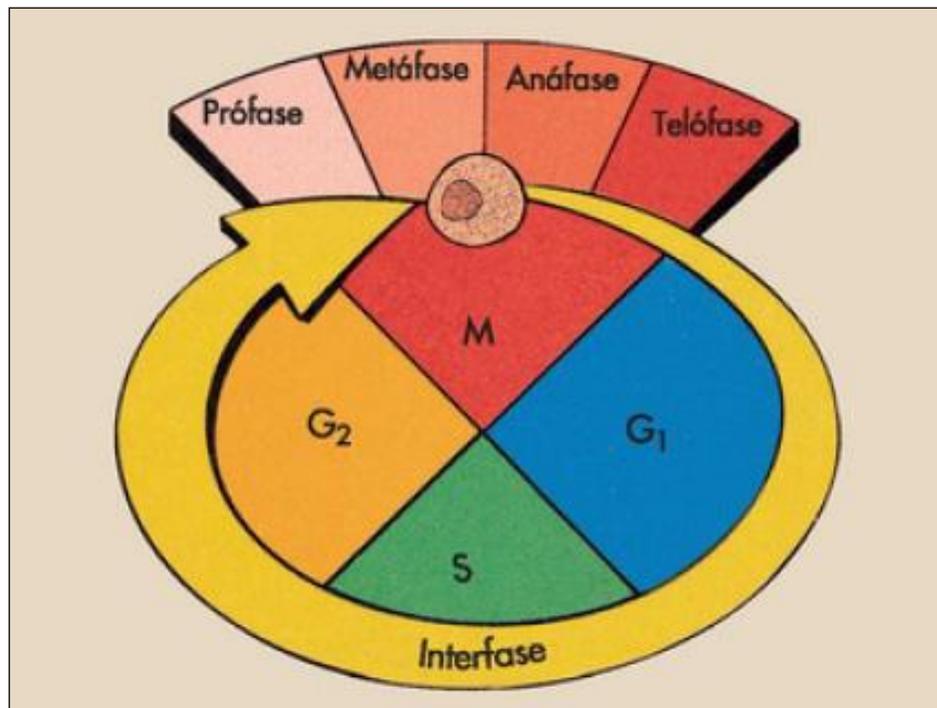


**Figura 2** - Célula humana. **Fonte:** BUSHONG, 2008.

Contextualizando as principais estruturas, as mitocôndrias são grandes estruturas responsáveis pela produção de energia. As estruturas em forma de ponto são os ribossomos, nos quais ocorrem a síntese de proteínas e os sacos em forma de ervilha são os lisossomos, os quais contêm enzimas capazes de digerir fragmentos celulares e se necessário até a própria célula (BUSHONG, 2008).

Toda célula humana tem uma função específica, dentre elas temos as células neurais, células sanguíneas e células musculares, que estão o tempo todo se reproduzindo. No nosso corpo existem dois tipos de células, as somáticas e as germinativas, sendo a mitose a divisão e proliferação das células somáticas enquanto a meiose é a divisão e proliferação das células germinativas (BITELLI, 2006).

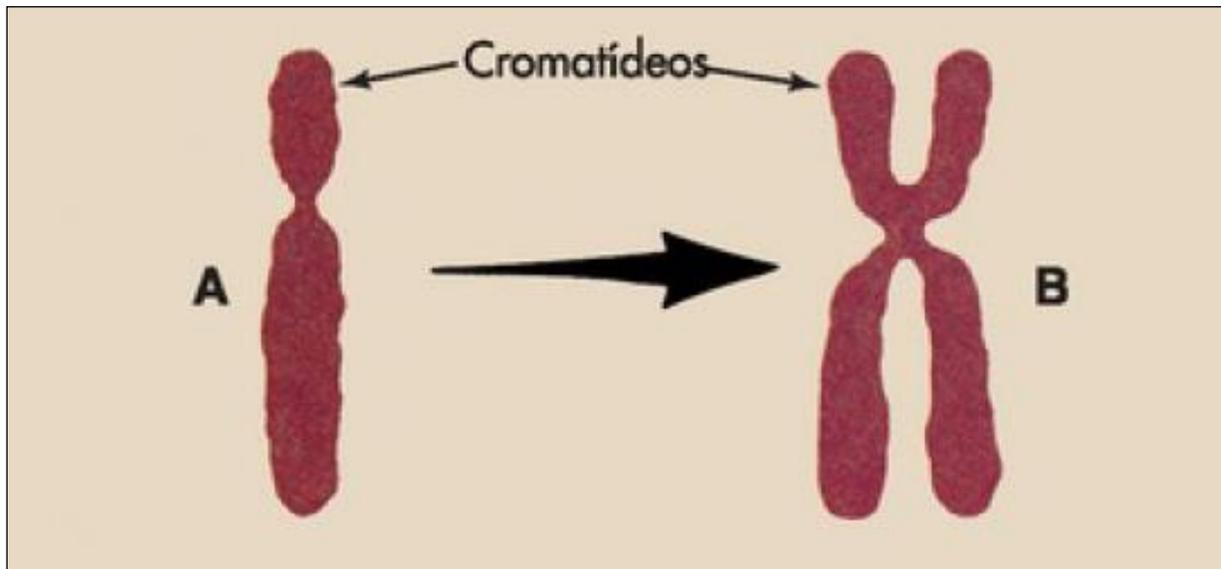
O ciclo celular de mitose acompanha vários estágios de crescimento e divisão da célula, que podem ser observados na Figura 3.



**Figura 3** - Fases da mitose. **Fonte:** BUSHONG, 2008.

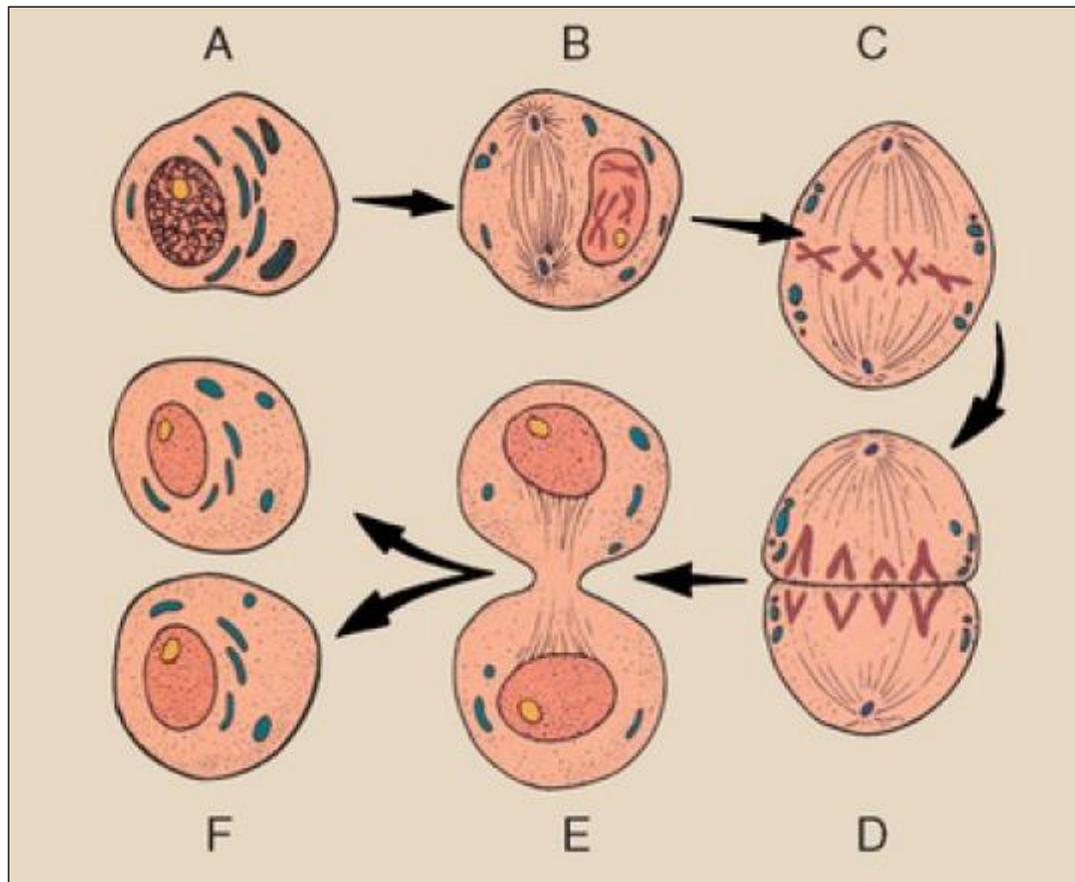
A mitose é a fase em que a célula se divide, sendo subdividida em quatro fases: prófase, metáfase, anáfase e telófase. A parte entre os eventos mitóticos é chamada de interfase, a qual ocorre o crescimento da célula entre as divisões. As fases M, G<sub>1</sub>, S e G<sub>2</sub> são caracterizadas pela estrutura do cromossomo, contendo DNA. Durante a fase S de síntese do DNA, cada molécula de DNA é replicada em duas moléculas filhas de DNA idênticas (BUSHONG, 2008).

Na fase S, os cromossomos são transformados em uma estrutura de dois cromátídeos ligados em um centrômero em uma estrutura contendo quatro cromátídeos ligados a um centrômero. Esse processo origina dois pares de cromátídeos homólogos, com mesmos conteúdos e estrutura de DNA (BUSHONG, 2008).



**Figura 4** – Cromátídeos. Fonte: BUSHONG, 2008.

Durante a fase e interfase os cromossomos não são visíveis, porém durante a fase de mitose é possível a observação por meio de um microscópio das fases na Figura 5.

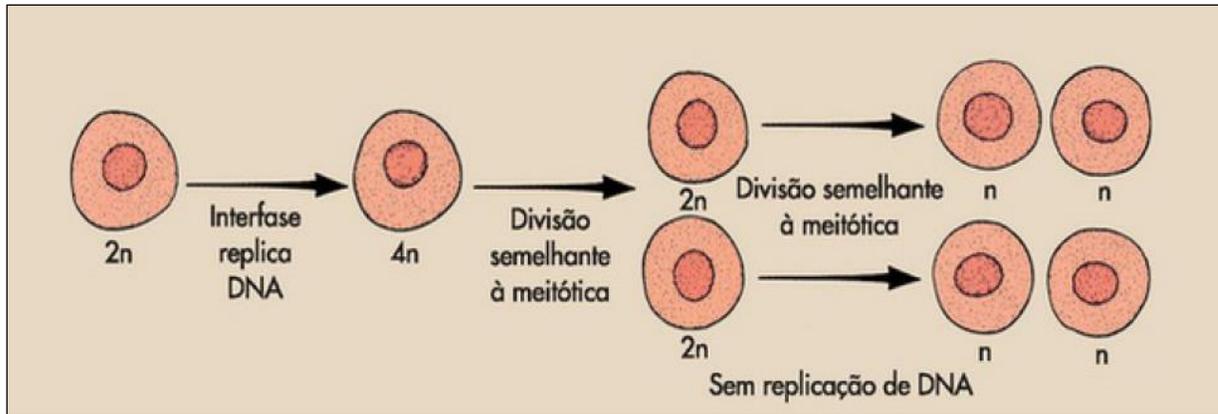


**Figura 5** – Interfase. **Fonte:** BUSHONG, 2008.

Durante a prófase, o volume do núcleo aumenta, e o DNA se torna mais proeminente e começa a assumir forma estrutural. Na metáfase, os cromossomos ficam mais visíveis, durante a metáfase a mitose pode ser interrompida e os cromossomos podem ser analisados detalhadamente com uso de um microscópio. A anáfase é caracterizada pela separação de cada cromossomo no centrômero, enquanto a telófase é a última fase da mitose, sendo caracterizada pelo desaparecimento dos cromossomos estruturais no DNA e o fechamento da membrana nuclear (BUSHONG, 2008).

E por fim, temos a meiose que não consiste no foco de estudo deste trabalho, porém, é caracterizada pelo processo de divisão das células germinativas, que apresentam inicialmente um número de cromossomos igual ao das células somáticas. No entanto, para que a célula germinativa seja capaz de se ligar a uma outra célula germinativa, os seus cromossomos devem ser reduzidos à metade, ou seja, 23

cromossomos, de forma que após ligação das duas células germinativas, as células filhas terão também 46 cromossomos.



**Figura 6** – Meiose. Fonte: BUSHONG, 2008.

### 3.3 EFEITOS DA RADIAÇÃO IONIZANTE SOBRE A ESTRUTURA CELULAR

Efeitos da radiação ionizante sobre organismos vivos vêm sendo observados pela humanidade desde a descoberta dos raios X por Wilhelm Conrad Roentgen em seus experimentos (ATTIX, 1986). Desde então, acidentes nucleares foram surgindo e efeitos adversos foram catalogados, servindo de apoio para o estudo sobre altas doses de radiações ionizantes até os dias atuais. No entanto, estudos mais recentes comprovam que a radiação ionizante pode interagir diretamente com componentes celulares do DNA, proteínas e lipídios, provocando ações estruturais. É o chamado efeito direto constituindo 30% dos efeitos da radiação ionizante (BITELLI, 2006).

As radiações ionizantes provocam nas células uma série de respostas que podem levá-las ou não à morte celular. Essas respostas, na maioria das vezes, estão ligadas diretamente a modificações no DNA, sendo um dos alvos mais importantes para os efeitos citotóxicos da radiação, quebra cromossômicas e, conseqüentemente, os consecutivos rearranjos, dando origem a formação de fragmentos e anéis que se tornam

um bom parâmetro de dosimetria biológica após exposições acidentais de radiação (SINGH *et al.*, 2005).

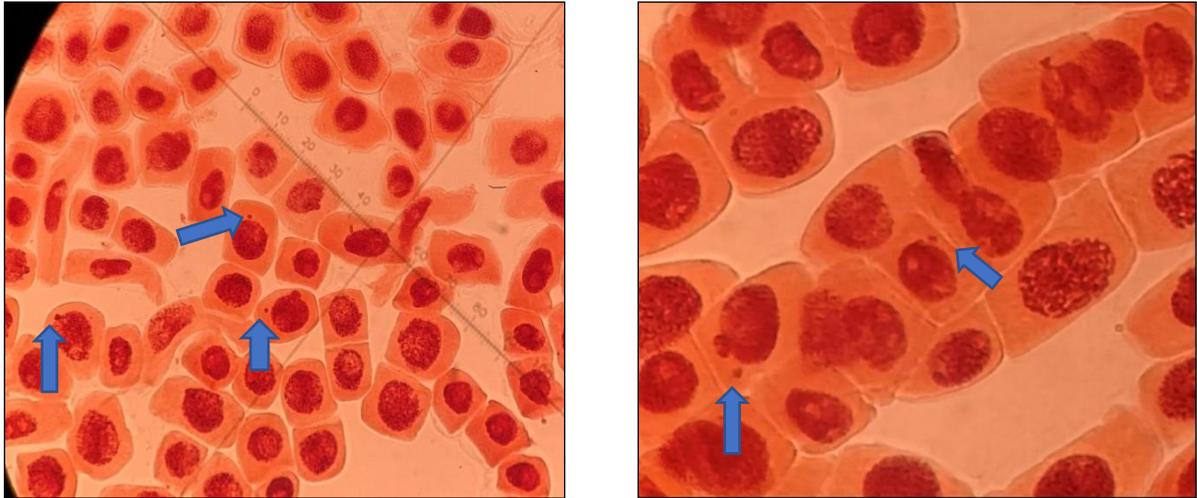
Após efeitos da radiação ionizante as células provavelmente terão algum tipo de resposta já mencionada, que possuem várias vias de respostas, entre elas a capacidade de reparo retomando ao estado saudável da célula (GOMES *et al.*, 2019). Quando tais reparos são malsucedidos, uma alternativa para manutenção da homeostasia é apoptose, caracterizada como morte celular. A apoptose é um mecanismo que remove as células durante o desenvolvimento. Ela é um tipo de morte celular programada, diferindo da necrose, em que as células morrem por causa de uma lesão. A apoptose elimina as células potencialmente cancerosas e infectadas mantendo o equilíbrio no corpo. Pode ser que ocorra também um outro tipo de morte celular, a clono gênica ou falência reprodutiva, onde a célula permanece morfolologicamente íntegra. No entanto, a célula perde a sua capacidade de divisão celular (BITELLI.,2006). O tipo de morte clono gênica pode estar mais associado aos efeitos tardios que a radiação pode causar, devido ao fato de momentaneamente as células continuarem morfolologicamente íntegras, porém, apresenta alterações não identificáveis no momento.

### **3.4 MICRONÚCLEOS E AVALIAÇÃO DE DANOS CELULARES**

Ao se falar em análise citogenética devido a exposições a radiação, são usualmente utilizadas técnicas de análise de aberrações cromossômicas por serem mais confiáveis. Atualmente, tal técnica vem sendo substituída pela técnica de análise de micronúcleos, por consistir de um método simples e rápido, pois MN são fáceis de identificar e não exigem um treinamento muito específico (VAIJAPURKAR *et al.*, 2001; ROBERTS *et al*, 1986).

Segundo (VAIJAPURKAR *et al.*, 2001), micronúcleos são originados a partir de elementos excêntricos da cromatina, formados pela fragmentação de cromossomos, ou cromossomos inteiros, que não são incluídos nos núcleos filhos durante a divisão mitótica. De forma resumida, MN consistem na demonstração de danos não reparados

ou mal reparados, sendo expostos em células filhas tendo as mesmas características, porém com tamanho reduzido (SINGH *et al.*, 2005)



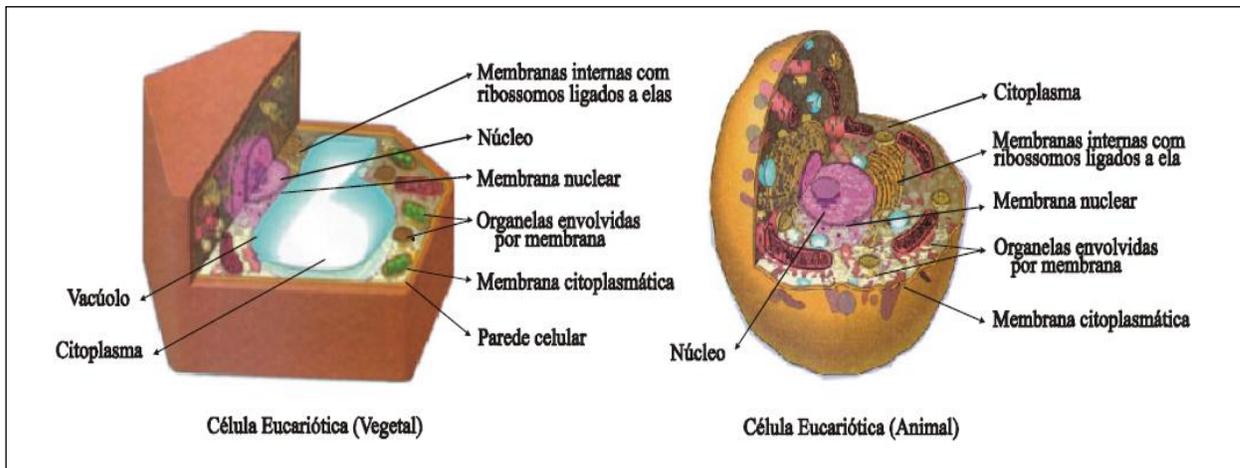
**Figura 7** - Células observadas em microscópio óptico apresentando micronúcleos em destaque com as setas azuis. **Fonte:** O autor.

Plantas tem sido continuamente utilizada como modelos genéticos para testes citogenéticos. Entre as espécies biológicas, a cebola (*Allium cepa*) demonstra ser um bom bioindicador para estimacão de dose de radiação devido a sua grande sensibilidade a radiações e produtos químicos (LEME; MARIN-MORALES, 2008) além de seu baixo custo e facilidade de manuseio e não requerem preparações previas das amostras testadas (LUDOVICI *et al.*, 2020).

Segundo (BOLSUNOVSKY *et al.*, 2019) é conveniente utilizar sementes por serem biologicamente dormentes e geneticamente e fisiologicamente uniformes. Além disso, ela tem a vantagem de não necessitar da adição de sistemas metabólicos exógenos. Mesmo apresentando baixas concentrações de oxidase e uma limitação na especificação do substrato em relação a outros organismos, apresenta resultados consistentes que podem servir de base em estudos de outros organismos, já que o alvo de estudo é o DNA, presente em todos os organismos (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Embora as células apresentem diferenças nas suas estruturas, as células animais e vegetais apresentam estruturas em comum. Dessa forma elas são envolvidas por uma

membrana citoplasmática e contêm, na maioria dos casos, um núcleo facilmente identificável (TAUHATA *et al.*, 2014). Por esse motivo as células vegetais podem ser utilizadas para análises citogenéticas que irão gerar respostas semelhantes às células animais.



**Figura 8** - Estrutura celular. **Fonte:** TAUHATA *et al.*, 2014.

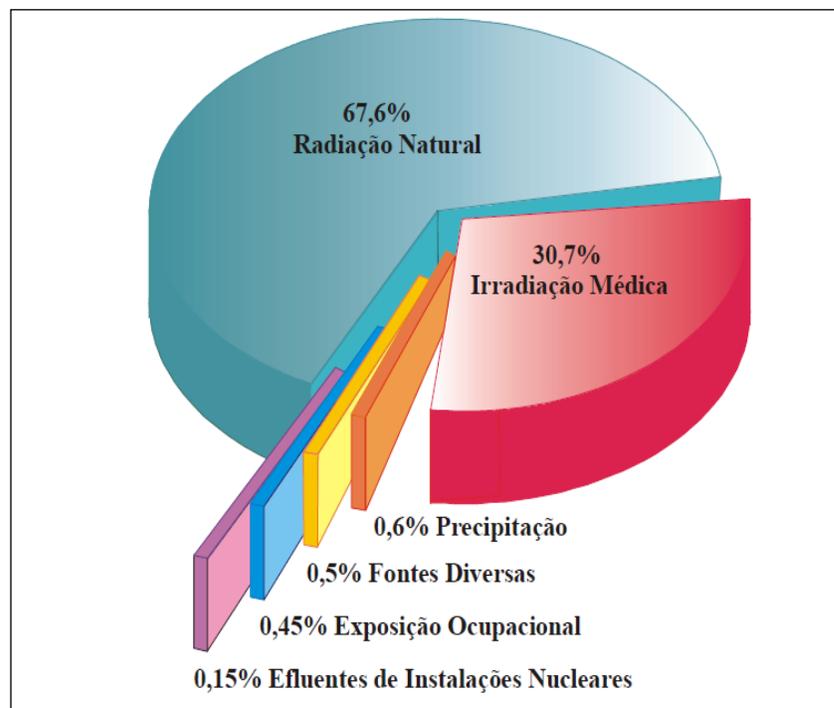
Além das alterações cromossômicas e micronúcleos, o índice mitótico (IM) tem sido utilizado em conjunto. O índice mitótico é nada menos que o número de células em divisão em relação ao número total de células. Alterações tanto no aumento do IM como na sua redução podem indicar, dependendo do sistema analisado e do tipo de agentes externos que interferiram (XAVIER *et al.*, 2021). A radiação poderia impedir que o DNA se replicasse corretamente, pois pode danificar o DNA de maneira tão severa que a célula irá morrer. Em geral, uma célula morta não é um grande problema, pois milhões delas morrem todos os dias em nossos corpos. Mas se muitas células morrem ao mesmo tempo, o organismo também pode morrer. Mas, a radiação também pode danificar sistemas celulares críticos e, às vezes, pode até levar ao câncer.

A diminuição do índice mitótico de células meristemáticas da cebola (*Allium cepa*), quando comparados aos ensaios de controle negativo, pode resultar em alterações decorrente da ação química do crescimento e desenvolvimento de organismos expostos, enquanto o aumento do índice mitótico quando comparado as amostras de controle

negativo, pode se considerar um crescimento desordenado das células sendo propenso a formação de tecidos tumorais (MIDANDER; RÉVÉSZ, 1980).

### 3.5 INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO COM A MATÉRIA

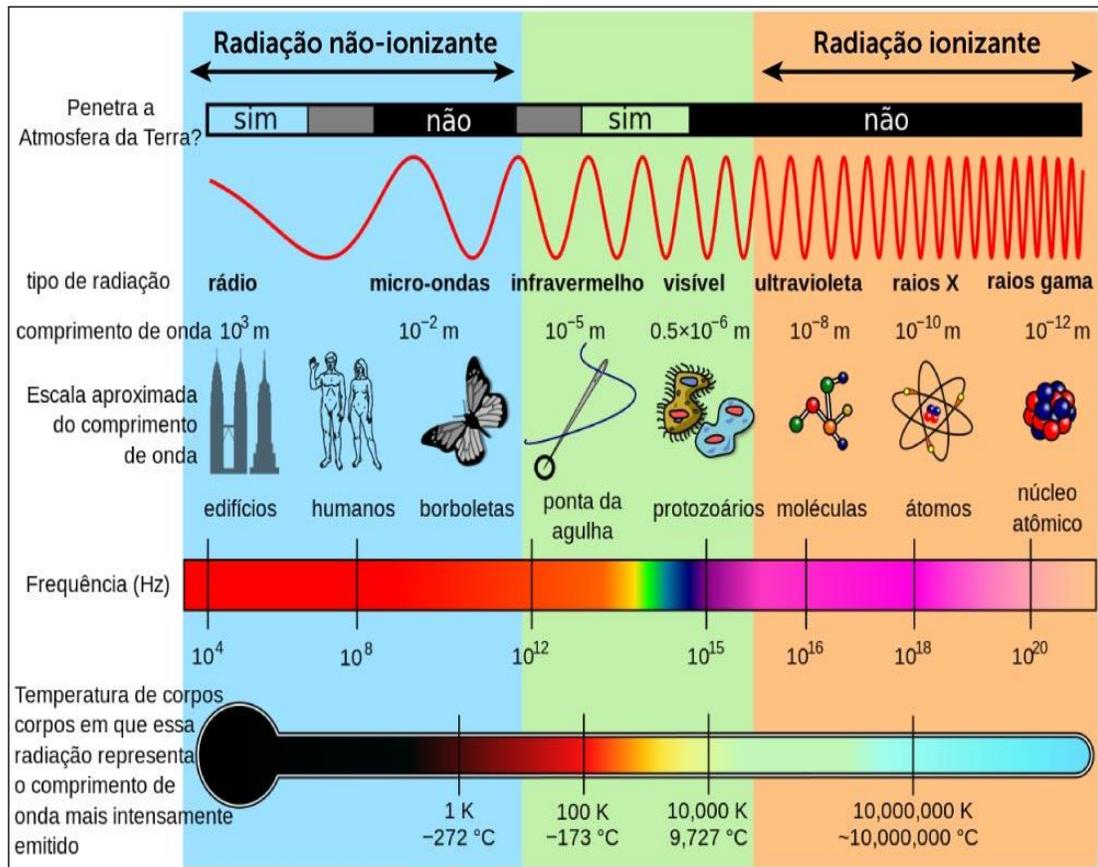
Os seres humanos são continuamente expostos a radiações ionizantes, sendo 70% dessa exposição proveniente de fontes naturais devido a exposição de raios cósmicos que são partículas altamente energéticas na ordem de centenas de MeV a GeV, alimentos, água, ar e o próprio corpo humano. A quantidade de radiação aumenta com a altitude e longitude. Os habitantes de regiões polares são mais expostos que as pessoas de regiões equatoriais (TAUHATA *et al.*, 2014). Os outros 30 % são provenientes de tratamentos de irradiações médicas como mostra a Figura 9.



**Figura 9** - Taxa de exposições a radiação. **Fonte:** TAUHATA *et al.*, 2014.

Quando organismos vivos são expostos a níveis de radiação, eles sofrem reações diversas. Ao se tratar de radiações não ionizantes, em alguns casos, podem causar danos tão maléficos quanto a radiação ionizante, embora seus efeitos ainda não sejam totalmente claros na literatura (BISHT, 2021). No entanto, se estivermos tratando de um tipo de radiação ionizante, teremos os mais diversos efeitos até mesmo o possível desenvolvimento de tumores. Embora as radiações ionizantes atuam de forma diferente ao tecido biológico, existem fatores que podem diferenciar esses tipos de radiação, eles são: Massa, Energia, Velocidade, Carga e Origem

A Figura 10 ilustra os principais tipos de radiações eletromagnéticas ionizantes e não ionizantes presentes no cotidiano. As radiações não ionizantes têm papel fundamental na vida humana como: aquecer alimentos no interior de um aparelho de micro-ondas, iluminar um ambiente com luz visível, fazer o tratamento de inflamações em músculos e articulações utilizando o ultravioleta e infravermelho, dentre outras utilidades. Já as radiações ionizantes são constantemente utilizadas em tratamentos de câncer, realização de exames de imagem como: radiografia e tomografia, esterilização de alimentos e objetos hospitalares. Se utilizadas corretamente, podem ser extraídos vários efeitos benéficos a vida humana (DOROW, MEDEIROS,2019).



**Figura 10** - Tipos radiação eletromagnética e algumas de suas características. **Fonte:** O autor.

### 3.6 CARACTERÍSTICAS DA RADIAÇÃO

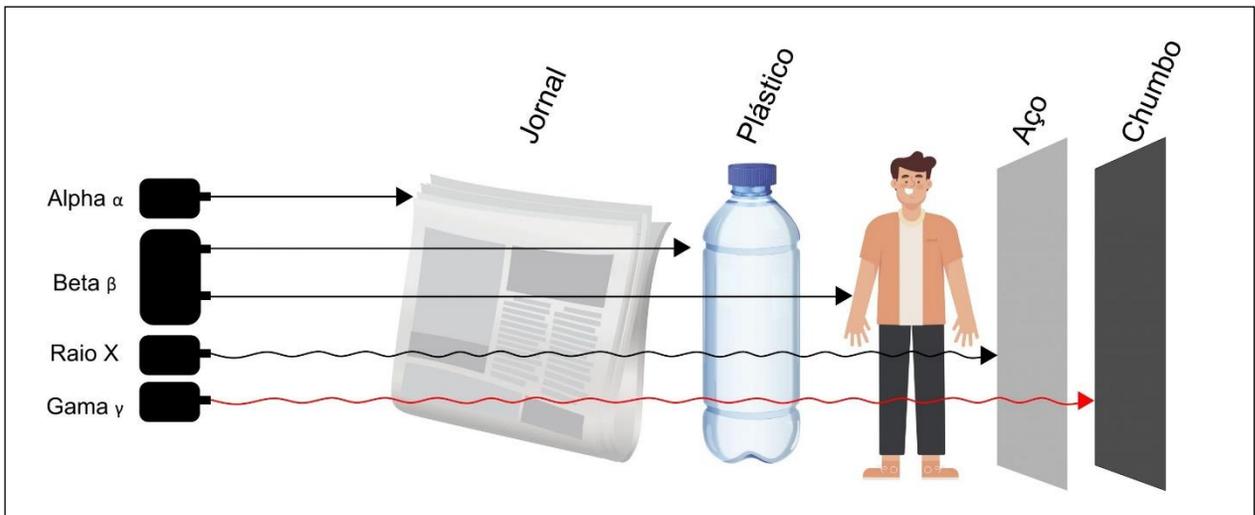
Como descrito no tópico anterior, as radiações podem ser classificadas em 2 tipos, ionizante e não ionizante. No entanto, o foco de estudo deste trabalho se destina as radiações ionizantes que podem ser convenientemente classificadas em duas categorias, radiação corpuscular e radiação eletromagnética (XAVIER, 2006).

Segundo (BUSHONG, 2008), existem dois tipos principais de radiação corpuscular: partículas alfas e partículas beta. As partículas alfa têm um alcance no ar inferior a 10 cm. Elas são facilmente barradas por papel, roupas e pele. Dessa forma, quando as partículas alfa são provenientes de uma fonte externa não oferecem risco ao corpo humano, pois interagem fortemente com a pele morta na superfície, sem penetrar

até o tecido vivo. No entanto, como elas equivalem a um núcleo de hélio, contendo dois prótons e dois nêutrons, são bastante ionizantes, pois podem ejetar vários elétrons dos átomos e das moléculas do meio pela interação coulombiana, sendo as partículas alfa transformadas em átomos de hélio no fim do seu percurso. Dessa forma, com uma fonte interna de radiação alfa, o perigo é o oposto da fonte externa. A radiação alfa pode ionizar de forma intensa o tecido local, gerando um grande dano aos tecidos vivos (DAFRE; MARIS, 2013).

As partículas beta são particularmente diferentes das partículas alfa. O alcance da partícula beta é bem maior do que a partícula alfa. Dependendo de sua energia, uma partícula beta pode cruzar cerca de 10 a 100 cm de ar, e aproximadamente, 1 a 2 cm de tecido mole (BUSHONG, 2008). Como são elétrons, uma partícula beta é bem mais leve que uma partícula alfa, tendo seu caminho bastante desviado pela interação coulombiana com os átomos do meio. Mas, devido a sua menor carga elétrica, elas podem penetrar bem mais na matéria do que as partículas alfa. Assim, o perigo oferecido pela partícula beta é tido como moderado, tanto como fonte externa como fonte interna (HALL, 2000).

Em se tratando da radiação eletromagnética temos: raios X e raios gama, sendo com frequência chamados de fótons. Os fótons não possuem massa e carga, viajam na velocidade na luz ( $c = 3 \times 10^8$  m/s), são considerados perturbações no espaço. A penetrabilidade dos raios X e gama é muito maior quando comparada as partículas alfa e beta, pois não interagem por interação colombiana (não possuem carga elétrica) e possuem um comprimento ( $\lambda$ ) de onda muito pequeno. Os raios gama quando oriundos de uma fonte externa oferecem grande perigo, pois têm um longo alcance. Por outro lado, quando se trata de uma fonte interna, oferecem perigo moderado pelo mesmo motivo, pois devido ao seu grande poder de penetração a maior parte da radiação gama sai do corpo sem interagir (BUSHONG, 2008). A Figura 11 ilustra o poder de penetração dessas diferentes radiações.



**Figura 11** - Interação da radiação com a matéria. **Fonte:** <https://opusmedical.com.br/2020/12/09/tipos-de-radiacoes-ionizantes/>

### 3.7 CONSEQUÊNCIAS DA TAXA DE DOSE

A exposição à radiação ionizante pode ser prejudicial aos seres humanos causando danos biológicos significativos (RICHARDSON *et al.*, 2015). Como já mencionado neste capítulo, o indicador biológico da dose da radiação é útil em situações onde não foi possível se obter estimativas de doses físicas, sendo uma tarefa difícil quando se trata de acidentes nucleares.

Segundo (VAIJAPURKAR *et al.*, 2001), um dos importantes efeitos causados na vida celular é a interferência na atividade mitótica. Se uma célula recebe radiação na prófase tardia ou em fases após ela, a divisão mitótica ocorrerá normalmente. No entanto, se isso ocorre antes desse período podem ocorrer alterações significativas na taxa de índice mitótico (IM), sendo esse dano dependente da dose de radiação recebida. Se essa inibição for temporária, as células podem a longo prazo retornar sua atividade mitótica. Caso as doses sejam muito altas, essa inibição pode ser duradoura levando as células a morte.

Após influência de pequena dose de radiação, muitas alterações celulares podem ser analisadas microscopicamente. Em trabalhos como (BARQUINERO *et al.*, 1993),

pequenas doses de radiação foram suficientes para notar aberrações estruturais do tipo cromossômica quando comparadas com os controles negativos<sup>1</sup>. Além desse tipo de alteração, uma série de sinais de lesão celular podem ser observadas após exposição de baixas doses. Dentre elas podemos citar a inibição dos movimentos de anáfase, o deslocamento de alguns cromossomos, a divisão desigual dos cromossomos de células filhas, as cromátides, as quebras cromossômicas e a produção de micronúcleos no próximo ciclo celular (VAIJAPURKAR *et al.*, 2001).

A intensidade dos danos causados devido a baixas, moderadas e altas doses de radiação também podem ser variadas de acordo com tipo de radiação as quais as células foram expostas. Estudos vêm demonstrando que o dano citogenético causado pela exposição à radiação alfa pode persistir por muitos anos após exposição (HALL *et al.*, 2017)

### **3.8 DOSIMETRIA BIOLÓGICA ALIADA A DOSIMETRIA FÍSICA**

Durante os últimos anos vem crescendo o risco de eventos radiológicos devido ao poder de produção de armas nucleares, construção de usinas nucleares e construção das bombas sujas (KULKA *et al.*, 2017). As bombas sujas são confeccionadas com dejetos radioativos criados na maioria por usinas nucleares, atividades industriais e pesquisas. A Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), responsável pela gerência de rejeitos radioativos, criou normas de descarte como a norma CNEN NN 8.01, que estipula padrões de descarte de rejeitos radioativos de baixo e médios níveis de radiação, o que diminui o risco de ocorrer eventos radiológicos.

Historicamente a técnica mais utilizada para detecção de níveis de radiação eram os dosímetros físicos utilizados pelos profissionais, tais como crachás de filmes e canetas dosimétricas. Os dosímetros de filme atualmente foram substituídos na sua maioria por

---

<sup>1</sup> Os controles negativos são um grupo de comparação de amostras não irradiadas

dosímetros termoluminescência (TLD) ou dosímetros de luminescência opticamente estimulada (OSLD) (ALEXANDER *et al.*, 2007; YUKIHARA E McKEEVER, 2011).

Embora não existam dosímetros perfeitos, quando se trata de dosimetria física os métodos usados convencionalmente incluem as técnicas de termoluminescência (TL), luminescência opticamente estimulada (OSL), de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) e ativação nuclear. A técnica EPR descreve uma estimativa de dose absorvida dos centros paramagnéticos, como radicais ou defeitos pontuais originados especificamente por radiação ionizante. A dosimetria luminescente é baseada na emissão de luz devido a energia da radiação absorvida por um isolante ou por um semicondutor. Essa estimulação pode ser realizada termicamente (por TL) ou opticamente (por OSL). E por fim a técnica de ativação de nêutrons, que se baseia na medição da radioatividade induzida pela interação do nêutron com tecidos biológicos (AINSBURY *et al.*, 2011; KULKA *et al.*, 2017).

Segundo (AINSBURY *et al.*, 2011) as comunidades de dosimetria física e biológica têm atuado separadamente, no entanto o foco atual de grandes centros de pesquisa tem sido a conciliação dos métodos físicos com os biológicos. Como citado anteriormente, não existe método dosimétrico perfeito, sendo necessária a avaliação do fato para identificar o método ou métodos mais adequados para estipular a taxa de exposição da radiação ocasionada pelo evento.

Dentre a comunidade da dosimetria biológica as técnicas mais utilizadas vêm sendo o ensaio de cromossomos dicêntricos, que são quase que exclusivamente induzidos por radiação ionizante, condensação cromossômica prematura (PCC), que são aberrações cromossômicas visualizadas durante a interfase, o ensaio de micronúcleos que surgem de cromossomos inteiros, que não são incorporados aos núcleos filhos durante a divisão celular, e a técnica de hibridização *in situ* de fluorescência (FISH), que tem o poder de avaliar exposições passadas (AINSBURY *et al.*, 2011).

Segundo (AINSBURY *et al.*, 2011) existem poucas técnicas capazes de avaliar doses recebidas de emissores internos. Embora existam uma vasta gama de técnicas físicas e biológicas, ainda assim, outras técnicas genéticas imunoquímicas e computacionais vêm sendo desenvolvidas, pois como já descrito anteriormente nenhuma delas é suficiente para abordar todos os possíveis cenários de radiação (ALEXANDER *et al.*, 2007).

### 3.9 MÉTODO DE ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística neste trabalho foi realizada através do software Past 4. Past inicialmente surgiu em 1980 com o objetivo de analisar dados paleontológicos. Sua primeira versão foi denominada de PALSTAT, sendo programada para um microcomputador (HAMMER *et al.*, 2001).

Atualmente o Past sofreu atualizações e se trata de um software livre destinado à análise de dados científicos, com funções para manipulação de dados, plotagem, estatística univariada, multivariada, análise ecológica, séries temporais, análise espacial, morfometria e estratigrafia. Sua escolha se justifica por se tratar de um software livre e fluido não dependendo de um computador de alta desempenho, além da sua facilidade de operação. Basicamente o software realiza todo o procedimento, necessitando apenas que o operador insira os dados e escolha as opções que necessita.

A partir do Past foram utilizados dois testes estatísticos para se confirmar ou não alterações estatísticas significativas. Um desses testes é denominado de ANOVA (Análise de Variância) sendo reafirmado pelo teste Tukey. O ANOVA é um método estatístico bem consolidado no meio acadêmico. Basicamente ele compara a distribuição de três ou mais grupos em amostras independentes (FIELD; VIALI, 2000).

O teste realizado no ANOVA adota um nível de significância de  $p < 0,05$ . Se obtermos um valor de  $p < 0,05$  a única certeza que se tem é que no mínimo um par de medidas difere, mas não se sabe quantas nem quais. Para determinação do par de medidas que diferem é necessário realizar um teste adicional, sendo o teste Tukey utilizado neste trabalho. O teste Tukey basicamente compara todos os possíveis pares de medidas, oferecendo uma melhor precisão de medida quando os tamanhos amostrais dos grupos são iguais. O teste de Tukey indica quais grupos tiveram uma diferença estatística significativa (Ronald *et al.*, 2011).

De forma prática, podemos exemplificar o teste ANOVA em sequência do teste Tukey com uma das análises realizadas nesse trabalho. Raízes da *Allium cepa* foram irradiadas com um irradiador Samara contendo três fontes de radiação beta. No entanto, algumas raízes de *Allium cepa* não foram irradiadas com o intuito de servir de

comparação e, assim, foram denominadas de controle negativo (CN). Através dos dados obtidos após análise das lâminas por microscopia óptica, foi calculado o Índice Mitótico (IM). No presente exemplo devemos comparar se houve alguma alteração significativa entre a taxa de IM das amostras não irradiadas e IM das amostras irradiadas pela fonte F1.

Após aplicação do teste ANOVA nesse exemplo, o valor de  $p$  (same)  $> 0,05$  indica que não há diferenças estatísticas significantes entre os tratamentos. Isso pode ser confirmado após aplicação do teste Tukey.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 GERMINAÇÃO

A metodologia deste trabalho consistiu na análise de efeitos citogenéticos induzidos em células vegetais pela sua exposição à radiação ionizante. Com essa finalidade, sementes de cebola (*Allium Cepa*) foram germinadas e seus meristemas foram expostos à radiação  $\beta$  de um irradiador  $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ . Esse tipo de amostra foi escolhido, pois a *Allium cepa* é um modelo padrão frequentemente utilizado determinar o potencial citotóxico e genotóxico de diferentes poluentes ambientais, servindo como um sistema de alerta para evitar danos à saúde humana. Além disso, por se tratar de um material tecido equivalente tem a possibilidade de ser um bom bioindicador dos efeitos da radiação sem o uso direto de amostras humanas ou animais.

Todo procedimento neste trabalho foi realizado no Laboratório de Corrosão e Nanotecnologia (LCNT), no Laboratório de Física das Radiações e no Laboratório de Dosimetria Biofísica, todos na Universidade Federal de Sergipe (UFS).

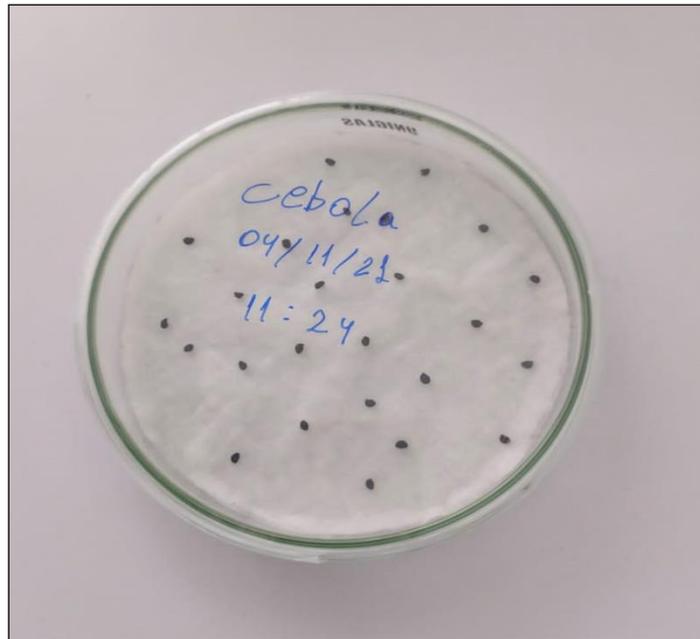
O procedimento iniciou-se com esterilização de todo equipamento a ser utilizado. Os materiais (como placas de Petri e papel filme de germinação) foram dispostos em ambiente estéril dentro de uma Capela de Fluxo Laminar Veco CFLV09 (Figuras 15) para serem expostos a fonte de luz UV-C com comprimento de onda de 254 nm por 15 min, para garantir a esterilidade desses materiais. Após esse tempo de esterilização, a luz ultravioleta foi desligada, mas o fato de o interior da capela consistir de um ambiente estéril, foi adequado para o procedimento de montagem das amostras com menor risco de contaminação.



**Figura 12** - Capela de Fluxo Laminar utilizada nos experimentos. **Fonte:** O autor.

Foram adquiridas sementes de *Allium cepa* da variedade Baia Periform (ISLATM), número de lote 136834-002 S2, livre de agrotóxicos. O pacote de sementes foi aberto somente após a luz ultravioleta ter sido desligada. Na sequência, as sementes foram submersas por 20 s em solução de álcool 70% a fim de se evitar qualquer tipo de alteração citogenética, e ainda ajuda a esterilizar externamente essas sementes. Após esses 20 s, as sementes foram submersas em água destilada por 6 vezes com o intuito de se eliminar quaisquer resquícios de álcool.

Depois de postas sobre um papel filtro para retirar o excesso de água destilada, essas sementes foram distribuídas em placas de Petri. Foram utilizadas 9 placas de Petri com o fundo recoberto por 2 camadas de papel filtro de germinação, onde foram acrescentados 4 ml de água destilada e 25 sementes de cebola (*Allium cepa*) em cada uma. Logo após, todas as placas foram cobertas com suas tampas e vedadas com plástico Parafilm® M® com o intuito evitar contato das sementes com o ambiente externo (Figura 17). O período de cultivo durou média de 6 dias mantidas numa estufa incubadora na temperatura de aproximadamente de  $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$ , sem exposição a qualquer fonte de radiação, exceto os níveis de radiação de fundo, até que as raízes cresceram com aproximadamente 0,5 cm de comprimento e 400  $\mu\text{m}$  de espessura.



**Figura 13** - Placa de petri com sementes em germinação. **Fonte:** O autor.

## 4.2 IRRADIAÇÃO

Após o processo de cultivo das raízes até cerca de 0,5 cm, esses meristemas foram levados para o Laboratório de Física das Radiações onde foram irradiadas com o irradiador Samara (Figura 18)



**Figura 14** - Irradiador Samara com fontes de  $^{90}\text{Sr}+^{90}\text{Y}$ . **Fonte:** O autor.

O irradiador Samara consiste de fontes emissoras beta de  $^{90}\text{Sr}+^{90}\text{Y}$ . Esse irradiador foi construído com materiais de baixo custo e três fontes aplicadoras, sendo duas côncavas e uma planar. As fontes são posicionadas no centro e na extremidade superior de prismas retangulares de acrílico. As fontes foram recentemente calibradas pelo grupo de pesquisa da UFS (SILVA *et al.*, 2020) por duas metodologias, a saber, filme radiocrômico e luminescência opticamente estimulada (OSL). Adotou-se nesse trabalho a calibração feita por filme radiocrômico por se assemelhar a estrutura da pele humana, atuando favoravelmente a essa pesquisa. Nesse trabalho foi planejado aproximar a fonte das amostras, simulando a proximidade da pele humana à fonte.

A Tabela 1 apresenta resultados obtidos para o cálculo das taxas de dose atuais das fontes do irradiador Samara por meio da calibração com os filmes radiocrômicos. Sendo a fonte F1 do tipo côncava de número de série SIA6-1522, F2 do tipo côncava de número de série SIQ6-9737 e F3 do tipo Planar de número de série SIA5-1510.

Nº da fonte	Tipo de aplicador	Número de série	Taxa de dose ( $\text{mGy}\cdot\text{s}^{-1}$ )
F2	Côncavo	SIQ6-9737	$7,2 \pm 1,5$
F3	Planar	SIA5-1510	$13,8 \pm 2,1$
F1	Côncavo	SIA6-1522	$19,5 \pm 3,1$

**Tabela 1** - Taxas de dose das fontes  $^{90}\text{Sr}+^{90}\text{Y}$  do irradiador Samara. As fontes foram colocadas em ordem crescente da sua taxa de dose.

O procedimento de irradiação desse trabalho foi realizado com três doses distintas. Como as taxas de dose de cada uma eram diferentes, tempo de exposição para atingir a dose desejada para cada fonte foi calculado. Os detalhes do tempo de irradiação com cada configuração são apresentados na Tabela 2.

Dose de radiação (Gy)	Tempo F2 (s)	Tempo F3 (s)	Tempo F1 (s)
0,72	101	53	37
2,0	278	146	103
4,0	556	290	206

**Tabela 2** - Tempo de irradiação necessário para atingir as doses desejadas em cada uma das configurações usadas no irradiador Samara.



**Figura 15** – Raízes cultivadas colocadas em suporte para serem irradiadas. **Fonte:** O autor.

O procedimento de irradiação das amostras foi realizado em triplicata para que fosse possível obter resultados mais precisos. Em cada irradiação, com uma pinça eram

colocadas 3 raízes de cebola, escolhidas aleatoriamente, sobre o suporte do irradiador como mostra a Figura 19, de forma que sempre estivessem numa mesma geometria durante todas as irradiações, a fim de se evitar qualquer anormalidade no recebimento da dose nas amostras. O suporte em forma de prisma, recoberto com uma camada dupla de chumbo (4 mm) permitia que a amostra pudesse ser irradiada a uma distância de 3,0 mm da superfície da fonte.

Após colocar as raízes sobre o suporte a fonte de irradiação era colocada recobrindo o suporte e ao mesmo tempo era acionado o cronômetro para o controle de tempo. Dessa forma cada irradiação era composta com uma taxa de dose diferente com tempos diferentes para as três doses (0,72 Gy, 2 Gy e 4 Gy) sendo esse processo feito três vezes tentando reproduzir as mesmas condições da primeira, embora fosse esperado uma alternância dos resultados devido ao fato de estar se trabalhando com material biológico.

Para facilitar o transporte do Laboratório de Física das Radiações até o Laboratório de Dosimetria Biofísica, após as irradiações, as raízes eram retiradas do suporte no irradiador e colocadas cuidadosamente em placas de petri de plástico. Todas as sementes eram postas dentro das placas com papel filtro e cerca de 2 ml de água destilada. Elas eram identificadas, bem vedadas e logo em seguida armazenadas por 24 h numa estufa incubadora na temperatura de aproximadamente de  $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$  e sem a presença de luz. Esse período permite ainda o crescimento das raízes, com a divisão e multiplicação das células.

#### **4.3 PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS E CONTAGEM DE MICRONÚCLEOS**

Após 24 h de irradiadas, as raízes foram coletadas da estufa incubadora e inseridas no fixador Carnoy (etanol/ácido acético na proporção 3:1) em tubos de ensaio armazenados a temperatura ambiente ( $24^\circ\text{C}$ ) por 24 h. Esse é um passo importante para interromper o processo de divisão celular na fase inicial e preservar a histologia presente (DIAS *et al.*, 2016). Após as 24 horas, as raízes foram retiradas do fixador Carnoy,

transferidas para uma solução de etanol a 70%. Parte delas foi destinada para realização das etapas seguintes e parte armazenada a 4°C preservadas até a produção das lâminas.

O processo de produção de lâminas não foi feito de forma contínua por conta dos poucos dias em que as mesmas podiam ser preservadas. Ao longo de 7 dias há perda da coloração e o surgimento de bolhas, assim comprometendo a análise. Portanto, a produção foi feita de acordo com a disponibilidade para observação das mesmas.

As raízes separadas para a produção de lâmina, foram colocadas em HCl num tubo de coleta. Esses tubos foram submersos em um Becker com água sobre um aquecedor a 45 °C por 5 min. Logo em seguida, as raízes foram retiradas do HCl e foram submersas em água destilada por um período mínimo de 10 min para que fossem hidratadas, e assim, o tecido celular ficasse mais visível. Ao retirá-las da água foram colocadas sobre uma superfície seca e adicionado ácido acético nas pontas das raízes por 3 minutos para que facilitasse o rompimento da parede celular na produção de lâminas para observação em microscópio. Em seguida, nas pontas das raízes foi adicionado orceína acética 2% por 11 min e cobertas com um papel laminado para evitar a perda da integridade da orceína acética. Essa coloração é importante para se ter o contraste das células na microscopia óptica.

As pontas das raízes são importantes, pois apresentam o meristema apical<sup>2</sup>, que na maioria das vezes é visível, variando de tamanho de acordo cada raiz. Para a produção das lâminas, após a coloração, os meristemas apicais (região de interesse visível) das plantas cortados com uma lâmina de bisturi, separados do restante da raiz e esmagados cuidadosamente entre uma lâmina de vidro e uma lamínula de vidro. Para vedar as amostras entre a lâmina e a lamínula, utilizou-se uma base incolor na lateral, evitando contato com o ar; cada lâmina foi identificada. Algumas lâminas preparadas são mostradas na Figura 20.

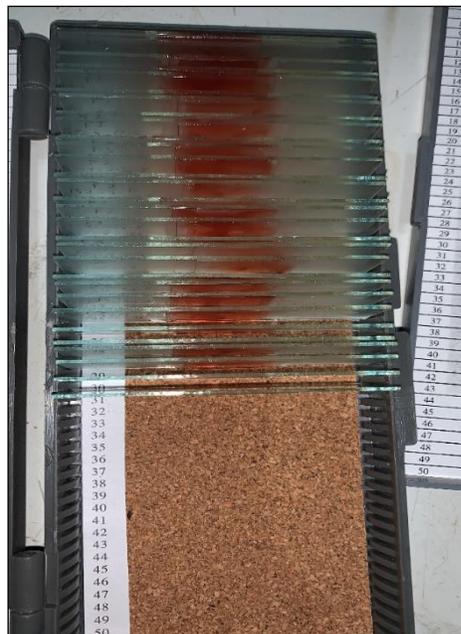
---

<sup>2</sup> Meristema apical é o tecido da região da ponta da raiz. Ele é o responsável pelo seu crescimento, pois possui células com alto grau de divisão celular, ou seja, em mitose.



**Figura 16** - Lâminas preparadas com os meristemas apicais (pontas das raízes) para contagem de micronúcleos. **Fonte:** O autor.

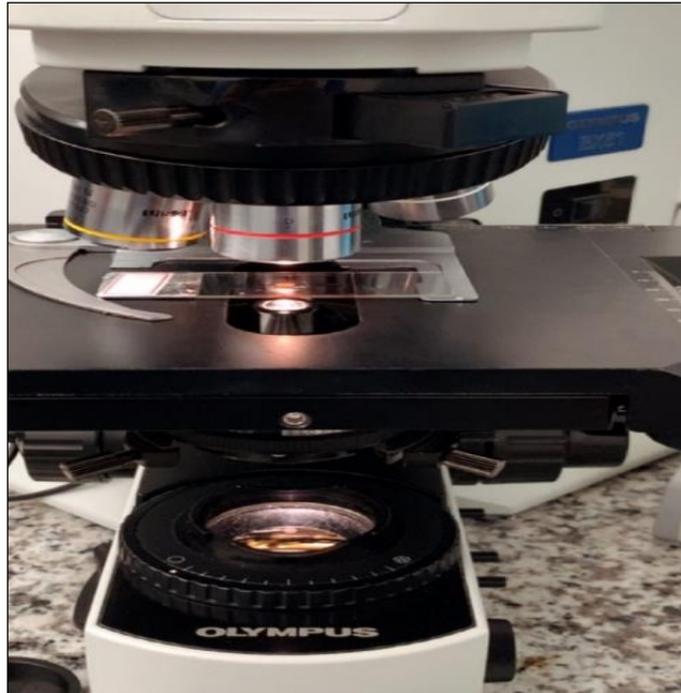
Após o processo de secagem da base incolor, as lâminas foram armazenadas numa caixa apropriada (Figura 21) e colocadas em geladeira a temperatura  $(23 \pm 1) ^\circ\text{C}$  com a finalidade de prorrogar a sua integridade por um maior período de tempo.



**Figura 17**-Lâminas armazenadas em caixa apropriada. **Fonte:** O autor.

As lâminas preparadas foram analisadas por microscopia óptica para fim de contagem dos micronúcleos e dos índices mitóticos. Para esse propósito foi utilizado o microscópio óptico Olympus BX51 (Figura 22). As lâminas foram observadas com uma

lente objetiva 500 x, sendo nítida a percepção do tecido celular. De cada uma das raízes foi feita uma contagem de 1000 células em interfase e, assim, contabilizada a frequência de micronúcleos de cada uma.



**Figura 18** - Lâmina preparada colocada no microscópio óptico BX51 para contagem de micronúcleos.  
**Fonte:** O autor.

Além de fazer a contagem dos micronúcleos, também foram registrados o número de células em prófase, anáfase, telófase e metáfase num campo de acordo a sua quantidade (1, 2 ou 3). Também foi calculado o índice mitótico (Equação (1)), que expressa o percentual de células saudáveis em divisão do seu sistema biológico. Sendo a razão entre as células em mitose (anáfase, prófase, telófase e metáfase) e o número total de células calculadas (XAVIER *et al.*, 2021).

$$IM = \frac{CM}{TC} \times 100 \quad (1)$$

Onde: índice mitótico (IM), número de células em mitose (CM) e total de células (TC).

A fim de se obter uma estimativa de dose com uma boa precisão estatística, um grande número de células deve ser avaliado (IAEA, 2011) por vários fatores, como a qualidade do material produzido, custo de produção e quão dispendioso é para refazer todo o processo. No entanto, a recomendação é que essa análise seja feita com cerca de 500 a 1000 células, sendo o padrão de 1000 células, como utilizado neste trabalho.

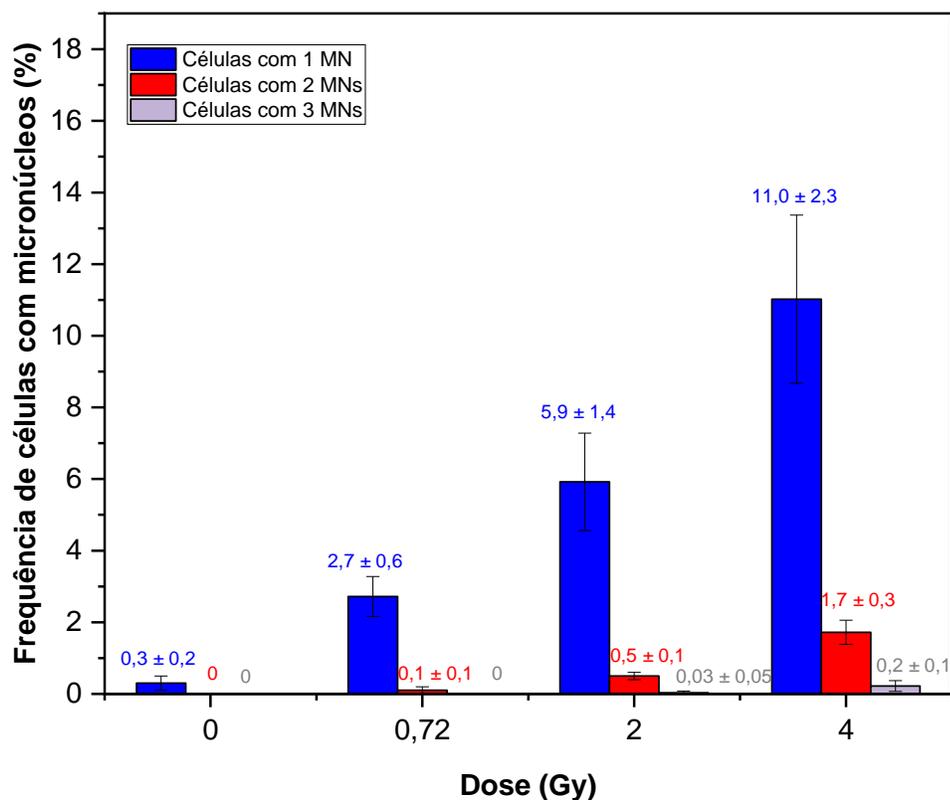
#### **4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para a análise estatística dos dados obtidos no presente trabalho utilizou-se o software Past 4. Com ele foram feitos dois testes estatísticos em todos os dados para se confirmar ou não alterações estatísticas significativas. Os testes realizados foram o ANOVA e o Tukey.

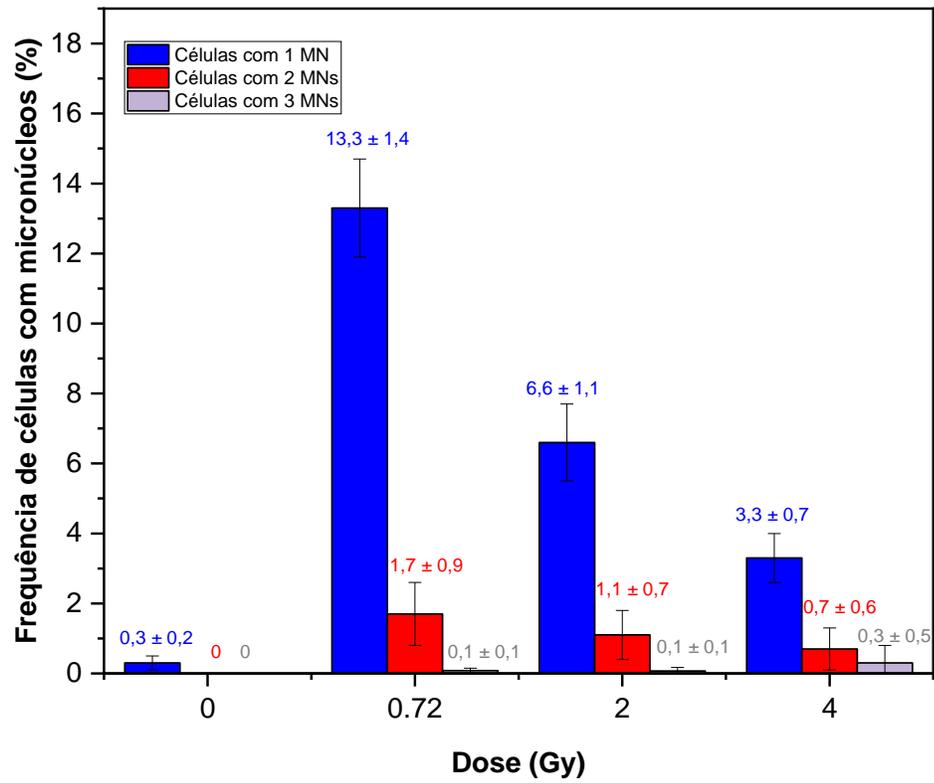
Foram identificados os IM das amostras para cada dose para cada uma das taxas de dose e avaliados em comparação ao controle negativo (amostras não irradiadas). As frequências de MN usadas para análises estatísticas foram aquelas com maior predominância, que consistiram das células com 1 MN.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

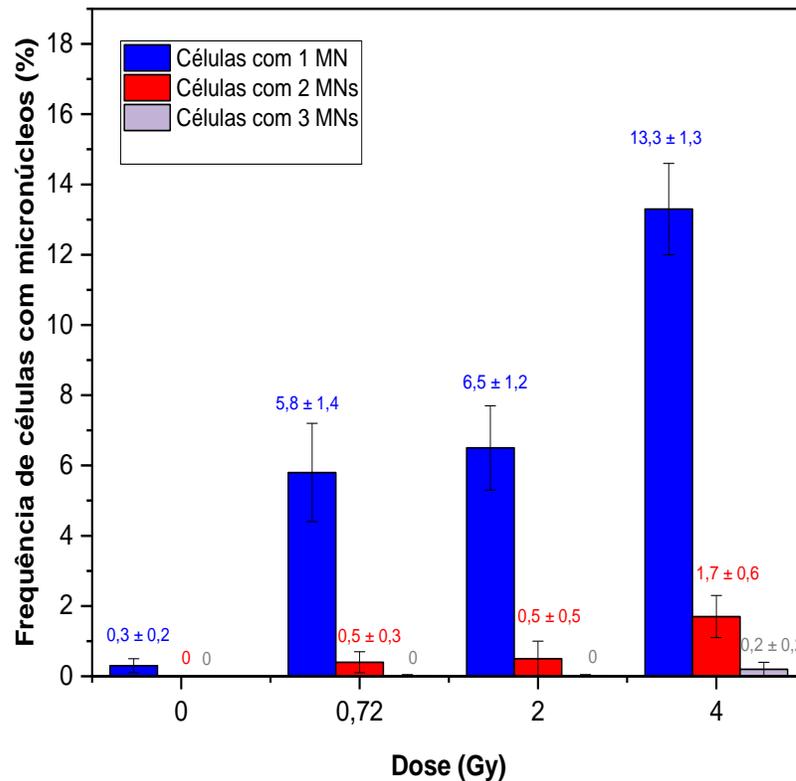
Neste trabalho raízes de cebola (*Allium cepa*) foram expostas a 3 diferentes fontes emissoras de radiação beta de  $^{90}\text{Sr}+^{90}\text{Y}$ . Cada uma delas apresenta uma taxa de dose diversa. Seguindo uma ordem da menor taxa para a maior taxa de dose, temos a F2 com  $(7,2 \pm 1,5) \text{ mGy}\cdot\text{s}^{-1}$ , a F3 com  $(13,8 \pm 2,1) \text{ mGy}\cdot\text{s}^{-1}$  e a F1 com  $(19,5 \pm 3,1) \text{ mGy}\cdot\text{s}^{-1}$ . Na sequência são apresentadas as frequências de micronúcleos encontradas nas amostras irradiadas com a F2 (Figura 23), F3 (Figura 24) e F1 (Figura 25). O MN foram contados para doses de 0 Gy (sem exposição a fonte), 0,72 Gy, 2 Gy e 4 Gy (para amostras irradiadas nas 3 fontes de radiação beta  $^{90}\text{Sr}+^{90}\text{Y}$ ). A frequência espontânea de micronúcleos do CN, ou seja, antes das irradiações teve uma média de 0,3 %.



**Figura 19** - Frequência de células detectadas com de micronúcleos (MN) nas amostras irradiadas com a fonte F2 – em azul com 1 MN, em vermelho 2 MN, em lilás 3 MN. **Fonte:** O autor.



**Figura 20** - Frequência de células detectadas com micronúcleos (MN) nas amostras irradiadas com a fonte F3 – em azul com 1 MN, em vermelho 2 MN, em lilás 3 MN. **Fonte:** O autor.



**Figura 21** - Frequência de células detectadas com micronúcleos (MN) nas amostras irradiadas com a fonte F1 – em azul com 1 MN, em vermelho 2 MN, em lilás 3 MN. **Fonte:** O autor.

Como esperado pelos dados de trabalhos anteriores reportados na literatura (VAIJAPURKAR *et al.*, 2001; XAVIER, 2021), observou-se, que as irradiações induzem alterações no número de MN apresentados pelas células. No entanto, cada taxa de dose apresentou um comportamento diferente com o aumento da dose absorvida.

Na Figura 23 se vê que com o aumento de dose houve um aumento gradativo na frequência de MN encontrados nas amostras irradiadas com a fonte F2. Como já foi dito, apenas uma pequena fração das células não irradiadas apresentava um MN, com média de frequência de 0,3 %. Com a dose de 0,72 Gy já surgem algumas células com dois MN e há um aumento significativo daquelas com um MN. Células com três MN podem ser observadas a partir da dose de 2 Gy.

Apesar de termos uma indução do aumento gradativo da frequência das células com 1, 2 e 3 micronúcleos, a maior predominância nas alterações consistiu em células com a presença de um único micronúcleo ao se usar essa fonte F2. Os testes ANOVA

unilateral e Tukey ( $p < 0,05$ ) apresentaram diferenças estatísticas significativas nas frequências de células com 1 MN para amostras irradiadas com F2 se comparadas às não irradiadas. Para o teste ANOVA foi encontrado  $p = 1,55 \times 10^{-12}$ . Esse  $p < 0,05$  demonstra uma diferença estatística significante. Na Tabela 4 é apresentado o teste Tukey que aponta os resultados que apresentaram diferenças estatísticas significativas destacadas com campos coloridos em laranja nessa tabela.

	CN	0,72 Gy	2 Gy	4 Gy
CN		0,01625	$4,509 \times 10^{-7}$	$1,384 \times 10^{-12}$
0,72 Gy	4,614		0,001218	$2,945 \times 10^{-10}$
2 Gy	10,74	6,126		$2,337 \times 10^{-6}$
4 Gy	20,47	15,86	9,73	

**Tabela 3** - Teste Tukey para a frequência de 1 micronúcleo das amostras irradiadas com a F2. CN – Controle Negativo. Os resultados com campos em destaque vermelho indicam que há alterações significativas.

Dessa forma foi possível observar os danos causados gradativamente com o aumento da dose através do aumento na frequência de células com 1 MN. Esse resultado pode ser mais bem reafirmado com a análise estatística feita com o índice mitótico (IM) das amostras irradiadas com essa taxa de dose comparado ao das células não irradiadas (Tabela 5). Ao se analisar estatisticamente por meio do ANOVA unilateral, encontramos um  $p = 0,47$ . Esse  $p > 0,05$  não indica diferença estatística significativa. Esse resultado acompanhado do Teste Tukey (Tabela 6), que também não aponta alterações estatísticas significantes (nenhum dos valores da tabela foram destacados), indica que o IM não sofreu alterações nas amostras irradiadas. Dessa forma, pode-se concluir que as células continuaram se reproduzindo normalmente, estivessem elas saudáveis ou com alterações que induzidas pela radiação.

### Índice Mitótico (IM)

Dose	CN	0,72 Gy	2 Gy	4 Gy
Lâmina 1	13,42 (%)	19,72 (%)	10,74 (%)	1,57 (%)
Lâmina 2	10,28 (%)	7,53 (%)	3,27 (%)	8,89 (%)
Lâmina 3	9,21 (%)	4,80 (%)	0,39 (%)	7,65 (%)
Lâmina 4	4,33 (%)	5,23 (%)	0,37 (%)	7,07 (%)
Lâmina 5	5,69 (%)	3,29 (%)	11,04 (%)	1,05 (%)
Lâmina 6	4,95 (%)	5,26 (%)	0,47 (%)	7,34 (%)
Lâmina 7	8,13 (%)	7,68 (%)	8,76 (%)	5,58 (%)

**Tabela 4** - Índices Mitóticos das amostras irradiadas com F2 utilizados nos testes ANOVA e Tukey

	CN	0,72 Gy	2 Gy	4 Gy
CN	0,2961	0,9967	0,5434	0,6967
0,72 Gy	1,905		0,6706	0,8129
2 Gy	1,547	1,609		0,9942
4 Gy		1,251	0,3579	

**Tabela 5** - Teste Tukey para Índice Mitótico das amostras irradiadas com a da F2. CN – Controle Negativo. Nenhum valor aparece em destaque, apontando que não há diferenças significativas entre as amostras.

Por outro lado, ao analisarmos a Figura 24, com evolução das alterações de frequência de micronúcleos induzidas pela fonte F3, que possui uma taxa de dose de  $(13,8 \pm 2,1) \text{ mGy}\cdot\text{s}^{-1}$ , notamos uma maior indução de micronúcleos para doses mais baixas do que para doses mais altas. Essas alterações para o índice de 1 MN foram analisadas estatisticamente por meio do ANOVA unilateral e obtive-se  $p = 3,34 \times 10^{-18}$ . Esse  $p < 0,05$  indica que há diferenças significativas entre os valores. Isso pode ser confirmado com o teste Tukey, apresentado na Tabela 7. Os resultados nos campos destacados em laranja que mostram que há alterações significativas nas três doses utilizadas quando comparadas entre elas ou com a amostra não irradiada.

	CN	0,72 Gy	2 Gy	4 Gy
CN		$1,754 \times 10^{-14}$	$2,33 \times 10^{-11}$	$2,263 \times 10^{-5}$
0,72 Gy	36,7		$8,838 \times 10^{-12}$	$1,843 \times 10^{-14}$
2 Gy	17,93	18,77		$3,214 \times 10^{-6}$
4 Gy	8,392	28,31	9,538	

**Tabela 6** - Teste Tukey para a frequência de 1 micronúcleo das amostras irradiadas com a F3. CN – Controle Negativo. Os resultados com campos em destaque vermelho indicam que há alterações significativas.

Quando as taxas de IM (Tabela 8) são analisadas estatisticamente para amostras desse grupo das irradiadas com a F3 em comparação com as taxas de células não irradiadas, o ANOVA unilateral resulta num  $p = 0,008$ . Novamente, como é um  $p < 0,05$ , resulta numa diferença estatística significativa, que é também acusada pelo teste Tukey (Tabela 9). No teste de Tukey há valores apontados com alterações significativas que estão destacados nos campos coloridos em laranja na Tabela 9. Ou seja, à medida que essas doses foram aumentando, possivelmente houve um número maior de células que sofreram morte celular, principalmente para 4 Gy, alterando o índice mitótico. A apoptose pode ser induzida por agentes agressores como a radiação (BITELLI, 2006). Se isso foi o que ocorreu com essas amostras, o número de células contadas com MN deve diminuir com o aumento da dose de radiação, pois as células mortas não entram nessa contagem, exatamente como mostra a Figura 24, com a redução da frequência de células com 1 MN para doses mais altas.

#### Índice Mitótico (IM)

Dose	CN	0,72 Gy	2 Gy	4 Gy
Lâmina 1	13,42 (%)	12,99 (%)	0,98 (%)	4,21 (%)
Lâmina 2	10,28 (%)	13,06 (%)	10,06 (%)	0,00 (%)
Lâmina 3	9,21 (%)	6,83 (%)	4,08 (%)	8,13 (%)
Lâmina 4	4,33 (%)	9,42 (%)	11,90 (%)	0,77 (%)
Lâmina 5	5,69 (%)	5,97 (%)	8,35 (%)	2,02 (%)

Lâmina 6	4,95 (%)	8,07 (%)	4,16 (%)	4,59 (%)
Lâmina 7	8,13 (%)	9,38 (%)	7,07 (%)	3,26 (%)

**Tabela 7** - Índices Mitóticos das amostras irradiadas com F3 utilizados nos testes ANOVA e Tukey.

	<b>CN</b>	<b>0,72 Gy</b>	<b>2 Gy</b>	<b>4 Gy</b>
<b>CN</b>		0,8774	0,8186	0,03905
<b>0,72 Gy</b>	1,055		0,3873	0,007
<b>2 Gy</b>	1,235	2,29		0,2159
<b>4 Gy</b>	4,063	5,118	2,829	

**Tabela 8** - Teste Tukey para Índice Mitótico das amostras irradiadas com a F3. CN – Controle Negativo. Os resultados com células em destaque laranja indicam que há alterações significativas.

A F1 foi a fonte utilizada com maior taxa de dose ( $19,5 \pm 3,1$ )  $\text{mGy}\cdot\text{s}^{-1}$ . Os dados de frequência de MN com o aumento de dose para essa fonte mostram que quanto mais alta a dose depositada sobre as raízes de cebola, maior foi o número de micronúcleos induzidos nas células (Figura 26). Esses resultados foram comprovados com diferenças estatísticas significativas quando aplicado o teste ANOVA na frequência de células com 1 MN, resultando num  $p = 7,43 \times 10^{-16}$ . Como esse  $p < 0,05$ , há uma diferença estatística significativa. Isso que é demonstrado também através do teste Tukey (Tabela 10), que apontou com os campos em destaque laranja os valores com diferenças estatísticas significantes.

	<b>CN</b>	<b>0,72 Gy</b>	<b>2 Gy</b>	<b>4 Gy</b>
<b>CN</b>		$1,63 \times 10^{-8}$	$1,765 \times 10^{-9}$	$1,754 \times 10^{-14}$
<b>0,72 Gy</b>	12,92		0,6823	$3,823 \times 10^{-11}$
<b>2 Gy</b>	14,5	1,581		$2,679 \times 10^{-10}$
<b>4 Gy</b>	30,43	17,51	15,93	

**Tabela 9** - Teste Tukey para a frequência de 1 micronúcleos das amostras irradiadas com a F1. CN – Controle Negativo. Os resultados com células em destaque vermelho indicam que há alterações significativas.

Podemos notar que a maior predominância foi no crescimento de número de micronúcleos unitários. Mesmo assim, pode ser observada a presença de uma certa frequência de células com duplos micronúcleos e a presença não desprezível de células com três micronúcleos com 4 Gy.

Ao se avaliar o IM, não se obteve diferença estatística significativa das células irradiadas em comparação com as não irradiadas (Tabela 11), pois o teste ANOVA unilateral resultou num  $p = 0,3$ , ou seja, é um  $p > 0,05$ . Isso também foi apontado pelo teste Tukey (Tabela 12), que não acusou nenhuma diferença estatística significativa. Portanto, embora estiveram sobre ação de uma taxa de dose mais alta que as demais, a divisão mitótica das células irradiadas parece não ter sido afetada ao ponto de cessar. Como as células não sofreram morte celular, aquelas células que sofreram danos e apresentaram MN foram contadas no microscópio óptico nesse experimento. Isso leva a um aumento gradual de frequências de células tanto com 1, 2 ou 3 MN, como visto na Figura 25.

#### Índice Mitótico (IM)

Dose	CN	0,72 Gy	2 Gy	4 Gy
Lâmina 1	13,42 (%)	6,53 (%)	15,32 (%)	6,61 (%)
Lâmina 2	10,28 (%)	10,24 (%)	10,97 (%)	13,14 (%)
Lâmina 3	9,21 (%)	10,64 (%)	7,05 (%)	9,00 (%)
Lâmina 4	4,33 (%)	11,57 (%)	10,24 (%)	5,71 (%)
Lâmina 5	5,69 (%)	7,92 (%)	9,91 (%)	6,09 (%)
Lâmina 6	4,95 (%)	11,17 (%)	5,61 (%)	5,39 (%)
Lâmina 7	8,13 (%)	9,69 (%)	9,83 (%)	6,70 (%)

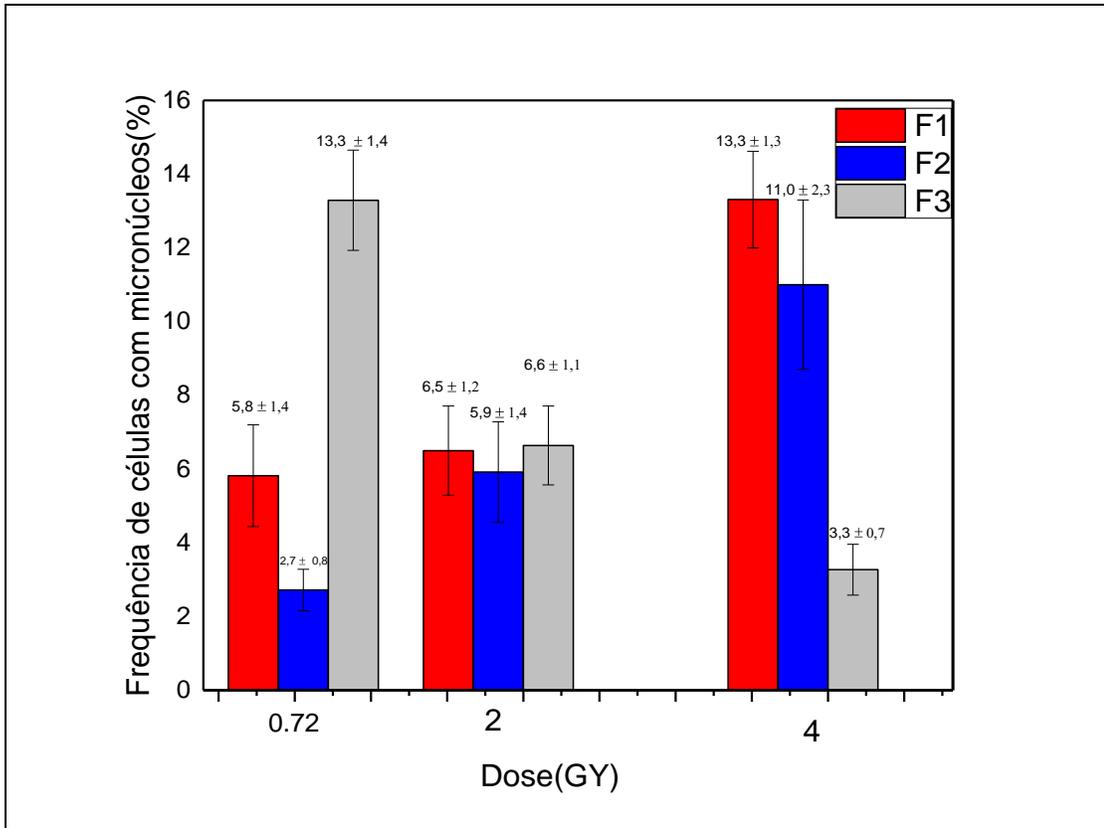
**Tabela 10** – Índices Mitóticos das amostras irradiadas com F1 utilizados nos testes ANOVA e Tukey.

	<b>CN</b>	<b>0,72 Gy</b>	<b>2 Gy</b>	<b>4 Gy</b>
<b>CN</b>		0,7222	0,655	0,9757
<b>0,72 Gy</b>	1,485		0,9995	0,4742
<b>2 Gy</b>	1,645	0,1601		0,4102
<b>4 Gy</b>	0,5844	2,069	2,23	

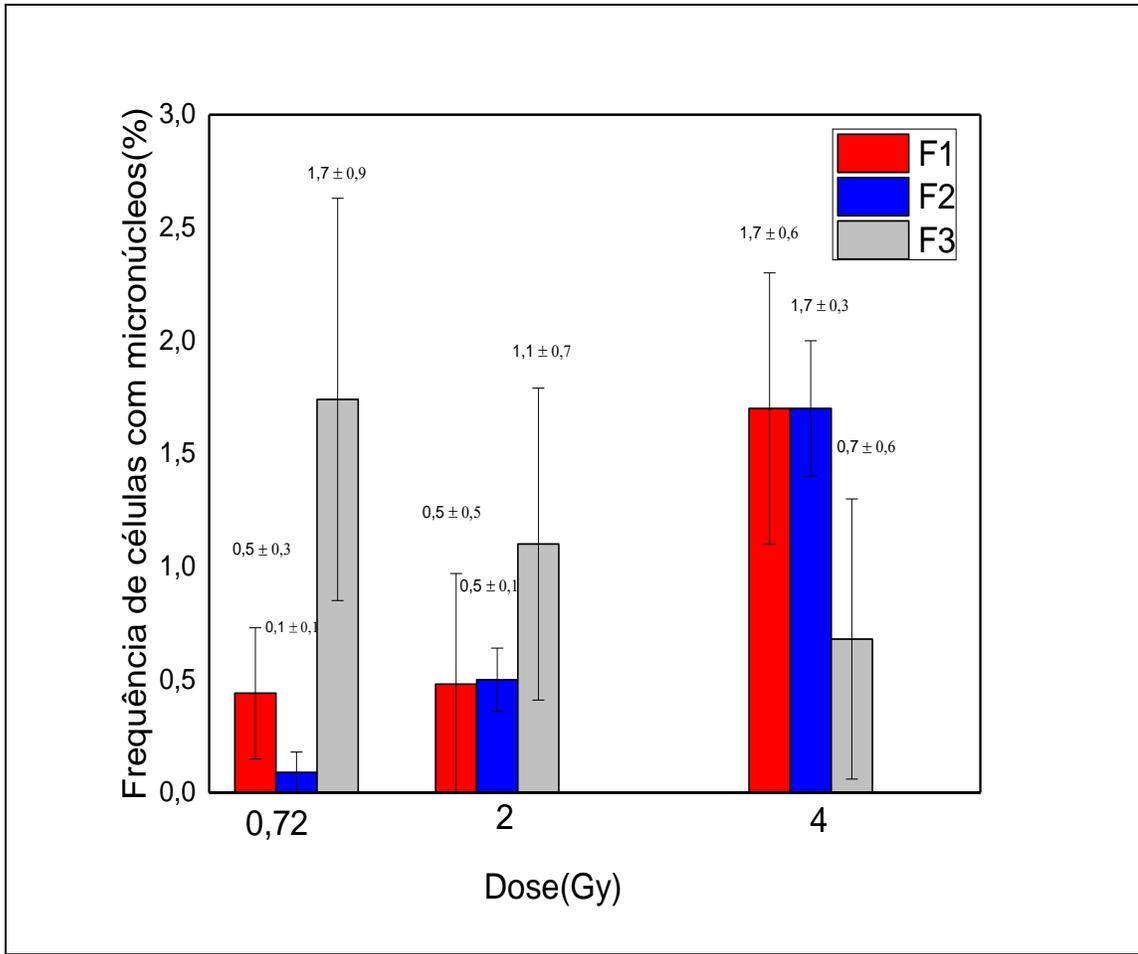
**Tabela 11** - Teste Tukey para Índice Mitótico das amostras irradiadas com a F1. CN – Controle Negativo.

## 5.1 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS RESULTADOS DAS TRÊS FONTES

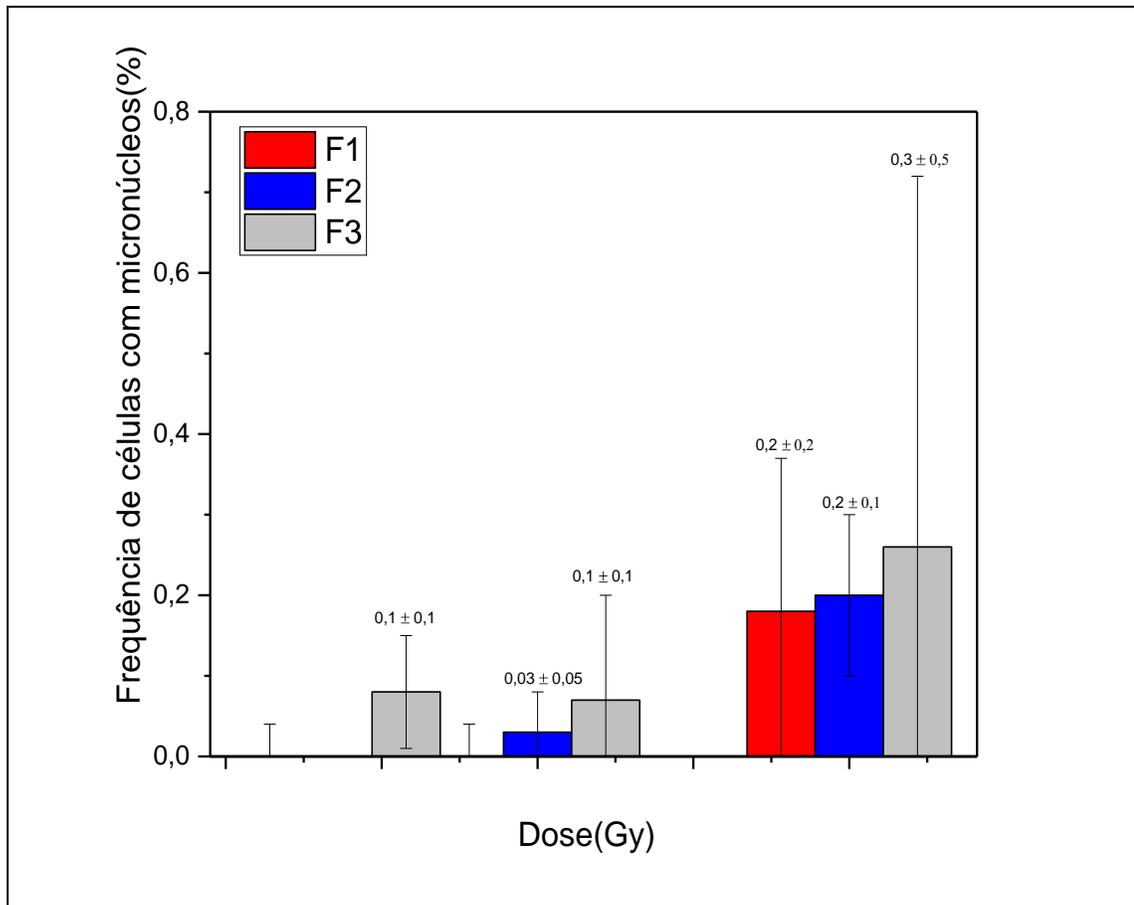
As Figuras 25, 26 e 27 mostram a frequência de micronúcleos em função da dose, agrupando-se os dados obtidos para as 3 fontes por número de MN surgido. Na Figura 25 estão os resultados para um MN, na Figura 26 para 2 MN e na Figura 27 para 3 MN.



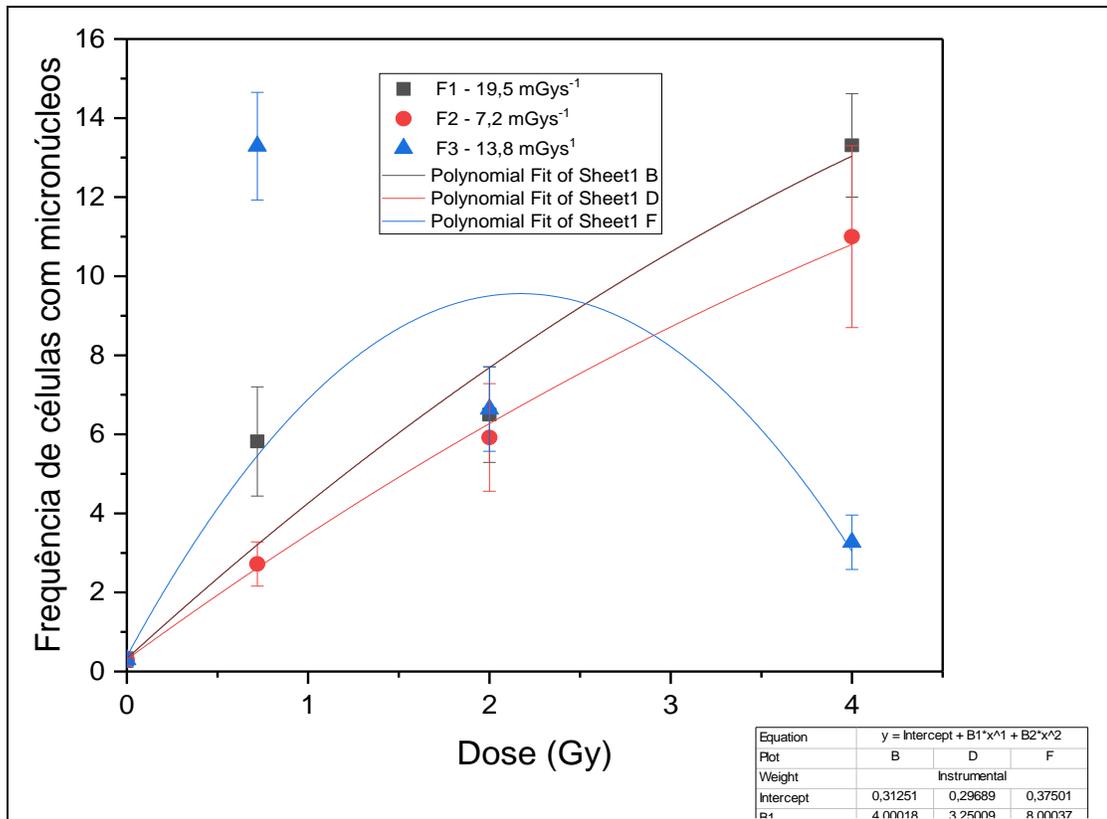
**Figura 22** - Frequência de células com um micronúcleo para as 3 fontes usadas. **Fonte:** O autor.



**Figura 23** - Frequência de células com dois micronúcleos para as 3 fontes usadas. **Fonte:** O autor.



**Figura 24** - Número de células com três micronúcleos para as 3 fontes usadas. Fonte: O autor.



**Figura 25** - Frequência de células detectadas com micronúcleos (MN) nas amostras em função da dose de radiação beta. **Fonte:** O autor.

As fontes F1 e F2, embora apresentem taxas de dose bastante diferentes, mostraram comportamentos semelhantes quanto a indução no número de um único micronúcleo e na presença de dois micronúcleos. Suas frequências para 1 MN aumentaram conforme as doses eram aumentadas, como pode ser visto na Figura 28, que mostra o ajuste polinomial feito para os dados encontrados com as 3 fontes. O mesmo comportamento de aumento da frequência de MN, quando se contam as células com 2 e 3 MN para essas fontes F1 e F2. De certa forma, isso quer dizer que, embora as células tenham sofrido danos temporários, ainda foi possível o reparo celular, sem uma forte indução de morte celular. Essas células danificadas ficaram presentes com suas alterações que criaram micronúcleos e estes puderam ser contados nas amostras. Conforme já foi analisado, isso foi confirmado com o IM.

Por outro lado, podemos notar a taxa de dose da F3 tem um comportamento contrário. Ou seja, a radiação parece ter induzido um decréscimo do número de MN para

com o aumento da dose. Esse seria um comportamento contrário ao esperado, pois quanto maior a dose, maior deve ser o dano provocado. O que explica esse comportamento é o IM. A tabela 13 resume os níveis de significância obtidos no teste ANOVA para o Índice Mitótico das amostras irradiadas em cada uma das fontes. Quando há grande alteração no IM, a frequência de MN contada pode ser bem menor do que a esperada. A análise para os dados das amostras irradiadas com a F3 demonstrou realmente uma alteração no IM. Essa fonte que induziu danos nas células que não foram possíveis ser reparados, gerando morte celular em maior quantidade de células quanto maior era a dose. Como as células mortas não são contadas, resulta na baixa contagem de células com micronúcleos, com um comportamento aparentemente contrário ao esperado. Isso indica que se usada como um bioindicador para dosimetria, o índice mitótico das células da *Allium cepa* é um fator fundamental. Sem a avaliação do IM, pode-se fazer uma avaliação equivocada do comportamento geral da frequência de MN em função da dose.

	<b>F2</b>	<b>F3</b>	<b>F1</b>
<b>p</b>	0,47	0,08	0,3
<b>significância</b>	Não significante	significante	Não significante

**Tabela 12** - Nível de significância no teste ANOVA para o índice Mitótico das amostras irradiadas em cada uma das fontes (se  $p < 0,05$  é significante).

A frequência de três micronúcleos presentes nas células, tanto para fonte F1 quanto para F2 foi muito inferior quando comparada à frequência de dois e três micronúcleos. Ainda assim, as frequências de 2 e 3 MN aumentaram com a dose. Quando analisados os resultados para fonte F3, para 2 MN a frequência diminuiu com a dose e para 3 MN a frequência aumentou com o aumento da dose de radiação. As figuras 31, 32 e 33 mostram a soma das frequências de 1 MN, 2 MN e 3 MN em função da dose recebida pelas células da *Allium cepa* encontrados nas amostras irradiadas com as fontes F2, F3 e F1, respectivamente. Mesmo quando somadas as frequências de todos os MN identificados, as amostras irradiadas com a F3 apresentaram um comportamento contrário

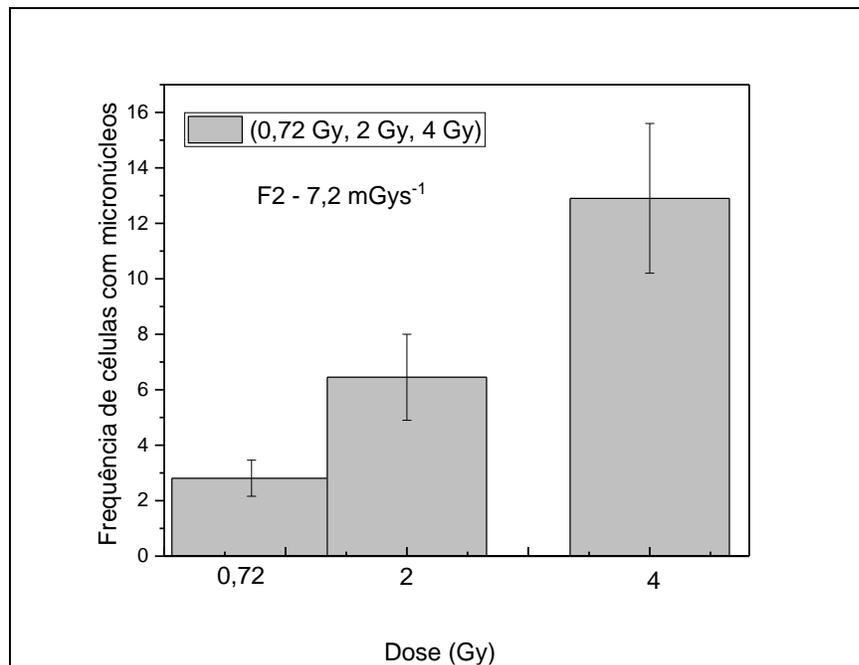
ao esperado, com a diminuição das células danificadas em função da dose. Esse comportamento variável novamente pode ser explicado pelo IM, fortemente afetado na amostra irradiada com a F3. Mais uma vez, reforça-se a importância da determinação do IM na avaliação do comportamento da frequência de MN em função da dose, caso se deseje utilizar esse tipo de amostra para dosimetria. No caso, o comportamento da frequência de MN só poderia ser utilizado como um indicador da dose caso o IM não tenha sofrido alteração. Isso restringe o uso dessas amostras para avaliação de dose também a doses baixas, pois uma dose mais alta também pode ser responsável pela morte celular.

Apesar dessa indicação de que a contagem foi bastante alterada devido a variação do IM, quando se trata de organismos vivos, podemos ter comportamentos variados, que nem sempre podem ser explicados por de alterações genéticas induzidas somente pela irradiação. As alterações podem ser ocasionadas também por outros efeitos como no processo de cultivo entre outras. Assim, esses experimentos devem ser repetidos muitas vezes para uma conclusão definitiva sobre o processo.

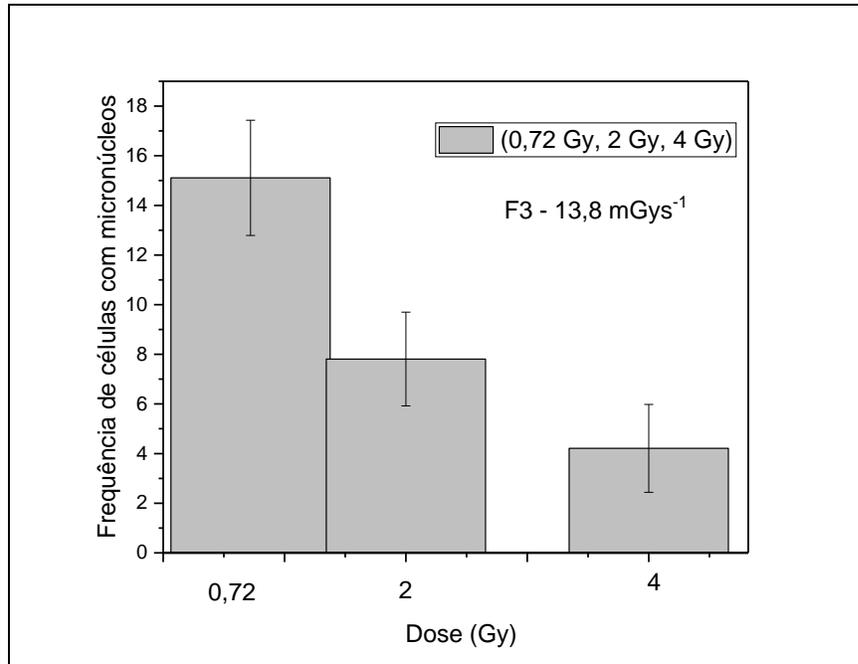
É importante destacar também que a taxa de dose influenciou fortemente a frequência de MN para uma mesma dose absorvida. Na contagem de frequências de um MN, apenas com 2 Gy o número de MN seria considerado similar, dentro das incertezas para qualquer uma das 3 taxas de dose utilizadas. A maior taxa de dose pode induzir um número maior de MN para uma mesma dose, mas também pode levar a um maior número de morte de células. Por isso, apesar da F1 ter a maior taxa de dose, o número de MN contados no experimento é menor do que com taxas menores. Parece interessante verificar esse processo, variando-se ainda mais as taxas de dose. Porém, as doses utilizadas nesse trabalho foram muito altas. Como a própria dose mais alta também pode ser a responsável pela morte celular, será necessário realizar experimentos com doses bem mais baixas evitando a indução de morte celular pelas altas doses, verificando melhor o efeito das taxas de dose.

Ajustes dos gráficos para as fontes F1, F2 e F3 foram feitos com intuito de se obter curvas para comparar os resultados obtidos das três taxas de dose quanto ao aumento do número de células com 1 MN (Figura 29). Um ajuste linear seria considerado um ápice para pesquisa. No entanto, o melhor ajuste consistiu de uma função polinomial. Como há

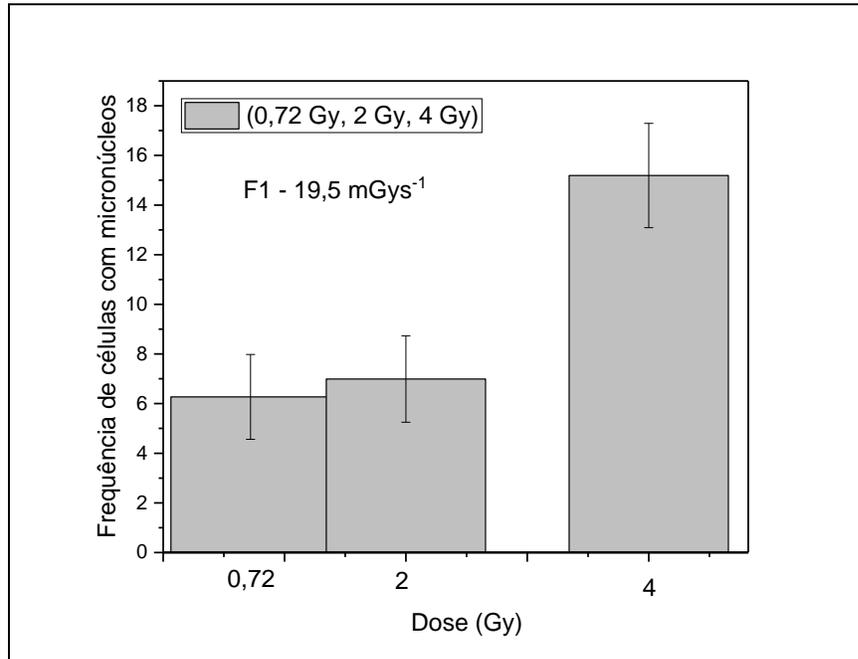
apenas três pontos de dose, isso dificulta a construção de uma boa curva de ajuste. Portanto, é necessário realizarmos um maior número de experimentos com mais doses para melhor compreensão do comportamento da frequência de MN com a dose de radiação beta. Também foram feitos histogramas para o total de MN das fontes F2 (Figura 29), F3 (Figura 30) e F1(Figura 31), onde para as fontes F2 e F1 podemos notar um crescimento do surgimento de MN de acordo o aumento da dose, enquanto a fonte F3 apresenta um comportamento inverso exigindo uma análise mais detalhada num futuro trabalho.



**Figura 26** - Soma das frequências de 1 MN, 2 MN e 3 MN encontrados nas amostras irradiadas com a fonte F2. **Fonte:** O autor.



**Figura 27** - Soma das frequências de 1 MN, 2 MN e 3 MN encontrados nas amostras irradiadas com a fonte F3. **Fonte:** O autor.



**Figura 28** - Soma das frequências de 1 MN, 2 MN e 3 MN encontrados nas amostras irradiadas com a fonte F1. **Fonte:** O autor.

## 6 CONCLUSÕES

Todas as três fontes utilizadas e em todas as doses absorvidas aplicadas nas raízes da *Allium cepa* induziram de danos nas suas células, com surgimento de micronúcleos em número maior do que em células não irradiadas.

As taxas de dose de  $7,2 \text{ mGy.s}^{-1}$  e  $19,5 \text{ mGy.s}^{-1}$  induziram mais MN quanto maior foi a dose absorvida. A taxa de dose  $13,8 \text{ mGy.s}^{-1}$  induziu mais MN quanto menor a dose. Ou seja, taxas de dose diferentes induziram um comportamento diverso na frequência de micronúcleos para um mesmo intervalo de dose. Apesar do comportamento esperado ser que de uma dose maior induz um maior dano produzindo um maior número de células com MN, o índice mitótico foi um fator fundamental. As amostras que demonstraram um comportamento inesperado, com diminuição da frequência de MN com o aumento da dose tiveram alterações no IM, o que significa um número maior morte de celular, diminuindo também a contagem da frequência de MN nelas. Com isso, esse trabalho leva a conclusão de que para se usar o comportamento da frequência de MN nas células a *Allium cepa* na avaliação de dose absorvida, é indispensável se analisar também o Índice Mitótico para verificar se não houve morte celular que irá alterar o comportamento gerando falsas avaliações. Esse é um problema ainda maior em altas doses, onde as mesmas também induzem morte celular e podem provocar alterações no comportamento das curvas de frequência versus dose.

Alterações citogenéticas com a dose absorvida de radiação beta, bem como com a taxa de dose utilizada foram observadas nesse trabalho. O aumento da frequência de micronúcleos induzidos pela radiação juntamente com a análise de índice mitótico dá indícios de que a *Allium cepa* poderá ser usada para demonstrar os efeitos causados por diferentes taxas de dose de radiação beta, podendo contribuir no entendimento de efeitos biológicos induzidos por diferentes taxas de dose, como o que acontece durante o uso da radioterapia flash.

## 7 PERSPECTIVAS

Como a morte celular é mais significativa em altas doses, e como foram escolhidas doses mais altas para esse trabalho, futuramente é necessária uma investigação mais detalhada com doses menores para se verificar somente o efeito das diferentes taxas de dose, evitando a morte celular pelo efeito da alta dose.

Pretende-se testar as mesmas fontes, porém utilizando uma faixa mais abrangente de doses, principalmente incluindo doses mais baixas para verificar com clareza o efeito na indução de MN pelas das diferentes taxas de dose. Pretende-se também incluir outras fontes com taxas de dose diferentes.

Serão comparados os dados dos efeitos da irradiação beta com outros tipos de fontes. Tais resultados podem ser aliados no estudo de células sanguíneas de linfócitos periféricos, permitindo a comparação dos dados obtidos em células vegetais e animais para se estipular até o quanto as biotas vegetais podem ser consideradas um bom parâmetro de obtenção de respostas a exposição, quando comparado ao corpo humano.

## REFERÊNCIAS

AINSBURY, E. A. et al. Review of retrospective dosimetry techniques for external ionising radiation exposures. **Radiation protection dosimetry**, v. 147, n. 4, p. 573-592, 2011.

ALEXANDER, George A. et al. BiodosEPR-2006 Meeting: Acute dosimetry consensus committee recommendations on biodosimetry applications in events involving uses of radiation by terrorists and radiation accidents. **Radiation Measurements**, v. 42, n. 6-7, p. 972-996, 2007.

ATTIX, Frank Herbert. **Introduction to radiological physics and radiation dosimetry**. John Wiley & Sons, 2008.

BOLSUNOVSKY, A. et al. Chromosomal aberrations and micronuclei induced in onion (*Allium cepa*) by gamma-radiation. **Journal of environmental radioactivity**, v. 207, p. 1-6, 2019.

BUSHONG STEWART, C. Radiologic science for technologists. 2008.

TEDESCO, S. et al. Bioindicator of genotoxicity: the *Allium cepa* test. **Environmental contamination**, p. 137-156, 2012.

BISHT, Bhawna et al. Food irradiation: Effect of ionizing and non-ionizing radiations on preservation of fruits and vegetables—a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 114, p. 372-385, 2021..

DAFRE, A. L.; MARIS, A. F. Efeitos biológicos das radiações. Florianópolis. Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.

DE SOUZA, Raphael Bastão et al. Genotoxicity evaluation of two metallic-insecticides using *Allium cepa* and *Tradescantia pallida*: a new alternative against leaf-cutting ants. **Chemosphere**, v. 168, p. 1093-1099, 2017.

DIAS, Francisca L. et al. Cytogenetic analysis in lymphocytes from workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 23, n. 2, p. 228-233, 2007.

DIAS, Andre Roncon et al. Carnoy's solution increases the number of examined lymph nodes following gastrectomy for adenocarcinoma: a randomized trial. **Gastric Cancer**, v. 19, n. 1, p. 136-142, 2016.

DOROW, Patrícia Fernanda; MEDEIROS, Caroline de. Proteção radiológica no diagnóstico e terapia. **Florianópolis: Publicação do Ifsc**, 2019.

EASTMOND, David A.; TUCKER, James D. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 13, n. 1, p. 34-43, 1989.

FIELD, Andy. **Descobrimos a estatística usando o SPSS-5**. Penso Editora, 2009.

FISKESJÖ, G.; LEVAN, A. Evaluation of the first ten MEIC chemicals in the Allium test. *ATLA*, 21, 139-149;(c) Fiskesjö G.(1997) Allium test for screening chemicals; evaluation of cytological parameters. **Plants for Environmental Studies**, p. 307-333, 1993.

HALL, Eric J. et al. **Radiobiology for the Radiologist**. 2006.

DE SERRES, Frederick J. Introduction: Utilization of higher plant systems as monitors of environmental mutagens. **Environmental Health Perspectives**, v. 27, p. 3-6, 1978.

GRANT, William F. Chromosome aberration assays in Allium: A report of the US Environmental Protection Agency gene-tox program. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 99, n. 3, p. 273-291, 1982.

GROVER, I. S. et al. Genotoxicity of pesticides and plant systems. **Progress in Clinical and Biological Research**, v. 340, p. 91-106, 1990.

WEST, Catharine. Ionizing radiation biomarkers in epidemiological studies-An update. **Mutation Research-Reviews**, v. 771, p. 59-84, 2017.

HAMMER, D. A. T.; RYAN, P. D.; HAMMER, Ø.; HARPER, D.A .T., Past: Paleontological **Statistics Software Package for Education and Data Analysis Palaeontologia Electronica**. Disponível em: [http://palaeo-electronica.orghttp://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.orghttp://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm).

IAEA - International Atomic Energy Agency, **Technical report series**, Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment. a manual. 2001. Vienna: IAEA, 405.

IAEA – International Atomic Energy Agency, **Technical report series**, Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies. 2011. Vienna: IAEA.

KULKA, Ulrike et al. RENEB–Running the European Network of biological dosimetry and physical retrospective dosimetry. **International Journal of Radiation Biology**, v. 93, n. 1, p. 2-14, 2017.

LEME, Daniela Morais; MARIN-MORALES, Maria Aparecida. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water— a case study. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 650, n. 1, p. 80-86, 2008.

LEME, Daniela Morais; MARIN-MORALES, Maria Aparecida. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation research/reviews in mutation research**, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.

LUDOVICI, Gian Marco et al. Adaptation to ionizing radiation of higher plants: From environmental radioactivity to chernobyl disaster. **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 222, p. 106375, 2020..

LLOYD, D. C.; PURROTT, R. J. Chromosome aberration analysis in radiological protection dosimetry. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 1, n. 1, p. 19-28, 1981.

LLOYD, D. C. et al. **Doses in radiation accidents investigated by chromosome aberration analysis: Pt. 20. Review of cases investigated, 1991-1993**. National Radiological Protection Board, 1994.

LUDOVICI, G. M. et al. Cytogenetic bio-dosimetry techniques in the detection of dicentric chromosomes induced by ionizing radiation: A review. **The European Physical Journal Plus**, v. 136, n. 5, p. 482, 2021.

LUDOVICI, Gian Marco et al. Effects of Ionizing Radiation on Flora Ten Years after the Fukushima Dai-ichi Disaster. **Plants**, v. 11, n. 2, p. 222, 2022.

LEME, Daniela Morais; MARIN-MORALES, Maria Aparecida. Allium cepa test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation research/reviews in mutation research**, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.

MIDANDER, J.; REVESZ, Le. The frequency of micronuclei as a measure of cell survival in irradiated cell populations. **International Journal of Radiation Biology and Related Studies In Physics, Chemistry and Medicine**, v. 38, n. 2, p. 237-242, 1980.

MANGALAMPALLI, Bhanuramya; DUMALA, Naresh; GROVER, Paramjit. Allium cepa root tip assay in assessment of toxicity of magnesium oxide nanoparticles and microparticles. **Journal of Environmental Sciences**, v. 66, p. 125-137, 2018.

RICHARDSON, David B. et al. Risk of cancer from occupational exposure to ionising radiation: retrospective cohort study of workers in France, the United Kingdom, and the United States (INWORKS). **Bmj**, v. 351, 2015.

RÜHM, Werner et al. Dose and dose-rate effects of ionizing radiation: a discussion in the light of radiological protection. **Radiation and environmental biophysics**, v. 54, n. 4, p. 379-401, 2015.

RAMALHO, A. T.; NASCIMENTO, A. C. H.; NATARAJAN, A. T. Dose assessments by cytogenetic analysis in the Goiania (Brazil) radiation accident. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 25, n. 2, p. 97-100, 1988..

SILVA, Rogério MV et al. Low cost electron irradiator using  $^{90}\text{Sr}$ +  $^{90}\text{Y}$  sources. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 167, p. 108235, 2020.

SILVA, Júlio et al. Micronucleus frequency analysis in neutron-gamma-beam irradiated human blood at three different absorbed doses. **Blucher Biophysics Proceedings**, v. 2, n. 1, p. 24-27, 2019.

SINGH, Shalini et al. Radiation therapy induced micronuclei in cervical cancer—does it have a predictive value for local disease control?. **Gynecologic oncology**, v. 97, n. 3, p. 764-771, 2005.

TAUHATA, L. et al. Radioproteção e Dosimetria: Fundamentos, Instituto de Radioproteção e Dosimetria. **Comissão Nacional de Energia Nuclear, 5ª revisão, Rio de Janeiro, 2003.**

UNITED NATIONS SCIENTIFIC COMMITTEE ON THE EFFECTS OF ATOMIC RADIATION et al. **Report of the United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation 2014: Sixty-first Session (21-25 July 2014)**. United Nations, 2014.

VAIJAPURKAR, S. G. et al. Gamma-irradiated onions as a biological indicator of radiation dose. **Radiation measurements**, v. 33, n. 5, p. 833-836, 2001.

WALPOLE, Ronald E. et al. **Probability and statistics for engineers and scientists**. New York: Macmillan, 1993.

XAVIER, Ana M.; MORO, José T.; HEILBRON, Paulo F. Princípios básicos de segurança e proteção radiológica. **UFRGS, 3ª Edição**, 2006.

XAVIER, M. N. et al. Allium cepa used as a dosimetry system in nuclear and radiological emergencies. **The European Physical Journal Plus**, v. 136, n. 6, p. 1-11, 2021..

YUKIHARA, Eduardo G.; MCKEEVER, Stephen WS. **Optically stimulated luminescence: fundamentals and applications**. John Wiley & Sons, 2011.