



PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

TESE DE DOUTORADO

**Viabilidade do uso de biota vegetal para caracterização biofísica e análise
dosimétrica de danos citogenéticos induzidos por radiação ionizante**

por

MAGNO NOGUEIRA XAVIER

MAGNO NOGUEIRA XAVIER

Viabilidade do uso de biota vegetal para caracterização biofísica e análise dosimétrica de danos citogenéticos induzidos por radiação ionizante

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Física.

Orientadora: Profa. Dra. Susana de Souza Lalic

Agradecimentos

A Deus.

À Profa. Dra. Susana Lalic, pelo acolhimento desde o momento em que me recebeu como seu aluno de mestrado até agora com a finalização do meu doutorado. Obrigado pelos ensinamentos, compreensão, amizade e pelos puxões de orelha que me impulsionaram no desenvolvimento desta linha de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Francesco d'Errico, pela colaboração.

À Profa. Eliana Midori, por sempre se mostrar disposta a ajudar o nosso grupo de Dosimetria Biofísica.

À amiga e recém doutora Débora Siqueira, pela realização das medidas de TL e pelo suporte com a interpretação dos dados.

Ao Dr. Anderson Vinícius, pela realização das simulações computacionais e suporte com a interpretação dos dados.

Ao pessoal do Laboratório de Dosimetria Biofísica, em especial, à Alef, Brenda, Erison, Grazi, Iasmim, July, Ruan e Vinícius, que além de ter tido a oportunidade de coorientar alguns, foram extremamente parceiros e se tornaram grandes amigos.

Ao quase doutor e amigo (e talvez dono da UFS, kkkk) Michael Douglas, que além de ser um químico de alta categoria, é um ser humano de uma integridade ímpar! Obrigado por sempre ter estado disposto a ajudar com coisas básicas até às mais complexas!

Aos professores Dr. Ricardo Scher e Dra. Silmara Pantaleão, pelos ensinamentos e amizade.

À técnica do Laboratório de Genética e Conservação de Recursos Naturais (GECON) da UFS, Ma. Maria José Bryanne Araujo Santos, pela parceria nos experimentos e amizade.

À Profa. Dra. Simara Campos, por ter incentivado a minha curiosidade científica no período que fui seu orientando de IC.

À minha amiga-irmã Bárbara Matos, por muitas coisas, mas especialmente por ter sempre me ajudado durante momentos críticos de ansiedade.

Aos professores da Pós-Graduação, por direcionarem os meus estudos nas disciplinas cursadas.

À secretaria da Pós-Graduação, em especial, ao Álvaro, pela atenção e disposição em ajudar com as demandas dos estudantes.

Aos meus pais, irmã e sobrinha, que mesmo de longe sempre me deram/dão apoio, sendo eles a minha base e maior motivação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a minha formação acadêmica, fechando esse ciclo com a culminância desta tese.

RESUMO

XAVIER, M. N. **Viabilidade do uso de biota vegetal para caracterização biofísica e análise dosimétrica de danos citogenéticos induzidos por radiação ionizante.** São Cristóvão: Universidade Federal de Sergipe, 2023. 118 p. Tese (Doutorado em Física) – Universidade Federal de Sergipe, 2023.

É consensual na comunidade científica a necessidade de ampliar a compreensão sobre a biofísica envolvida nos processos de indução de danos biológicos causados por doses baixas e moderadas de radiação, tanto para proteção contra os seus efeitos indesejáveis, quanto para modulá-los para aplicações multifacetadas. O uso de plantas superiores em bioensaios é uma ferramenta amplamente utilizada para detecção e triagem de agentes potencialmente genotóxicos. Entre as espécies vegetais, a cebola (*Allium cepa*) é um dos modelos mais utilizados para determinação de potencial genotóxico de diversos químicos, com efeitos que se mostraram comparáveis em até 82% entre testes de determinação de anormalidades genéticas realizados com modelos animais. Em contrapartida, seu uso para investigação de toxicidade radio-induzida permanece insuficientemente explorado. Neste trabalho, raízes de *Allium cepa* foram irradiadas com fontes de ^{241}Am e $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$, emissoras de partículas α e β , respectivamente, objetivando quantificar as frequências dos principais endpoints citogenéticos radioinduzidos e selecionar o mais indicado para a plotagem de curvas de dose-resposta. Simulações computacionais dos cenários experimentais foram realizadas usando códigos de Monte Carlo, a fim de determinar as taxas de doses absorvidas pelas raízes de *Allium cepa*. Adicionalmente, para as irradiações β , uma curva de dose-resposta TL foi plotada para fins de comparação usando irradiações de TLD-100 com a mesma configuração experimental utilizada para as irradiações das raízes de *Allium cepa*. Parâmetros como diferenças na LET, taxas de doses e doses absorvidas, bem como a influência de diferentes intervalos após as irradiações foram considerados. Os principais resultados incluem uma dependência linear da frequência de micronúcleos com a dose para a irradiação com partículas α , de 0,02 a 0,08 Gy, com início de atividade citotóxica a partir de 0,1 Gy. Por outro lado, para as irradiações com partículas β , dentro do intervalo de 0,04 a 1,44 Gy, a dependência das frequências de micronúcleos com as doses foi não-linear. Não foi detectada a presença de atividade citotóxica, mas houve agravamento do dano genotóxico a partir de 0,72 Gy, detectado como células com dois e três micronúcleos. As análises da evolução temporal após três ciclos celulares de cessadas às irradiações, indicaram por meio das frequências de micronúcleos, potencial para instabilidade cromossômica. Os dados sobre as influências de diferentes taxas de doses absorvidas de partículas β ($\dot{D}_1 = 1,4 \pm 0,1$ mGy/s, $\dot{D}_2 = 5,3 \pm 2,3$ mGy/s, $\dot{D}_3 = 12,2 \pm 3,4$ mGy/s e $\dot{D}_4 = 13,9 \pm 3,2$ mGy/s) mantendo-se fixa a dose absorvida (0,72 Gy), revelaram comportamentos distintos nas frequências de micronúcleos radioinduzidas, porém, todas influenciadas por alterações do índice mitótico. Após essas análises, foi proposto um modelo matemático que incorporou um fator de correção que aproxima a estimativa da dose de radiação beta absorvida detectada via frequência de micronúcleos da dose absorvida detectada via dosimetria TL convencional. Este fator de correção permitiu subtrair a influência do coeficiente quadrático no coeficiente linear da dose, com base em fundamentos radiobiológicos. Isso, por sua vez, mostrou que conforme a dose foi aumentada, o coeficiente quadrático exerceu maior influência na estimativa da dose, principalmente devido ao possível aumento da atividade de mutagenicidade. Como conclusão, a frequência de MN em células de *Allium cepa* mostrou potencial para ser usada como um biodosímetro citogenético, desde que sejam feitas considerações radiobiológicas e ajustes matemáticos apropriados.

Palavras-chave: *Allium cepa*. Biofísica das radiações. Bioindicadores. Micronúcleo. Proteção Radiológica. Radioatividade.

ABSTRACT

XAVIER, M. N. **Viability of using plant biota for biophysical characterization and dosimetric analysis of ionizing radiation-induced cytogenetic damage.** São Cristóvão: Federal University of Sergipe, 2023. 118 p. Thesis (PhD's degree in Physics) – Federal University of Sergipe, 2023.

It is a consensus within the scientific community the need to broaden the understanding of the biophysics involved in the processes of induction of biological damage caused by low and moderate doses of radiation, both for protection against their undesirable effects and for modulating them for multifaceted applications. The use of higher plants in bioassays is a widely employed tool for the detection and screening of potentially genotoxic agents. Among plant species, onion (*Allium cepa*) is one of the most used models for determining the genotoxic potential of various chemicals, with effects that were comparable in up to 82% between tests to determine genetic abnormalities carried out with animal models. However, its use for investigating radio-induced toxicity remains insufficiently explored. In this work, *Allium cepa* roots were irradiated with ^{241}Am and $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ sources, emitting α and β particles, respectively, aiming to quantify the frequencies of major radioinduced cytogenetic endpoints and select the most suitable one for plotting cytogenetic dose-response curves. Computational simulations of the experimental scenarios were performed using Monte Carlo codes to determine the absorbed dose rates by *Allium cepa* roots. Additionally, for the β irradiations, a TL dose-response curve was plotted for comparison purposes using TLD-100 irradiations with the same experimental setup used for the *Allium cepa* root irradiations. Parameters such as differences in LET, dose rates, absorbed doses, as well as the influence of different time intervals after irradiation, were considered. The main results include a linear dependence of micronucleus frequency on dose for α particle irradiation, from 0.02 to 0.08 Gy, with cytotoxic activity starting at 0.1 Gy. On the other hand, for β particle irradiations, within the range of 0.04 to 1.44 Gy, the dependence of micronucleus frequencies on doses was nonlinear. Cytotoxic activity was not detected, but an aggravation of genotoxic damage was observed from 0.72 Gy, detected as cells with two and three micronuclei. Analyses of temporal evolution after three cell cycles following irradiations indicated potential for chromosomal instability through micronucleus frequencies. Data on the influences of different absorbed dose rates of β particles ($\dot{D}_1 = 1.4 \pm 0.1 \text{ mGy/s}$, $\dot{D}_2 = 5.3 \pm 2.3 \text{ mGy/s}$, $\dot{D}_3 = 12.2 \pm 3.4 \text{ mGy/s}$ e $\dot{D}_4 = 13.9 \pm 3.2 \text{ mGy/s}$) while keeping the absorbed dose fixed (0.72 Gy) revealed distinct behaviors in radio-induced micronucleus frequencies, but all influenced by changes in the mitotic index. Following these analyses, a mathematical model was proposed that incorporated a correction factor that approximates the estimated absorbed beta radiation dose detected via micronucleus frequency to the absorbed dose detected via conventional TL dosimetry. This correction factor allowed for subtracting the influence of the quadratic coefficient from the linear coefficient of the dose, based on radiobiological fundamentals. This, in turn, showed that as the dose was increased, the quadratic coefficient exerted greater influence on the dose estimate, mainly due to the possible increase in mutagenic activity. In conclusion, the frequency of micronuclei in *Allium cepa* cells showed potential for use as a cytogenetic biodosimeter, provided appropriate radiobiological considerations and mathematical adjustments are made.

Keywords: *Allium cepa*. Radiation Biophysics. Bioindicators. Micronucleus. Radiological Protection. Radioactivity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 – Espalhamento de elétrons em um material	30
Figura 4.2 – Alcance R (cm) de partículas beta em vários materiais (densidade em g/cm ³) ...	30
Figura 4.3 – Diagramas das células animal e vegetal.....	34
Figura 4.4 – Representação do ciclo celular	34
Figura 4.5 – Esquema da mitose celular	35
Figura 4.6 – Representação da estrutura e composição de um cromossomo.....	36
Figura 4.7 – Modelo simplificado do fenômeno termoluminescente. Em (a) é ilustrado o processo de excitação do elétron quando o material é irradiado. Elétron (círculos preenchidos em vermelho) e buraco (círculos vazios) difundem-se pelas bandas até serem aprisionados nas armadilhas T ou R, respectivamente. Posteriormente, é mostrado em (b) o aprisionamento do elétron e do buraco até serem estimulados termicamente. Por fim, em (c) mostra o efeito do estímulo térmico sobre os elétrons, que se difundem para a banda de condução, podendo ocorrer a recombinação com o buraco preso na armadilha R.....	42
Figura 4.8 – Distribuição de ionizações produzidas em uma célula por radiações com baixa e alta LET, respectivamente	43
Figura 4.9 – Processo de formação de micronúcleos.....	45
Figura 4.10 – Representação de uma distribuição normal de dados.....	46
Figura 5.1 – Fonte de ²⁴¹ Am.....	48
Figura 5.2 – Fonte de ⁹⁰ Sr/ ⁹⁰ Y	49
Figura 5.3 – Sistema de irradiação dos TLDs-100. (A) Vista completa do suporte sem a fonte de ²²⁶ Ra; (B) Vista da parte superior do suporte; (C) Vista da parte inferior do suporte; (D) Vista completa do suporte com a fonte de ²²⁶ Ra	51
Figura 5.4 – Leitora de TLDs Harshaw 4500.....	51
Figura 5.5 – Forno mufla utilizado para o tratamento térmico dos TLDs	53
Figura 5.6 – Irradiador SAMARA com fontes de ⁹⁰ Sr/ ⁹⁰ Y	53
Figura 5.7 – Procedimento de autoclavagem de materiais: (A) Revestimento dos materiais com papel alumínio e papel madeira; (B) Equipamento de autoclave; (C) Equipamento de autoclave em funcionamento; (D) Materiais autoclavados	54
Figura 5.8 – Esterilização dos materiais com luz UVC. (A) Disposição dos materiais na cabine de fluxo laminar; (B) Exposição dos materiais à luz UVC.....	55
Figura 5.9 – Procedimento de germinação de sementes de <i>Allium cepa</i>	56
Figura 5.10 – Irradiação beta de raízes de <i>Allium cepa</i> no suporte de acrílico	57

Figura 5.11 – Procedimento de preparo de lâminas de microscopia. (A) Hidrólise ácida; (B) Lavagem com H ₂ O destilada; (C) Coloração com orceína acética 2%; (D) Lâminas produzidas	58
Figura 5.12 – Microscópio óptico Olympus BX51. (A) Vista frontal do microscópio; (B) Vista lateral do microscópio; (C) Lâmina sob a objetiva de 100 ×; (D – E) Visualização das imagens das células com o aumento de 1000 ×	59
Figura 6.1 – Geometria de irradiação utilizada na simulação com o código PHITS.....	67
Figura 6.2 – Curva de dose-resposta para TLDs-100 irradiados durante diferentes tempos ..	70
Figura 6.3 – Comparação entre IM, FMN e FACs em função da dose absorvida de partículas alfa em células meristemáticas radiculares de <i>Allium cepa</i> (média ± erro padrão da média) ..	74
Figura 6.4 – Células de raízes de <i>Allium cepa</i> irradiadas com 200 mGy de radiação alfa: ^a ampliação de 400×; ^b ampliação de 1000 × (XAVIER et al., 2021).....	76
Figura 6.5 – Distúrbio na distribuição dos cromossomos na mitose e presença de micronúcleos em células radiculares de <i>Allium cepa</i> irradiadas com partículas α de uma fonte de ²⁴¹ Am (ampliação de 1000 ×). ^a prófase perturbada; ^b cromossomo sticky; ^{c1} cromossomo tardio em metáfase, ^{c2} metáfase multipolar; (^{d-f}) Micronúcleos (XAVIER et al., 2021).....	77
Figura 6.6 – Aberrações cromossômicas em células de raízes de <i>Allium cepa</i> irradiadas com partículas α de uma fonte de ²⁴¹ Am (ampliação de 1000 ×). ^a - ^c pontes na anáfase e micronúcleos; ^d fragmentos; ^e anáfase multipolar com cromossomo atrasado, ^f cromossomo atrasado e fragmentos; ^g cromossomo atrasado (XAVIER et al., 2021)	78
Figura 6.7 – Curva de dose-resposta citogenética para micronúcleos induzidos em células de <i>Allium cepa</i> por partículas alfa de uma fonte de ²⁴¹ Am	79
Figura 6.8 – Células radiculares de <i>Allium cepa</i> com mais de um micronúcleo induzido por radiação beta (aumento de 1000 ×)	83
Figura 6.9 – Aberrações cromossômicas induzidas por partículas beta em células meristemáticas radiculares de <i>Allium cepa</i> : 1 – 5 : pontes; 6 – 11 : cromossomo atrasado; 12 – 16 : fragmentos cromossômicos; 17 – 29 : Aberrações cromossômicas múltiplas; 30 : Stickness (aumento de 1000×)	85
Figura 6.10 – Curvas de dose-resposta para micronúcleos induzidos por radiação β em células meristemáticas radiculares de <i>Allium cepa</i> . (I) Frequência considerando a soma das células com um, dois e três micronúcleos; (II) frequência de células com um micronúcleo; (III) frequência de células com dois e três micronúcleos	87
Figura 6.11 – Evolução temporal do IM e das frequências de micronúcleos simples e múltiplos em células radiculares de <i>Allium cepa</i> (média ± erro padrão da média)	94

Figura 6.12 – Frequência de <i>endpoints</i> citogenéticos induzidos em células radiculares de <i>Allium</i> cepa após 24, 48 e 72 h de cessada as irradiações com partículas β (média \pm erro padrão da média)	98
Figura 6.13 – Influência de diferentes taxas de dose absorvida de partículas beta em <i>endpoints</i> citogenéticos induzidos em células radiculares de <i>Allium</i> cepa irradiadas com 0,72 Gy (média \pm erro padrão da média)	100
Figura 6.14 – Curva de dose-resposta para micronúcleos simples induzidos por partículas β	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 – Alcance R (cm) de partículas α e β no ar e no tecido humano.....	31
Tabela 4.2 – Grandezas radiológicas e dosimétricas.....	33
Tabela 4.3 – Evolução temporal e ação das radiações ionizantes no tecido biológico.....	38
Tabela 5.1 – Propriedades do TLD-100.....	50
Tabela 5.2 – Informações das fontes de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ utilizadas nas irradiações de raízes de <i>Allium cepa</i>	61
Tabela 6.1 – Resultados TL para três medições realizadas na mesma configuração de irradiação apresentada na seção 5.2.2.1	68
Tabela 6.2 – Resultados TL para os pares de TLDs-100 irradiados durante diferentes tempos e para o par de dosímetros não irradiados	69
Tabela 6.3 – Índice mitótico (IM) de células meristemáticas radiculares de <i>Allium cepa</i> expostas à diferentes doses de radiação alfa de uma fonte de ^{241}Am (média \pm erro padrão da média)	72
Tabela 6.4 – Aberrações cromossômicas e anormalidades nucleares induzidos por partículas alfa em células meristemáticas radiculares de <i>Allium cepa</i> (média \pm erro padrão da média).....	73
Tabela 6.5 – Índice mitótico (IM) de células meristemáticas radiculares de <i>Allium cepa</i> expostas à diferentes doses de radiação beta de uma fonte de $^{90}\text{Sr}/\text{Y}$ (média \pm erro padrão da média)	80
Tabela 6.6 – Aberrações cromossômicas em anáfase-telófase induzidos por partículas beta em células meristemáticas radiculares de <i>Allium cepa</i> (média \pm erro padrão da média)	81
Tabela 6.7 – Distribuição de micronúcleos em células meristemáticas radiculares de <i>Allium cepa</i> irradiadas com partículas beta (média \pm erro padrão da média).....	82
Tabela 6.8 – Frequência de micronúcleos induzida em células meristemáticas radiculares de <i>Allium cepa</i> por partículas alfa de uma fonte de ^{241}Am (média \pm erro padrão da média).....	88
Tabela 6.9 – Frequência de micronúcleos induzida em células meristemáticas radiculares de <i>Allium cepa</i> por partículas beta de uma fonte de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ (média \pm erro padrão da média).....	88
Tabela 6.10 – Resultados da FMN simples para três lotes de raízes de <i>Allium cepa</i> irradiadas com uma dose de 0,72 Gy sob a mesma configuração experimental.....	91
Tabela 6.11 – Resultados da FMN múltiplos para três lotes de raízes de <i>Allium cepa</i> irradiadas com uma dose de 0,72 Gy sob a mesma configuração experimental.....	91
Tabela 6.12 – Resultados da FMN para três lotes de raízes de <i>Allium cepa</i> não irradiadas ..	91
Tabela 6.13 – Frequência de células com micronúcleos (MNs) para três lotes de raízes de <i>Allium cepa</i> irradiadas com 0,72 Gy de partículas β (média \pm erro padrão da média)	93

Tabela 6.14 – Dosimetria de partículas β usando raízes de <i>Allium cepa</i> irradiadas com uma fonte de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$	104
--	-----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	UM BREVE ESTADO DA ARTE	19
3	OBJETIVOS.....	23
3.1.1	OBJETIVO GERAL	23
3.1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4	FUNDAMENTOS TEÓRICOS	25
4.1	FÍSICA DAS RADIAÇÕES IONIZANTES	25
4.1.1	INTERAÇÃO DA MATÉRIA COM FÓTONS.....	26
4.1.2	INTERAÇÃO DA MATÉRIA COM PARTÍCULAS CARREGADAS.....	28
4.1.3	GRANDEZAS RADIOLÓGICAS E DOSIMÉTRICAS	31
4.2	EFEITOS BIOLÓGICOS DAS RADIAÇÕES IONIZANTES.....	33
4.2.1	ESTRUTURA DA CÉLULA EUCARIÓTICA E CICLO CELULAR	33
4.2.2	BIOFÍSICA DO DANO CROMOSSÔMICO RADIOINDUZIDO	36
4.3	DOSIMETRIA DAS RADIAÇÕES IONIZANTES.....	39
4.3.1	TERMOLUMINESCÊNCIA.....	40
4.3.2	DOSÍMETROS TL: TLD-100 (LiF: Mg, Ti)	42
4.3.3	APLICAÇÃO DOS CONCEITOS DE DOSE EM DOSIMETRIA BIOLÓGICA	43
4.3.3.1	MICRONÚCLEOS NA AVALIAÇÃO DE DOSE ABSORVIDA	44
4.3.4	TRATAMENTO ESTATÍSTICO DE DADOS	45
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
5.1	DETERMINAÇÃO DA TAXA DE DOSE DA FONTE DE ^{241}Am	48
5.2	DETERMINAÇÃO DA TAXA DE DOSE DA FONTE DE $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$	49
5.2.1	DOSIMETRIA COMPUTACIONAL – MÉTODO TEÓRICO.....	49
5.2.2	DOSIMETRIA TERMOLUMINESCENTE – MÉTODO EXPERIMENTAL	50
5.2.2.1	TESTE DE REPRODUTIBILIDADE E HOMOGENEIDADE DE TLDS.....	50
5.2.2.2	ANÁLISE DA TAXA DE DOSE ABSORVIDA DE PARTÍCULAS BETA USANDO TLD-100 ...	52
5.2.2.3	ANÁLISE DO PERFIL DE CURVA DE DOSE-RESPOSTA USANDO TLD-100	54
5.3	EXPERIMENTOS <i>in vivo</i> COM RAÍZES DE <i>Allium cepa</i>	54
5.3.1	GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Allium cepa</i>	54
5.3.2	IRRADIAÇÃO COM PARTÍCULAS α	56

5.3.3	IRRADIAÇÃO COM PARTÍCULAS β	57
5.3.4	QUANTIFICAÇÃO DE DANOS CITOGENÉTICOS INDUZIDOS POR RADIAÇÃO IONIZANTE.....	57
5.3.4.1	PREPARO DE LÂMINAS PARA ANÁLISE POR MICROSCOPIA ÓPTICA.....	58
5.3.4.2	DETERMINAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS (ACs), MICRONÚCLEOS (MNs) E ÍNDICE MITÓTICO (IM).....	58
5.3.4.3	ANÁLISE DE SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	60
5.3.4.4	CURVAS DE DOSE-RESPOSTA CITOGENÉTICA PARA MICRONÚCLEOS	60
5.4	USO DE MICRONÚCLEOS EM CÉLULAS DE <i>Allium cepa</i> COMO UM BIO-DOSÍMETRO CITOGENÉTICO	61
5.4.1	ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE E REPRODUTIBILIDADE DA RESPOSTA DE MNs RADIOINDUZIDA	62
5.4.2	INVESTIGAÇÃO DA RESPOSTA DE MNs EM FUNÇÃO DO TEMPO	63
5.4.3	INFLUÊNCIA DA TAXA DE DOSE DE RADIAÇÃO BETA PARA A INDUÇÃO DE MICRONÚCLEOS.....	63
5.4.4	COMPARAÇÃO ENTRE CURVAS DE DOSE-RESPOSTA FÍSICA E BIOLÓGICA	63
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
6.1	TAXA DE DOSE DE PARTÍCULAS α	65
6.2	TAXA DE DOSE DE PARTÍCULAS β	66
6.2.1	DOSIMETRIA COMPUTACIONAL	66
6.2.2	DOSIMETRIA TERMOLUMINESCENTE (TL)	67
6.3	INFLUÊNCIA DA LET DA RADIAÇÃO NA INDUÇÃO DE DANOS CITOGENÉTICOS.....	71
6.3.1	IRRADIAÇÃO DE RAÍZES DE <i>Allium cepa</i> com partículas α	72
6.3.2	IRRADIAÇÃO DE RAÍZES DE <i>Allium cepa</i> com partículas β	80
6.3.3	COMPARAÇÃO SEMIQUANTITATIVA DAS FREQUÊNCIAS DE MICRONÚCLEOS INDUZIDAS EM CÉLULAS RADICULARES DE <i>Allium cepa</i> POR PARTÍCULAS α E β	87
6.4	MICRONÚCLEOS INDUZIDOS EM CÉLULAS RADICULARES DE <i>Allium cepa</i> POR PARTÍCULAS β COMO UM <i>endpoint</i> CITOGENÉTICO PARA DOSIMETRIA	89
6.4.1	ANÁLISE DE REPRODUTIBILIDADE E HOMOGENEIDADE DA FREQUÊNCIA DE CÉLULAS COM MICRONÚCLEOS.....	90
6.4.2	EVOLUÇÃO DA FREQUÊNCIA DE CÉLULAS COM MNs EM FUNÇÃO DO TEMPO	94
6.4.3	INFLUÊNCIA DA TAXA DE DOSE ABSORVIDA DE PARTÍCULAS β NA INDUÇÃO DE CÉLULAS COM MICRONÚCLEO	100
6.4.4	CURVAS DE DOSE-RESPOSTA FÍSICA E BIOLÓGICA.....	103
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	107
7.1	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	110

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
ANEXOS.....	117
ARTIGOS PUBLICADOS.....	117

1 INTRODUÇÃO

A Física da Saúde (do inglês, *Health Physics*) tem sido uma área fundamental para o reconhecimento, avaliação e controle dos riscos à saúde humana produzidos por exposições ocupacionais ou planejadas (diagnóstico e/ou tratamento) à radiação ionizante. No entanto, é bastante consensual na comunidade científica a necessidade de melhor compreender a biofísica envolvida nos processos de indução de danos biológicos em casos de exposição indesejada a doses baixas e moderadas. Incrementos de dose produzidos por exposições repentinas podem iniciar respostas capazes de alterar o DNA (do inglês, *DeoxyriboNucleic Acid*) de células somáticas, sendo um dos eventos chave no processo de carcinogênese (TANG, LOGANOVSKY, 2018; AVERBECK *et al.*, 2018).

Nesse contexto, as áreas de dosimetria das radiações e citogenética desempenham um papel de fundamental importância. Enquanto a dosimetria é responsável por mensurar a quantidade de radiação a que uma pessoa ou um grupo de pessoas foi exposto, a citogenética permite detectar alterações no material genético causada por essa exposição, ou seja, o uso conjunto das áreas pode detectar danos biológicos minuciosos induzidos pela radiação e, conseqüentemente, associá-los de uma forma mais precisa a potenciais riscos à saúde, bem como modulá-los para aplicações multifacetadas. Isso, por sua vez, pode ser usado para determinar a necessidade de tratamento médico, estabelecer diretrizes para futuras exposições e produzir um banco de dados para melhor compreender os efeitos da radiação sobre o DNA.

Anormalidades cromossômicas induzidas por radiação representam a manifestação primária de dano a um sistema biológico, que determina o risco de morte celular ou mutagênese radioinduzida (STREFFER, 2000). O teste do micronúcleo é um dos principais ensaios citogenéticos utilizados para investigar danos no DNA. Os micronúcleos surgem quando cromossomos inteiros e/ou fragmentos cromossômicos não conseguem atingir os polos das células

filhas telófásicas a tempo de serem incorporados por seus núcleos principais (UTSUNOMIYA, BIONE, PAGLIARINI, 2002). Portanto, células com micronúcleos (MNs) representam danos persistentes no DNA devido à perda de material genético induzida progressivamente desde o primeiro ciclo mitótico após a irradiação. Esse dano ao DNA também pode ser visualizado como aberrações cromossômicas (ACs) quando as células se dividem.

A conexão entre a frequência dessas respostas induzidas por radiação nas células, chamadas de *endpoints*, e a dose, é conhecida como dosimetria citogenética. Com aberrações cromossômicas (ACs) e a formação de micronúcleos (MNs) como *endpoints*, a dosimetria citogenética usando modelos animais foi bem estabelecida e amplamente aplicada (CRUZ *et al.*, 1994; KÖKSAL, DALCÍ, PALA, 1996; PONNAIYA *et al.*, 2004; SENTHAMIZHCHELVAN *et al.*, 2009; IAEA, 2011; ZÖLZER *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2014; TESTA, PALMA, PATRONO, 2019). Para humanos, esses *endpoints* têm sido usados para monitorar a relação dose/efeito em radioterapia (SENTHAMIZHCHELVAN *et al.*, 2009) ou para determinar o aparecimento de instabilidade genômica em indivíduos ocupacionalmente expostos (KÖKSAL, DALCÍ, PALA, 1996; ZÖLZER *et al.*, 2011) ou vítimas de acidentes nucleares e radiológicos (CRUZ *et al.*, 1994; CHEN *et al.*, 2014).

No entanto, embora extremamente necessários e úteis, os estudos com radiação usando modelos animais têm uma série de limitações. Quando realizados *in vitro* são geralmente caros e, conseqüentemente, não são acessíveis para que diversos laboratórios e pesquisadores possam realizá-los e comparar os seus resultados. Quando possíveis de serem realizados *in vivo*, nem todo tipo de teste será possível de executar devido a questões éticas. Frente a essa problemática, o uso de plantas como indicadores biológicos de dano citogenético radioinduzido surge como uma ferramenta em potencial para essas análises.

Estudos citogenéticos podem ser realizados em organismos de todas as categorias taxonômicas, e as plantas superiores são um sistema de escolha porque, além de fornecer uma primeira triagem para genotoxicidade ambiental, evitam o uso de modelos animais para testes (LEME, MARIN-MORALES, 2009). Os efeitos da radiação ionizante em plantas, isto é, na biota vegetal, são de interesse para a agricultura, ecologia, saúde e novas fronteiras espaciais. É improvável que as plantas exibam os mesmos efeitos estocásticos da radiação ionizante que os animais, que pode, por exemplo, causar carcinogênese (LUDOVICI *et al.*, 2020). No entanto, plantas superiores apresentam resultados consistentes que podem servir de alerta para outros sistemas biológicos, já que o alvo é o DNA, comum a todos os organismos (LEME, MARIN-MORALES, 2009). De fato, estudos anteriores mostraram que, para agentes genotóxicos químicos, resultados comparáveis em termos de anormalidades genéticas foram observados em sistemas vegetais e animais (GRANT, 1978; PALMIERI *et al.*, 2016; REIS *et al.*, 2017).

A cebola (*Allium cepa*) é um modelo padrão bem estabelecido e frequentemente utilizado em estudos toxicológicos, pois dispõe de uma ampla variedade de características que a tornam uma planta ideal para a avaliação de toxicidade (LEME, MARIN-MORALES, 2009; BONCIU *et al.*, 2018).

Dentre as suas principais características, a *Allium cepa* é uma espécie diploide ($2n = 16$), que possui grandes cromossomos e em uma quantidade considerada baixa, o que facilita a observação de anormalidades citogenéticas via microscopia ótica. Além disso, é uma planta de fácil cultivo em laboratório e em condições controladas, permitindo que os experimentos sejam facilmente reproduzidos em diferentes locais e em diferentes momentos. Isso, por sua vez, é importante para que se estabeleça padrões de referência de toxicidade que possam ser comparados em diferentes estudos. Outra vantagem é que a *Allium cepa* tem um ciclo de vida curto e um rápido tempo de resposta a agentes tóxicos, o que possibilita a detecção de toxicidade dentro de poucos dias. Essa característica permite avaliar potenciais riscos de substâncias em um curto intervalo de tempo e obter resultados mais rapidamente do que quando usados modelos animais, como por exemplo, ratos. Além disso, o seu baixo custo e disponibilidade em todo o mundo, torna os estudos com a *Allium cepa* mais acessíveis a uma ampla comunidade de pesquisadores e laboratórios. As suas raízes são altamente sensíveis a agentes potencialmente tóxicos e a análise de suas células meristemáticas pode fornecer dados valiosos de alterações citogenéticas induzidas por diferentes agentes químicos e físicos, incluindo a radiação ionizante (LEME, MARIN-MORALES, 2009; BONCIU *et al.*, 2018).

Tradicionalmente, a *Allium cepa* é utilizada para análises de toxicidade produzida por pesticidas, metais pesados e outros poluentes químicos, pois ela é capaz de absorver/incorporar rapidamente substâncias químicas presentes no solo e água, tornando-a, portanto, um excelente bioindicador de qualidade ambiental. No entanto, a *Allium cepa* também tem mostrado alta capacidade em determinar toxicidade induzida por radiação, porém, estudada de uma forma bem menos extensiva (LEME, MARIN-MORALES, 2009; BONCIU *et al.*, 2018). Os dados disponíveis sobre o uso de *endpoints* em células meristemáticas radiculares de *Allium cepa* para avaliar efeitos tóxicos da radiação ionizante estão concentrados em testes feitos com doses relativamente altas (acima de 1,5 – 2 Gy), que em sua maioria, envolveram radiações de baixa LET (do inglês, *Linear Energy Transfer*).

Considerando as qualidades aqui mencionadas, além da sua composição química essencialmente aquosa, a *Allium cepa* é uma biota vegetal com um amplo potencial de aplicabilidade no campo de efeitos biológicos das radiações ionizantes, incluindo as áreas de proteção radiológica, *screening* de emergências nucleares e radiológicas, modulação de danos citogenéticos para aplicações diversas e dosimetria citogenética. Em contrapartida, os efeitos

citogenéticos induzidos por radiação nas células meristemáticas de *Allium cepa* não são completamente conhecidos e, conseqüentemente, permanecem insuficientemente explorados. Isso, por sua vez, caracteriza uma lacuna de pesquisa que conduz ao desafio de caracterizar primeiramente esses efeitos citogenéticos em função do tipo de radiação, taxa de dose e dose absorvida, além de outros parâmetros físicos e biológicos, para só então mobilizar esses dados para as possíveis aplicações. Assim, diferenciando os efeitos causados por diferentes níveis de dose ou tipos de radiação, seria possível utilizar a *Allium cepa* como um indicador biológico para modular a resposta para aplicações diversas, bem como para estimar a dose recebida por pessoas em ambientes onde ocorreram uma emergência radiológica e, ao mesmo tempo, produzir ou direcionar estratégias eficientes para lidar com diferentes demandas.

Com isso, por meio de uma caracterização minuciosa das frequências dos principais *endpoints* citogenéticos, como por exemplo, da taxa de proliferação celular, que é medida através do índice mitótico (IM), de aberrações cromossômicas (ACs) e de micronúcleos (MNs) induzidos por diferentes tipos de radiação ionizante, foi buscada a compreensão dos mecanismos que influenciam na detecção dessas frequências, considerando a *LET*, as taxas de dose, doses absorvidas e intervalos de tempo após as irradiações. Além disso, foram propostas curvas de dose-resposta citogenéticas para os micronúcleos radioinduzidos e um modelo matemático que possibilitou a comparação entre curvas de dose-resposta obtidas por modalidades de dosimetria diferentes, citogenética e termoluminescente, respectivamente, com um bom grau de concordância entre si.

2 UM BREVE ESTADO DA ARTE

Genotoxicidade é a capacidade de agentes químicos, físicos ou biológicos de causarem danos ao material genético (DNA) das células. Esses danos podem induzir mutações, alterações cromossômicas e, em casos mais graves, iniciar o desenvolvimento de um câncer (LEME, MARIN-MORALES, 2009). A identificação rápida, bem como a caracterização biofísica de *endpoints* citogenéticos indicadores de danos primários que surgem após a exposição à radiação ionizante, podem direcionar estratégias adequadas de prevenção, remediação e ou modulação desses efeitos para aplicações multifacetadas.

No contexto de saúde ambiental, a ICRP (do inglês, *International Commission on Radiological Protection*) reconheceu a necessidade de estabelecer guias mais quantitativos sobre proteção radiológica ambiental (ULANOVSKY, 2016; HIGLEY, 2018). Para esse propósito, a correlação entre a dose absorvida e os seus efeitos na biota não humana se faz necessária. Plantas superiores são o principal sistema de suporte para os seres humanos, pois além de serem altamente sensíveis a alterações do ecossistema evitam o uso controverso de modelos animais para testes (LEME, MARIN-MORALES, 2009; TEDESCO, LAUGHINGHOUSE IV, 2012; BONCIU *et al.*, 2018).

A cebola (*Allium cepa*) é um modelo vegetal padrão bem estabelecido e amplamente utilizado em estudos citogenéticos, pois além de suas propriedades biológicas únicas, possui uma correlação de até 82% quando comparado com análises de carcinogenicidade realizados em sistemas teste com mamíferos (TEDESCO, LAUGHINGHOUSE IV, 2012; KAYHAN *et al.*, 2019).

Embora a utilização de modelos animais para estudos com radiação seja amplamente difundida, o uso da *Allium cepa* apresenta algumas vantagens em relação aos modelos animais. O seu baixo custo, a sua fácil manutenção em laboratório e ciclo de vida curto, permitem uma

detecção rápida dos efeitos biológicos primários radioinduzidos. Além disso, a cebola possibilita a avaliação desses efeitos em nível celular e molecular, enquanto os modelos animais avaliam os efeitos biológicos em nível sistêmico (LEME, MARIN-MORALES, 2009). Essas características fazem da *Allium cepa* um modelo experimental promissor para diversas configurações de estudos com radiação ionizante, pois permite que simultaneamente sejam realizadas a dosimetria, a avaliação toxicológica e a comparação com modelos animais. Isso, por sua vez, pode viabilizar avanços que possibilitem em um futuro próximo, modular os danos citogenéticos para aplicações multifacetadas, incluindo o aprimoramento de terapias com radiação e novos campos de uso.

Um dos primeiros trabalhos sobre o uso da *Allium cepa* para análise de danos de radiação ionizante, investigou os efeitos de raios X sobre as suas células meristemáticas radiculares, utilizando-se de doses variadas produzidas por exposições crônicas e agudas. O principal resultado deste estudo foi a detecção do aumento de aberrações cromossômicas como efeitos primários e secundários decorrentes das irradiações (SAX, 1941). No entanto, a falta de uma padronização do experimento impossibilitou a construção de uma curva de dose-resposta.

Desde isso houve uma série de outros trabalhos, porém, sem estabelecer um padrão do tipo de *endpoint* mais adequado para avaliar a dose de radiação recebida, bem como das influências de outros parâmetros físicos e biológicos na sua detecção. Na maioria dos trabalhos de campo, não foi feita uma distinção entre os efeitos causados pela dose de radiação e os efeitos químicos induzidos pelo radioisótopo emissor (KOVALCHUK *et al.*, 1998; SAGHIRZADEH *et al.*, 2008). Em relação aos trabalhos de laboratório, ainda são poucos os que padronizaram a sua metodologia e, ainda assim, esses estudos apresentam divergências que impossibilitam a comparação com outros laboratórios.

FUJIKAWA *et al.* (1999) avaliaram a capacidade de estimarem a dose absorvida devido a nêutrons rápidos, com doses que variaram de 4 – 21 cGy, baseando-se na frequência de micronúcleos detectada em células meristemáticas radiculares de *Allium cepa* após 24 h das irradiações. Foi feita uma comparação entre a dose estimada por meio da frequência de células com micronúcleos radioinduzida e a dose detectada mediante câmaras de ionização, obtendo-se um resultado que diferiu não mais que 10%. Nesse estudo, não foram contabilizadas as taxas de células em divisão e nem as taxas de aberrações cromossômicas radioinduzidas.

VAIJAPURKAR *et al.* (2001) irradiaram bulbos de cebola com uma fonte de ^{60}Co , emissora de radiação gama, variando a dose absorvida de 0,5 Gy a 20 Gy. Esse intervalo de dosagem foi considerado pelos autores como sendo de baixas doses. No entanto, essas doses são altas, principalmente, quando se é levada em consideração a taxa de dose informada de $10 \text{ Gy}\cdot\text{h}^{-1}$, pois isso significou que a entrega da dose de radiação ocorreu em um curto intervalo

de tempo e de forma concentrada. As coletas das raízes foram realizadas após 48 h das irradiações. Os autores reportaram inibição da atividade mitótica e aumento da frequência de micronúcleos, sugerindo a *Allium cepa* como um indicador biológico útil para medições de dose de radiação gama.

Em 2010, [TAKATSUJI et al.](#) utilizaram íons pesados acelerados para investigar a indução de micronúcleos em células de raízes de *Allium cepa*. Feixes de argônio, neônio e silício acelerados produziram uma dose absorvida máxima de 2 Gy, com as raízes sendo coletadas 18 h após as irradiações. Os autores construíram um modelo matemático para explicar a curva de dose-resposta plotada com os dados do estudo, chegando à conclusão de que a taxa de indução de micronúcleos, de danos letais ou de danos que atrasam a divisão celular por trajetória do íon era proporcional ao quadrado da LET. No entanto, a coleta das raízes de *Allium cepa* foi realizada antes da conclusão do primeiro ciclo pós irradiação, que tipicamente dura de 20 a 24 h ([MATAGNE, 1968](#)).

Mais tarde, raízes de *Allium cepa* foram expostas à radiação não ionizante na faixa de radiofrequência e a partículas alfa de uma fonte de ^{239}Pt . Embora os tempos das irradiações tenham sido informados, a dose de ambos os tipos de radiação não foi calculada. A irradiação com partículas alfa induziu um maior aumento da atividade clastogênica do que a irradiação com radiofrequência, que foi detectada como um aumento de aberrações cromossômicas, como quebras cromossômicas e micronúcleos. Além disso, foi relatado um aumento da taxa de divisão celular ([PESNYA, ROMANOVSKY, 2013](#)).

Em 2019, [BOLSUNOVSKY et al.](#) usaram uma fonte de ^{137}Cs , emissora de raios gama, para avaliarem o efeito da irradiação crônica de 24 h em células radiculares de *Allium cepa*, com intervalo de dosagem que variou de 0,02 a 13 Gy. Os autores detectaram um perfil de curva de dose-resposta não linear tanto para ACs quanto para MNs. Além disso, as curvas de dose-resposta foram analisadas por intervalo de dosagem. Para doses baixas, foi observado um comportamento linear crescente. Para doses intermediárias e altas foram observadas regiões de platô, que se iniciaram em 2,6 Gy e 5 Gy para MNs e ACs, respectivamente. Em contrapartida, a taxa de divisão celular não foi avaliada neste trabalho.

Na Universidade Federal de Sergipe (UFS) foram iniciadas pesquisas na área de biofísica das radiações ionizantes usando a *Allium cepa*, culminando com o primeiro trabalho publicado em 2021. Nesse trabalho, foi investigada a influência de doses baixas (20 – 200 mGy) de exposições agudas à radiação alfa na indução de *endpoints* citogenéticos, como alterações nas taxas de divisão celular, aberrações cromossômicas e micronúcleos radioinduzidos. Os principais resultados reportados nesse estudo incluíram uma relação dependente da dose para as frequências de aberrações cromossômicas, anormalidades mitóticas e micronúcleos até a dose de 80 mGy. No entanto, a partir de 100 mGy, os dados

indicaram o início de atividade citotóxica, detectado como uma redução dessas frequências. Além disso, quando comparadas com todas as amostras, incluindo o grupo de controle não irradiado, a dose de 80 mGy apresentou as maiores taxas de anormalidades cromossômicas acompanhadas da maior taxa de divisão celular detectada. Isso, por sua vez, reforçou a hipótese de atividade citotóxica detectada a partir da dose de 100 mGy (XAVIER *et al.*, 2021).

O estudo dos efeitos da radiação beta usando a *Allium cepa* como um indicador biológico é um tema pouco explorado na literatura científica. Alguns autores utilizaram concentrações de estrôncio-90 ou de trítio, mas sem focar nos efeitos da radiação emitida pelos radioisótopos (GIRI *et al.*, 1984; CORTÉS *et al.*, 1990; MEENA *et al.*, 2013). Outros autores utilizaram campos mistos advindos de radioisótopos naturais ou artificiais que possuíam em sua série de decaimento a radiação beta, mas muitos deles não forneceram informações importantes como dose, taxa de dose, distância entre a fonte e o material biológico, ou ainda não apresentaram dados sobre as concentrações dos contaminantes nas amostras de água e/ou solo utilizadas (KOVALCHUK *et al.*, 1998; SAGHIRZADEH *et al.*, 2008; BOLSUNOVSKY *et al.*, 2016; ADROVIC *et al.*, 2021).

Ainda há muito a ser explorado nessa área, e é fundamental que futuros estudos forneçam informações detalhadas sobre as metodologias utilizadas e as condições experimentais para aprimorar nosso conhecimento sobre os efeitos das radiações ionizantes em *Allium cepa*, a fim de utilizá-la como um indicador biológico e/ou um dosímetro citogenético. Não foram encontrados estudos detalhados sobre os efeitos das radiações alfa e beta em células de *Allium cepa*, que considerasse simultaneamente diferentes variáveis físicas e biológicas para além da dose absorvida, o que motivou o presente trabalho.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar os principais *endpoints* citogenéticos induzidos por radiação alfa e beta, utilizando células meristemáticas radiculares de *Allium cepa*, a fim de selecionar o *endpoint* mais adequado para estimativa de dose biológica, bem como as influências de parâmetros físicos e biológicos para detectá-lo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O presente trabalho propôs-se verificar a possibilidade de aplicação da *Allium cepa* como um indicador biológico de dose de radiação absorvida, investigando minuciosamente as influências de parâmetros como a *LET*, taxa de dose, dose absorvida e intervalo de tempo após as irradiações na detecção de *endpoints*. Para isso, os objetivos específicos foram:

- Caracterizar dosimetricamente via simulação computacional e/ou dosimetria termoluminescente (TL), os cenários experimentais de irradiação das raízes de *Allium cepa* com partículas α e β , provenientes de fontes de ^{241}Am e $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$, respectivamente;
- Quantificar as frequências de ACs, MNs e IM induzido em células de *Allium cepa* em função do tipo de radiação (α ou β), taxa de dose, dose absorvida e/ou intervalo de tempo após cessada as irradiações;

- Construir curvas de dose-resposta citogenética para MNs induzidos por partículas α e β em células de *Allium cepa*;
- Comparar a curva de dose-resposta citogenética para MNs induzidos por partículas β em células de *Allium cepa* com uma curva de dose-resposta plotada via dosimetria TL.

4 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Neste capítulo são apresentados de forma breve, fundamentos teóricos básicos referentes aos procedimentos experimentais utilizados neste trabalho, tais como conceitos radiobiológicos e físicos da interação das radiações ionizantes com a matéria, que tornaram possíveis detectar e quantificar os seus efeitos por meio de técnicas físicas e biológicas.

4.1 Física das radiações ionizantes

A Física das radiações ionizantes é um campo de estudo que se concentra na interação de radiação eletromagnética e corpuscular com a matéria. As radiações ionizantes são aquelas que possuem energia suficiente para remover elétrons de átomos e moléculas, gerando íons. Tal efeito pode ser produzido tanto diretamente, quando partículas carregadas depositam a sua energia por meio de interações coulombianas com elétrons orbitais dos átomos do meio, quanto indiretamente, quando ondas eletromagnéticas ou nêutrons ao interagirem com a matéria, transferem a sua energia para partículas carregadas que irão ser responsáveis por ionizá-la de forma secundária (ATTIX, 1986; PODGORSK, 2005).

As radiações ionizantes além de estarem presentes intrinsecamente no nosso ambiente, são amplamente utilizadas para fins benéficos em diversas áreas, como na medicina, na indústria e na pesquisa científica. Contudo, elas também podem apresentar riscos à saúde humana e ao meio ambiente.

A qualidade, a dose e a taxa de dose da radiação ionizante determinam o nível de perigo. A qualidade da radiação é expressa como uma função da *LET* (do inglês, *Linear Energy Transfer*), que é uma medida da densidade de ionizações induzidas pela radiação, calculada em média ao longo de um comprimento de caminho unitário definido ($\text{keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$). A radiação

de alta *LET* é densamente ionizante e transfere mais energia por unidade de comprimento de caminho em comparação com a radiação de baixa *LET*. Tipicamente, raios γ , raios X e partículas β são consideradas radiações de baixa *LET*, enquanto nêutrons, partículas α e núcleos pesados são considerados radiações de alta *LET* (PODGORSK, 2005; KNOLL, 2010; HALL, GIACCIA., 2018).

Entender os processos de interação das radiações ionizantes com diferentes materiais, incluindo tecidos biológicos, é essencial para garantir que as aplicações dessas radiações sejam seguras e eficazes.

4.1.1 Interação da matéria com fótons

As radiações indiretamente ionizantes são aquelas que, ao interagir com a matéria, transferem energia para partículas carregadas que, por sua vez, ionizam outros átomos e moléculas próximos, causando, portanto, a ionização de forma secundária. Fótons de raios X e raios γ são exemplos de radiações indiretamente ionizantes, assim como os nêutrons. A diferença entre essas radiações é que enquanto os raios X e os raios γ são classificados como ondas eletromagnéticas, os nêutrons possuem propriedades físicas que lhes conferem a classificação de partículas, porém, desprovidas de carga elétrica (PODGORSK, 2005; KNOLL, 2010).

Em relação aos fótons de raios X e de raios γ , a principal diferença reside no fato de que as suas origens ocorrem em regiões distintas do átomo. Raios X são produzidos devido às transições eletrônicas, enquanto os raios γ surgem devido às transições que ocorrem no núcleo atômico (EISBERG, RESNICK, 1979).

Quando fótons de raios X ou de raios γ interagem com a matéria, a transferência parcial ou total de sua energia para o meio pode ocorrer através de diferentes processos. Os principais são: efeito fotoelétrico, efeito Compton e produção de pares, além do espalhamento coerente para energias mais baixas dos fótons, mas que não transfere energia para a matéria (EISBERG, RESNICK, 1979).

Dentre os que transferem energia para a matéria, o efeito fotoelétrico é um processo no qual um fóton de radiação ionizante após ser absorvido por um átomo, cede totalmente a sua energia para um elétron orbital de camadas mais internas, que é ejetado com uma energia cinética bem definida. Esse processo é caracterizado pela equação:

$$E_c = h\nu - E_{lig} \quad (4.1)$$

onde, h é a constante de Planck, ν é a frequência da radiação e E_{lig} é a energia de ligação do elétron orbital.

Como E_c difere da energia do fóton de um valor constante E_{lig} , com a sua transferência para o material de um detector, pode ser utilizada como mecanismo de identificação do fóton e de sua energia (EISBERG, RESNICK, 1979; KNOLL, 2010).

A probabilidade de ocorrência do efeito fotoelétrico se torna maior quando a radiação ionizante incidente possui baixa energia e o material possui um número atômico (Z) elevado, como por exemplo, o chumbo (EISBERG, RESNICK, 1979). No caso de materiais biológicos, o efeito fotoelétrico pode levar a produção de elétrons livres e radicais livres, que podem danificar o DNA e outros componentes celulares, causando mutações e outras alterações prejudiciais às células (PODGORSK, 2005; OKUNO, YOSHIMURA, 2010).

No efeito Compton, o fóton de radiação ionizante incidente ao colidir inelasticamente com um elétron de baixa energia de ligação, transfere-lhe parcialmente a sua energia, sendo desviado pelo elétron e espalhado com uma energia menor do que a original. Matematicamente, o espalhamento Compton é caracterizado pela equação:

$$h\nu' = \frac{h\nu}{1 + \left[\frac{h\nu}{m_0 c^2 (1 - \cos \theta)} \right]} \quad (4.2)$$

onde $h\nu$ é a energia do fóton incidente, $h\nu'$ a energia do fóton espalhado, $m_0 c^2$ a energia de repouso do elétron e θ é o ângulo formado entre o fóton incidente e o espalhado (EISBERG, RESNICK, 1979).

O espalhamento Compton é influenciado tanto pela energia do fóton incidente quanto pela densidade eletrônica do material, sendo mais provável em materiais de baixa densidade e com menor número atômico efetivo. Assim como no efeito fotoelétrico, os elétrons ejetados podem ionizar secundariamente moléculas biológicas e, conseqüentemente, produzir danos ao DNA celular, com uma maior probabilidade desse efeito para fótons de maior energia (PODGORSK, 2005).

Quando a energia dos fótons de radiação ionizante alcança valores superiores à 1,022 MeV, a forma predominante da absorção da radiação eletromagnética passa a ser pela produção de pares elétron-pósitron. Esse tipo de processo ocorre devido a absorção total do fóton altamente energético por núcleos de átomos com Z elevado, que origina o par elétron-pósitron e, logo em seguida, ambas as partículas cedem a sua energia cinética para o meio material. O pósitron se dissipa rapidamente ao se combinar com um elétron do meio. Como

resultado, ambos se aniquilam e liberam dois fótons de radiação gama, cada um com 511 keV, que se propagam em direções opostas (EISBERG, RESNICK, 1979).

Na radioterapia, a produção de pares é predominante para a indução planejada de efeitos biológicos, uma vez que são usados feixes de radiação altamente energéticos para induzir danos seletivos em células cancerosas que levem à sua morte via apoptose. No entanto, em caso de exposição indesejada às radiações ionizantes de alta intensidade, como as que ocorrem em emergências nucleares e radiológicas, isso pode causar danos graves ao DNA das células dos seres vivos, levando a mutações e, potencialmente, ao desenvolvimento de doenças como o câncer, em humanos (PODGORSK, 2005).

Ainda em radioterapia, um outro processo de interação com fótons é bastante importante. Quando um acelerador linear (LINAC) opera acima de 8 MV, os fótons têm energia suficiente para ultrapassar a energia de ligação dos nêutrons, que é de 7 MeV nos núcleos dos materiais (W ou Pb), que estão presentes no cabeçote do LINAC, ou seja, fotonêutrons são produzidos, e podem afetar tanto o paciente, quanto a instalação como um todo (d'ERRICO et al., 2001).

4.1.2 Interação da matéria com partículas carregadas

Radiações diretamente ionizantes são todas as partículas carregadas, leves ou pesadas, como, prótons e íons, emitidas durante transformações nucleares, ou aceleradas por meio de campos eletromagnéticos intensos. Esse tipo de radiação ionizante transfere a sua energia interagindo com elétrons orbitais ou, eventualmente, com núcleos atômicos, mediante processos de excitação, ionização, freamento e para energias altas, de ativação (ATTIX, 1986; PODGORSK, 2005).

Quando uma partícula carregada interage com os átomos de um material, ela transfere a sua energia via processos de colisão e freamento. Conforme interage, a partícula vai perdendo parcialmente a sua energia dE ao longo da trajetória elementar dx que percorre. Assim,

$$S = -\frac{dE}{dx} \quad (4.3)$$

Na equação 4.3, S é denominado de poder de freamento linear (do inglês, *linear stopping power*), que depende do quadrado da carga da partícula, aumenta quando a velocidade diminui, e a massa só afeta a forma de sua trajetória (ATTIX, 1986; OKUNO, YOSHIMURA, 2010; TURNER, 2007; TAUHATA et al., 2013).

À medida que colidem com átomos, e eventualmente produzem radiação de freamento (*bremstrahlung*), as partículas carregadas perdem energia cinética e penetram no material até que a sua energia térmica se equilibre com as partículas do meio. Esse processo estabelece um alcance R (do inglês, *range*) no meio absorvedor, que pode ser percorrido em linha reta ou aleatoriamente, dependendo do tipo de partícula. Partículas pesadas como alfa e fragmentos de fissão têm uma trajetória quase que retilínea, enquanto elétrons têm uma trajetória praticamente aleatória (ATTIX, 1986; PODGORSK, 2005).

As partículas α (alfa) são núcleos de hélio-4 com carga elétrica duplamente positiva. Esse tipo de radiação ionizante corpuscular é emitido quando o número de núcleons é elevado ao ponto de a força de repulsão elétrica entre os prótons ser tão intensa, que é capaz de superar a força nuclear forte de curto alcance, tornando o núcleo instável (EISBERG, RESNICK, 1979).

O poder de penetração das partículas α é muito reduzido devido a interagirem fortemente com os elétrons do meio material, sendo incapazes de ultrapassarem a espessura da pele humana. No entanto, são altamente perigosas em casos de exposições internas, pois como são densamente ionizantes são capazes de cederem grandes quantidades de energia em pequenos volumes. O seu alcance na matéria dependerá da sua energia, da densidade e do tipo de material da interação, de modo que o alcance de partículas alfa é inversamente proporcional à densidade do material e diretamente proporcional à sua energia (ATTIX, 1986; PODGORSK, 2005).

As partículas β (beta) são do tipo elétrons, β^- , ou pósitrons, β^+ , altamente energéticos emitidos dos núcleos atômicos devido ao excesso de nêutrons ou de prótons, respectivamente. A transição beta β^- ou β^+ , dependerá além do tipo de núcleon em excesso, da energia disponível. Embora a energia liberada durante a transição beta seja bem definida, a forma como ela é distribuída entre o elétron (ou pósitron) e o antineutrino (ou neutrino) afeta o valor da energia da radiação beta detectada, que varia de 0 a um limite máximo denominado de $E_{máx.}$, que, consequentemente, resulta em um espectro contínuo (EISBERG, RESNICK, 1979; ATTIX, 1986; PODGORSK, 2005).

Majoritariamente, elétrons beta perdem sua energia devido às ionizações que causam quando interagem com a matéria. Entretanto, também podem ceder a sua energia mediante radiação de freamento. Como são relativamente leves, a trajetória dos elétrons no meio material é tipicamente irregular, podendo inclusive serem defletidos para a origem, como é mostrado na Figura 4.1 (ATTIX, 1986; PODGORSK, 2005).

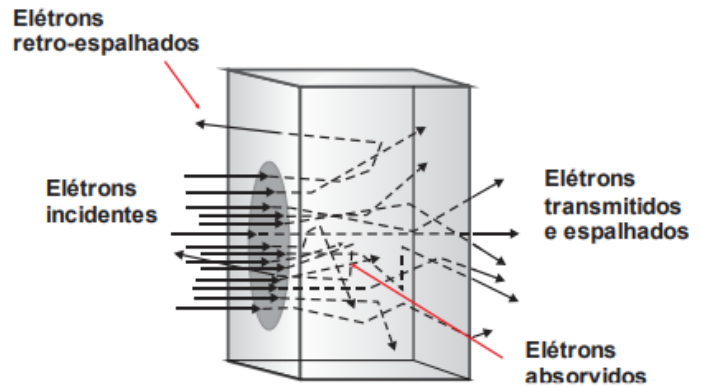


Figura 4.1 – Espalhamento de elétrons em um material (TAUHATA *et al.*, 2013).

No caso de uma irradiação com um feixe colimado de elétrons monoenergéticos, a sua detecção é afetada mesmo para pequenas espessuras do material absorvedor, pois haverá perdas de elétrons em decorrência de seu espalhamento. Consequentemente, elétrons que conseguem penetrar mais profundamente em um material sofrem um menor nível de alteração de sua trajetória durante as interações (ATTIX, 1986; PODGORSK, 2005).

No entanto, a definição de alcance para elétrons altamente energéticos é menos precisa em comparação com partículas pesadas, pois a trajetória total percorrida é consideravelmente maior do que a distância de penetração na direção do seu movimento incidente. Nesses casos, o alcance máximo de um elétron beta pode ser estimado mediante o alcance extrapolado, que é obtido mediante a projeção da curva de penetração em função da espessura do material absorvedor, prolongando-se a parte linear inferior da curva até interceptar o eixo das abscissas (ATTIX, 1986; PODGORSK, 2005).

Medições experimentais detectaram que os valores de S/ρ (do inglês, *mass stopping power*), variam pouco em

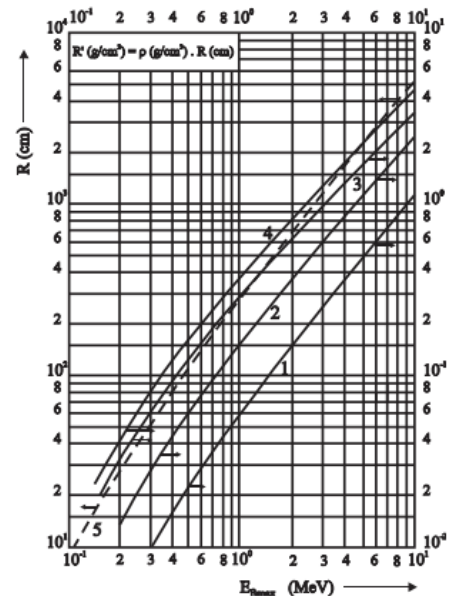


Figura 4.2 - Alcance R (cm) de partículas beta em vários materiais (densidade em g/cm³):

- (1) Ferro = 7,9;
- (2) Pirex = 2,6;
- (3) PVC = 1,4;
- (4) Plexiglass = 1,2;
- (5) Ar = 0,0012 (TAUHATA *et al.*, 2013).

relação à densidade dos materiais absorvedores, como pode ser visto na Figura 4.2 (TAUHATA *et al.*, 2013).

Como descrito anteriormente, a penetração de uma partícula carregada em um meio material ocorre até que toda a sua energia seja transferida para ele, definindo o seu alcance. Isso, por sua vez, dependerá do tipo de carga elétrica da partícula e da sua energia, bem como da densidade e do tipo de material. Na Tabela 4.1 são mostrados os alcances R (cm) de partículas α e β no ar e no tecido humano.

Tabela 4.1 – Alcance R (cm) de partículas α e β no ar e no tecido humano (adaptada de TAUHATA *et al.*, 2013).

Tipo de radiação	Energia (MeV)	R no ar (cm)	R no tecido humano (cm)
Alfa	5,5	4	0,005
Beta	1	300	0,4

4.1.3 Grandezas radiológicas e dosimétricas

As radiações ionizantes são imperceptíveis à visão humana, de modo que a sua detecção somente é possível a partir dos efeitos ocasionados pelas ionizações que produzem ao interagirem com a matéria. O ato de medir as grandezas físicas relacionadas à interação da radiação ionizante com a matéria é denominado de metrologia das radiações ionizantes.

A metrologia das radiações ionizantes é essencial para a segurança e proteção de indivíduos expostos a essas radiações, bem como para a garantia e controle de qualidade em aplicações que envolvam o uso de fontes radioativas. Para realizar essas medidas, são utilizados instrumentos específicos denominados de detectores. Esses dispositivos abrangem uma ampla categoria de materiais, podendo ser cintiladores, luminescentes, semicondutores, gasosos, químicos etc, e suas diferentes características tornam possíveis que se adequem às diferentes situações e condições de medição, dentre elas, aos diferentes intervalos e cenários de exposição à radiação (KNOLL, 2010).

Com o constante avanço tecnológico e, conseqüentemente, com o surgimento de novas aplicações que usam fontes radioativas, é fundamental que os profissionais que atuam nessa área estejam sempre atualizados e capacitados para lidarem com os novos desafios que surgem a cada dia.

A necessidade de medir os níveis de radiação ionizante fez com que fossem definidas grandezas e unidades para essa finalidade. Algumas dessas grandezas são apresentadas a seguir.

A atividade $A(t)$ de uma fonte radioativa é a medida da taxa de decaimentos por instante de tempo. Sendo $N(t)$, o número de átomos radioativos que ainda não decaíram no instante t , a atividade $A(t)$ pode ser calculada usando a equação 4.4.

$$A(t) = \frac{dN(t)}{dt} = -\lambda N(t) \quad (4.4)$$

o sinal negativo indica que o número de átomos radioativos diminui com o tempo e λ é a constante de decaimento, que é própria de cada radionuclídeo (TURNER, 2007; KNOLL, 2010; OKUNO, YOSHIMURA, 2010).

Embora a medida de atividade forneça informações sobre a intensidade e taxa de decaimentos radioativos da fonte, ela não informa a quantidade de radiação absorvida durante o seu processo de interação com a matéria. Os níveis médios de energia da radiação depositados por unidade de matéria são mensurados através da grandeza dose absorvida, calculada mediante a equação 4.5 (KNOLL, 2010; OKUNO, YOSHIMURA, 2010).

$$D = \frac{d\bar{E}}{dm} \quad (4.5)$$

Em algumas situações é necessário conhecer a quantidade de energia da radiação ionizante que é absorvida por um material em um determinado intervalo de tempo. Essa grandeza física é denominada de taxa de dose absorvida (KNOLL, 2010; OKUNO, YOSHIMURA, 2010).

No entanto, em termos de efeitos biológicos, o conceito de dose absorvida não é suficiente para explicá-los completamente, pois sofrem influência tanto do tipo e energia da radiação, quanto da radiosensibilidade do tecido e/ou órgão irradiado. Por essa razão, fatores de ponderação para diferentes tipos e energias de radiação ionizante e para diferentes tecidos ou órgãos foram propostos baseados na LET e sensibilidade do material biológico à radiação. Os valores desses fatores são multiplicados pelo valor de dose absorvida, dando origem às grandezas dosimétricas denominadas de dose equivalente (H) e dose efetiva (E), respectivamente (PODGORSK, 2005; KNOLL, 2010; OKUNO, YOSHIMURA, 2010).

A Tabela 4.2 mostra algumas grandezas radiológicas e dosimétricas e suas respectivas unidades no SI.

Tabela 4.2 – Grandezas radiológicas e dosimétricas (OKUNO, YOSHIMURA, 2010).

Grandeza	Meio	Tipo	Unidade (SI)	Unidade original	Conversão
Atividade	-	-	Bq = s ⁻¹	-	1 Ci = 3,7.10 ¹⁰ Bq
Atividade específica	-	-	Bq/L ou Bq/kg	-	
Dose absorvida	Qualquer	Qualquer	Gy (J/kg)	rad	1 Gy = 100 rad
Exposição	Ar	X, γ	C/kg		1 R = 2,58.10 ⁻⁴ C/ (kg de ar)
Dose equivalente	Órgão ou tecido	Qualquer	Sv	rem	1 Sv = 100 rem
Dose Efetiva	Corpo todo	Qualquer	Sv	rem	1 Sv = 100 rem

4.2 Efeitos biológicos das radiações ionizantes

A quebra de ligações químicas durante as ionizações que são induzidas por radiação é capaz de alterar a estrutura e funcionamento de moléculas. Quando isso ocorre em células, podem ser produzidos radicais livres, íons e elétrons que têm a capacidade de modificarem a sua estrutura e de seus constituintes internos, resultando em mutações e disfuncionalidades diversas. Os efeitos biológicos das radiações ionizantes nem sempre são nocivos, mas quando são, representam um dano ao organismo. A indução e detecção desses efeitos é influenciada por vários fatores, como por exemplo, dose, taxa de dose, tipo de exposição (única, fracionada ou periódica), tipo de radiação, tipo de célula ou tecido e o indicador (*endpoint*) considerado (BUSHONG, 2010; IAEA, 2011).

Conhecer a estrutura e o ciclo de vida celular é, portanto, imprescindível para uma avaliação minuciosa dos efeitos da radiação ionizante.

4.2.1 Estrutura da célula eucariótica e ciclo celular

A célula é a unidade básica de todo tecido biológico. Essencialmente, os organismos vivos são classificados em procariontes e eucariontes. Organismos procariontes não possuem um núcleo celular, ou seja, têm o seu material genético disperso no citoplasma. Por outro lado, os

organismos eucariontes dispõem de um núcleo celular bem definido, onde o DNA fica armazenado e, conseqüentemente, mais protegido. Animais e plantas são exemplos de organismos eucariontes (BUSHONG, 2010).

Embora as células eucarióticas difiram entre si, algumas estruturas são comuns às células animais e vegetais (Figura 4.3). Dentre elas, pode-se destacar a presença da membrana citoplasmática, que além de proteger e estabelecer os limites físicos da célula, está associada ao fato de que todos os nutrientes, secreções e rejeitos precisam passar por esta barreira. Além disso, há a presença de um líquido

que preenche a célula, denominado de citoplasma, onde estão presentes as organelas que desempenham diferentes funções, como por exemplo, as mitocôndrias, responsáveis por produzir energia por meio do processo de respiração celular, além de regular o metabolismo, a síntese de hormônios e respostas ao estresse ambiental. Adicionalmente, as células vegetais contam com uma parede celular, estrutura responsável por dar suporte mecânico à célula, protegendo-a contra as pressões externas e mantendo a sua forma (BUSHONG, 2010).

Devido à necessidade de desenvolvimento e/ou renovação de tecidos biológicos, as células não possuem estrutura e funcionamento permanentes. O ciclo celular, ilustrado na Figura 4.4 demonstra o ciclo de vida de uma célula (BUSHONG, 2010).

O processo de replicação celular ocorre em duas etapas: interfase e mitose.

A etapa interfásica é o período que precede a mitose, durante o qual a célula se prepara para a divisão celular. A interfase é dividida em três fases: G1, S e G2. Durante a fase G1, a célula cresce e produz proteínas para a duplicação do material genético.

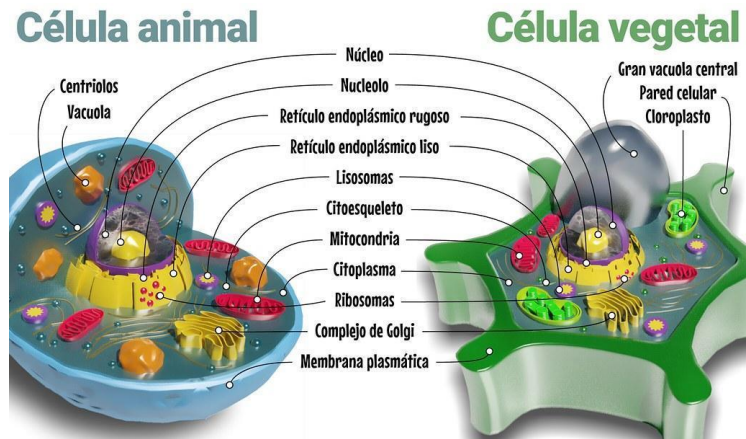


Figura 4.3 – Diagramas das células animal e vegetal (<https://www.passeidireto.com/arquivo/98955328/celula-caracteristicas-e-funcoes>).

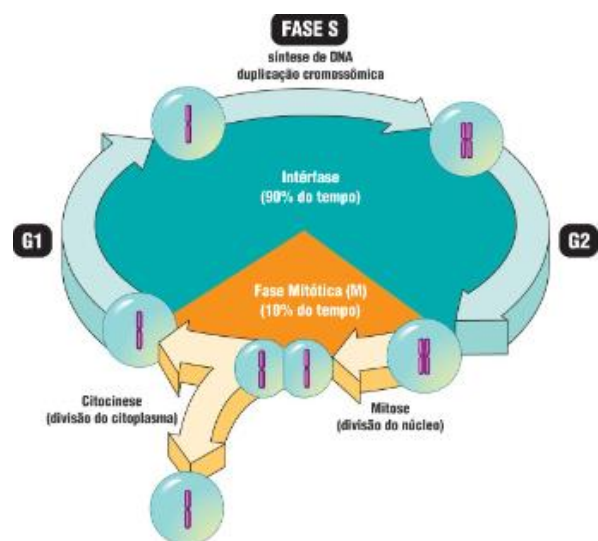


Figura 4.4 – Representação do ciclo celular (<https://emsinapse.wordpress.com/2017/08/25/interfase-uma-visao-realista-ainda->

Durante a fase S, ocorre a replicação do DNA e, por fim, durante a fase G2, a célula continua a crescer e se prepara para a divisão celular (BUSHONG, 2010).

A etapa mitótica é o processo de replicação celular que ocorre após a interfase. A mitose é dividida em quatro fases: prófase, metáfase, anáfase e telófase. Durante a prófase, o material genético se condensa e forma os cromossomos. Logo em seguida, prossegue para a metáfase, onde os cromossomos se alinham na região equatorial da célula. Posteriormente, segue para a anáfase, onde os cromossomos se separam e são puxados para os polos opostos da célula. Finalmente, chegando na telófase, os cromossomos se descondensam e a membrana celular se forma em torno das duas células filhas. A mitose geralmente leva cerca de uma hora para ser concluída em células humanas. A Figura 4.5 mostra o processo de replicação celular que ocorre durante a mitose (BUSHONG, 2010).

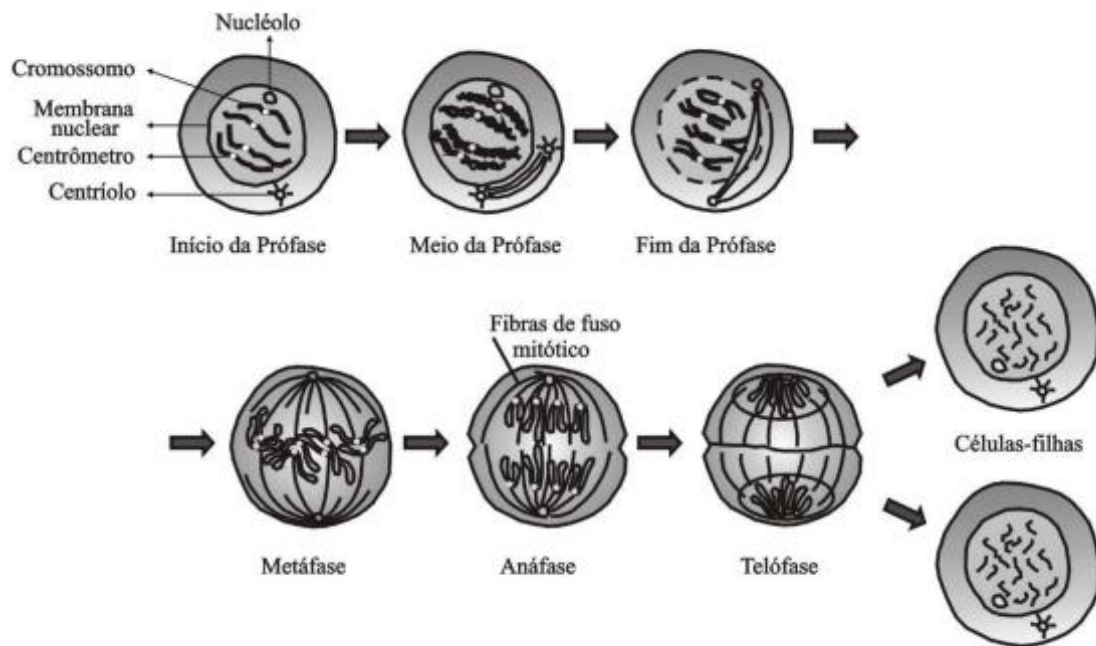


Figura 4.5 – Esquema da mitose celular (TAUHATA *et al.*, 2013).

4.2.2 Biofísica do dano cromossômico radioinduzido

Cromossomos são estruturas presentes no núcleo celular, compostas por moléculas de DNA e proteínas histonas, como ilustrado na Figura 4.6. Eles são responsáveis por armazenar e transmitir as informações genéticas de uma geração para outra. Consequentemente, os cromossomos são fundamentais para a hereditariedade, pois são eles que contêm os genes que determinam as características físicas e biológicas de um indivíduo (IAEA, 2011).

Durante a divisão celular, os cromossomos se replicam e se separam, garantindo que cada célula filha receba uma cópia completa da informação genética da célula mãe (IAEA, 2011).

Como mencionado anteriormente, a detecção de anormalidades cromossômicas induzidas por radiação ionizante reflete a manifestação primária de um dano a um sistema biológico, capaz de determinar o risco de morte celular ou mutagênese radioinduzida (STREFFER, 2000).

A interação das radiações ionizantes com tecidos biológicos pode remover elétrons das moléculas que os constituem. Embora uma grande variedade de danos possa ser induzida em diversas estruturas celulares, o alvo crítico é o DNA, que pode ser afetado tanto pela interação direta com a radiação, quanto indiretamente. A ação indireta das radiações ionizantes sobre o DNA, ocorre porque em um organismo biológico, a molécula mais abundante é a água. Quando a água presente nas células é irradiada, ela pode sofrer radiólise, promovendo a dissociação da molécula em pares de íons, que ao se recombinarem eletronicamente com o meio podem produzir radicais livres (H^+ e OH^-). Como essas espécies são altamente reativas, podem interagir quimicamente entre si ou com moléculas próximas a elas. Como consequência, novas moléculas são danificadas, inclusive a do DNA, que pode sofrer quebras simples ou duplas de suas cadeias (PODGORSK, 2005; BUSHONG, 2010; IAEA, 2011).

Valores iguais de dose absorvida podem produzir efeitos biológicos totalmente diferentes conforme o tipo de radiação ionizante incidente. Isso, por sua vez, está associada a

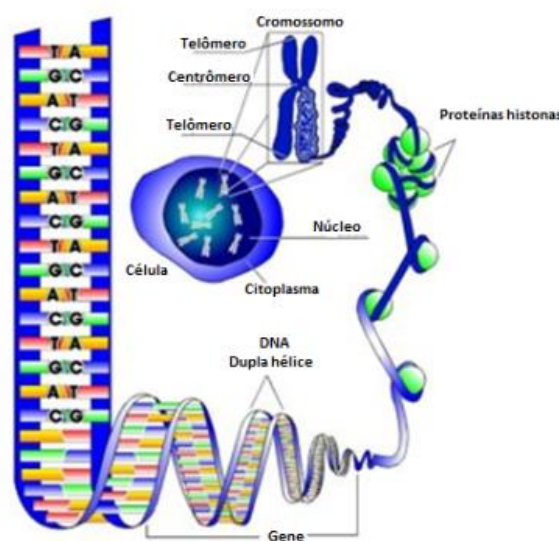


Figura 4.6 – Representação da estrutura e composição de um cromossomo (IAEA, 2011).

densidade de ionizações que a radiação produz ao longo da trajetória que percorre, ou seja, de sua *LET*. O conceito de *LET* provém da simplificação do termo de colisão da equação de *stopping power*, que descreve a perda média de energia de uma partícula carregada por unidade de comprimento, a cada colisão que ela sofre. É importante mencionar, que enquanto o *stopping power* mede o efeito do meio na partícula, a *LET* mede o efeito da partícula no meio, geralmente em tecidos biológicos (PODGORSK, 2005; BUSHONG, 2010; IAEA, 2011).

Para que diferentes tipos de radiação ionizante produzam um mesmo nível de efeito são necessários, portanto, valores de dose diferentes. A *RBE* (do inglês, *Relative Biological Effectiveness*) é uma grandeza adimensional que permite comparar a quantidade de dose necessária para produzir o mesmo efeito com diferentes tipos de radiação (PODGORSK, 2005; BUSHONG, 2010). Matematicamente, a *RBE* pode ser calculada por meio da equação 4.6.

$$RBE = \frac{Dose_{referência}}{Dose_{teste}} \quad (4.6)$$

É implícito que a *RBE* sobre influência direta da *LET* da radiação. No entanto, parâmetros como a dose, taxa de dose, fracionamento da dose e tipo de material biológico também influenciam no tipo de *endpoint* analisado e, conseqüentemente, exercem influência nos valores de *RBE* (PODGORSK, 2005; BUSHONG, 2010; IAEA, 2011).

Danos cromossômicos indicam a propagação de falhas permanentes no material genético das células. Nesses casos, a célula alterada, mantendo a sua capacidade reprodutiva, potencialmente, pode evoluir para uma carcinogênese (PODGORSK, 2005; BUSHONG, 2010; IAEA, 2011). As etapas desse mecanismo são apresentadas na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Evolução temporal e ação das radiações ionizantes no tecido biológico (Adaptada de MILIAN, 2006).

Etapa	Tempo	Eventos
Física	10^{-18} s	Partícula ionizante atravessa a molécula – Ionização
Físico-química	10^{-15} s	Excitação – vibração e/ou dissociação molecular, termalização dos elétrons
Química heterogênea	10^{-12} s	Difusão dos radicais livres
Química homogênea	10^{-10} s	Reação dos radicais livres com o soluto
	10^{-8} s	Formação dos produtos moleculares
	10^{-6} s	Conclusão das reações químicas
Bioquímica	1 s	Reações enzimáticas, processo de reparo
Biológica	1 h	Início dos processos que podem gerar instabilidade genômica, aberrações, mutações e morte celular
Efeitos primários	Dias	Morte das células tronco, danos ao tecido sadio e distúrbios celulares
Efeitos tardios	Meses	Fibroses, telangiectasia, danos na pele, danos na medula óssea e ao sistema sanguíneo
Carcinogênese	Anos	Surgimento de tumores e multiplicação desses

A detecção de anormalidades cromossômicas ainda no estágio primário pode permitir, dentre outras estratégias, iniciar um tratamento menos agressivo a um indivíduo que tenha sido indevidamente exposto às radiações ionizantes, de modo que esses danos radioinduzidos não evoluam para uma carcinogênese. Tanto a indução quanto a detecção e, por sua vez, possíveis tratamentos, dependem da radiosensibilidade celular. Tal conceito define a capacidade de

um determinado tipo de célula ser afetado pela radiação ionizante. Algumas células são mais sensíveis à radiação do que outras, e essa sensibilidade pode ser influenciada tanto por fatores físico-químicos quanto biológicos (IAEA, 2011).

São muitos os fatores que podem afetar a radiosensibilidade das células, incluindo o tipo de célula, a etapa e a fase do ciclo celular, a *LET*, a dose e a taxa de entrega da radiação, bem como a habilidade da célula em reparar danos induzidos no DNA. As células que estão em divisão (mitose) ativa, por exemplo, são mais sensíveis à radiação, pois estão em uma fase de alta atividade metabólica e divisão celular, como por exemplo, células sanguíneas e células do trato gastrointestinal. Além disso, células que possuem dificuldades em reparar danos ao DNA ou que possuem uma capacidade de reparação menor são mais suscetíveis a danos causados pela radiação ionizante (PODGORSK, 2005; BUSHONG, 2010; IAEA, 2011).

A indução de *endpoints* citogenéticos, como a formação de micronúcleos, que são pequenos núcleos adicionais que podem se formar após danos ao DNA, também pode ser influenciada pela radiosensibilidade das células. A formação de micronúcleos é considerada um indicador de qualidade para identificação de danos ao DNA. A frequência de sua formação pode ser usada para avaliar a extensão dos danos causados pela radiação. A taxa de formação de micronúcleos pode variar dependendo do tipo de célula e de outros parâmetros físicos que afetam a radiosensibilidade celular, como a *LET*, a dose e a taxa de dose (IAEA, 2011).

4.3 Dosimetria das radiações ionizantes

A dosimetria das radiações ionizantes é o processo de medir a quantidade de radiação absorvida por um indivíduo ou um material exposto à radiação ionizante. Essa medida é essencial, sobretudo, para avaliar o risco de efeitos biológicos indesejáveis causados pela exposição indevida à radiação. Logo, a dosimetria é de fundamental importância para que aplicações benéficas nas áreas de tratamentos e diagnósticos médicos, indústria, pesquisa científica, entre outras, sejam realizadas de forma controlada e segura, de modo que os níveis de exposição se mantenham dentro dos limites aceitáveis, minimizando os riscos de efeitos colaterais (OKUNO, YOSHIMURA, 2010).

Além disso, a dosimetria assume um papel fundamental na gestão de emergências nucleares e radiológicas, pois permite a triagem e a definição de estratégias para lidar com exposições em função do nível de exposição.

A grandeza dose absorvida pode ser mensurada por meio de métodos físicos, químicos ou biológicos. O ponto em comum em todos os tipos de métodos é o princípio físico básico de

interação da radiação ionizante com a matéria, que ao deixar seus rastros podem ser quantificados e correlacionados com a dose. Nesta seção, serão discutidos dois métodos de medição de dose baseados no fenômeno de termoluminescência e na taxa de micronúcleos radioinduzida, ou seja, modalidades de dosimetria física e biológica, respectivamente.

4.3.1 Termoluminescência

A termoluminescência (TL) é um fenômeno físico caracterizado pela emissão de luz por materiais isolantes (dielétricos) ou semicondutores expostos previamente à radiação ionizante e que, posteriormente, são aquecidos, porém, sem que haja um aumento significativo de temperatura ao ponto de torná-los incandescentes. A luz que é emitida possui um comprimento de onda (λ) maior do que a radiação incidente, podendo estar na região do ultravioleta ($\lambda < 400$ nm), infravermelho ($\lambda > 700$ nm) ou mais comumente, na faixa do espectro visível ($400 < \lambda < 700$ nm). Além disso, em alguns casos, a luz emitida é proporcional à dose absorvida, o que vem permitindo ao longo dos anos aplicações em larga escala do fenômeno de TL em dosimetria (McKEEVER, 1988).

A explicação do fenômeno de TL é fundamentada na teoria de bandas de energia para os elétrons nos sólidos, na qual depende da definição dos conceitos de bandas de energia e *gap*. As bandas são os níveis de energia ocupados pelos elétrons ou buracos (ausência de elétrons) nos materiais, e o *gap* é a diferença de energia entre as bandas de valência e de condução, também conhecido como banda proibida. A ocupação total ou parcial das bandas determina se um material é condutor, semicondutor ou isolante. Nos isolantes, o *gap* de energia é muito alto (> 5 eV), o que dificulta o deslocamento dos elétrons ou buracos da banda de valência para a banda de condução (ASHCROFT, MERNIN, 1976; KITTEL, 1996). Em geral, materiais TL são policristais iônicos e, em sua maioria, isolantes, nos quais os elétrons preenchem a banda de valência, enquanto a banda de condução é vazia.

A teoria de bandas de energia explica como a estrutura eletrônica dos materiais influencia suas propriedades elétricas e, conseqüentemente, na sua capacidade de emitir luz via TL. Quantitativamente, a intensidade da emissão de luz via TL é diretamente influenciada pela ocupação das bandas de energia $N(E)$, que é determinada pela densidade de estados disponíveis, $Z(E)$, e pela função de distribuição de Fermi-Dirac, $f(E)$, (ASHCROFT, MERNIN, 1976).

$$N(E) = Z(E) \cdot f(E) \quad (4.7)$$

onde,

$$f(E) = \frac{1}{e^{\left(\frac{E-E_f}{kT}\right)} + 1} \quad (4.8)$$

com k sendo a constante de Boltzman, T , a temperatura absoluta, E , a energia, e E_f , o nível de Fermi.

Assim, a densidade de estados, $Z(E)$, representa o número de estados disponíveis em uma determinada energia E , enquanto a função de distribuição de Fermi-Dirac, $f(E)$, descreve a probabilidade de que um estado em uma dada energia E esteja ocupado por um elétron (ASHCROFT, MERNIN, 1976).

No zero absoluto, todos os estados de energia abaixo do nível de Fermi estão ocupados, enquanto aqueles acima do nível de Fermi estão vazios. Isso, por sua vez, define as bandas de valência e condução, respectivamente. É importante notar que os níveis da banda proibida estão acima do nível de Fermi (ASHCROFT, MERNIN, 1976).

Um estímulo eletromagnético ou térmico pode fazer com que os elétrons (ou buracos) saltem da banda de valência para a banda de condução. Isso cria um buraco na banda de valência, que pode se mover livremente pela banda, ou ser capturado por uma armadilha na banda proibida. As armadilhas podem ser definidas como estados de energia metaestáveis localizados na banda proibida, que podem ser intrínsecos devido à presença de impurezas no material, ou adicionados a ele na forma de dopantes (McKEEVER, 1988).

Se um elétron (ou buraco) ficar preso em uma armadilha, ele pode se recombinar com seu par elétron-buraco por meio do recebimento de energia térmica proveniente do aquecimento. Depois de ser liberado, o elétron pode se mover livremente e se recombinar com um buraco ou ser recapturado por outra armadilha na banda proibida (McKEEVER, 1988). A Figura 4.7 ilustra de maneira simplificada todo esse processo.

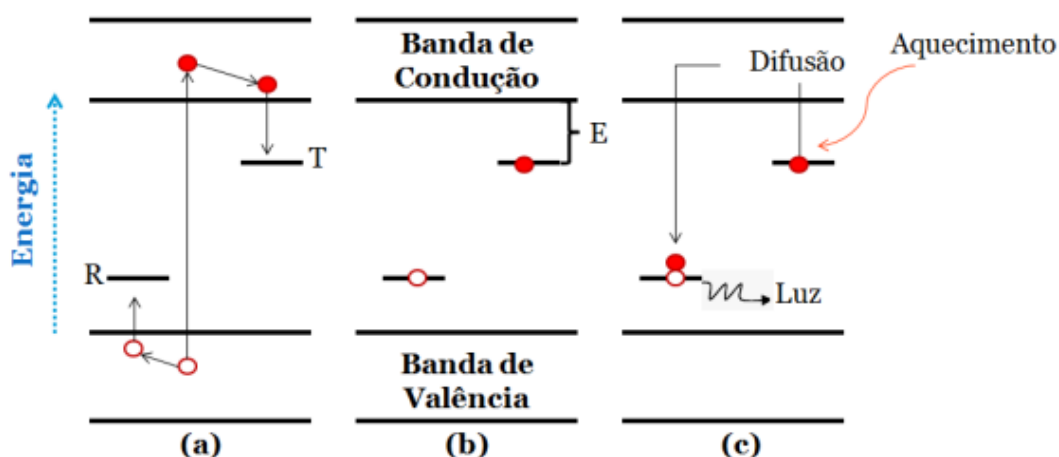


Figura 4.7 – Modelo simplificado do fenômeno termoluminescente. Em (a) é ilustrado o processo de excitação do elétron quando o material é irradiado. Elétron (círculos preenchidos em vermelho) e buraco (círculos vazios) difundem-se pelas bandas até serem aprisionados nas armadilhas T ou R, respectivamente. Posteriormente, é mostrado em (b) o aprisionamento do elétron e do buraco até serem estimulados termicamente. Por fim, em (c) mostra o efeito do estímulo térmico sobre os elétrons, que se difundem para a banda de condução, podendo ocorrer a recombinação com o buraco preso na armadilha R (LIMA, 2017).

4.3.2 Dosímetros TL: TLD-100 (LiF:Mg, Ti)

Dosímetros termoluminescentes (TL) são dispositivos amplamente utilizados em dosimetria pessoal, de procedimentos médicos (radiodiagnóstico e radioterapia), ambiental e industrial, sobretudo, devido às suas propriedades de baixo custo, simplicidade de produção, durabilidade, linearidade de resposta, baixo limite de detecção e capacidade de serem reutilizados várias vezes (d'ERRICO, BOS, 2004).

Existem diversos materiais que são utilizados como TLDs (do inglês, *Thermoluminescent Dosimeters*), dentre eles se destaca o LiF:Mg, Ti, comercializado como TLD-100 pela *Thermo Fisher Scientific*, antiga *Harshaw*.

O TLD-100 é utilizado tanto em dosimetria pessoal quanto ambiental. Na classificação de materiais, o fluoreto de lítio (LiF) é um sólido cristalino, dopado com magnésio (Mg) e titânio (Ti). Entre as principais vantagens do TLD-100 se destacam a sua alta sensibilidade às radiações beta e gama, linearidade da resposta em uma ampla faixa de doses, estabilidade da leitura, baixa dependência com a energia da radiação, além de ser um dosímetro de baixo custo e possuir um $Z_{eff} = 8,1$ próximo ao $Z_{eff} = 7,4$ do tecido biológico mole, conferindo-lhe a característica de tecido equivalente. Em contrapartida, assim como todo material TL, a principal

desvantagem reside no fato de que a dose somente pode ser lida uma vez, pois o processo de leitura “zera” o TLD (KOVACEVIC, VRTAR, VEKIC, 2005).

A curva de emissão TL do LiF:Mg, Ti compreende 10 picos distintos, variando de 50 a 450 °C. Contudo, para fins de dosimetria, utiliza-se normalmente os picos 4 e 5, que se encontram em torno de 160 e 190 °C, respectivamente. Dentre os dois, o pico 5 é considerado o mais relevante e é denominado de pico dosimétrico do material (RIBEIRO, 2000).

4.3.3 Aplicação dos conceitos de dose em dosimetria biológica

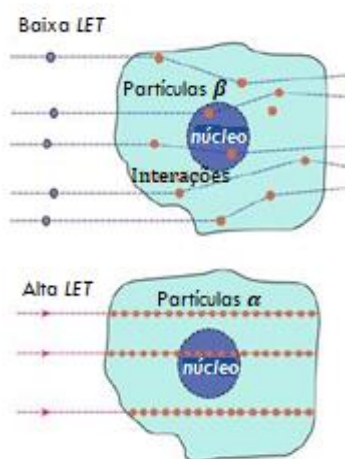


Figura 4.8 – Distribuição de ionizações produzidas em uma célula por radiações com baixa e alta LET, respectivamente.

A distribuição das ionizações produzidas por radiações com diferentes LET afeta a distribuição de frequência de aberrações cromossômicas nas células (Figura 4.8). Em radiações com baixa LET, as ionizações são distribuídas aleatoriamente entre as células devido ao grande número de *tracks*, resultando em aberrações cromossômicas dispostas aleatoriamente. Em contrapartida, em radiações com alta LET, a energia é depositada em pacotes discretos em menos *tracks*, resultando em aberrações cromossômicas concentradas em regiões bem delimitadas da célula. Essas diferenças são importantes na dosimetria biológica, especialmente em exposições parciais ou não uniformes (IAEA, 2011).

Matematicamente, o modelo mais comumente utilizado para descrever hipóteses sobre a resposta de tecidos biológicos às radiações ionizantes é o linear-quadrático, que é mostrado na equação 4.9 (IAEA, 2011).

$$Y = C + \alpha D + \beta D^2 \quad (4.9)$$

onde,

Y é a frequência total do *endpoint* analisado, C é a frequência basal espontânea do *endpoint* analisado, α é o coeficiente linear da dose e β é o coeficiente quadrático da dose.

É importante notar que o termo linear-quadrático é matematicamente impreciso, uma vez que algo não pode ser simultaneamente linear e quadrático. Esse termo é utilizado pois para baixas doses, o efeito é proporcional ao aumento da dose, respondendo de forma linear, enquanto para doses altas, o efeito aumenta com o quadrado da dose de radiação (IAEA, 2011).

Em contrapartida, para radiações de alta *LET*, como por exemplo, partículas alfa, o coeficiente α da equação 4.9 torna-se grande e, eventualmente, o coeficiente β torna-se menos relevante biologicamente e também estatisticamente mascarado (IAEA, 2011). Consequentemente, a resposta à dose é aproximada pela equação linear, dada por:

$$Y = C + \alpha D \quad (4.10)$$

Quando a curva de dose-resposta para um determinado *endpoint* citogenético é ajustada pelo modelo linear-quadrático, os coeficientes linear e quadrático dessa curva permitem avaliar quantitativamente as contribuições dos eventos de interação únicos e múltiplos, respectivamente, da radiação com o alvo biológico, que resultaram nas frequências desse *endpoint*. Dessa forma, por meio da verificação da predominância de um desses coeficientes da curva, é possível identificar o comportamento da interação da radiação com o alvo biológico para induzir o *endpoint* analisado. É importante destacar, que além da *LET*, a dose e a taxa de dose absorvida, o tipo de célula ou tecido biológico, bem como o tipo de *endpoint* analisado, podem influenciar nos valores dos coeficientes α e β e, consequentemente, no formato da curva de dose-resposta (IAEA, 2011).

4.3.3.1 Micronúcleos na avaliação de dose absorvida

Ao interagir com a matéria biológica, as radiações ionizantes podem ser potencialmente genotóxicas, isto é, podem danificar a informação genética das células, o DNA. Como manifestação primária desses danos, podem surgir as aberrações cromossômicas, que, por sua vez, podem originar os micronúcleos (Figura 4.9) (IAEA, 2011).

Os micronúcleos são estruturas que surgem quando cromossomos inteiros e/ou fragmentos cromossômicos não conseguem ser incorporados aos núcleos principais das células filhas durante a mitose (UTSUNOMIYA, BIONE, PAGLIARINI, 2002; FENECH *et al.*, 2011). A sua presença nas células descendentes são indicativos de danos persistentes no DNA causados pela perda gradual de material genético após a irradiação (IAEA, 2011).

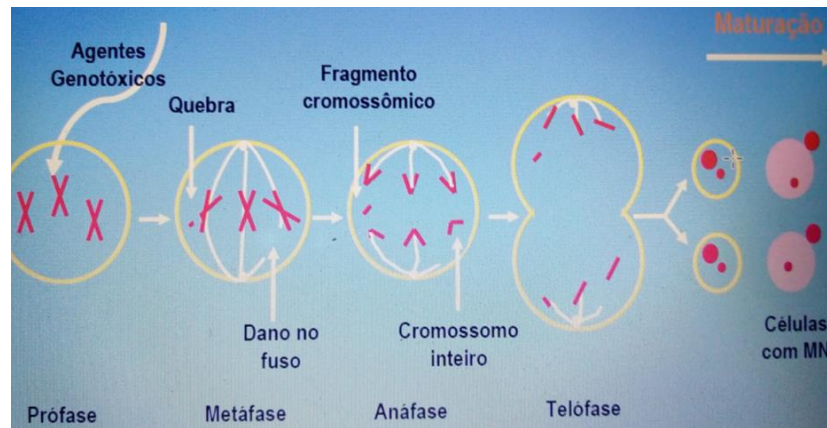


Figura 4.9 – Processo de formação de micronúcleos (GOOGLE IMAGENS, 2023).

A frequência de células com micronúcleos é um *endpoint* que pode ser correlacionado com a dose absorvida, permitindo a construção de curvas de dose-resposta citogenéticas. Entretanto, na maioria dos casos, devido a influência de diversos parâmetros físicos, como *LET*, dose, taxa de dose, bem como de parâmetros biológicos, como o tipo de célula e duração do seu ciclo celular, essa relação apesar de se apresentar proporcional, não é linear (BOLSUNOVSKY *et al.*, 2019; XAVIER *et al.*, 2023). Isso, por sua vez, pode ser contornado com fatores de correção que considerem a influência desses parâmetros e permitam estimativas aproximadas da dose recebida por um determinado sistema biológico (FUJIKAWA *et al.*, 1999).

4.3.4 Tratamento estatístico de dados

A verificação da normalidade dos dados é uma etapa fundamental para análises estatísticas, pois dados não-normais podem levar a conclusões equivocadas de um estudo. Um grupo amostral segue uma distribuição normal (ou gaussiana) quando os seus valores são simetricamente distribuídos em torno de uma média central, apresentando uma curva em formato de sino. A área sob essa curva representa 100% da probabilidade de ocorrência de um fenômeno. Portanto, a probabilidade de uma observação estar entre dois pontos é igual à área sob a curva desses pontos (Figura 4.10) (WALPOLE *et al.*, 2012).

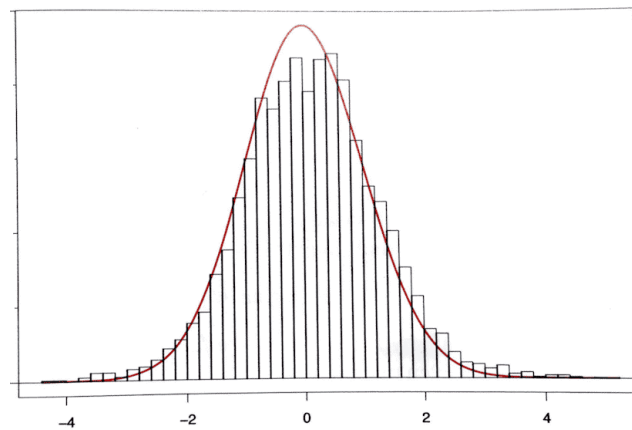


Figura 4.10 – Representação de uma distribuição normal de dados.

A normalidade de dados pode ser determinada numericamente mediante testes estatísticos disponíveis em *softwares*. Os testes mais comumente utilizados para verificação de normalidade de dados são o de D'Agostino-Pearson, Shapiro-Wilk e o de Kolmogorov-Smirnov. A escolha do teste implica em uma maior ou menor significância estatística, porém, isso depende dentre outras variáveis, do tamanho da amostra analisada (WALPOLE *et al.*, 2012).

A significância estatística está relacionada com a rejeição da hipótese nula, que é uma afirmação inicial que assume que não há diferença significativa entre dois grupos ou variáveis em estudo. A hipótese nula é rejeitada quando temos no mínimo um valor de $p < 0,05$, que indica a probabilidade de obter o mesmo resultado ou o mais próximo dele (WALPOLE *et al.*, 2012.). Em outras palavras, quando é detectado um valor de $p < 0,05$ significa que se um experimento for realizado 100 vezes sob as mesmas condições, a probabilidade de encontrar o mesmo resultado ou o mais próximo dele é de 95 vezes (ou 95%), sendo que as 5 vezes (ou 5%) restantes são as flutuações estatísticas que podem ocorrer. Desse modo, o valor p mede a força das evidências contra a hipótese nula e indica se o resultado observado é estatisticamente significativo.

Somente após a verificação da normalidade dos dados é possível aplicar os testes paramétricos que identificam e comparam a significância estatística dos grupos amostrais em estudo. Dentre os testes paramétricos de análise de significância estatística destaca-se a ANOVA (WALPOLE *et al.*, 2012).

A ANOVA unilateral é uma ferramenta estatística baseada na análise de variância dentro e entre os grupos amostrais, amplamente usada para comparar a distribuição de três ou mais grupos de amostras independentes. O teste adota um nível de significância de $p < 0,05$, indicando que, se obtivermos um valor de $p < 0,05$, pelo menos um par de medidas

difere, mas sem informar quantas nem quais. Para determinar quais medidas diferem é necessário realizar um teste adicional, e o teste Tukey é frequentemente utilizado para esse fim. O teste Tukey compara todos os possíveis pares de medidas, fornecendo uma melhor precisão de medida quando os tamanhos amostrais dos grupos são iguais ([WALPOLE et al., 2012](#)). Em outras palavras, o teste de Tukey indica quais grupos tiveram uma diferença estatística significativa. No geral, esses testes são úteis para compreender as diferenças entre grupos e como elas afetam os resultados de estudos científicos.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Devido ao seu caráter interdisciplinar, esse trabalho foi dividido em duas partes fundamentais e comuns às áreas de Física Nuclear e Biofísica das Radiações Ionizantes, que serão detalhadas ao longo deste capítulo. De caráter físico, primeiramente foi necessário determinar as taxas de dose e doses absorvidas das fontes radioativas de ^{241}Am e $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$, emissoras de partículas α e β , respectivamente, dentro das configurações utilizadas para as irradiações das amostras da biota vegetal investigada. Para tal propósito, utilizou-se de cálculos computacionais via simulações de Monte Carlo e de medições experimentais do sinal termoluminescente de dosímetros comerciais TLD-100 (LiF:Mg, Ti) irradiados. De caráter biofísico, raízes de cebola (*Allium cepa*) foram inicialmente cultivadas e, logo em seguida, irradiadas com diferentes tipos e taxas de dose de radiação. As frequências de dano citogenético radioinduzido, como por exemplo, alterações no índice mitótico (IM), aberrações cromossômicas (ACs) e células com micronúcleos (MNs) foram quantificadas e analisadas considerando as diferenças de LET (do inglês, *Linear Energy Transfer*), taxas de dose, doses absorvidas e intervalos de irradiação e de proliferação celular, permitindo conectar as análises de respostas biológicas aos parâmetros físicos das irradiações.

5.1 Determinação da taxa de dose da fonte de ^{241}Am

Uma fonte pontual de ^{241}Am (Figura 5.1), fabricada pela Phywe System Co. Ltd, Alemanha, com uma atividade nominal de 74 kBq, em 11 de agosto de 2003, e energia média de emissão de partícula α de 5,48 MeV foi utilizada para irradiações de raízes de *Allium cepa* com aproximadamente $0,5 \pm 0,1$ cm de comprimento e 400 ± 5 μm de espessura à $1,0 \pm 0,1$ cm de distância. Cálculos de Monte Carlo usando o código MCNP6 (versão 1.0) foram realizados pelo grupo de dosimetria



Figura 5.1 – Fonte de ^{241}Am .

computacional da Universidade de Pisa, Itália, para determinação da taxa de dose absorvida de partículas alfa para essa configuração de irradiação. As raízes de *Allium cepa* foram simuladas como cilindros de água, seguindo as especificações de suas medidas experimentais de comprimento, espessura e distância à fonte de ^{241}Am .

5.2 Determinação da taxa de dose da fonte de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$

5.2.1 Dosimetria computacional – Método teórico

Com a finalidade de avaliar o efeito da diferença de *LET* na indução de danos citogenéticos radioinduzidos, irradiações de raízes de *Allium cepa* com partículas β foram realizadas usando uma fonte de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$, do tipo aplicador dermatológico planar (Figura 5.2), fabricado pela *Amersham Health* (Buckinghamshire, Reino Unido), com uma atividade nominal de 19407 MBq, em 27 de novembro de 1973, energias máximas de emissão de partículas beta de 0,546 e 2,28 MeV para o ^{90}Sr e o ^{90}Y , respectivamente, e uma taxa de dose de $14,6 \text{ mGy.s}^{-1}$ à 0,5 cm de distância.



Figura 5.2 – Fonte de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$.

Cálculos de Monte Carlo usando o código *PHITS* (do inglês, *Particle and Heavy Ion Transport Code System*), versão 3.25, foram realizados pelo grupo de dosimetria computacional da Universidade de Yale, Estados Unidos, para determinar a taxa de dose atual para a configuração adotada nos experimentos com partículas β . Nessa simulação, a geometria cilíndrica, a composição química aquosa e os parâmetros de comprimento e espessura das raízes de *Allium cepa* foram os mesmos da simulação com partículas α . Contudo, um plástico filme de PVC de 10 μm de espessura foi colocado entre a fonte de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ e as raízes de cebola. Isso foi feito para manter uma distância de 0,5 cm entre a fonte e a superfície das raízes durante as irradiações e, portanto, também foi adicionado na simulação para determinar a taxa de dose absorvida de partículas beta para essa configuração de irradiação.

5.2.2 Dosimetria termoluminescente – Método experimental

TLDs-100 (LiF:Mg, Ti), fabricados pela *Thermo Fisher Scientific*, de formato cúbico e dimensões $1 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$, foram utilizados para as medições experimentais de dose absorvida. O TLD-100 foi utilizado nesta tese devido a sua disponibilidade e pelas suas propriedades geométricas e dosimétricas adequadas para a configuração dos experimentos com partículas beta. Além de suas dimensões já mencionadas anteriormente, algumas dessas características são mostradas na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Propriedades do TLD-100 (HARSHAW, 2001; BASSINET *et al.*, 2010).

TLD-100 (LiF:Mg, Ti)	
Densidade	2,64 g/cm ³
Número atômico efetivo para absorção fotoelétrica	8,1
Espectro de emissão termoluminescente (TL)	350 a 600 nm (máximo em 400 nm)
Temperatura do pico TL dosimétrico	195 °C
Resposta TL em função da energia dos fótons (30 keV/ ⁶⁰ Co)	1,25
Faixa de utilização em função do kerma-ar	10 µGy – 10 Gy
Desvanecimento otimizado a 20 °C	5% ao ano

5.2.2.1 Teste de reprodutibilidade e homogeneidade de TLDs

Um lote com 30 TLDs-100 não irradiados foi enviado para a Universidade de Pisa, Itália, para realização de testes. Com o objetivo de eliminar possíveis sinais adicionais de termoluminescência devido ao aumento dos níveis de *background* de radiação proveniente da exposição dos dosímetros aos raios X no aeroporto e radiação cósmica durante o voo do Brasil à Itália, foi realizado um tratamento térmico pré irradiação recomendado pelo fabricante do TLD-100, que consistiu em submetê-los a uma temperatura de 400 °C por 1 h e, logo em seguida, tratá-los por 2 h à temperatura de 100 °C.

Após o tratamento térmico, o lote contendo os 30 TLDs-100 foi irradiado com uma dose de 4,8 mSv, usando uma fonte de ²²⁶Ra, com atividade nominal de 2,22 MBq (julho de 2009), e com uma taxa de dose atual de 0,2 mSv.h⁻¹ a uma distância de 5 cm (Figura 5.3).



Figura 5.3 – Sistema de irradiação dos TLDs-100. (A) Vista completa do suporte sem a fonte de ^{226}Ra ; (B) Vista da parte superior do suporte; (C) Vista da parte inferior do suporte; (D) Vista completa do suporte com a fonte de ^{226}Ra .

A leitura dos TLDs-100 e, conseqüentemente, a aquisição dos dados foi realizada em uma leitora da *Harshaw*, modelo 4500 (Figura 5.4), conjuntamente com o software *WinREMS* instalado no sistema operacional *Windows*. Cada dosímetro foi lido individualmente. Finalizada as leituras, os dosímetros eram colocados imediatamente para tratamento térmico.



Figura 5.4 – Leitora de TLDs *Harshaw* 4500.

Foi estabelecida uma taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C/s}$, realizando contagens entre as temperaturas de 50 até $400\text{ }^{\circ}\text{C}$. Essa taxa de aquecimento utilizada foi obtida mediante testes para determinação do melhor perfil para a leitura dos dosímetros.

Testes de reprodutibilidade e homogeneidade dos dosímetros foram realizados no *Laboratorio di Misure Nucleari*, Pisa, Itália, a fim de selecionar os TLDs-100 que garantissem uma

maior confiabilidade e precisão nas medições de dose-resposta. Isso foi feito para assegurar que dentro desse lote, fosse selecionado apenas os dosímetros que apresentassem a mesma resposta para uma mesma dose quando irradiados repetidas vezes sob as mesmas condições, além de garantir a uniformidade de sensibilidade de cada dosímetro e, conseqüentemente, reduzir as incertezas associadas.

Os 30 dosímetros do mesmo lote foram irradiados por três vezes consecutivas, sob as mesmas condições (tratamento térmico antes da irradiação e após a leitura do sinal TL, mesma configuração experimental e mesma dose). Os dados de cada irradiação foram dispostos em colunas do *Excel* para a realização das análises de reprodutibilidade e homogeneidade do lote.

O requisito adotado para determinar a homogeneidade do lote foi que o valor analisado (E) para qualquer dosímetro não diferisse de outro valor de qualquer outro dosímetro em mais de 30% (CASMIE, 1995), ou seja:

$$\frac{E_{m\acute{a}x} - E_{m\acute{i}n}}{E_{m\acute{i}n}} \leq 30\% \quad (5.1)$$

onde, $E_{m\acute{a}x}$ e $E_{m\acute{i}n}$, são os valores máximos e mínimos das leituras TL avaliadas, respectivamente.

A reprodutibilidade de cada dosímetro do lote foi verificada por meio do coeficiente de variação (CV), considerando a média das três respostas (sinais TL) obtidas de cada dosímetro e calculado pela equação 5.2. Segundo critérios estabelecidos pela ISO 12794:2000 (ISO 2000), esse valor não deve ser igual ou superior a 15% para cada dosímetro avaliado individualmente.

$$CV = \frac{S}{\overline{TL}_i} \times 100 \quad (5.2)$$

onde, CV corresponde a medida de dispersão relativa para cada dosímetro, S representa o desvio padrão e \overline{TL}_i é a média das três respostas (sinais TL) obtidas para cada dosímetro.

5.2.2.2 Análise da taxa de dose absorvida de partículas beta usando TLD-100

Após os testes de reprodutibilidade e homogeneidade do lote contendo os 30 TLDs-100, realizados na Universidade de Pisa, Itália, foram selecionados 20 dosímetros utilizados nesta tese.

Como os dosímetros voltaram ao Brasil e, conseqüentemente, foram expostos à raios X no aeroporto e aumento dos níveis de *background* de radiação devido ao voo da Itália ao

Brasil, foi realizado o mesmo tratamento térmico recomendado pelo fabricante do TLD-100 e executado anteriormente durante a etapa de testes.

No Brasil, esse tratamento térmico foi realizado em um forno mufla (Figura 5.5), instalado no laboratório multiusuário do Núcleo de Petróleo e Gás de Sergipe (NUPEG – SE).



Figura 5.5 – Forno mufla utilizado para o tratamento térmico dos TLDs.

Posteriormente, foram feitos “pontos” com grafite em uma das faces de cada TLD-100 para facilitar a orientação espacial durante a irradiação e garantir que as leituras fossem sempre realizadas com o dosímetro na mesma posição.

Para a determinação da taxa de dose absorvida de partículas beta, da fonte de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$, mostrada na Figura 5.2, foram usados pares de TLDs-100 irradiados durante 30 s, 1 min e 3 min, à uma distância de 0,5 cm, totalizando 6 dosímetros. Para manter essa distância foi colocado um plástico filme de PVC de 10 μm de espessura entre a fonte e os dosímetros. Para fins de comparação, 2 TLDs-100 foram irradiados durante 1 min no irradiador SAMARA (Figura 5.6), utilizando uma fonte de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$, número de série SIA5-1520, com uma taxa de dose de $12,2 \pm 3,4 \text{ mGy.s}^{-1}$, mantendo a configuração da recente calibração realizada pelo grupo de Física Médica da Universidade Federal de Sergipe (SILVA *et al.*, 2020). Adicionalmente, 2 TLDs-100 não irradiados foram armazenados para subtração do *background* do sinal TL, uma vez que esses dosímetros foram enviados para Universidade de Pisa, Itália, para serem lidos.



Figura 5.6 – Irradiador SAMARA com fontes de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$.

5.2.2.3 Análise do perfil de curva de dose-resposta usando TLD-100

Os TLDs-100 restantes foram submetidos às mesmas condições experimentais que os experimentos de irradiação das raízes da biota vegetal *Allium cepa*, que será descrito detalhadamente mais adiante. A fonte de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ utilizada nas irradiações foi a da Figura 5.2, que teve a taxa de dose absorvida investigada como parte deste trabalho, considerando a configuração experimental com um plástico filme de 10 μm de espessura entre a fonte e os dosímetros, mantendo 0,5 cm de distância entre ambos. Os tempos das irradiações foram 2 min e 51 s, 5 min e 42 s, 11 min e 25 s e 22 min e 49 s. Além disso, um par de TLDs-100 não irradiados foi armazenado para posterior subtração do *background* do sinal TL, pois as suas leituras foram sempre realizadas na Universidade de Pisa, Itália.

5.3 Experimentos *in vivo* com raízes de *Allium cepa*

5.3.1 Germinação de sementes de *Allium cepa*

Experimentos de laboratório com material biológico requerem um ambiente asséptico para mitigar a carga de microrganismos patógenos, como por exemplo, esporos de fungos, que possam contaminá-los. Para tal propósito, antes de iniciar os experimentos com a *Allium cepa*, todo material de vidraria (béqueres, placas de Petri, frascos com água destilada etc.), objetos metálicos, como pinças, e o papel de germinação que foi utilizado nos experimentos foram embalados em papel alumínio e papel madeira e, logo em seguida, autoclavados seguindo o procedimento padrão, isto é, sob uma pressão de 1 atm e temperatura de 121 °C por 15 minutos (Figura 5.7).



Figura 5.7 – Procedimento de autoclavagem de materiais: (A) Revestimento dos materiais com papel alumínio e papel madeira; (B) Equipamento de autoclave; (C) Equipamento de autoclave em funcionamento; (D) Materiais autoclavados.

O ambiente asséptico utilizado nos experimentos desta tese foi uma cabine de fluxo laminar previamente esterilizada com etanol 70% e, posteriormente, irradiada durante 15 minutos com luz UVC, com pico de $\lambda \cong 254 \text{ nm}$, que é amplamente utilizado como germicida (SOUZA *et al.*, 2022).

Após o resfriamento dos materiais autoclavados, as suas embalagens foram borrifadas com etanol 70% antes de serem transferidas para a cabine de fluxo laminar. Além dos materiais autoclavados, materiais que não podiam entrar na autoclave devido à baixa resistência ao aumento de temperatura, como plásticos diversos (Parafilm, marcadores permanentes, micropipetas, suportes para irradiações etc), também foram primeiramente borrifados com etanol 70% e, posteriormente, tiveram ambos os lados de suas superfícies irradiados com luz UVC durante 15 minutos (Figura 5.8).



Figura 5.8 – Esterilização dos materiais com luz UVC. **(A)** Disposição dos materiais na cabine de fluxo laminar; **(B)** Exposição dos materiais à luz UVC.

Com a assepsia do ambiente e dos materiais realizada, embalagens com sementes de cebola (*Allium cepa*), variedade Baia Periform, livres de pesticidas, da marca brasileira ISLA™, foram borrifadas com etanol 70% e transferidas para dentro da cabine de fluxo laminar. Então, as embalagens foram abertas e as sementes foram colocadas dentro de béqueres e lavadas durante 20 s com etanol 70% e, posteriormente, enxaguadas 5 vezes com água destilada. Finalizada a assepsia das sementes de *Allium cepa*, elas foram distribuídas em placas de Petri forradas com uma dupla camada de papel filtro de germinação. Logo em seguida, 4 ml de água destilada foram adicionados e as placas de Petri foram fechadas e as suas laterais seladas com plástico Parafilm® M. Essas sementes foram germinadas dentro de uma estufa incubadora BOD (do inglês, *Biochemical Oxygen Demand*), mantidas a uma temperatura de

$25 \pm 1^\circ\text{C}$, sem exposição a qualquer fonte de radiação, exceto os níveis de *background* naturais, até o crescimento de raízes com aproximadamente $0,5 \pm 0,1$ cm de comprimento e 400 ± 5 μm de espessura (Figura 5.9).



Figura 5.9 – Procedimento de germinação de sementes de *Allium cepa*.

5.3.2 Irradiação com partículas α

Após o crescimento de raízes de *Allium cepa*, elas foram medidas com uma régua para padronização do seu comprimento para irradiação com partículas alfa. Sete grupos de amostras foram definidos, transferindo aleatoriamente raízes com $0,5 \pm 0,1$ cm para novas placas de Petri. As raízes de seis grupos foram individualmente irradiadas com a fonte pontual de ^{241}Am da Figura 5.1, que teve a sua taxa de dose absorvida de partículas alfa investigada neste trabalho por meio de simulação computacional, seguindo a mesma configuração experimental descrita na seção 5.1. Adicionalmente, um grupo de controle, isto é, de raízes de *Allium cepa* não irradiadas, foi selecionado para determinar as frequências basais de possíveis anormalidades citogenéticas espontâneas. Após os seis grupos de amostras serem irradiados com doses diferentes, as raízes de *Allium cepa* foram novamente acondicionadas em placas de Petri, seladas com plástico Parafilm® M e transferidas para a estufa incubadora BOD, onde permaneceram juntamente com a amostra de controle não irradiada por mais 20 h, que é aproximadamente o tempo médio para a conclusão de um ciclo celular vegetal (MATAGNE, 1968; NORMAN, 1969; VAIJAPURKAR *et al.*, 2001). As doses absorvidas médias avaliadas foram de 20, 40, 60, 80, 100 e 200 mGy e os índices de dano citogenético radioinduzidos foram comparados com a amostra de controle não irradiada.

5.3.3 Irradiação com partículas β

O mesmo procedimento de medição do comprimento médio e seleção de raízes de *Allium cepa* com aproximadamente $0,5 \pm 0,1$ cm também foi realizado para as irradiações com partículas beta. Logo em seguida, oito destas raízes medidas foram aleatoriamente transferidas para um suporte de acrílico (Figura 5.10) e o procedimento de irradiação obedecendo a mesma configuração utilizada nas investigações experimentais e via simulação computacional de taxa de dose absorvida de partículas beta, que pode ser visto detalhadamente nas seções 5.2.1 e 5.2.2.3, foi executado.

Sete grupos de amostras foram irradiados com doses de 0,04, 0,09, 0,13, 0,18, 0,36, 0,72 e 1,44 Gy. Além disso, assim como foi feito no experimento com partículas alfa, um grupo de controle não irradiado, isto é, de raízes de *Allium cepa* não irradiadas, foi selecionado para determinar as frequências basais de possíveis anormalidades citogenéticas espontâneas. O mesmo procedimento de transferência para a estufa incubadora BOD também foi realizado, porém, tanto os sete grupos de amostras irradiadas quanto o grupo de controle não irradiado foram mantidos na BOD por 24 h, que foi o período otimizado para a detecção de anormalidades citogenéticas observadas em células de raízes de *Allium cepa* irradiadas.



Figura 5.10 – Irradiação beta de raízes de *Allium cepa* no suporte de acrílico.

5.3.4 Quantificação de danos citogenéticos induzidos por radiação ionizante

Após 20 e 24 h das irradiações com partículas α e β , respectivamente, as raízes de *Allium cepa* foram transferidas das placas de Petri para tubos de ensaio identificados com a dose absorvida correspondente, fixadas em solução Carnoy – etanol absoluto e ácido acético (3:1), e mantidas a uma temperatura ambiente de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 h. Logo em seguida, as amostras foram transferidas da solução Carnoy para etanol 70% e armazenadas à 4°C até o preparo de lâminas de microscopia para quantificação das frequências de danos citogenéticos induzidos por radiação (GUERRA, SOUZA, 2002).

5.3.4.1 Preparo de lâminas para análise por microscopia óptica

Lâminas de microscopia foram produzidas hidrolisando as raízes de *Allium cepa* por cinco minutos em uma solução de HCl 1N mantida à 42 °C e, logo em seguida, lavando-as com água destilada por três minutos. Para aumentar a qualidade/contraste da coloração e melhorar o espalhamento das células, as raízes de *Allium cepa* foram coradas com orceína acética 2% (Sigma-Aldrich) entre 10 e 30 min, e então uma gota de ácido acético 45% foi adicionada para remover possíveis excessos de coloração. Logo em seguida, as pontas das raízes foram separadas com lâmina de bisturi sobre a lâmina, cobertas com lamínulas e cuidadosamente esmagadas (GUERRA, SOUZA, 2002). Por fim, a montagem de lâminas semipermanentes foi finalizada vedando-as com esmalte incolor aplicado nas bordas das lamínulas (Figura 5.11). Com a finalidade de aumentar o seu tempo de conservação, essas lâminas foram armazenadas sob refrigeração à 4 °C para análises posteriores das frequências de danos citogenéticos radioinduzidos.

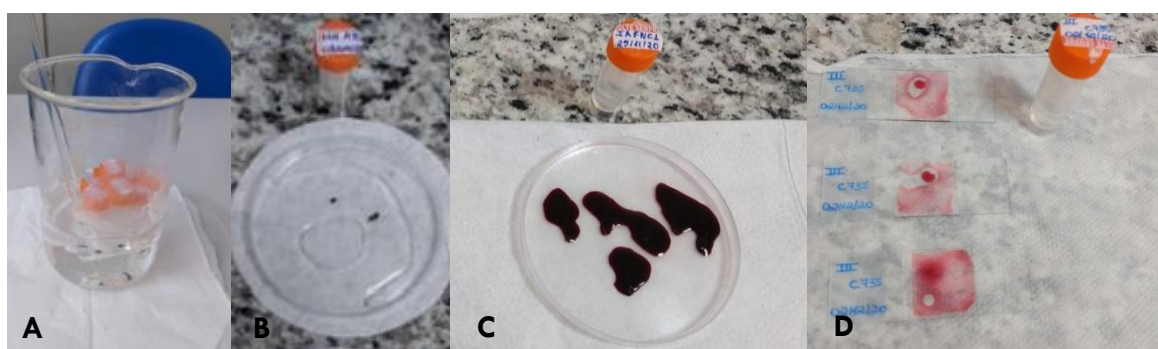


Figura 5.11 – Procedimento de preparo de lâminas de microscopia. (A) Hidrólise ácida; (B) Lavagem com H₂O destilada; (C) Coloração com orceína acética 2%; (D) Lâminas produzidas.

5.3.4.2 Determinação das frequências de aberrações cromossômicas (ACs), micronúcleos (MNs) e índice mitótico (IM)

A análise das lâminas foi realizada por meio de microscopia óptica usando um microscópio óptico Olympus BX51 com ampliação de 1000 × (Figura 5.12).

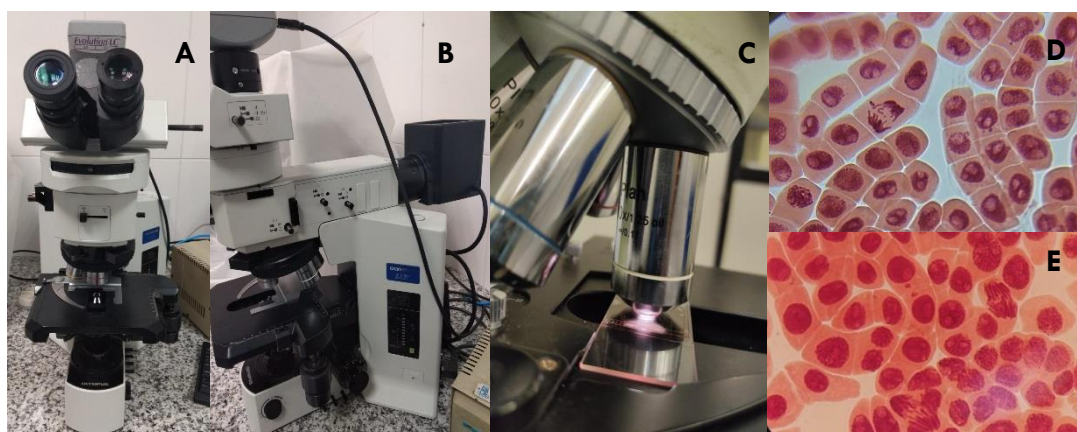


Figura 5.12 – Microscópio óptico Olympus BX51. (A) Vista frontal do microscópio; (B) Vista lateral do microscópio; (C) Lâmina sob a objetiva de 100 ×; (D – E) Visualização das imagens das células com o aumento de 1000 ×.

Tanto para as amostras irradiadas com partículas alfa quanto para as amostras irradiadas com partículas beta, foram investigados o potencial citotóxico e genotóxico radioinduzido em células de *Allium cepa*. A citotoxicidade foi investigada com base no índice mitótico (IM), calculado por meio da equação 5.3:

$$IM = \frac{\text{Número de células em divisão}}{\text{Número de células analisadas}} \times 100 \quad (5.3)$$

Dessa forma, o IM expressou o valor percentual de células em mitose. Um total de 1000 células foi analisado para o cálculo de IM de cada lâmina produzida a partir de uma raiz de *Allium cepa* (LEME, MARIN-MORALES, 2009). O IM das amostras irradiadas com partículas alfa foi obtido por meio de dois experimentos independentes, analisando 8000 células (4 lâminas × 1000 células × 2 replicatas) por ponto de dose, incluindo o grupo de controle não irradiado. Já para as amostras irradiadas com partículas beta, o IM foi obtido por meio de três experimentos independentes, analisando 15000 células (5 lâminas × 1000 células × 3 replicatas) por ponto de dose, incluindo o grupo de controle não irradiado.

A frequência de células com micronúcleos (FMN%) foi avaliada como um *endpoint* indicador de genotoxicidade e foi expressa como o número de células com micronúcleos por 1000 células analisadas. Para a análise de MNs induzidos pelas irradiações com partículas alfa foram contabilizadas 8000 células, enquanto para a análise de MNs induzidos pelas irradiações com partículas beta foram contabilizadas 15000 células. Como um critério para a

análise foram consideradas apenas células com membranas citoplasmáticas intactas e os micronúcleos não excederam 1/3 do tamanho do núcleo celular principal. Além disso, todas as análises foram realizadas usando lâminas codificadas, garantido, portanto, que não houvesse influência do observador nos resultados.

A frequência de ACs (FAC%) foi calculada para apoiar os dados da frequência de MNs. Aproximadamente 100 células em anáfase-telófase foram examinadas por lâmina para ambos os tipos de radiações. 800 células (4 lâminas \times 100 células \times 2 replicatas) foram contabilizadas para os experimentos com partículas alfa e 1200 células (4 lâminas \times 100 células \times 3 replicatas) foram contabilizadas para os experimentos com partículas beta. Três tipos de aberrações cromossômicas foram majoritariamente utilizados para essa análise: pontes, fragmentos e cromossomos atrasados, pois é esperado que essas ACs se tornem micronúcleos mais tarde no ciclo celular – se a célula aberrante sobreviver ao dano (FENECH *et al.*, 2011). Todos os dados obtidos, isto é, de IM e das frequências de MNs e ACs foram expressos como as médias \pm o erro padrão das médias.

5.3.4.3 Análises de significância estatística dos dados

Inicialmente, testes de normalidade recomendados para cada tamanho amostral foram aplicados para direcionar a escolha correta dos testes de análise de significância estatística (WALPOLE *et al.*, 2012). Para os experimentos com partículas alfa, o tamanho da amostra foi de $N = 8$, e a normalidade dos dados foi testada utilizando o teste de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$). Já para os experimentos com partículas beta, onde se teve um $N = 15$, a normalidade dos dados foi testada usando o teste de D'Agostino-Pearson ($p < 0,05$). Após a verificação da normalidade dos dados de ambos os experimentos foi realizada uma análise de variância para as médias de IM, MNs e ACs (one-way ANOVA) seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$) para verificar se as diferenças entre as amostras que foram irradiadas com diferentes doses tinham significância estatística. As análises estatísticas desta tese foram realizadas usando o software *GraphPad Prism 9.0.2*.

5.3.4.4 Curvas de dose-resposta citogenética para micronúcleos

A FMN% foi utilizada para plotar curvas de dose-resposta para ambos os tipos de radiações. Foram investigados os perfis individuais dessas curvas, considerando os principais

parâmetros físicos e biológicos que influenciam na indução e detecção dos MNs observados nas células de *Allium cepa*, como por exemplo, a LET das radiações e as alterações nas taxas de proliferação celular (IM) e de aberrações cromossômicas (ACs). Devido a limitação do N das amostras dos dois experimentos ser diferente, apenas uma comparação semiquantitativa foi realizada entre as curvas de dose-resposta de micronúcleos induzidos por partículas alfa e beta.

5.4 Uso de micronúcleos em células de *Allium cepa* como um bio-dosímetro citogenético

O potencial do uso de micronúcleos em células de raízes de *Allium cepa* como um indicador biológico de exposição à dose de radiação absorvida foi avaliado por meio da realização de alguns testes. Para esta parte do trabalho foram realizadas irradiações com fontes diversas de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$, emissoras de partículas β , pertencentes ao Laboratório de Radiações, da Universidade Federal de Sergipe. As informações dessas fontes podem ser verificadas na Tabela 5.2. Foram avaliados parâmetros como homogeneidade e reprodutibilidade da resposta de MNs radioinduzida, influência da taxa de dose absorvida de partículas β na sensibilidade de detecção de MNs, e os principais indicadores biológicos que podem limitar a sua detecção nas células, como por exemplo, a alteração na atividade mitótica (IM) e a indução de ACs. Por fim, uma análise comparativa entre curvas de dose-resposta física e biológica foi realizada com o objetivo de identificar como um método pode apoiar o outro.

Tabela 5.2 – Informações das fontes de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ utilizadas nas irradiações de raízes de *Allium cepa*.

Número da fonte	Geometria	Número de série	Atividade nominal (MBq)	Data da calibração do fabricante ^a	Taxa de dose atual (mGy.s ⁻¹)
1	Côncava	SIA6-1522	370	27/11/1973	13,9 ± 3,2 ^b
2	Côncava	SIQ6-9737	740	14/01/1992	5,3 ± 2,3 ^b
3	Planar	SIA5-1520	74	27/11/1973	12,2 ± 3,4 ^b
4	Planar	-	19407	27/11/1973	Investigada nesta tese

^a Amersham Health, Buckinghamshire, Reino Unido.

^b Taxas de dose determinadas via técnica de OSL por SILVA et al., 2020.

5.4.1 Análise de homogeneidade e reprodutibilidade da resposta de MNs radioinduzida

Sementes de cebola (*Allium cepa*), variedade Baia Periform, da marca brasileira ISLA™, livres de pesticidas e provenientes de três lotes diferentes (134567-004 S2, 138206-001 S2 e 141941-000 S2) foram germinadas conforme descrito na seção 5.3.1 e irradiadas com uma dose de 0,72 Gy de partículas β , usando a mesma fonte e configuração descritas na seção 5.3.3. No total, foram analisadas 5000 células para cada lote de raízes irradiadas, bem como para os seus respectivos grupos de controle não irradiados.

Seguindo um procedimento adaptado da análise de reprodutibilidade e homogeneidade realizada para os dosímetros TL (seção 5.2.2.1), os dados de cada irradiação foram dispostos em colunas do Excel para a avaliação de reprodutibilidade e homogeneidade de cada lote de raízes de *Allium cepa*.

O requisito adotado para determinar a homogeneidade do lote foi que o valor analisado, isto é, a frequência de células com micronúcleo ($FMN\%$) para qualquer lâmina analisada não diferisse de outro valor de qualquer outra lâmina em mais de 30%, ou seja:

$$\frac{FMN\%_{m\acute{a}x} - FMN\%_{m\acute{i}n}}{FMN\%_{m\acute{i}n}} \leq 30\% \quad (5.4)$$

onde, $FMN\%_{m\acute{a}x}$ e $FMN\%_{m\acute{i}n}$, são os valores máximos e mínimos das leituras de $FMN\%$ avaliadas, respectivamente.

A reprodutibilidade do teste de MN em células de *Allium cepa* irradiadas com partículas β foi verificada por meio de uma adaptação do coeficiente de variação (CV), haja vista que devido a se tratar de um dano biológico seria impossível zerar o sinal de MN como é realizado nos dosímetros TL. Dessa forma, isso foi contornado selecionando 5 raízes de cada um dos três lotes investigados (134567-004 S2, 138206-001 S2 e 141941-000 S2), que foram irradiadas com uma dose de 0,72 Gy sob a mesma configuração experimental. Assim, o $CV_{FMN\%}$ foi calculado pela equação 5.5. Seguindo uma adaptação do raciocínio que foi utilizado no cálculo de CV para dosímetros TL, mantendo-se a premissa que esse valor não deveria ser superior a 15% para cada lâmina avaliada individualmente.

$$CV_{FMN\%} = \frac{S}{\overline{FMN\%}} \times 100 \quad (5.5)$$

onde, $CV_{FMN\%}$ corresponde a medida de dispersão relativa para cada lâmina analisada, S representa o desvio padrão e $\overline{FMN\%}$ é a média das cinco respostas (Frequência de MNs) obtida para cada lote de raízes de *Allium cepa* irradiado.

5.4.2 Investigação da resposta de MNs em função do tempo

Como mencionado anteriormente, um ciclo celular completo da *Allium cepa* dura entre 20 e 24 h (MATAGNE, 1968; NORMAN, 1969; VAIJAPURKAR *et al.*, 2001), isto significa, que esse é o tempo mínimo para a detecção de células com micronúcleos (MNs). No entanto, é interessante também saber quais os possíveis caminhos desses danos citogenéticos, que podem induzir perdas de genes funcionais, segregação desigual e envelhecimento precoce de cromossomos causados por quebras, perdas e degradação dessas estruturas, em ciclos celulares posteriores. Dessa forma, foi realizada uma análise do IM e da frequência de MNs induzida em raízes de *Allium cepa* irradiadas com doses de 0,36, 0,72 e 1,44 Gy de partículas β e coletadas após 24, 48 e 72 h após as irradiações. 5000 células foram quantificadas para cada uma dessas doses e tempos, incluindo os seus respectivos grupos de controle não irradiados.

5.4.3 Influência da taxa de dose de radiação beta para a indução de micronúcleos

A taxa de dose de radiação absorvida é uma variável física que pode afetar a detecção de células com micronúcleos (MNs), pois pode dentre outras coisas alterar a atividade mitótica. Por essa razão, raízes de *Allium cepa* foram irradiadas com quatro fontes de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ com taxas de dose de partículas beta diferentes (Tabela 5.2), mantendo a dose de 0,72 Gy em todas as quatro irradiações. Isso foi realizado para se investigar o efeito da taxa de dose sobre o IM e a frequência de MNs após 24 h das irradiações. Para cada fonte utilizada e, consequentemente, para cada taxa de dose investigada foram avaliadas 5000 células, incluindo os seus respectivos grupos de controle não irradiados.

5.4.4 Comparação entre curvas de dose-resposta física e biológica

A partir das frequências de células com MNs (FMN%) quantificadas para cada ponto de dose de raízes de *Allium cepa* irradiadas com a fonte 4 (Tabela 5.2) foi possível plotar uma

curva de dose-resposta citogenética. O perfil dessa curva foi avaliado tanto em função dos parâmetros físicos quanto biológicos. Logo em seguida, um modelo matemático foi proposto para fins de dosimetria, com o objetivo de comparar as doses absorvidas de partículas β detectadas pelas frequências de células com micronúcleos e pelos TLDs-100, isto é, usando modalidades de dosimetria biológica e física, respectivamente.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira parte desta tese foi feita a caracterização dosimétrica para as configurações experimentais utilizadas para as irradiações das raízes de *Allium cepa*. Foram considerados parâmetros como a geometria e a atividade das fontes, tipos e energias das radiações emitidas, distâncias entre a fonte e o alvo (biota biológica ou dosímetro inorgânico), composição química do material dosimétrico, volume irradiado etc. Isso foi feito devido a importância de quantificar as taxas de dose e doses absorvidas de cada tipo de radiação ionizante usada em cada caso.

A segunda parte consistiu na realização de experimentos *in vivo* utilizando células de raízes de *Allium cepa* irradiadas, cujo objetivo foi verificar a sua utilidade como um indicador biológico de exposição à dose de radiação. Dessa forma, foi investigada a influência de parâmetros físicos como diferentes *LETs*, taxas de dose e doses absorvidas nos efeitos biológicos detectáveis nas células dessa biota vegetal. Isso, por sua vez, foi feito por meio de observação por microscopia óptica das alterações nas suas taxas de proliferação celular e como isso se relacionava com as frequências de aberrações cromossômicas e micronúcleos detectadas.

Por fim, o conjunto dessas análises foi utilizado para conectar as análises de respostas biológicas aos parâmetros físicos das irradiações, permitindo plotar e comparar curvas de dose-resposta física e biológica e, conseqüentemente, determinar como o método dosimétrico biológico pode complementar o método de dosimetria convencional físico.

6.1 Taxa de dose de partículas α

A taxa de dose absorvida de partículas α foi determinada mediante cálculos de Monte Carlo, usando o código MCNP6 (versão 1.0). Como a composição química das raízes de *Allium cepa* é essencialmente aquosa, foi utilizado nos cálculos dosimétricos o tecido mole da ICRU 44 (ICRU, 1989). Uma geometria cilíndrica foi adotada para simular as raízes de *Allium cepa*,

reproduzindo as suas dimensões médias medidas experimentalmente de $0,5 \pm 0,1$ cm de comprimento e 400 ± 5 μm de espessura. Considerando a correção da atividade inicial (seção 5.1) da fonte pontual de ^{241}Am para a data em que ocorreram as irradiações, realizadas em fevereiro de 2020, e a distância de $1,0 \pm 0,1$ cm entre a fonte e a raiz de *Allium cepa*, a taxa de dose absorvida de partículas α foi de $7,92 \text{ mGy} \cdot \text{min}^{-1}$ para essa configuração experimental. O erro (1 S.D.) dessa simulação de Monte Carlo foi menor que 1%.

6.2 Taxa de dose de partículas β

Para fins de comparação, a taxa de dose absorvida de partículas β foi investigada por simulação computacional e, experimentalmente, por meio de dosímetros termoluminescentes. Embora os TLDs-100 (LiF:Mg, Ti) fossem adequados para essa análise (Tabela 5.1), com destaque dentre outras características para as suas dimensões cúbicas de $1 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$, ainda se fazia necessário verificar se a taxa de dose de partículas beta absorvida para as raízes de *Allium cepa* seria próxima ou distante do valor da taxa de dose experimental obtida das medições do sinal TL dos dosímetros irradiados, sobretudo, devido a espessura média das raízes ser cerca de 2,5 vezes menor que a espessura dos TLDs-100.

6.2.1 Dosimetria computacional

Como descrito na seção 5.2, cálculos de Monte Carlo usando o código *PHITS* (do inglês, *Particle and Heavy Ion Transport Code System*), versão 3.25, foram realizados para determinar a taxa de dose absorvida de partículas β pelas raízes de *Allium cepa*. Haja vista que a composição química da *Allium cepa* é essencialmente aquosa, as raízes foram simuladas como cilindros de água, adotando as suas dimensões médias medidas experimentalmente de $0,5 \pm 0,1$ cm de comprimento e 400 ± 5 μm de espessura. A atividade inicial (seção 5.2) da fonte de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$, do tipo aplicador dermatológico planar, foi recalculada para junho de 2020, ou seja, para o período em que ocorreram as irradiações. Após a obtenção da atividade atual da fonte, foram considerados para a simulação a adição de um plástico filme de PVC de 10 μm de espessura, utilizado para manter uma distância de $0,5 \pm 0,1$ cm entre a fonte e a superfície superior das raízes (Figura 6.1) durante as irradiações. A taxa de dose absorvida de partículas β para essa configuração experimental foi de $63,1 \text{ mGy} \cdot \text{min}^{-1}$ e o erro (1 S.D.) associado a essa simulação foi de aproximadamente 1,6%.

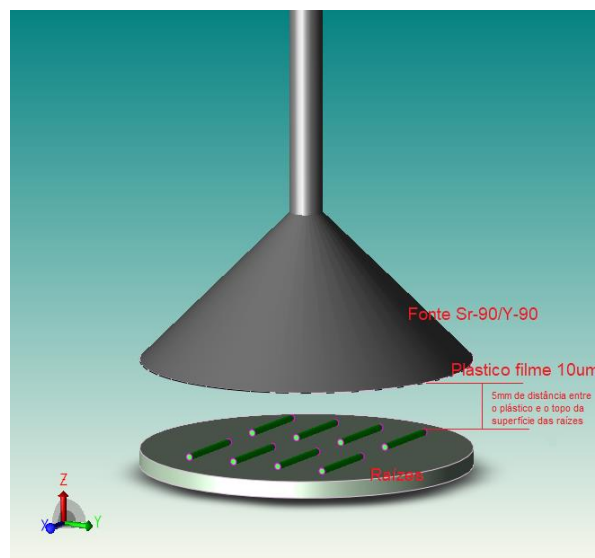


Figura 6.1 – Geometria de irradiação utilizada na simulação com o código *PHITS*.

6.2.2 Dosimetria termoluminescente (TL)

Testes preliminares de reprodutibilidade e homogeneidade do lote contendo 30 TLDs-100 foram realizados a fim de selecionar apenas os dosímetros que garantissem uma estimativa de taxa de dose confiável. Os procedimentos de tratamento térmico (antes da irradiação e após a leitura), irradiação e perfil da leitura dos TLDs-100 foram descritos na seção 5.2.2.1 de materiais e métodos.

Os dados de resposta do sinal TL dos 30 dosímetros irradiados por três vezes consecutivas, sob as mesmas condições (tratamento térmico antes a irradiação e após a leitura do sinal TL, mesma configuração experimental e mesma dose), acompanhados dos seus respectivos CVs (%) e valores E (%) são mostrados na Tabela 6.1. Destacados em vermelho estão os dosímetros descartados devido a não satisfazerem as condições de reprodutibilidade e/ou homogeneidade descritas na seção 5.2.2.1 de materiais e métodos, e destacados em laranja estão aqueles que foram descartados por chegarem muito próximo dos valores limites estabelecidos.

Tabela 6.1 – Resultados TL para três medições realizadas na mesma configuração de irradiação apresentada na seção 5.2.2.1.

ID	Sinal TL (nC)			Média	Desvio	CV (%)	E (%)
	Medições						
dosímetro	1	2	3		padrão		
1	67,8	63,8	65,0	65,5	2,0	3,1	6,3
2	75,7	69,2	64,3	69,7	5,7	8,2	17,8
3	72,2	68,7	64,4	68,4	3,9	5,7	12,1
4	97,7	71,6	68,1	79,1	16,2	20,4	43,5
5	77,5	68,1	68,8	71,5	5,2	7,3	13,8
6	84,2	67,1	61,2	70,8	11,9	16,9	37,6
7	83,0	69,9	66,8	73,2	8,6	11,7	24,2
8	74,2	66,3	56,8	65,8	8,7	13,2	30,6
9	88,4	68,3	71,1	75,9	10,9	14,3	29,4
10	71,7	64,3	64,6	66,9	4,2	6,3	11,5
11	84,1	88,5	72,8	81,8	8,1	9,9	15,5
12	81,9	75,3	71,5	76,2	5,3	6,9	14,5
13	92,4	64,4	63,1	73,3	16,5	22,6	46,4
14	60,2	67,1	63,6	63,6	3,4	5,4	11,5
15	95,4	81,4	67,6	81,5	13,9	17,1	41,1
16	70,0	66,9	63,8	66,9	3,1	4,6	9,7
17	74,5	72,4	67,0	71,3	3,9	5,4	11,2
18	86,5	73,7	72,1	77,4	8,0	10,2	20,0
19	80,1	69,7	62,1	70,6	9,0	12,8	29,0
20	91,2	80,8	71,2	81,1	10,0	12,3	28,1
21	71,8	64,3	66,0	67,4	3,9	5,8	8,8
22	73,4	71,2	67,3	70,6	3,1	4,4	9,1
23	70,2	68,4	69,6	69,4	0,9	1,3	2,6
24	83,6	73,5	65,4	74,2	9,1	12,3	27,8
25	77,2	68,9	67,7	71,3	5,2	7,2	14,0
26	75,7	66,2	61,0	67,6	7,4	11,0	24,1
27	79,0	70,0	69,8	72,9	5,2	7,2	13,2
28	73,2	69,2	74,8	72,4	2,9	4,0	8,1
29	88,8	68,8	72,1	76,6	10,7	14,0	29,1
30	71,7	67,3	64,5	67,8	3,6	5,3	11,2

Finalizada a etapa de testes de reprodutibilidade e homogeneidade dos TLDs-100, foram selecionados 20 dosímetros que satisfaziam as condições para estimar a taxa de dose absorvida de partículas β com confiabilidade.

Os resultados das leituras do sinal médio TL dos pares de dosímetros irradiados com a fonte 4 (Tabela 5.2) durante 30 s, 1 min e 3 min, conforme descrito na seção 5.2.2.2, e do par de dosímetros não irradiados, são mostrados na Tabela 6.2.

Tabela 6.2 – Resultados TL para os pares de TLDs-100 irradiados durante diferentes tempos e para o par de dosímetros não irradiados.

Tempo de irradiação (min)	Sinal TL (nC)		Média	Desvio padrão	CV (%)
	Dosímetro				
	1	2			
0 (Não irradiado)	64,8	67,0	65,9	1,5	2,3
0,5	526,6	507,1	451,0*	13,7	3,0
1	1029,1	1201,2	1049,2*	121,7	11,6
3	3358,9	3794,2	3510,6*	307,8	8,8

*Média do sinal TL subtraída do sinal TL médio do par de TLDs-100 não irradiados.

Com a finalidade de determinar a taxa de dose absorvida de partículas β para a fonte 4 (Tabela 5.2), foi feita uma regra de três com os valores médios dos sinais TL das irradiações de 1 min, tomando como referência o valor de taxa de dose da fonte 3 ($12,2 \pm 3,4$ mGy.s⁻¹) e seu respectivo valor médio de sinal TL, que foi comparado ao valor médio de sinal TL da fonte 4, investigada nesta tese para determinação de sua taxa de dose.

	Fonte 3	Fonte 4
Taxa de dose	($0,73 \pm 0,20$) Gy/1 minuto	X Gy/1 minuto
Resposta (Sinal TL médio)	9327,8	1049,2
X (Gy/1 minuto)	0,082	
σ_x (Gy/1 minuto)	0,008	

Assim, após a estimativa experimental da taxa de dose absorvida de partículas β da fonte 4, foram feitas irradiações com pares de TLDs-100 durante os mesmos tempos em que foram irradiados os experimentos com a *Allium cepa*, que serão discutidos mais adiante. Os

tempos das irradiações foram 2 min e 51 s, 5 min e 42 s, 11 min e 25 s e 22 min e 49 s. A curva de dose-resposta TL é mostrada na Figura 6.2.

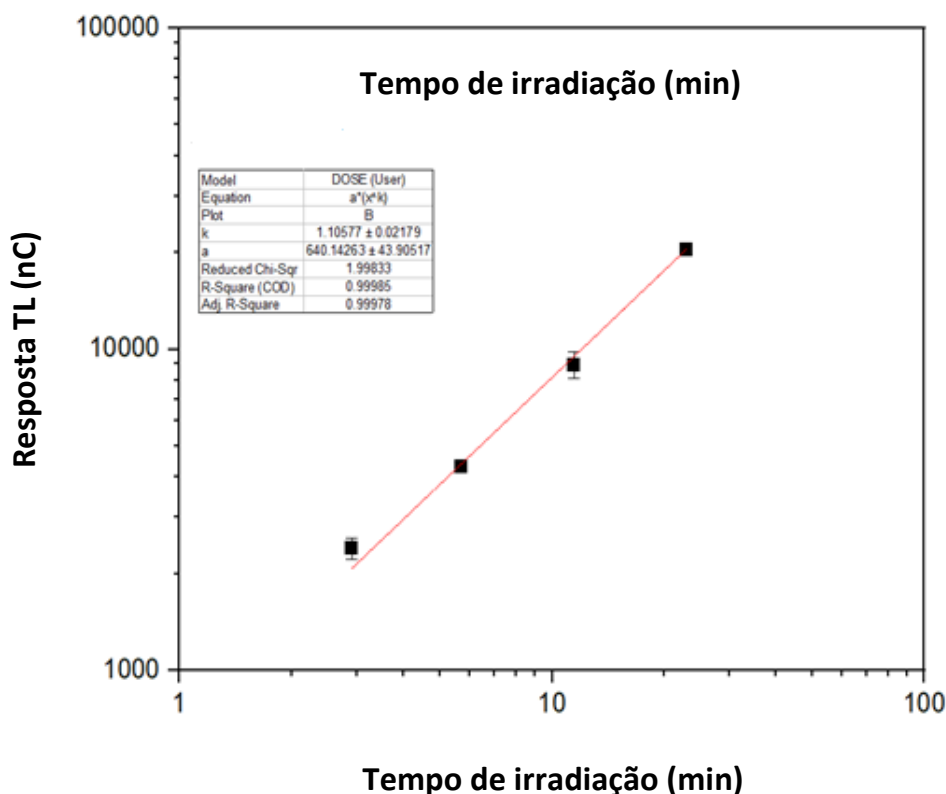


Figura 6.2 – Curva de dose-resposta para TLDs-100 irradiados durante diferentes tempos.

Embora o perfil linear da curva de dose-resposta dos TLDs-100 seja um indicativo do seu funcionamento adequado para a determinação da taxa de dose absorvida de partículas beta, quando o seu valor médio determinado experimentalmente via dosimetria TL ($82 \pm 8 \text{ mGy} \cdot \text{min}^{-1}$) foi comparado com o valor obtido por simulação computacional ($63,1 \pm 1,6\% \text{ mGy} \cdot \text{min}^{-1}$), notou-se uma diferença de aproximadamente 23%. Isso, por sua vez, pode ser explicado principalmente devido a espessura média das raízes de *Allium cepa* ser 2,5 vezes menor que a espessura do TLD-100. Assim, já era esperado que a deposição de dose nas raízes de *Allium cepa* seria menor, pois como o volume das raízes era menor e irregular, isso poderia afetar a sua interação com a radiação e, conseqüentemente, uma parte da radiação beta poderia apenas atravessá-las. De fato, isso pode ter acontecido e sustenta a hipótese do porquê a taxa de dose absorvida de partículas β foi menor quando a biota *Allium cepa* foi usada como material dosimétrico nos cálculos computacionais. No entanto, além disso existem diferenças entre a dose física e biológica que serão discutidas na seção 6.4.4.

6.3 Influência da *LET* da radiação na indução de danos citogenéticos

O efeito da *LET* (do inglês, *Linear Energy Transfer*) foi avaliado nesta tese utilizando células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* irradiadas com partículas α e partículas β . Como as células aqui analisadas foram extraídas de um tecido biológico vegetal e não havia um fator de ponderação (W_T) para esse tecido até o momento da escrita desta tese, as comparações que foram realizadas foram apenas semiquantitativas, pois somente foi possível considerar os valores de dose absorvida. Além disso, o tamanho amostral N dos dois tipos de radiações testados também foi diferente, sendo outro fator limitante para essa análise.

Para ambos os tipos de radiações foi investigada a influência que a *LET* teve na alteração dos principais parâmetros citogenéticos, ou seja, nas taxas de proliferação celular (IM) e nas frequências de células aberrantes (ACs e MNs) radioinduzidas.

6.3.1 Irradiação de raízes de *Allium cepa* com partículas α

Para a irradiação com partículas α , os dados de IM e ACs em função da dose absorvida são mostrados em detalhes nas tabelas 6.3 e 6.4, respectivamente. Por sua vez, a Figura 6.3 mostra um histograma que compara essas taxas de IM e ACs com as frequências de células com MNs, conforme o aumento de dose absorvida.

Tabela 6.3 – Índice mitótico (IM) de células meristemáticas radiculares de *Allium cepa* expostas à diferentes doses de radiação alfa de uma fonte de ^{241}Am (média \pm erro padrão da média).

Dose (mGy)	Nº de células em mitose	IM (%)	Índice de fase (%)			
			P	M	A	T
Controle não irradiado (0)	79 \pm 7	7,9 \pm 0,7	1,2 \pm 0,1	2,3 \pm 0,1	2,4 \pm 0,1	2,0 \pm 0,2
20	29 \pm 3	2,9 \pm 0,3	0,4 \pm 0,2	0,8 \pm 0,1	0,8 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1
40	49 \pm 8	4,9 \pm 0,8	2,3 \pm 0,2	0,8 \pm 0,1	1,2 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1
60	42 \pm 5	4,2 \pm 0,5	0,6 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	1,2 \pm 0,2	1,4 \pm 0,1
80	149 \pm 11	14,9 \pm 1,1 ^{a, b, c, d}	4,9 \pm 0,9	3,1 \pm 0,2	3,6 \pm 0,2	3,3 \pm 0,2
100	44 \pm 3	4,4 \pm 0,3 ^e	0,30 \pm 0,03	0,9 \pm 0,1	1,3 \pm 0,2	1,5 \pm 0,1
200	15 \pm 4	1,5 \pm 0,4 ^{a, e}	0	0,5 \pm 0,1	0,30 \pm 0,03	0,7 \pm 0,1

P: prófase, M: metáfase; A: anáfase, T: telófase.

ANOVA com o teste Tukey: ^a Estatisticamente significativo ($p < 0,01$), quando comparado com o ensaio de controle não irradiado;

^b Estatisticamente significativo ($p < 0,01$), quando comparado com o ensaio com amostras irradiadas com 20 mGy; ^c Estatisticamente significativo ($p < 0,01$), quando comparado com o ensaio com amostras irradiadas com 40 mGy; ^d Estatisticamente significativo ($p < 0,01$), quando comparado com o ensaio com amostras irradiadas com 60 mGy; ^e Estatisticamente significativo ($p < 0,01$), quando comparado com o ensaio com amostras irradiadas com 80 mGy.

Tabela 6.4 – Aberrações cromossômicas e anormalidades nucleares induzidos por partículas alfa em células meristemáticas radiculares de *Allium cepa* (média \pm erro padrão da média).

Dose (mGy)	Aberrações cromossômicas (ACs) e Anormalidades nucleares (ANs) por 100 células						
	Pontes	Fragmentos	Atrasos	Stickiness	Cinética anormal	Brotos Nucleares	Nº total de células aberrantes (%)
Controle não irradiado (0)	1,5 \pm 0,2	1,4 \pm 0,2	1,2 \pm 0,5	1,1 \pm 0,6	1,5 \pm 0,7	1,6 \pm 0,5	8,3 \pm 0,6
20	4,8 \pm 0,3	5,0 \pm 0,2	4,4 \pm 0,9	4,1 \pm 0,7	4,9 \pm 0,8	3,8 \pm 1,1	27,0 \pm 1,5 ^a
40	6,4 \pm 1,0	5,4 \pm 0,6	6,2 \pm 0,7	5,8 \pm 0,7	5,5 \pm 1,6	6,3 \pm 1,2	35,5 \pm 1,1 ^a
60	8,0 \pm 1,2	7,9 \pm 1,0	8,2 \pm 1,2	6,3 \pm 0,9	8,4 \pm 1,2	7,6 \pm 1,1	46,4 \pm 2,1 ^{a, b}
80	12,5 \pm 0,7	12,3 \pm 0,6	10,4 \pm 1,0	15,7 \pm 1,5	12,6 \pm 1,8	16,1 \pm 1,2	80,0 \pm 4,2 ^{a, b, c, d}
100	8,9 \pm 0,9	9,1 \pm 0,9	8,4 \pm 1,2	9,1 \pm 0,4	9,3 \pm 1,3	10,5 \pm 1,2	55,3 \pm 2,8 ^{a, b, c, e}
200	0,4 \pm 0,2	0,3 \pm 0,2	0,3 \pm 0,2	0,4 \pm 0,2	0	0,1 \pm 0,1	1,6 \pm 0,3

ANOVA com o teste de Tukey: ^a Estatisticamente significativo ($p < 0,05$), quando comparado com o ensaio de controle não irradiado;

^b Estatisticamente significativo ($p < 0,05$), quando comparado com o ensaio com amostras irradiadas com 20 mGy; ^c Estatisticamente significativo ($p < 0,05$), quando comparado com o ensaio com amostras irradiadas com 40 mGy; ^d Estatisticamente significativo ($p < 0,05$), quando comparado com o ensaio com amostras irradiadas com 60 mGy; ^e Estatisticamente significativo ($p < 0,05$), quando comparado com o ensaio com amostras irradiadas com 80 mGy.

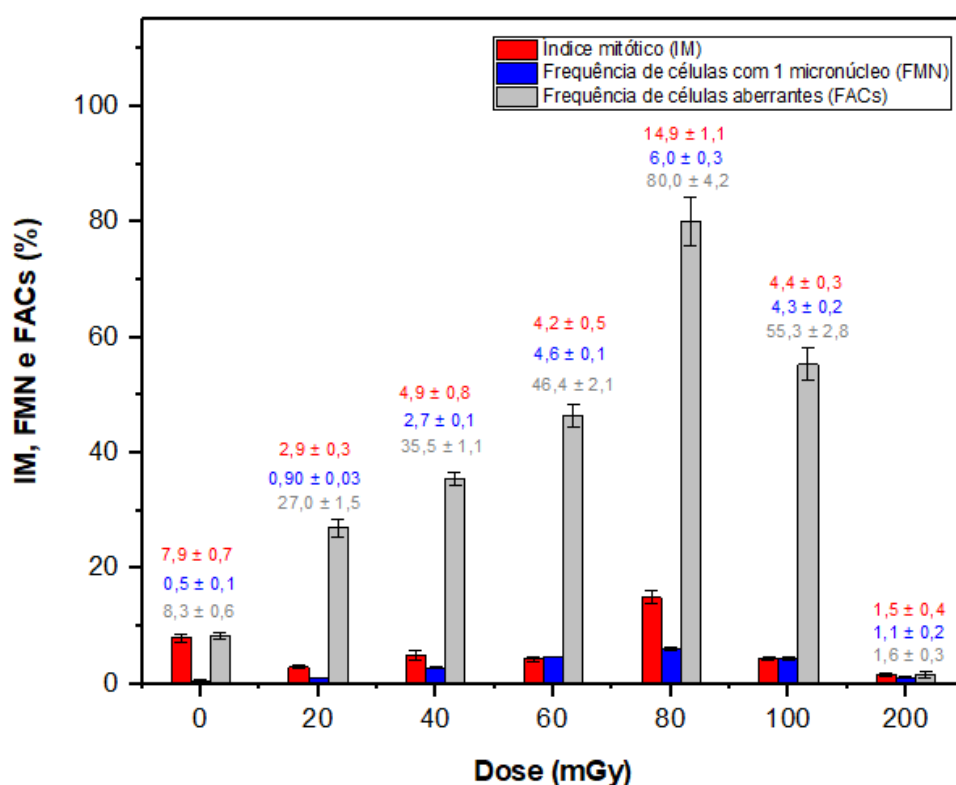


Figura 6.3 – Comparação entre IM, FMN e FACS em função da dose absorvida de partículas alfa em células meristemáticas radiculares de *Allium cepa* (média \pm erro padrão da média).

Quando comparado com os dados de IM da amostra de controle não irradiada, os dados de IM (Tabela 6.3) mostram uma redução da taxa de proliferação celular já no primeiro valor de dose absorvida investigado, ou seja, de 20 mGy. Logo em seguida, o IM aumentou e se manteve aproximadamente constante para o intervalo de doses entre 40 e 60 mGy, porém ainda apresentando valores de IMs menores cerca de 38% e 47%, respectivamente, em relação ao valor de IM da amostra de controle não irradiada. No entanto, um aumento abrupto de quase o dobro do IM da amostra de controle não irradiada foi detectado para a dose de 80 mGy, seguido de uma redução de seu valor nas amostras irradiadas com 100 mGy, que ocasionou uma regressão para o mesmo patamar que foi observado para as doses de 40 e 60 mGy e, finalmente, tendo diminuído quase que totalmente para a dose de 200 mGy.

A análise estatística dos dados de IM, mostrou que quando comparada com a amostra de controle não irradiada, uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) foi observada apenas para as amostras irradiadas com as doses de 80 e 200 mGy, que induziram os valores máximo e mínimo de IM detectados, respectivamente. Além disso, as amostras irradiadas com 80 mGy de partículas alfa tiveram uma diferença estatisticamente significativa

($p < 0,01$) do LM, quando comparadas com os LMs dos ensaios irradiados com doses de 20, 40, 60, 100 e 200 mGy.

Esses valores de LM tiveram uma forte influência tanto na frequência de aberrações cromossômicas (ACS) e anormalidades nucleares (ANs) quanto na frequência de células com micronúcleos (MNs). Após 20 h das irradiações, as principais ACs e ANs detectáveis foram quantificadas e os valores de suas frequências podem ser conferidos na Tabela 6.4.

Quando comparada com a frequência basal espontânea de células aberrantes da amostra de controle não irradiada, um aumento gradativo e estatisticamente significativo ($p < 0,05$) foi observado para o intervalo de dosagem de 20 a 80 mGy. Logo em seguida, houve uma mudança desse padrão, com o início da redução da frequência de células aberrantes em 100 mGy sendo detectado. Como a dose de 200 mGy induziu uma forte inibição da atividade mitótica, houve uma diminuição da capacidade de detecção de ACs e ANs e, por essa razão, essa dose foi excluída das análises estatísticas.

A frequência de células com micronúcleos induzidos por partículas alfa mostrou uma clara dependência com a dose absorvida. Foi possível detectar um aumento do número médio de células com MNs proporcional ao aumento da dose absorvida para o intervalo de dosagem de 20 a 80 mGy (Figura 6.3). Para este intervalo de dosagem, os resultados foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em comparação com o grupo de controle não irradiado, exceto para a dose de 20 mGy. Em contrapartida, para as doses de 100 e 200 mGy, foi observada uma redução de cerca de 28% e 82%, respectivamente, no número médio de células com MNs em comparação com o ensaio com amostras irradiadas com 80 mGy.

A cebola (*Allium cepa*) é um modelo vegetal *in vivo* amplamente utilizado como indicador biológico de atividade citotóxica e/ou genotóxica para diversos agentes físicos e químicos, uma vez que permite detectar danos ao DNA e estimar potenciais riscos para eucariotos em geral, incluindo humanos (LEME, MARIN-MORALES, 2009; BONCIU *et al.*, 2018). Em estudos sobre efeitos biológicos das radiações o seu uso está limitado aos cenários de altas doses e predominantemente envolvendo radiações de baixa LET, especialmente, de radiação gama (VAIJAPURKAR *et al.*, 2001; SAGHIRZADEH *et al.*, 2008; BOLSUNOVSKY *et al.*, 2019).

Neste trabalho, células meristemáticas radiculares de *Allium cepa* foram avaliadas após 20 h de exposições à 20, 40, 60, 80, 100 ou 200 mGy de radiação alfa. Isso foi feito para verificar se esses níveis de doses absorvidas eram capazes de produzir alterações citogenéticas detectáveis, objetivando simular um cenário hipotético envolvendo exposições repentinas a esse intervalo de dosagem. Graças aos seus grandes cromossomos, efeitos citogenéticos induzidos em células de *Allium cepa* podem ser facilmente observáveis via microscopia óptica (GUERRA, SOUZA, 2002). Anormalidades mitóticas e nucleares, aberrações cromossômicas e a presença

de células com MNs no ciclo celular das raízes de *Allium cepa* foram observadas como *endpoints* indicadores de genotoxicidade. O índice mitótico (IM) foi avaliado como um indicador de citotoxicidade.

Como pode ser visto na Tabela 6.3 e Figura 6.3, as amostras irradiadas dentro do intervalo de dosagem de 20 e 60 mGy sofreram uma aparente redução do IM, quando comparado com o IM da amostra de controle não irradiada, mas sem apresentar significância estatística. Em contraste, a dose absorvida de 80 mGy estimulou fortemente a atividade mitótica das células de *Allium cepa*, que quando comparadas ao grupo controle não irradiado e aos ensaios expostos às doses de 20, 40 e 60 mGy apresentaram diferença estatística altamente significativa ($p < 0,01$). Quando o IM é significativamente maior do que o nível de controle, pode ser prejudicial às células, levando a uma proliferação celular desordenada e até mesmo a transformações malignas (LEME, MARIN-MORALES, 2009). No entanto, não há consenso sobre o aumento do IM ser considerado um efeito benéfico ou prejudicial.

Neste estudo, as maiores frequências de dano citogenético foram encontradas para o ensaio que apresentou a maior atividade mitótica, ou seja, o ensaio com amostras irradiadas com 80 mGy. Os dados sugerem que de 20 a 60 mGy, as células de *Allium cepa* possivelmente lidam com os danos citogenéticos restringindo a sua atividade mitótica por meio dos *checkpoints* celulares, que podem ter inibido/atrasado temporariamente a divisão celular. O dano ao DNA é a principal indicação para que uma célula se restrinja e não entre na fase mitótica. No entanto, a partir de 80 mGy os danos são tão severos, que uma das principais vias seria a apoptose. Essa hipótese é reforçada principalmente devido a detecção de uma redução do IM acompanhada das reduções das frequências de ACs e MNs para as doses seguintes investigadas, especialmente para a dose de 200 mGy (Figura 6.3), que mostrou células com perda de integridade, indicando um possível efeito de fragmentação da cromatina (Figura 6.4) (BUSHONG, 2010; IAEA, 2011).

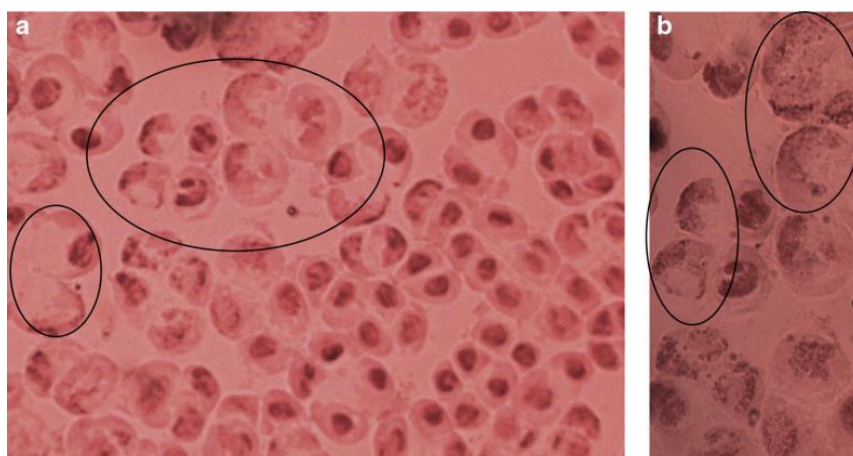


Figura 6.4 – Células de raízes de *Allium cepa* irradiadas com 200 mGy de radiação alfa: **a** ampliação de 400×; **b** ampliação de 1000× (XAVIER *et al.*, 2021).

Em concordância, em um estudo anterior com células de linfoblastos humanos foi relatado que doses de partículas α superiores a 100 mGy poderiam causar parada do ciclo celular, retardo da divisão nuclear e redução da formação de MNs (REN *et al.*, 2013), como de fato foi observado no presente estudo com células de *Allium cepa*.

A detecção de ACs ocorreu principalmente na anáfase. Entretanto, entre 20 e 100 mGy, ACs foram observados em todas as fases do ciclo mitótico da *Allium cepa* (Figura 6.5). Anormalidades mitóticas são tipicamente associadas com distúrbios no fuso (GADDE, HEALD, 2004; TKALEC *et al.*, 2009). Os dados de cinética anormal apresentados na Tabela 6.4 indicam que mesmo a menor dose avaliada de 20 mGy foi capaz de prejudicar a formação dos microtúbulos fusiformes, estrutura responsável por promover adequadamente a divisão celular.

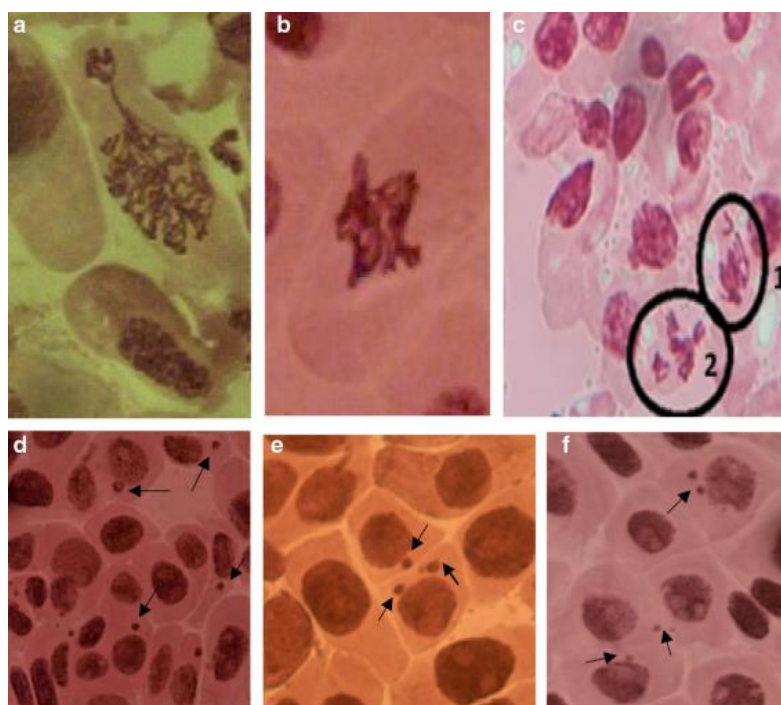


Figura 6.5 – Distúrbio na distribuição dos cromossomos na mitose e presença de micronúcleos em células radiculares de *Allium cepa* irradiadas com partículas α de uma fonte de ^{241}Am (ampliação de 1000 \times). ^a prófase perturbada; ^b cromossomo sticky; ^{c1} cromossomo tardio em metáfase, ^{c2} metáfase multipolar; (^{d-f}) Micronúcleos (XAVIER *et al.*, 2021).

O aparecimento de pontes, fragmentos e cromossomos atrasados (Figura 6.6) foi proporcional ao aumento da dose, exceto para 100 mGy (Tabela 6.4). Essas aberrações devem se transformar em micronúcleos mais tarde no ciclo celular – se a célula aberrante sobreviver ao dano (FENECH *et al.*, 2011). Esses dados são suportados pelas análises de frequência MN,

que foram proporcionais de 20 a 80 mGy, mas que começaram a diminuir a partir de 100 mGy (Figura 6.3).

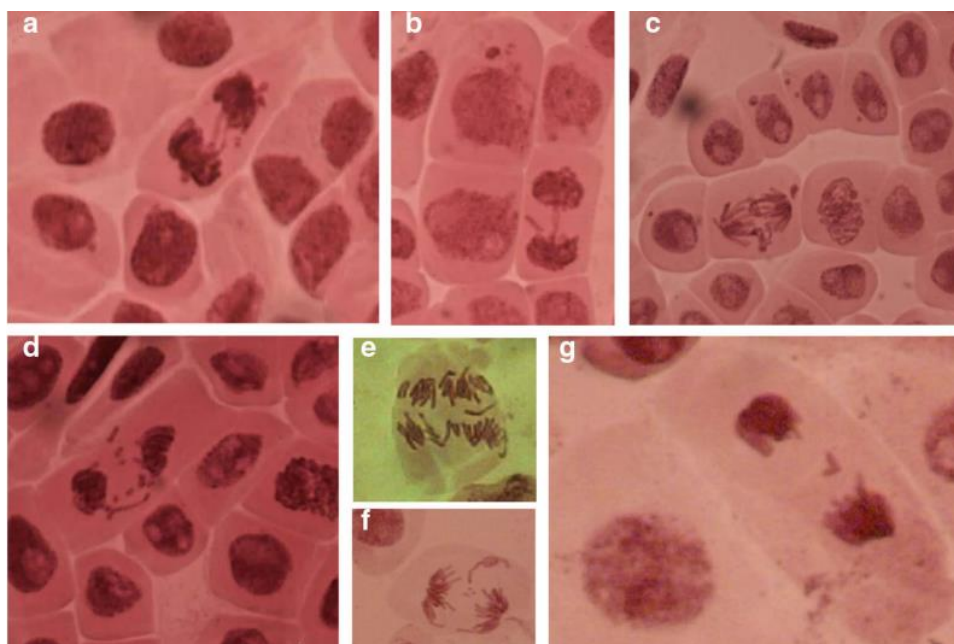


Figura 6.6 – Aberrações cromossômicas em células de raízes de *Allium cepa* irradiadas com partículas α de uma fonte de ^{241}Am (ampliação de 1000 \times). a - c Pontes na anáfase e micronúcleos; d fragmentos; e anáfase multipolar com cromossomo atrasado; f cromossomo atrasado e fragmentos; g cromossomo atrasado (XAVIER *et al.*, 2021).

Mutações originadas de exposições a baixas doses afetam o pareamento de base, a codificação, a transcrição e, por conseguinte, a expressão genômica (IAEA, 2011; REN *et al.*, 2013). A formação de MNs é uma das técnicas citogenéticas que pode detectar danos não reparados no DNA de cromátides por uma série de agentes potencialmente danosos ao DNA, incluindo a radiação ionizante

Sabe-se que o dano ao DNA induzido por partículas α é difícil de ser reparado, pois leva a danos celulares graves e, conseqüentemente, enfraquece a capacidade de defesa da célula (IAEA, 2011). Os dados combinados de IM, ACs e MNs sugerem que os processos de checkpoint de restrição celular são intensificados a partir de 100 mGy. Como mencionado anteriormente, essa hipótese ganha força quando se observam os dados do ensaio que foi exposto à dose de 200 mGy. A redução abrupta do IM, ACs e MNs das amostras deste ensaio indica evidências claras de atividade citotóxica. Isso, por sua vez, é reforçado pela observação da perda de integridade celular das amostras neste ensaio (Figura 6.4).

Para fins dosimétricos, a análise combinada das frequências de IM, ACs e MNs mostrou ser essencial para plotar curvas de dose-resposta citogenéticas, pois a inibição da atividade mitótica mostrou afetar drasticamente a capacidade de detecção de ACs e MNs, como foi observado a partir de 100 mGy com o início da atividade citotóxica. Dessa forma, considerando os parâmetros biológicos mencionados e a sua relação com a dose, uma curva de dose-resposta citogenética para micronúcleos entre 0 e 80 mGy mostrou ser a mais adequada para a avaliação de dose absorvida de partículas alfa usando células meristemáticas radiculares de *Allium cepa* (Figura 6.7).

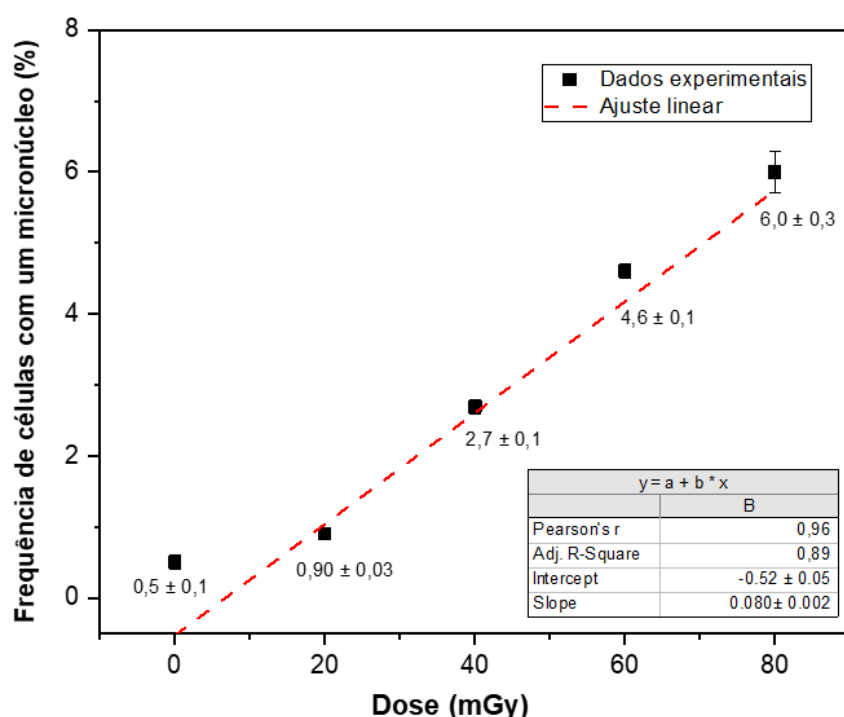


Figura 6.7 – Curva de dose-resposta citogenética para micronúcleos induzidos em células de *Allium cepa* por partículas alfa de uma fonte de ^{241}Am .

O perfil linear da curva de dose-resposta para micronúcleos induzidos por 20 – 80 mGy de partículas alfa é condizente com a alta *LET* da radiação (IAEA, 2011). É possível notar, que o aumento de dose absorvida influenciou no aumento proporcional da frequência de MNs para essa faixa de dose. Isso, por sua vez, indica que de 20 a 80 mGy, as células meristemáticas radiculares de *Allium cepa* podem ser utilizadas como um potencial dosímetro citogenético baseado na quantificação e determinação das frequências desse *endpoint*. Contudo, estudos mais detalhados incluindo outras técnicas capazes de mensurar a integridade do DNA, como por exemplo, o ensaio de eletroforese em gel de célula única, podem ser úteis para estabelecer essa curva de dose-resposta, sobretudo, para determinar o perfil e a influência das taxas de dano/reparo na detecção de MNs.

6.3.2 Irradiação de raízes de *Allium cepa* com partículas β

Para a irradiação com partículas β , os dados de IM, ACs e MNs em função da dose absorvida são mostrados em detalhes nas Tabelas 6.5, 6.6 e 6.7, respectivamente.

Tabela 6.5 – Índice mitótico (IM) de células meristemáticas radiculares de *Allium cepa* expostas à diferentes doses de radiação beta de uma fonte de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ (média \pm erro padrão da média).

Dose (Gy)	Índice mitótico (%)	Índice de fase (%)			
		P	M	A	T
0	12,7 \pm 1,0	3,4 \pm 0,4	2,2 \pm 0,1	3,1 \pm 0,3	4,0 \pm 0,3
0,04	14,5 \pm 0,8	4,7 \pm 0,3	2,6 \pm 0,2	3,7 \pm 0,4	3,5 \pm 0,3
0,09	14,9 \pm 1,3	5,0 \pm 0,6	2,3 \pm 0,3	3,0 \pm 0,2	4,6 \pm 0,5
0,13	14,2 \pm 1,0	5,0 \pm 0,4	2,2 \pm 0,3	3,0 \pm 0,3	3,9 \pm 0,3
0,18	13,7 \pm 0,9	4,4 \pm 0,3	2,2 \pm 0,2	2,8 \pm 0,2	4,3 \pm 0,4
0,36	12,3 \pm 1,0	4,5 \pm 0,4	1,5 \pm 0,2	2,5 \pm 0,3	3,8 \pm 0,3
0,72	10,3 \pm 0,5	4,2 \pm 0,3	1,5 \pm 0,1	1,8 \pm 0,1	2,8 \pm 0,1
1,44	10,6 \pm 0,8	5,4 \pm 0,6	1,6 \pm 0,1	1,1 \pm 0,2	2,6 \pm 0,3

P: prófase, M: metáfase; A: anáfase, T: telófase.

Tabela 6.6 – Aberrações cromossômicas em anáfase-telófase induzidas por partículas beta em células meristemáticas radiculares de *Allium cepa* (média \pm erro padrão da média).

Dose (Gy)	Aberrações cromossômicas em anáfase-telófase por 100 células (%)			
	Pontes	Cromossomo atrasado	Fragmentos	Frequência total de células aberrantes
0	0,5 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	—	0,6 \pm 0,2 ^{d, e, f, g, h}
0,04	1,9 \pm 0,4	0,4 \pm 0,2	0,1 \pm 0,1	2,4 \pm 0,4 ^{e, f, g, h}
0,09	2,9 \pm 0,5	1,2 \pm 0,3	0,3 \pm 0,1	4,4 \pm 0,5 ^{f, g, h}
0,13	3,3 \pm 0,3	2,8 \pm 0,5	3,2 \pm 0,5	9,4 \pm 0,9 ^{a, g, h}
0,18	5,4 \pm 1,4	1,7 \pm 0,4	3,9 \pm 1,0	11,0 \pm 1,4 ^{a, b, g, h}
0,36	5,2 \pm 0,8	3,4 \pm 0,6	5,3 \pm 1,0	14,0 \pm 0,9 ^{a, b, c, g, h}
0,72	6,1 \pm 1,4	4,9 \pm 0,8	11,2 \pm 1,6	22,2 \pm 1,2 ^{a, b, c, d, e, f, h}
1,44	16,0 \pm 2,6	16,0 \pm 2,1	35,1 \pm 1,8	67,1 \pm 3,1 ^{a, b, c, d, e, f, g}

ANOVA com teste Tukey: : ^a Estatisticamente significativo ($p < 0,05$), quando comparado com o ensaio de controle não irradiado; ^b Estatisticamente significativo ($p < 0,05$), quando comparado com o ensaio com amostras irradiadas com 0,04 Gy; ^c Estatisticamente significativo ($p < 0,05$), quando comparado com o ensaio com amostras irradiadas com 0,09 Gy; ^d Estatisticamente significativo ($p < 0,05$), quando comparado com o ensaio com amostras irradiadas com 0,13 Gy; ^e Estatisticamente significativo ($p < 0,05$), quando comparado com o ensaio com amostras irradiadas com 0,18 Gy; ^f Estatisticamente significativo ($p < 0,05$), quando comparado com o ensaio com amostras irradiadas com 0,36 Gy; ^g Estatisticamente significativo ($p < 0,05$), quando comparado com o ensaio com amostras irradiadas com 0,72 Gy; ^h Estatisticamente significativo ($p < 0,05$), quando comparado com o ensaio com amostras irradiadas com 1,44 Gy.

Tabela 6.7 – Distribuição de micronúcleos em células meristemáticas radiculares de *Allium cepa* irradiadas com partículas beta (média \pm erro padrão da média).

Dose (Gy)	Frequência de células com micronúcleos (%)		
	1 MN	2 ou 3 MN	Frequência total de MN
0	0,4 \pm 0,1 ^{d, e, f, g, h}	0,01 \pm 0,01 ^{g, h}	0,4 \pm 0,1 ^{d, e, f, g, h}
0,04	0,6 \pm 0,1 ^{d, e, f, g, h}	0,02 \pm 0,01 ^{g, h}	0,7 \pm 0,1 ^{d, e, f, g, h}
0,09	1,5 \pm 0,1 ^{d, e, f, g, h}	0,01 \pm 0,01 ^{g, h}	1,5 \pm 0,1 ^{d, e, f, g, h}
0,13	3,2 \pm 0,2 ^{a, b, c, f, g, h}	0,2 \pm 0,1 ^{g, h}	3,4 \pm 0,1 ^{a, b, c, f, g, h}
0,18	4,3 \pm 0,2 ^{a, b, c, f, g, h}	0,3 \pm 0,1 ^{g, h}	4,6 \pm 0,2 ^{a, b, c, f, g, h}
0,36	6,2 \pm 0,4 ^{a, b, c, d, e, g, h}	0,4 \pm 0,1 ^{g, h}	6,6 \pm 0,4 ^{a, b, c, d, e, g, h}
0,72	11,9 \pm 0,4 ^{a, b, c, d, e, f, h}	1,5 \pm 0,1 ^{a, b, c, d, e, f, h}	13,4 \pm 0,4 ^{a, b, c, d, e, f, h}
1,44	18,2 \pm 0,5 ^{a, b, c, d, e, f, g}	6,0 \pm 0,3 ^{a, b, c, d, e, f, g}	24,2 \pm 0,7 ^{a, b, c, d, e, f, g}

ANOVA com teste Tukey: ^a Estatisticamente significativo ($p < 0,05$), quando comparado com o ensaio de controle não irradiado; ^b Estatisticamente significativo ($p < 0,05$), quando comparado com o ensaio com amostras irradiadas com 0,04 Gy; ^c Estatisticamente significativo ($p < 0,05$), quando comparado com o ensaio com amostras irradiadas com 0,09 Gy; ^d Estatisticamente significativo ($p < 0,05$), quando comparado com o ensaio com amostras irradiadas com 0,13 Gy; ^e Estatisticamente significativo ($p < 0,05$), quando comparado com o ensaio com amostras irradiadas com 0,18 Gy; ^f Estatisticamente significativo ($p < 0,05$), quando comparado com o ensaio com amostras irradiadas com 0,36 Gy; ^g Estatisticamente significativo ($p < 0,05$), quando comparado com o ensaio com amostras irradiadas com 0,72 Gy; ^h Estatisticamente significativo ($p < 0,05$), quando comparado com o ensaio com amostras irradiadas com 1,44 Gy.

O uso de plantas superiores em bioensaios é uma ferramenta amplamente utilizada para uma primeira triagem de riscos devido a agentes potencialmente genotóxicos (LEME, MARIN-MORALES, 2009). Como já mencionado, buscou-se com o experimento aqui desenvolvido, simular um cenário hipotético de irradiação que liberasse em um curto espaço de tempo, o intervalo de dosagem aqui investigado (0,04 – 1,44 Gy), bem como determinar a sua influência na indução das principais frequências de *endpoints* indicadores de genotoxicidade em células radiculares de *Allium cepa*.

Desse modo, foram analisadas as frequências de células em anáfase-telófase, que mostram mais facilmente aberrações cromossômicas (ACs), e as frequências de micronúcleos (MNs), principalmente em células interfásicas, como *endpoints* de genotoxicidade. O índice mitótico (IM) foi calculado e utilizado como medidor de citotoxicidade. Para análises de citotoxicidade, o índice mitótico de cada amostra irradiada foi primeiro comparado com o índice mitótico das amostras de controle não irradiadas e, posteriormente, foram realizadas comparações aos pares dos índices mitóticos de todas as amostras irradiadas. Em todas as comparações, observou-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na atividade mitótica entre os grupos (Tabela 6.5). Portanto, a irradiação com partículas beta para o intervalo de dosagem de 0,04 a 1,44 Gy, não produziu efeito citotóxico no primeiro ciclo de divisão celular de raízes de *Allium cepa*.

Em contraste, a frequência de células micronucleadas mostrou uma clara dependência com a dose de radiação absorvida (Tabela 6.7). Majoritariamente, foram observadas células com um micronúcleo. Entretanto, a partir da dose de 0,72 Gy foi observado um aumento de células com dois e três micronúcleos (Tabela 6.7 e Figura 6.8). Comparado ao grupo de controle não irradiado, uma diferença significativa ($p < 0,05$) na frequência de células com um micronúcleo foi observada a partir da dose de 0,13 Gy. Em relação às células com micronúcleos múltiplos, um aumento significativo ($p < 0,05$) foi detectado apenas a partir de 0,72 Gy.

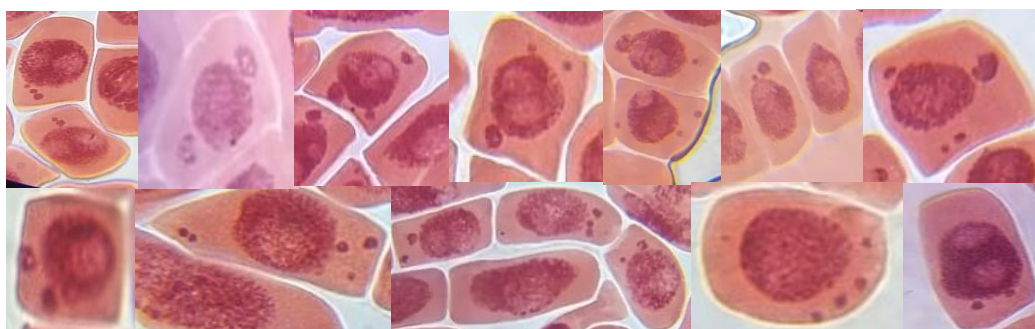


Figura 6.8 – Células radiculares de *Allium cepa* com mais de um micronúcleo induzido por radiação beta (aumento de 1000×).

A formação de micronúcleos é determinada principalmente pela frequência de aberrações cromossômicas geradas durante a anáfase. Células com micronúcleos (MNs) representam danos persistentes no DNA devido à perda de material genético induzida progressivamente desde o primeiro ciclo mitótico pós-irradiação. Nas células humanas, os micronúcleos podem se originar durante a anáfase devido a cromossomos acêntricos atrasados ou fragmentos de cromátides causados por reparo incorreto de quebras de DNA ou quebras de DNA não reparadas (FENECH *et al.*, 2011). No entanto, para células vegetais, os mecanismos de formação de micronúcleos permanecem insuficientemente explorados.

Um ciclo celular vegetal típico, incluindo a interfase, dura de 20 a 24 horas, com a mitose em si ocorrendo entre 3 e 4 horas (NORMAN, 1969; VAIJAPURKAR *et al.*, 2001). Os micronúcleos são observados principalmente na interfase e, conseqüentemente, após o término da atividade mitótica. Se as células com micronúcleos não forem inibidas e passarem para uma nova fase mitótica, espera-se um aumento na frequência de aberrações cromossômicas. Alguns tipos de aberrações cromossômicas, como pontes, fragmentos e cromossomos atrasados são os principais precursores da formação de novos micronúcleos – se a célula aberrante sobreviver ao dano (FENECH *et al.*, 2011).

Uma análise da frequência de células aberrantes (ACs) na anáfase-telófase foi realizada para apoiar os dados do micronúcleo. Foi observado um aumento na frequência de pontes, fragmentos e cromossomos atrasados dependente da dose absorvida e com diferença significativa ($p < 0,05$) na frequência total de células aberrantes a partir da dose de 0,13 Gy, quando comparado ao grupo de controle não irradiado (Tabela 6.6). Além disso, foi encontrada uma correlação positiva ($r = 0,94$) entre as frequências de células com micronúcleos e as frequências de células aberrantes em anáfase-telófase.

Como as amostras de raízes de *Allium cepa* foram mantidas crescendo por 24 horas após a irradiação, que é aproximadamente o tempo para a conclusão de um ciclo celular (MATAGNE, 1968), isso significou que, no momento da análise, as células estavam cruzando seus primeiros ciclos pós irradiação. Conseqüentemente, as células aberrantes observadas foram possivelmente o resultado de distúrbios cromossômicos que afetaram as células que estavam em mitose durante a irradiação, enquanto os micronúcleos foram o resultado de danos no DNA ocorridos durante a irradiação em células em interfase.

Os dados de IM (Tabela 6.5) mostram que até 20% das células observadas estavam em mitose e que não houve inibição da atividade mitótica em nenhuma das amostras irradiadas quando comparadas às amostras de controle não irradiadas. Isso sugere que as células mitóticas afetadas durante a irradiação passaram por um ciclo interfásico com micronúcleos e, logo em seguida, conseguiram se dividir novamente, produzindo novas células aberrantes (Figura 6.9).

Isso, por sua vez, pode indicar uma propensão à instabilidade cromossômica das células mitóticas danificadas pela irradiação com partículas beta com doses de até 1,44 Gy, com eventos que podem incluir a perda de genes funcionais, segregação desigual e envelhecimento prematuro dos cromossomos causados por quebras, atrasos e degradação dessas estruturas (FENECH *et al.*, 2011).

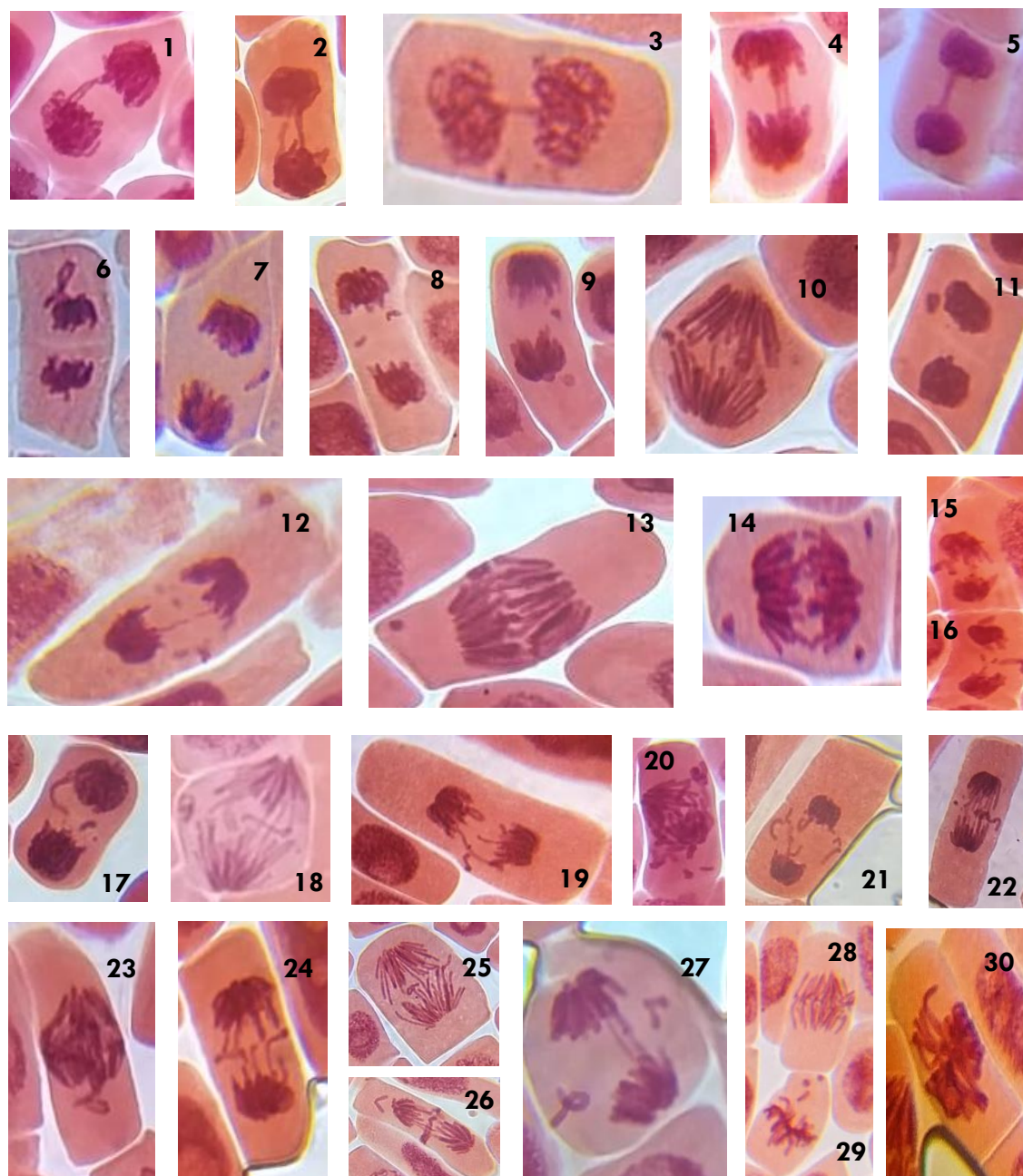


Figura 6.9 – Aberrações cromossômicas induzidas por partículas beta em células meristemáticas radiculares de *Allium cepa*: 1 – 5: pontes; 6 – 11: cromossomo atrasado; 12 – 16: fragmentos cromossômicos; 17 – 29: Aberrações cromossômicas múltiplas; 30: *Stickiness* (aumento de 1000×).

Os dados de MN (Tabela 6.7) sugerem um aumento de dano genotóxico dependente da dose absorvida de partículas β . Entretanto, a partir da dose de 0,72 Gy houve um agravamento do dano genotóxico detectado tanto como um aumento células com dois e três micronúcleos (Tabela 6.7), quanto da frequência de células aberrantes (Tabela 6.6).

Em trabalhos anteriores, curvas de dose-resposta para micronúcleos induzidos em células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* por radiação ionizante, foram plotadas em sua maioria sem considerar a sua distribuição nas células (VAIJAPURKAR *et al.*, 2001; BOLSUNOVSKY *et al.*, 2019). Determinar a distribuição do número de micronúcleos por célula pode permitir categorizar as células que sofreram maior ou menor perda de material genético. Consequentemente, também possibilita estimar a gravidade do nível de dano ao DNA que ocorreu nessas células.

Nesta parte da tese, o número de micronúcleos por célula foi utilizado como parâmetro para a construção de três curvas dose-resposta (Figura 6.10). Inicialmente, foi plotada uma curva de dose-resposta considerando a soma das células com um, dois e três micronúcleos. Esses dados foram melhor ajustados por uma função linear: $Y = (-0,4 \pm 0,1) + (17,5 \pm 0,5)D; R^2 = 0,97$, (Figura 6.10; Curva I). Posteriormente, foram consideradas apenas a população de células com um micronúcleo e a função que melhor se ajustou aos dados experimentais dessa curva de dose-resposta foi um polinômio de segunda ordem: $Y = (-0,6 \pm 0,1) + (23,6 \pm 1,1)D - (7,6 \pm 0,8)D^2; R^2 = 0,97$, (Figura 6.10; Curva II). Finalmente, quando consideradas células com dois e três micronúcleos, uma função polinomial de segunda ordem: $Y = (-0,01 \pm 0,02) + (0,12 \pm 0,28)D + (2,79 \pm 0,28)D^2; R^2 = 0,98$ foi novamente a que melhor se ajustou a estes dados (Figura 6.10; Curva III).

Tipicamente, os eventos que geram uma alta frequência de células aberrantes são predominantemente associados a DSBs (do inglês, *double-strand breaks*) não reparadas, embora outros tipos de danos biológicos também sejam induzidos por radiação ionizante (BUSHONG, 2010; IAEA, 2011). As raízes de *Allium cepa* são essencialmente aquosas. Portanto, espera-se que o dano ao DNA induzido pelas partículas β ocorra principalmente pela via indireta, ou seja, pelo ataque de radicais livres produzidos após a radiólise da água. A taxa de produção de radicais livres é influenciada pela dose de radiação. Quando a dose aumenta, uma maior densidade de radicais livres é produzida e, consequentemente, aumenta a probabilidade de múltiplos eventos danosos ao DNA e outras estruturas biológicas, incluindo também a interação direta com a radiação (IAEA, 2011). Isso, por sua vez, pode afetar a linearidade para induzir células com 1 MN. Na dose de 0,72 Gy parece ser onde se iniciou o dano ao DNA induzido em células de *Allium cepa* por eventos múltiplos, ou seja, onde se observa o agravamento do dano genotóxico bem como um aumento significativo ($p < 0,05$) de células com múltiplos micronúcleos

(Figura 6.10; Curva III) e como aumento significativo ($p < 0,05$) de células aberrantes (Tabela 6.6). Além disso, a perda de linearidade na curva de células com 1 MN (Figura 6.10; Curva II) começa em 0,72 Gy, reforçando essa hipótese.

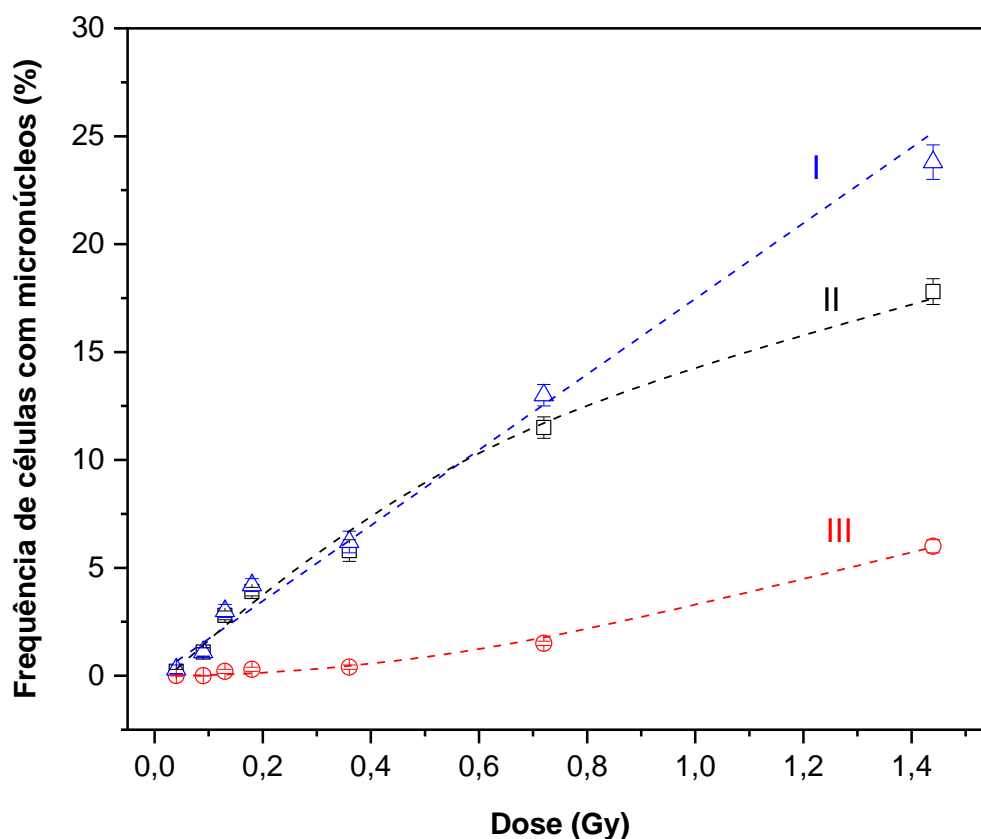


Figura 6.10 – Curvas de dose-resposta para micronúcleos induzidos por radiação β em células meristemáticas radiculares de *Allium cepa*. (I) Frequência considerando a soma das células com um, dois e três micronúcleos; (II) frequência de células com um micronúcleo; (III) frequência de células com dois e três micronúcleos.

6.3.3 Comparação semiquantitativa das frequências de micronúcleos induzidas em células radiculares de *Allium cepa* por partículas α e β

Como já mencionado, apenas uma comparação semiquantitativa foi realizada devido às limitações descritas na seção 5.3.4.4.

As tabelas 6.8 e 6.9 mostram as frequências de micronúcleos para valores próximos de doses absorvidas de partículas α e β , respectivamente.

Tabela 6.8 – Frequência de micronúcleos induzida em células meristemáticas radiculares de *Allium cepa* por partículas alfa de uma fonte de ^{241}Am (média \pm erro padrão da média).

Irradiação com partículas α							
Dose absorvida (Gy)	0	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1	0,2
Frequência de células com MN (%)	$0,5 \pm 0,1$	$0,90 \pm 0,03$	$2,7 \pm 0,1$	$4,6 \pm 0,1$	$6,0 \pm 0,3$	$4,3 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,2$

Tabela 6.9 – Frequência de micronúcleos induzida em células meristemáticas radiculares de *Allium cepa* por partículas beta de uma fonte de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ (média \pm erro padrão da média).

Irradiação com partículas β					
Dose absorvida (Gy)	0	0,04	0,09	0,13	0,18
Frequência de células com MN (%)	$0,4 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,1$	$3,2 \pm 0,2$	$4,3 \pm 0,2$

Ao se comparar as frequências de células com um micronúcleo de ambos os tipos de radiação é possível perceber uma indução de MNs proporcional ao aumento de dose, exceto para a irradiação com partículas alfa que teve um decréscimo nas frequências desse *endpoint* a partir da dose de 0,1 Gy.

A irradiação com partículas alfa induziu uma maior frequência de MNs nas células radiculares de *Allium cepa*, quando comparada com a irradiação com partículas beta. Isso, por sua vez, já era esperado devido a diferença na *LET* de ambos os tipos de radiação. Tomando como referência a dose absorvida de mesmo valor em ambos os tipos de irradiação, ou seja, 0,04 Gy, a irradiação com partículas alfa induziu uma frequência de MNs 4,5 vezes maior que a irradiação com partículas beta. Para as doses absorvidas de 0,08 Gy de partículas alfa e de 0,09 Gy de partículas beta, a diferença foi de 4 vezes superior para a irradiação com partículas alfa.

No entanto, quando a dose absorvida de partículas alfa foi aumentada para 0,1 Gy e, posteriormente, para 0,2 Gy, foi observado a diminuição das frequências de MNs, enquanto para a irradiação com partículas beta, o aumento da dose absorvida para 0,13 Gy e, logo em seguida, para 0,18 Gy, induziu um aumento proporcional de células com MNs.

Pesquisas anteriores observaram diferentes comportamentos nas frequências de *endpoints* induzidos por radiação de diferentes *LET* em células meristemáticas radiculares de *Allium cepa*. No experimento anterior desta tese com partículas alfa, foram avaliados o IM e as frequências de ACs e MNs induzidos por doses de 20 – 200 mGy. Foi observado um aumento proporcional de ACs e MNs conforme o aumento da dose absorvida até 60 mGy. Por outro lado, o IM não apresentou diferenças significativas. Para a dose de 80 mGy, foi observado um aumento abrupto nas frequências de IM, MNs e ACs, seguido de uma queda abrupta em todas as frequências. O conjunto de dados apresentados (Figura 6.3) sugere que os checkpoints celulares lidam com danos até uma dose de 60 mGy e, a partir desse limiar, o dano começa a se intensificar ao ponto de iniciar os processos de morte celular (XAVIER *et al.*, 2021). BOLSUNOVSKY *et al.* (2019), observaram em seus experimentos com radiação gama um perfil linear de curva dose-resposta para micronúcleos (0 a 4,5 Gy) seguido de um platô (4,5 a 13 Gy), porém, os autores não avaliaram o índice mitótico.

Aqui, no experimento com partículas beta, o tipo de radiação e o intervalo de dosagem (0 a 1,44 Gy) parecem não ter alterado a atividade mitótica do primeiro ciclo celular pós irradiação. Assim, embora sejam experimentos diferentes, as células meristemáticas radiculares de *Allium cepa* se mostraram mais radiorresistentes à irradiação beta (XAVIER *et al.*, 2023) quando comparadas ao experimento com irradiação alfa (XAVIER *et al.*, 2021), conforme esperado devido à diferença de *LET* de ambos. Isso, por sua vez, possibilitou observar que o aumento da dose absorvida produziu um aumento proporcional na frequência de células aberrantes (MNs e ACs). Consequentemente, a análise de IM combinada com a análise de ACs e MNs foi essencial para estimar os prováveis caminhos futuros de *endpoints* citogenéticos (morte celular ou instabilidade cromossômica) de ambas as irradiações. Além disso, se por um lado as células radiculares de *Allium cepa* parecem ser mais radiorresistentes à mesma dose de partículas beta do que às de partículas alfa, isso pode ter implicações maiores, especialmente se essas células com material genético danificado sobreviverem após o dano da radiação e continuarem seus processos de mitose. Então, para a mesma dose absorvida, os dados de IM, MNs e ACs sugerem que a irradiação beta pode produzir mais células aberrantes nos próximos ciclos celulares do que àquela irradiada com partículas alfa, que mostrou uma tendência maior à morte celular.

6.4 Micronúcleos induzidos em células radiculares de *Allium cepa* por partículas β como um *endpoint* citogenético para dosimetria

Além do dano citogenético em si, as taxas de reparo, recuperação e morte das células de *Allium cepa* danificadas por radiação são parâmetros que influenciam na observação e

quantificação de *endpoints* citogenéticos. Em estudos anteriores, foi demonstrado que a contribuição do dano ao DNA induzido por radiação em doses baixas em comparação com o dano espontâneo ao DNA é bastante pequena. Consequentemente, postulou-se que o aumento na indução de micronúcleos nas doses mais baixas resulta de eventos de reparo incorreto, resultando, por sua vez, em uma certa linearidade (SARAPUL'TZEV, GERAS'KIN, 1993; FEINENDEGEN, POLLYCOVE, 2001). De fato, um perfil linear de curva dose-resposta para micronúcleos simples (Figura 6.10, Curva II e Tabela 6.7) foi observado para células irradiadas com até 360 mGy. Entretanto, a significância estatística ($p < 0,05$) foi observada apenas a partir de 130 mGy.

A partir da dose de 720 mGy foram observadas células com micronúcleos múltiplos. GEORGE *et al.* (2014), sugerem em seu experimento com radiação gama que a eficácia dos sistemas de reparo diminui e fica sobrecarregada conforme a dose aumenta, resultando em múltiplas aberrações. Aqui, nos experimentos com partículas beta, esse limiar parece começar com uma dose de 720 mGy, intensificando-se com uma dose de 1,44 Gy, na qual além do aumento significativo ($p < 0,05$) de células com micronúcleos múltiplos, um aumento significativo ($p < 0,05$) de células aberrantes também foi observado. Foi feita uma comparação entre as frequências de células com micronúcleos múltiplos e células aberrantes nas doses de 0,72 e 1,44 Gy e, a partir dessa comparação foram detectados aumentos significativos ($p < 0,05$) de 4 e 3 vezes nas frequências desses *endpoints*, respectivamente (Tabela 6.7 e Tabela 6.6). Esse aumento do dano citogenético observado pode indicar uma maior tendência à morte das células danificadas, principalmente com 1,44 Gy.

6.4.1 Análise de reprodutibilidade e homogeneidade da frequência de células com micronúcleos

Uma análise de reprodutibilidade e homogeneidade da resposta de MNs em função da dose absorvida de 720 mGy de partículas β foi realizada seguindo o procedimento descrito na seção 5.4.1. As Tabelas 6.10 e 6.11 mostram os valores dos parâmetros $CV_{FMN\%}$ e $FMN_{\%}$, que avaliaram a reprodutibilidade e homogeneidade das frequências de micronúcleos simples e múltiplos, respectivamente, seguindo os critérios adotados na seção 5.4.1. Adicionalmente, a Tabela 6.12 mostra os valores desses mesmos parâmetros para as amostras de controle não irradiadas.

Tabela 6.10 – Resultados da FMN simples para três lotes de raízes de *Allium cepa* irradiadas com uma dose de 720 mGy sob a mesma configuração experimental.

Lote	FMN simples (%)					Média	Desvio padrão	$CV_{FMN\%}$	$FMN_{\%}$
	ID da raiz								
	1	2	3	4	5				
1	12,0	13,6	11,1	12,2	12,2	12,2	0,9	7,4	22,5
2	13,9	11,7	10,3	10,2	11,6	11,5	1,5	13,0	36,3
3	12,4	11,5	12,3	10,6	11,1	11,6	0,8	6,9	17,0

Tabela 6.11 – Resultados da FMN múltiplos para três lotes de raízes de *Allium cepa* irradiadas com uma dose de 720 mGy sob a mesma configuração experimental.

Lote	FMN múltiplos (%)					Média	Desvio padrão	$CV_{FMN\%}$	$FMN_{\%}$
	ID da raiz								
	1	2	3	4	5				
1	1,7	2,9	1,4	1,5	1,9	1,9	0,6	31,6	107,1
2	1,2	1,9	1,5	1,2	1,1	1,4	0,3	21,4	72,7
3	1,6	1,6	1,0	0,5	1,6	1,3	0,5	38,5	220,0

Tabela 6.12 – Resultados da FMN para três lotes de raízes de *Allium cepa* não irradiadas.

Lote	FMN (%)					Média	Desvio padrão	$CV_{FMN\%}$	$FMN_{\%}$
	ID da raiz								
	1	2	3	4	5				
1	0,6	0,5	0,8	0,4	0,3	0,5	0,2	40	166,7
2	0,4	0,4	0,3	0,3	0,5	0,4	0,1	25	66,7
3	0,4	0,3	0,3	0,1	0,1	0,2	0,1	50	300

A análise dos valores de $CV_{FMN\%}$ revelou que a quantificação de células de *Allium cepa* com um micronúcleo se mostrou um método reprodutível para a dose investigada de 720 mGy. Em contraste, a homogeneidade de lote, que foi avaliada mediante os valores de $FMN_{\%}$ foi observada apenas para os lotes 1 e 3 (Tabela 6.10). Cumpre ressaltar, que organismos

biológicos podem apresentar variações na resposta de *endpoints* citogenéticos devido a susceptibilidade genética individual à danos, que pode influenciar no aumento ou redução de suas frequências (LEME, MARIN-MORALES, 2009; IAEA, 2011). Ainda assim, esse resultado é promissor, sobretudo, porque ao contrário da dosimetria convencional TL, onde um mesmo dosímetro, isto é, um material inorgânico, é utilizado para diversas medições para investigar a homogeneidade do lote, aqui foram usadas raízes diferentes, ou seja, indivíduos biológicos diferentes, de um mesmo lote foram submetidos à mesma configuração de irradiação, obtendo-se um resultado satisfatório dentro das limitações do método citogenético.

Por outro lado, tanto a análise dos valores de $CV_{FMN\%}$ quanto dos valores de FMN% para as frequências de células com micronúcleos múltiplos (Tabela 6.11) revelaram que esse tipo de *endpoint* não é adequado para análises dosimétricas. Em contrapartida, as frequências de MNs múltiplos se mostraram úteis para a detecção do agravamento do dano genotóxico e, consequentemente, para explicar a perda de linearidade da curva de dose-resposta para as células de *Allium cepa* com um micronúcleo, que foi observada a partir da dose de 720 mGy, como foi discutido anteriormente.

Quando é feita a análise de reprodutibilidade e homogeneidade para as raízes não irradiadas de cada lote, os valores de $CV_{FMN\%}$ e FMN% indicaram uma alta variação no sinal/frequência de células de *Allium cepa* com MN. No entanto, como já mencionado anteriormente, isso se deve ao fato da susceptibilidade genética individual. Adicionalmente, os valores das frequências basais de células com micronúcleos para os grupos de controle não irradiados estão dentro dos limites preconizados pelas agências internacionais de toxicologia, incluindo a Agência Internacional de Energia Atômica, que estabelece o limiar de 3 MN/1000 células analisadas, isto é, 0,3%, como sendo danos citogenéticos espontâneos (IAEA, 2011).

Além desses testes, as raízes de *Allium cepa* dos três diferentes lotes tiveram as suas frequências de células com micronúcleos (Tabela 6.13) comparadas com as frequências de células com micronúcleos do experimento realizado com sementes do mesmo lote e em triplicata (Tabela 6.7). Para todos os lotes de sementes testados, as diferenças nas frequências de micronúcleos totais induzidas nas células meristemáticas radiculares de *Allium cepa* por uma dose de 720 mGy de partículas beta foram inferiores a 1,5%. Por sua vez, essa pouca diferença nas frequências de micronúcleos mostra que o teste de micronúcleos em células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* é um método reprodutível e confiável para avaliar danos genotóxicos induzidos por radiação até esta dose.

Tabela 6.13 – Frequências de células com micronúcleos (MNs) para três diferentes lotes de raízes de *Allium cepa* irradiadas com 720 mGy de partículas β (média \pm erro padrão da média).

Dose (mGy)	Frequência de células com micronúcleos (%)								
	Lote 1 (134567-004 S2)			Lote 2 (138206-001 S2)			Lote 3 (141941-000 S2)		
	1 MN	2 ou 3 MN	Total de MN	1 MN	2 ou 3 MN	Total de MN	1 MN	2 ou 3 MN MN	Total de MN
0	0,5 \pm 0,1	0,02 \pm 0,02	0,52 \pm 0,12	0,37 \pm 0,04	0	0,37 \pm 0,04	0,24 \pm 0,04	0	0,24 \pm 0,04
720	12,2 \pm 0,4	1,9 \pm 0,3	14,1 \pm 0,6	11,5 \pm 0,7	1,4 \pm 0,1	12,9 \pm 0,7	11,6 \pm 0,4	1,3 \pm 0,2	12,9 \pm 0,5

Para fins de dosimetria de radiação usando células de raízes de *Allium cepa*, os dados aqui apresentados sugerem que para doses iguais ou superiores a 720 mGy, o número de micronúcleos observados nas células deve ser considerado para plotar curvas dose-resposta. Caso contrário, se a contagem de células com micronúcleos for realizada sem considerar a sua distribuição nas células, isso pode produzir um perfil de curva que oculta informações radiobiológicas importantes, como o agravamento do dano genotóxico acompanhado de um possível efeito de morte celular.

6.4.2 Evolução da frequência de células com MNs em função do tempo

A Figura 6.11 mostra histogramas comparativos entre os índices mitóticos (IM) e as frequência de células com micronúcleo simples e múltiplos, tanto para os ensaios com amostras de controle não irradiadas, quanto para os ensaios com amostras irradiadas com 0,36, 0,72 e 1,44 Gy de partículas β , e a evolução desses endpoints citogenéticos após 24, 48 e 72 h.

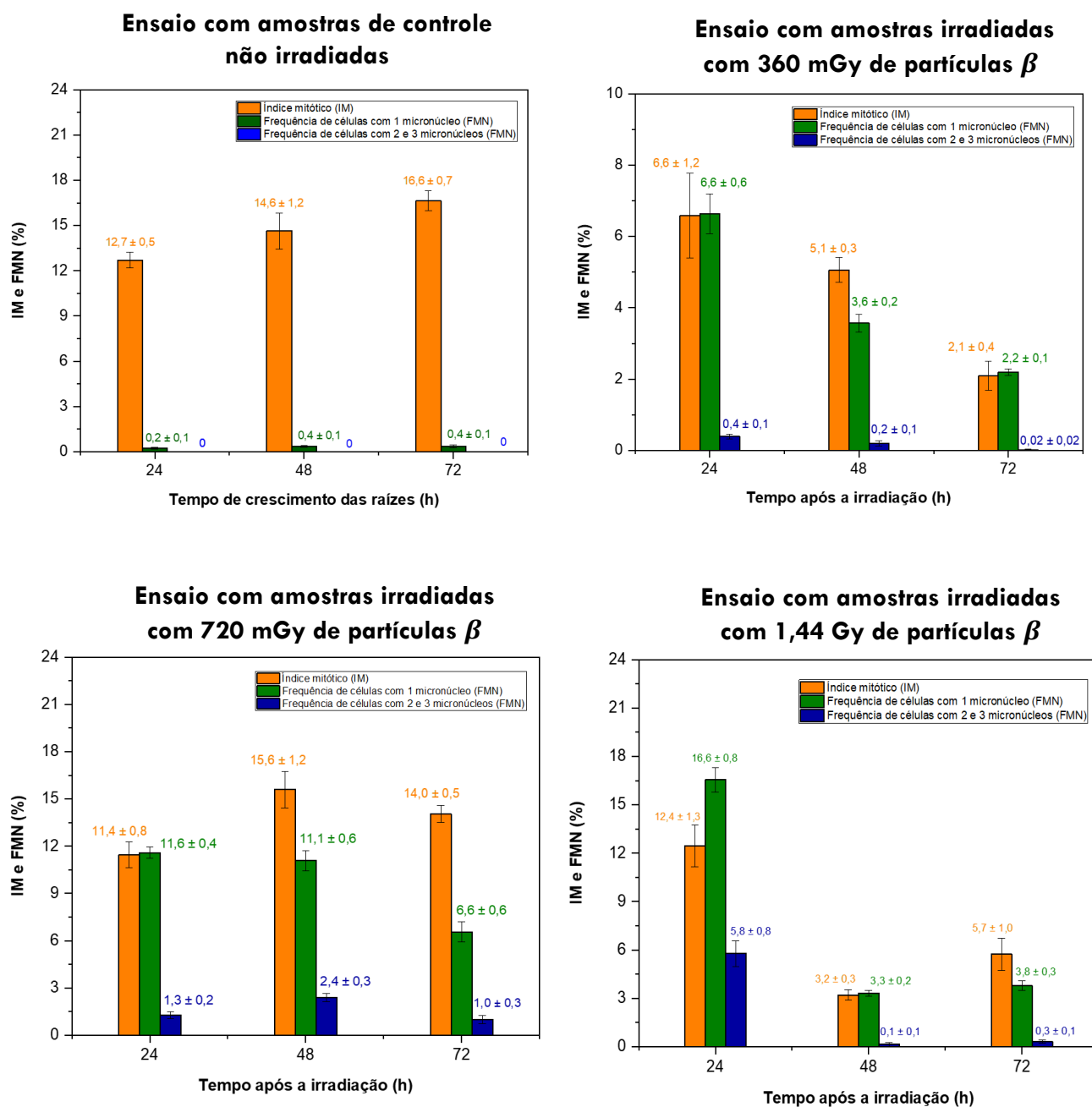


Figura 6.11 – Evolução temporal do IM e das frequências de micronúcleos simples e múltiplos em células radiculares de *Allium cepa* (média \pm erro padrão da média).

Inicialmente foi realizada uma análise temporal (24, 48 e 72 h) dos valores de IM e MNs simples e múltiplos para cada uma das doses absorvidas investigadas individualmente (Figura 6.11). Isso foi feito para determinar a influência da dose absorvida referente ao intervalo de 0,36 a 1,44 Gy de partículas β , sobretudo, em relação a como as células de *Allium cepa* lidam com os danos causados nos três primeiros ciclos pós irradiação para cada valor de dose. Posteriormente, foram feitas comparações desses parâmetros citogenéticos quantificados em cada um dos tempos investigados, tomando como referência o aumento de dose absorvida e a sua comparação em relação aos seus respectivos grupos de controle não irradiados.

A análise das amostras de células de *Allium cepa* do grupo de controle não irradiado revelou um padrão aproximadamente constante para o IM, com um brando aumento significativo ($p < 0,05$) sendo observado apenas entre as amostras crescidas por 24 e 72 h, respectivamente. A frequência de células com MNs simples para esse grupo ficaram dentro dos limites preconizados para os três tempos investigados, ou seja, garantindo que o grupo de controle não irradiado do experimento estava apto para comparações com os ensaios irradiados com 0,36, 0,72 e 1,44 Gy de partículas β . Micronúcleos múltiplos não foram detectados nas amostras de controle não irradiadas.

Quando analisada a evolução temporal dos parâmetros citogenéticos induzidos nas amostras irradiadas com 0,36 Gy de partículas β (Figura 6.11), não foi detectada diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) do IM entre o primeiro e o segundo ciclos celulares pós irradiação. Por outro lado, quando comparado os tempos de 48 h e 72 h após a irradiação, o IM das células de *Allium cepa* reduziu significativamente ($p < 0,05$) em cerca de $2,5 \times$. Essa redução de IM também se mostrou estatisticamente significativa ($p < 0,05$), quando comparados os tempos de 24 e 72 h após a irradiação, onde foi detectado uma redução de aproximadamente $3 \times$ no seu valor. O IM mostrou influenciar a detecção de MNs, uma vez que foi observado que conforme o IM ia diminuindo após o segundo e terceiro ciclo celular, respectivamente, isso foi acompanhado de uma redução proporcional das frequências de MNs simples. Quantitativamente, as frequências de MNs simples apresentaram valores de $6,6 \pm 0,6\%$, $3,6 \pm 0,2\%$ e $2,2 \pm 0,1\%$ após 24, 48 e 72 h da irradiação com partículas beta, respectivamente. Para esse nível de dose foi detectado o início da presença de MNs múltiplos, porém, sem significância estatística ($p > 0,05$) e com os valores sendo praticamente zerados após o terceiro ciclo celular.

Ao dobrar o valor de dose absorvida de partículas beta, isto é, de 360 mGy para 720 mGy, o IM das células de *Allium cepa* apresentou uma elevação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) de aproximadamente 4,2%, quando comparados os IMs das amostras de 24 e 48

h pós irradiação. Em contrapartida, o IM não mostrou diferença significativa ($p > 0,05$) para as demais comparações. Ao se considerar as frequências de células com MNs simples, nos dois primeiros ciclos celulares pós irradiação foram detectados praticamente o mesmo valor, portanto, sem apresentar significância estatística ($p > 0,05$). Isso, por sua vez, mudou no terceiro ciclo celular pós irradiação, quando foi observada uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) da frequência de MNs simples em quase metade do valor observado nos dois ciclos celulares anteriores. Finalmente, quando foi verificada as taxas de células com MNs múltiplos, houve um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) de mais de 1% após 48 h da irradiação, quando comparada a amostra de 24 h. No entanto, após 72 h da irradiação, a frequência de células com MNs múltiplos voltou a apresentar o mesmo valor detectado nas amostras coletadas após 24 h das irradiações.

A influência do IM sobre a FMN ficou mais evidente quando as raízes de *Allium cepa* foram irradiadas com uma dose de 1,44 Gy de partículas β (Figura 6.11). Com a conclusão do segundo ciclo celular após a irradiação, foi possível notar que houve uma redução abrupta e estatisticamente significativa ($p < 0,05$) de quase 75% do IM detectado na amostra coletada após 24 h da irradiação. O IM detectado na amostra coletada 72 h após as irradiações apresentou indícios de recuperação, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) apenas quando comparado ao IM da amostra de 24 h, porém, com aproximadamente metade do seu valor. As frequências de células com MNs simples mostraram ser altamente dependentes do IM, prova disto foi a detecção de uma redução abrupta e estatisticamente significativa ($p < 0,05$) de aproximadamente 80% na FMN simples da amostra coletada após 48 h da irradiação, quando comparada com a FMN simples observada na amostra coletada após 24 h. Esse valor se manteve para a amostra coletada após 72 h da irradiação. Por fim, quando considerada a FMN múltiplos foi possível notar que o primeiro ciclo celular pós irradiação apresentou aproximadamente 1/3 da FMN simples detectada. Em contraste, a FMN múltiplos foi praticamente zerada para os dois ciclos posteriores investigados.

Na Figura 6.12 são apresentados histogramas comparativos entre os índices mitóticos (IMs) e as frequências de células com micronúcleo simples e múltiplos em função do aumento de dose absorvida de partículas beta e as suas evoluções após 24, 48 e 72 h de cessadas as irradiações. Todas as comparações foram feitas tomando como referência os valores das frequências desses *endpoints* detectados nos seus respectivos grupos de controle não irradiados.

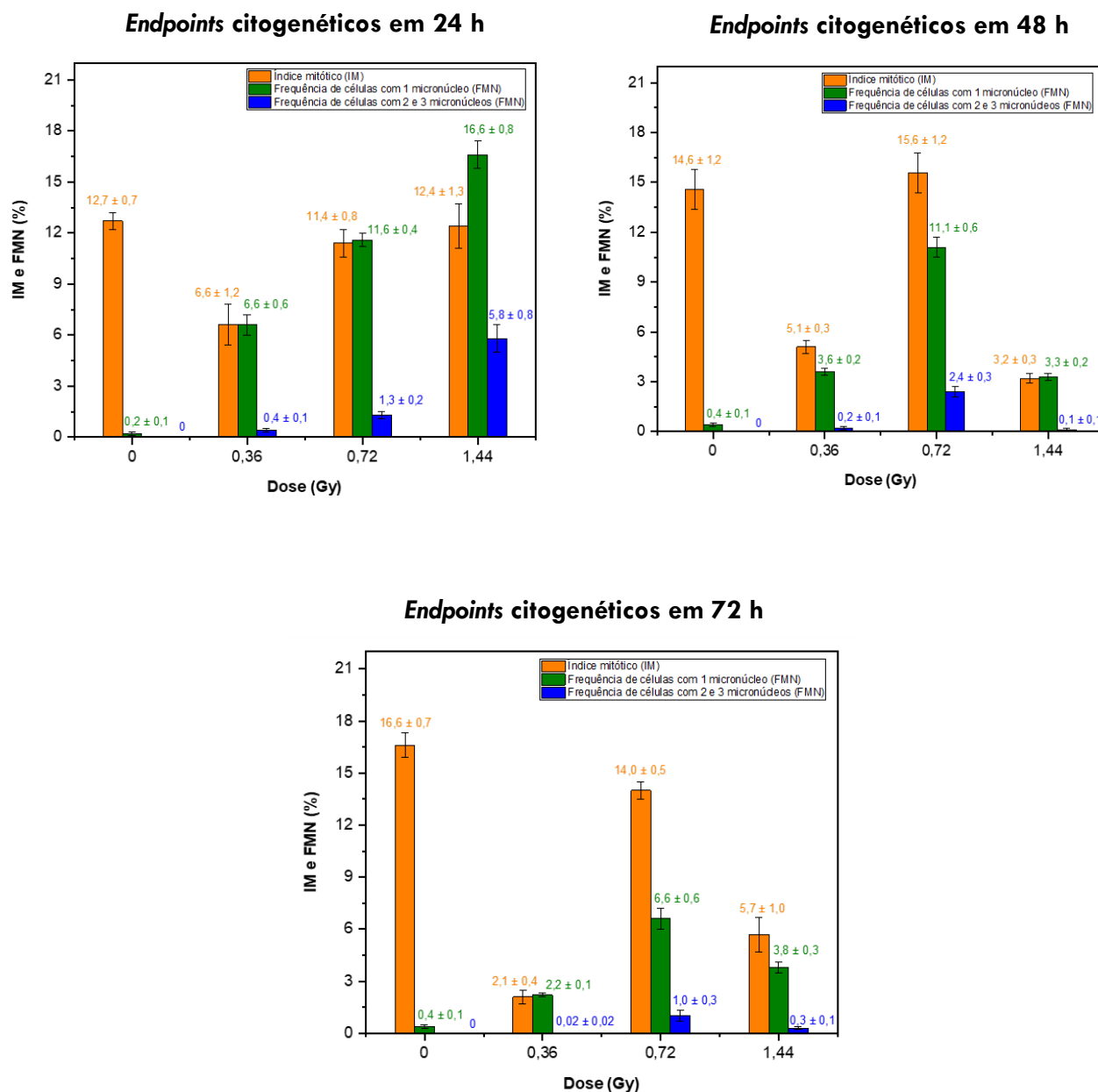


Figura 6.12 – Frequência de *endpoints* citogenéticos induzidos em células radiculares de *Allium cepa* após 24, 48, 72 h de cessada as irradiações com partículas β (média \pm erro padrão da média).

Nas primeiras 24 h pós irradiação, ou seja, após a conclusão de um ciclo celular da *Allium cepa*, foi observado que a dose absorvida de 360 mGy de partículas β induziu uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) de aproximadamente 50% do IM, quando comparada ao IM da amostra de controle não irradiada. Em contraste, quando as doses absorvidas foram aumentadas para 0,72 e 1,44 Gy, respectivamente, os IMs das amostras

irradiadas com essas doses voltaram a crescer e alcançaram o mesmo patamar detectado na amostra de controle não irradiada.

Com a dose de 360 mGy, a redução de aproximadamente 50% em relação ao IM da amostra de controle não irradiada, sugere indícios de ativação dos mecanismos de defesa para lidarem com disfuncionalidades genômicas (IAEA, 2011). Uma prova disto são as frequências de MNs simples e múltiplos serem as mais baixas em relação às doses de 0,72 e 1,44 Gy, como esperado. Por outro lado, quando o IM voltou a crescer com o aumento das doses de 0,72 e 1,44 Gy, a capacidade de proliferação celular aumentou e, conseqüentemente, um aumento proporcional das frequências de MNs simples e múltiplos foi detectado. Isso, por sua vez, indica a falha ou incapacidade dos mecanismos de defesa em lidar com esses danos radioinduzidos a partir da dose de 720 mGy. Essa hipótese é reforçada, especialmente, pela detecção de micronúcleos múltiplos, que apresentaram significância estatística ($p < 0,05$) também a partir de 720 mGy e, que, indicam um agravamento do dano genotóxico após a conclusão de um ciclo celular das raízes de *Allium cepa* irradiadas com doses de 0,72 e 1,44 Gy de partículas beta (GEORGE *et al.*, 2014; BOLSUNOVSKY *et al.*, 2019).

No segundo ciclo pós irradiação, ou seja, 48 h depois de cessada a exposição a partículas beta, o IM das amostras irradiadas com 360 mGy diminuiu significativamente ($p < 0,05$) em aproximadamente 2/3, quando comparado ao IM da amostra de controle não irradiada. Logo em seguida, voltou a crescer com a dose de 720 mGy e atingiu o mesmo valor de IM detectado para a amostra não irradiada. Contudo, quando o valor de dose absorvida aumentou para 1,44 Gy, o IM teve uma redução abrupta e estatisticamente significativa ($p < 0,05$) de aproximadamente 4/5 do IM observado na amostra de controle. As frequências de MNs simples e múltiplos reforçam que o IM influencia altamente na detecção desses *endpoints*. Em 360 mGy, a redução do IM foi acompanhada da redução da capacidade de detecção de MNs. O aumento da dose para 720 mGy induziu um aumento no IM e das frequências de MNs simples e múltiplos e, por fim, com a redução abrupta do IM observado para a dose de 1,44 Gy, também foi detectada uma redução em ambas as frequências de MNs. Cumpre ressaltar, que mesmo o IM tendo aumentado ou reduzido em todo o intervalo de dosagem investigado, as frequências de MNs, ou seja, de danos genotóxicos, foram todas superiores, quando comparadas com as frequências de MNs da amostra de controle detectadas no segundo ciclo celular.

Finalmente, quando foi investigada as frequências dos *endpoints* citogenéticos induzidos após três ciclos celulares pós irradiação, isto é, decorridas 72 h de cessada a exposição a partículas beta, a dose de 360 mGy permaneceu com o menor IM das doses absorvidas investigadas, indicando um efeito citotóxico para este valor de dose. Em 720 mGy, os dados

de IM sugerem que as células de *Allium cepa* conseguem se adaptar a esse aumento de dose, indicado pelo aumento do IM, que se equipara ao valor de IM da amostra não irradiada. Já para a dose de 1,44 Gy, embora tenha havido uma recuperação do IM após 72 h da irradiação em relação ao IM observado no segundo ciclo celular pós irradiação, este ainda foi 2/3 menor que o IM da amostra de controle de 72 h. As frequências de MNs simples para a irradiação de 360 mGy, considerando o intervalo de tempo de 72 h de cessada a exposição, reforçam a hipótese de que houve a indução de citotoxicidade induzida por esse nível de dose nas células de *Allium cepa*. As frequências desse *endpoint* para a irradiação de 720 mGy, também apoia os dados de IM, que sugerem uma maior capacidade dos mecanismos de defesa em lidar com danos induzidos por esse valor de dose, sendo detectados como uma redução em quase 50% da frequência de células com MNs detectada no ciclo celular anterior.

Por fim, quando foi analisada a dose de 1,44 Gy foi observado que embora o IM tenha dado indícios de recuperação em relação ao IM do ciclo celular anterior, a FMN simples se manteve praticamente igual, sugerindo um potencial para instabilidade cromossômica. As frequências de MNs múltiplos apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação a amostra de controle, apenas quando comparada com a amostra irradiada com 720 mGy. Novamente, as FMN simples e múltiplos para as irradiações com partículas beta dentro do intervalo de dosagem de 0,36 a 1,44 Gy foram todas superiores a FMN detectada para a amostra de controle não irradiada de 72 h.

6.4.3 Influência da taxa de dose absorvida de partículas β na indução de células com micronúcleo

A Figura 6.13 mostra a influência de diferentes taxas de dose absorvida de partículas β no IM e na indução de frequências de células de *Allium cepa* com micronúcleos simples e múltiplos, respectivamente, irradiadas com uma mesma dose de 720 mGy e coletadas após 24 h das irradiações. Os tempos das irradiações para atingir a dose absorvida usando diferentes fontes de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ (Tabela 5.2) com taxas de dose absorvidas de partículas β de $\dot{D}_1 = 1,4 \pm 0,1$ mGy/s, $\dot{D}_2 = 5,3 \pm 2,3$ mGy/s, $\dot{D}_3 = 12,2 \pm 3,4$ mGy/s e $\dot{D}_4 = 13,9 \pm 3,2$ mGy/s foram de 8 min e 45 s, 2 min e 16 s, 59 s e 52 s, respectivamente.

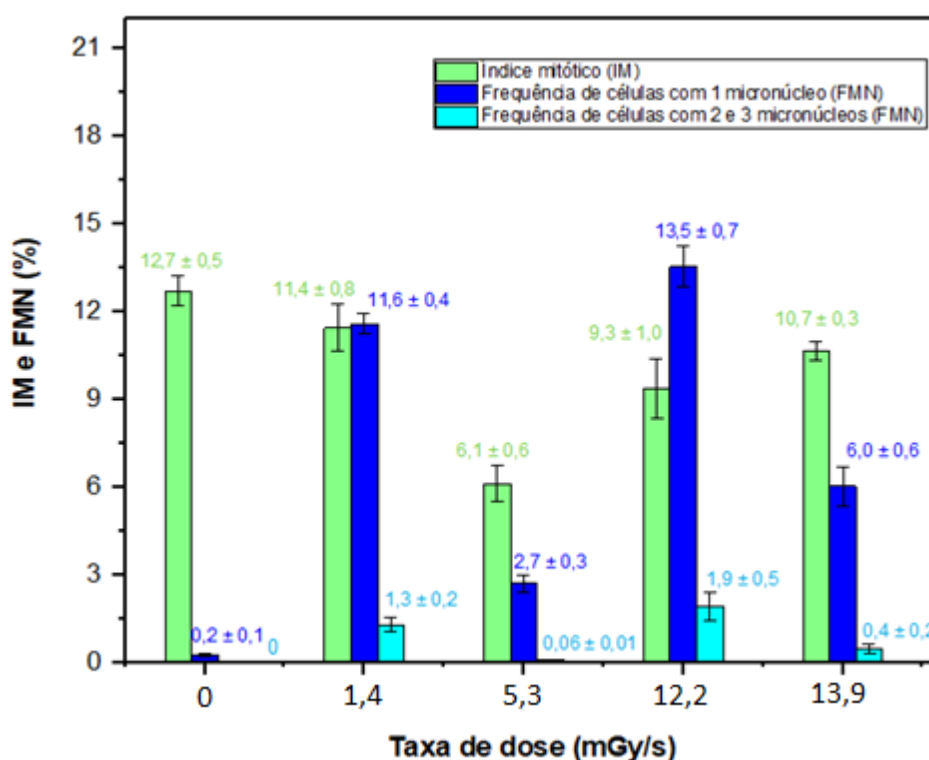


Figura 6.13 – Influência de diferentes taxas de dose absorvida de partículas beta em endpoints citogenéticos induzidos em células radiculares de *Allium cepa* irradiadas com 720 mGy (média \pm erro padrão da média).

Como pode ser observado na Figura 6.13, as diferentes taxas de dose absorvida de partículas β induziram diferentes frequências dos endpoints citogenéticos investigados nesta tese, mesmo mantendo a dose absorvida de 720 mGy para todas as irradiações. Quando comparado ao IM da amostra de controle não irradiada, apenas os IMs das células radiculares

de *Allium cepa* irradiadas com as fontes de taxas de dose $\dot{D}_2 = 5,3 \pm 2,3$ mGy/s e $\dot{D}_3 = 12,2 \pm 3,4$ mGy/s, apresentaram reduções estatisticamente significativas ($p < 0,05$) de aproximadamente $1/2$ e $1/3$, respectivamente. Em contrapartida, as taxas de dose $\dot{D}_1 = 1,4 \pm 0,1$ mGy/s e $\dot{D}_4 = 13,9 \pm 3,2$ mGy/s não mostraram influenciar ($p > 0,05$) os IMs das células de *Allium cepa* irradiadas.

Embora exista um paradigma entre o tempo de irradiação e o dano biológico radioinduzido, os dados de IM sugerem que apesar da menor taxa de dose, ou seja, \dot{D}_1 , levar a um maior tempo de exposição à radiação ionizante das células de *Allium cepa*, o fato de a deposição de dose absorvida ser mais lenta, pode ter fornecido tempo suficiente para que os mecanismos de defesa celular tentassem lidar com os danos radioinduzidos (IAEA, 2011). Isso, por sua vez, se altera quando são observados os dados de IM das amostras irradiadas com as taxas de dose \dot{D}_2 e \dot{D}_3 . No primeiro caso, isto é, quando usada \dot{D}_2 , o aumento da taxa de dose absorvida de partículas β em quase 4 vezes o valor de \dot{D}_1 , provocou alterações no meio biológico capazes de regular/inibirem a atividade mitótica das células de *Allium cepa*, reproduzindo um comportamento semelhante ao observado no experimento com partículas α . Essa hipótese foi reforçada quando foram analisados os dados de IM referentes às irradiações com \dot{D}_3 e \dot{D}_4 , onde os IMs voltaram a crescer, indicando incapacidade de lidarem com os danos e, conseqüentemente, de não conseguirem repararem as mutações radioinduzidas. Além disso, o aumento do IM pode também ser um indicativo de uma possível adaptação à radiação, especialmente, nas irradiações realizadas com a fonte de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ de maior taxa de dose, ou seja, \dot{D}_4 . Esse efeito concorda com as observações feitas em plantas crescidas em Chernobyl após o acidente nuclear, que demonstraram adaptação à exposição à níveis extremos de radiação (LUDOVICI *et al.*, 2021).

A análise de dados de células com MN simples e múltiplos corroborou com as discussões anteriormente feitas. Quando comparados com a amostra de controle não irradiada, todos os ensaios irradiados com as diferentes taxas de dose absorvida de partículas β , aqui estudadas, apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) nas frequências de células de *Allium cepa* com MN simples. Para \dot{D}_1 , a FMN simples detectada apresentou praticamente o mesmo valor do IM desse ensaio, indicando que a não inibição da atividade mitótica (IM) para essa taxa de dose, pode ser interpretada pelas células como danos leves, aos quais as células conseguem sobreviver. Por outro lado, isso é preocupante pois a presença de células com MNs indica danos permanentes ao DNA, provenientes de quebras ou perdas de cromossomos, ou seja, a FMN sendo próxima ao IM pode estar indicando uma proliferação da perda de genes funcionais e, conseqüentemente, de sucessivas alterações na informação genética das células de *Allium cepa*.

Com o aumento da taxa de dose para \dot{D}_2 , os dados de FMN simples indicaram uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) de aproximadamente $3/4$, em relação a FMN detectada para \dot{D}_1 . Isso, por sua vez, foi acompanhada de uma redução significativa ($p < 0,05$) do IM de \dot{D}_2 em aproximadamente $1/2$ do IM da amostra irradiada com \dot{D}_1 . A análise conjunta de ambos os tipos de *endpoints* permitiu, portanto, inferir que o aumento da taxa de dose em quase 4 vezes em relação a \dot{D}_1 , foi capaz de estimular os mecanismos de defesa celular que regularam/inibiram a atividade mitótica das células de *Allium cepa* com a finalidade de lidarem com os danos citogenéticos radioinduzidos, sendo um indicativo de um possível agravamento do dano genotóxico induzido por esse aumento de taxa de dose.

Em contrapartida, quando a taxa de entrega da dose nas células de *Allium cepa* aumentou para aproximadamente 2,5 vezes do valor de \dot{D}_2 , isto é, quando foi usada a fonte de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ de taxa de dose \dot{D}_3 , foi detectada a maior FMN simples detectada entre todas as 4 taxas de dose investigadas. Embora pareça contraditório do ponto de vista físico, biologicamente isso pode ser conjuntamente explicado pelo fato de o IM ter sido $1/3$ maior que o IM detectado no ensaio irradiado com a \dot{D}_2 e a FMN simples ter sido 5 vezes maior em relação a \dot{D}_2 . Ambos os tipos de *endpoints* foram influenciados por um menor tempo de exposição à radiação das células de *Allium cepa* e, conseqüentemente, a uma menor população de células sendo irradiada e possivelmente afetada. No caso da FMN simples, o seu aumento abrupto e significativo ($p < 0,05$) em relação a \dot{D}_2 , pode vir do fato da soma dos fatores de redução de tempo de exposição com a concentração da dose absorvida em uma população de células localizada em uma determinada região, tornando o efeito biológico mais efetivo (IAEA, 2011). No entanto, mais estudos são necessários para caracterizar minuciosamente a biofísica envolvida nesses processos e, conseqüentemente, elucidar essas lacunas sobre efeitos de altas taxas de doses.

Para \dot{D}_4 , embora a diferença em relação a \dot{D}_3 seja maior um pouco menos de 2 vezes, essa pouca diferença na taxa de dose absorvida de partículas β foi suficiente para preservar o tecido sadio, detectado com o aumento do IM e, simultaneamente, reduzir significativamente ($p < 0,05$) a FMN simples para menos da metade da FMN simples observada para a irradiação com \dot{D}_3 .

Por fim, quando comparadas as FMN múltiplos, apenas os ensaios irradiados com \dot{D}_2 e \dot{D}_3 apresentaram aumentos significativos ($p < 0,05$) em relação a amostra de controle não irradiada. Esse aumento da FMN múltiplos corroborou com as discussões feitas sobre o indicativo

de agravamento de dano genotóxico detectado tanto nos ensaios irradiados com \dot{D}_2 quanto com \dot{D}_3 .

6.4.4 Curvas de dose-resposta física e biológica

Com a finalidade de comparar as respostas física e biológica devido às doses absorvidas de partículas β , foram selecionados quatro tempos de irradiação, nos quais foram irradiados tanto TLD-100 quanto raízes de *Allium cepa*, sob as mesmas configurações experimentais.

Na Figura 6.2 foi apresentada uma curva de dose-resposta TL para diferentes tempos de irradiação. Os mesmos tempos de irradiação foram investigados com o uso das raízes de *Allium cepa*, considerando a taxa de dose obtida por simulação computacional ($63,1 \text{ mGy} \cdot \text{min}^{-1}$). A respectiva curva de dose-resposta para MN simples induzidos após 24 horas das irradiações com doses de 0,18, 0,36, 0,72 e 1,44 Gy é mostrada na Figura 6.14.

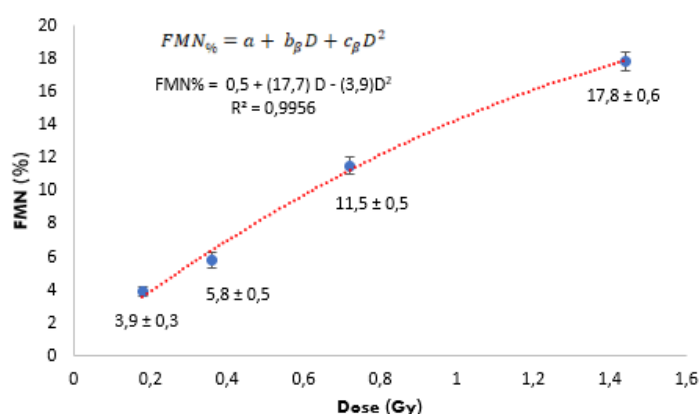


Figura 6.14 – Curva de dose-resposta para micronúcleos simples induzidos por partículas β .

Como esperado, os perfis das curvas de dose-resposta física e biológica foram diferentes devido a diferença de espessura observada entre o TLD-100 e as raízes de *Allium cepa* e, conseqüentemente, das suas respectivas taxas de doses absorvidas. Contudo, foi possível fazer uma comparação entre as diferenças percentuais na estimativa de dose para ambas as modalidades de dosimetria. Isso foi feito mediante uma adaptação da fórmula proposta por FUJIKAWA *et al.* (1999) para medições biológicas de dose de radiação. Assim, após a adaptação na fórmula, a dose biológica absorvida de partículas beta pelas raízes de *Allium cepa* pôde ser determinada usando:

$$D_{\beta} = \frac{FMN\% - a}{(b_{\beta} - c_{\beta})} \quad (6.1)$$

onde, D_β = dose absorvida de partículas β ; $FMN\%$ = frequência de células de *Allium cepa* com micronúcleos simples radioinduzidos; a = frequência espontânea de micronúcleos; b_β = coeficiente da contribuição linear para a indução de MNs e c_β = coeficiente de contribuição quadrática para a indução de MN.

A tabela 6.14 mostra os resultados da dosimetria baseada na frequência de MN simples e sua comparação com a dosimetria computacional, bem como com a dosimetria TL, acompanhadas das diferenças relativas (%) entre as modalidades de dosimetria utilizadas.

Tabela 6.14 – Dosimetria de partículas β usando raízes de *Allium cepa* irradiada com uma fonte de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$.

Tempo de exposição	Simulação de Monte Carlo		<i>Allium cepa</i>		TLD-100		Diferença relativa (%)		
	^a Taxa de dose (mGy/min)	Dose absorvida (Gy)	^b FMN%	^c D_β (Gy)	^d Taxa de dose (mGy/min)	D_β (Gy)	^e Simulação vs. TLD-100	^f FMN% vs. Simulação	^g FMN% vs. TLD-100
2 min e 51 s		0,18	$3,9 \pm 0,3$	0,28		0,23	-22	+55	+22
5 min e 42 s		0,36	$5,8 \pm 0,5$	0,42		0,47	-23	+17	-11
11 min e 25 s	63,1	0,72	$11,5 \pm 0,5$	0,83	82,3	0,94	-23	+15	-12
22 min e 49 s		1,44	$17,8 \pm 0,6$	1,29		1,88	-23	-10	-31

^a Taxa de dose determinada via simulação computacional;

^b Frequência de micronúcleos radioinduzidos subtraída da frequência de micronúcleos espontânea;

^c Dose absorvida de partículas β determinada experimentalmente por meio da equação 5.1;

^d Taxa de dose determinada experimentalmente mediante dosimetria TL;

^e $R\% = (D_\beta \text{ nas raízes de } Allium \text{ cepa via simulação de Monte Carlo} - D_\beta \text{ no TLD} - 100 / D_\beta \text{ no TLD} - 100) \times 100$

^f $R\% = (D_\beta \text{ nas raízes de } Allium \text{ cepa (FMN\%)} - D_\beta \text{ nas raízes de } Allium \text{ cepa via simulação de Monte Carlo} / D_\beta \text{ nas raízes de } Allium \text{ cepa via simulação de Monte Carlo}) \times 100$

^g $R\% = (D_\beta \text{ nas raízes de } Allium \text{ cepa (FMN\%)} - D_\beta \text{ no TLD} - 100 / D_\beta \text{ no TLD} - 100) \times 100$

Embora o fato da espessura média das raízes de *Allium cepa* ser $2,5 \times$ menor que a espessura do TLD-100 e, conseqüentemente, ser um parâmetro físico que influenciou em uma taxa de dose absorvida de partículas beta aproximadamente 23% menor do que quando utilizado o TLD-100, algumas considerações radiobiológicas precisam ser levadas em conta para a estimativa da dose, uma vez que a FMN% é um *endpoint* citogenético.

O modelo matemático proposto na equação 6.1 levou em consideração as influências de fatores radiobiológicos e os fundamentos teóricos do modelo linear-quadrático (IAEA, 2011). Desse modo, a estimativa de dose biológica absorvida de partículas β a partir dessa equação, incorpora no numerador os valores de frequência de células com micronúcleos ($FMN_{\%}$) detectada para cada tempo de irradiação (Tabela 6.14) subtraída da frequência espontânea de micronúcleos (grupo de controle não irradiado) e no denominador uma subtração dos coeficientes b_{β} e c_{β} , que representam, os coeficientes da curva de dose-resposta (Figura 6.13) que estão associadas com as componentes linear e quadrática da dose, respectivamente.

O coeficiente b_{β} foi aproximadamente $4,5 \times$ maior que o coeficiente c_{β} na equação de dose-resposta (Figura 6.14) para micronúcleos simples. Isso, por sua vez, sugere que a indução desses danos manteve uma proporcionalidade quase que linear, indicado que esses danos foram causados majoritariamente por eventos de interação única com o alvo biológico (IAEA, 2011). Por outro lado, embora o coeficiente c_{β} tenha influenciado de forma sutil a indução de micronúcleos, foi suficiente para causar a perda de linearidade da curva de dose-resposta. Esse coeficiente é associado aos eventos de interação múltipla, que podem causar mutações e instabilidade cromossômica (IAEA, 2011).

No experimento sobre a influência do parâmetro tempo na indução de micronúcleos, foi detectada a redução das frequências de micronúcleos múltiplos acompanhada da redução de IM após a conclusão de 3 ciclos celulares pós irradiação (Figura 6.12). Esses dados sugerem que ocorreu a morte dessas células. Embora tenha sido realizado em momentos diferentes, os dados de MNs após 24 horas das irradiações foram bem próximos dos resultados do experimento aqui considerado (Tabela 6.14). Desse modo, como o coeficiente c_{β} está associado aos eventos de interação múltipla da radiação com o alvo e que este afeta a linearidade da curva de dose-resposta, presume-se que a redução da frequência de células com micronúcleos simples sofreu a sua influência, uma vez que o c_{β} contribuiu para a indução de micronúcleos múltiplos. Como essas células com micronúcleos múltiplos estão morrendo após três ciclos celulares, a influência de c_{β} foi subtraída de b_{β} , uma vez que tanto matematicamente quanto radiobiologicamente, a influência de b_{β} se mostrou predominante para a estimativa de dose absorvida de partículas β a partir da frequência de células com micronúcleos simples.

Assim, mediante os fundamentos radiobiológicos associados a equação 6.1, foi possível observar valores de dose biológica que se aproximam dos valores da dose física tanto pelo método computacional, quanto pelo método experimental termoluminescente. Isso, por sua vez, permitiu uma comparação entre as modalidades de dosimetria biológica e física, respectivamente (Tabela 6.14), com uma boa concordância na estimativa de dose, exceto para o maior tempo de irradiação, onde o c_β exerceu uma maior predominância, detectado como uma redução da frequência de micronúcleos simples devido a um aumento da frequência de células com micronúcleos múltiplos (Figura 6.12).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Os cálculos computacionais se mostraram úteis para estimar as taxas de doses e doses absorvidas de partículas α e β pelas raízes de *Allium cepa*, uma vez que possibilitaram delinear e reproduzir o cenário experimental das irradiações. A partir dessas simulações, foi possível usar a dosimetria convencional TL para fornecer dados experimentais de dose absorvida, que tornaram possíveis uma comparação com a dosimetria citogenética baseada na frequência de células com micronúcleos radioinduzida por partículas beta.

Para ambos os tipos de radiações ionizantes, a frequência de células com micronúcleos se mostrou o *endpoint* citogenético mais adequado para uso em dosimetria. Para tal, é imprescindível a avaliação conjunta de ACs e, principalmente, do IM, pois a plotagem de curvas de dose-resposta para micronúcleos radioinduzidos em células de *Allium cepa* são influenciadas pelas frequências desses *endpoints*.

Como esperado, a radiação α foi mais efetiva que a radiação β para induzir micronúcleos devido a sua alta LET. Adicionalmente, a radiação α produziu um efeito citotóxico a partir de 100 mGy, com danos severos detectados como fragmentação da estrutura nuclear e redução abrupta do IM, principalmente, na dose de 200 mGy. Por outro lado, mesmo a maior dose absorvida de partícula beta, isto é, 1,44 Gy, não produziu efeito citotóxico nos primeiros experimentos realizados, demonstrando, portanto, uma maior radiorresistência a este tipo de radiação. No entanto, essa maior radiorresistência das células de *Allium cepa* à radiação beta, produziu efeitos adicionais, como micronúcleos múltiplos, causando um agravamento do dano genotóxico conforme o aumento da dose absorvida.

A partir da análise temporal dos valores de IM e MNs em células de *Allium cepa* irradiadas com doses de partículas β entre 0,36 e 1,44 Gy, foi possível observar que o IM influenciou a detecção de MNs simples e múltiplos. Foi possível detectar que quando consideradas as doses absorvidas de menor e maior valor dessa análise, ou seja, 0,36 Gy e 1,44 Gy, a menor dose induziu progressivamente a redução do IM ao longo dos três ciclos celulares analisados. Por outro lado, a dose de 1,44 Gy não apresentou redução do IM no primeiro ciclo celular, algo que se modificou nos segundo e terceiro ciclos celulares seguintes, com reduções de $3/4$ e $2/3$, respectivamente, em relação ao IM detectado após a conclusão do primeiro ciclo pós irradiação. Isso significou que as raízes de *Allium cepa* mostraram sinais de adaptação às doses mais altas, embora o perfil de instabilidade cromossômica tenha sido observado em todos os valores de dose absorvida investigados (0,36; 0,72 e 1,44 Gy).

Em relação a variação da taxa de dose absorvida de partículas beta, mesmo mantendo a dose fixa para todas as irradiações, ou seja, de 0,72 Gy, foram detectados diferentes valores de frequência de micronúcleos radioinduzidas nas células radiculares de *Allium cepa*. Novamente, o IM influenciou na detecção das frequências de MNs, porém, com comportamentos diversos. Esses comportamentos podem ter acontecido não só devido à uma entrega mais rápida ou mais devagar da dose de radiação, mas também pela concentração da dose em uma determinada população de células.

Finalmente, quando foram construídas as curvas de dose-resposta para micronúcleos radioinduzidos, foram observados que os ajustes das curvas foram condizentes com o que se era previsto pelos modelos teóricos, isto é, linear para a radiação alfa, e linear-quadrático para a radiação beta. Como foi realizada medições experimentais com dosímetros termoluminescentes (TLD-100), sob as mesmas condições de irradiação as quais as raízes de *Allium cepa* foram irradiadas, isso permitiu a construção de um modelo matemático para comparação de ambas as modalidades de dosimetria.

O modelo matemático proposto nesta tese para estimar a dose absorvida de partículas beta, usando micronúcleos radioinduzidos em células de *Allium cepa*, considerou a influência dos coeficientes linear (b_β) e quadrático (c_β) da curva de dose-resposta, bem como a identificação de parâmetros radiobiológicos que interferem na linearidade da curva, isto é, a presença de micronúcleos múltiplos. Os dados sobre a evolução temporal das frequências de células com micronúcleos múltiplos mostraram que elas praticamente zeram após o terceiro ciclo celular de cessada a irradiação, sugerindo, portanto, a morte dessas células. Consequentemente, isso tornou plausível subtrair a influência de c_β sobre b_β , pois embora ambos os tipos de dano ocorram simultaneamente, os danos com potencial de gerar instabilidade cromossômica são os danos induzidos por eventos únicos da radiação com as células de *Allium cepa*, como de fato

foi observado. A estimativa de dose absorvida de partículas beta usando a frequência de células com micronúcleos simples baseada nesse modelo matemático produziu dados satisfatórios para comparar com a dose medida nos TLDs-100, sobretudo, pelas limitações do método citogenético. Entretanto, para exposições prolongadas como foi o caso da exposição de 22 min e 49 s, a influência de c_β passou a ser predominante, sendo detectada como o aumento de células com micronúcleos múltiplos. Isso, por sua vez, reduziu drasticamente a precisão do modelo para estimar essa dose.

Assim, pode-se concluir que as células radiculares meristemáticas de *Allium cepa* podem servir como um sistema de suporte à dosimetria convencional baseada em métodos físicos, uma vez que permitem além de estimar a dose de radiação absorvida, determinar o nível de efeito biológico induzido e investigar os seus possíveis desdobramentos. Ademais, destaca-se neste trabalho o potencial de aplicações do uso de biota vegetal, especialmente, da *Allium cepa*, para identificar, categorizar e analisar dosimetricamente os efeitos citogenéticos induzidos por exposições repentinas à diferentes tipos e níveis de radiação ionizante, podendo direcionar estratégias rápidas e eficientes de *screening* em casos de emergências radiológicas e/ou nucleares em pequena e média escala.

7.1 Sugestões para trabalhos futuros

- Utilizar detectores de radiação adequados para determinar experimentalmente a dose absorvida de partículas α ;
- Plotar a curva de dose-resposta experimental para micronúcleos radioinduzidos em células radiculares de *Allium cepa* por partículas α ;
- Investigar a evolução temporal dos danos citogenéticos radioinduzidos por partículas β para diferentes taxas de doses e doses absorvidas;
- Avaliar por meio do ensaio de eletroforese em gel de célula única (ensaio cometa) a fragmentação do DNA induzida por diferentes tipos de radiação ionizante, taxas de dose e doses absorvidas, bem como a relação dano/reparo;
- Refinar os cenários de simulação computacional, aproximando-os o máximo possível das configurações experimentais adotadas;
- Analisar separadamente um cenário onde haja efeito de incorporação de radionuclídeos e efeito proveniente da radiação que emitem;
- Aperfeiçoar o modelo matemático de estimativa de doses de partículas β a partir da construção de um banco de dados adicionando variáveis que podem influenciar na sua determinação, bem como ajustar o modelo matemático em função de diferentes tipos e LET das radiações;
- Investigar o efeito combinado de diferentes tipos de radiação ionizante;
- Avaliar outras modalidades de biota vegetal, bem como a sua radiosensibilidade para diferentes tipos, taxas de doses e doses absorvidas de radiação ionizante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADROVIC, J.; EMINOVIC, I.; VIDOVIC, S.; ADROVIC, F. Chromosomal aberrations and nuclear anomalies in root tip cells of *Allium cepa* L. caused by radon in water. **International Journal of Modern Biological Research**. v. 9, n. 2, p. 25 – 36, 2021.

ASHCROFT, N. W.; MERMIN, N. D. **Solid state physics**. Florida: Saunders College, 1976.

ATTIX, F. H. **Introduction to radiological physics and radiation dosimetry**. Germany: WILEY-VCH, 1986.

AVERBECK, D.; SALOMAA S.; BOUFFLER, S.; OTTOLENGHI, A.; SMYTH, V.; SABATIER, L. Progress in low dose health risk research: Novel effects and new concepts in low dose radiobiology. **Mutation Research**. v. 776, p. 46 – 69, 2018.

BASSINET, C.; ROBBES, I.; BARBIER, L.; BAUMANN, M.; KERNISANT, B.; TROMPIER, F. Characterization of ⁷LiF:Mg,Ti TLD micro-cubes. **Radiation Measurements**. v. 45, n. 3 – 6, p. 646 – 648, 2010.

BOLSUNOVSKY, A. Y.; TROFIMOVA, E. A.; ZUEVA, A. V.; DEMENTIEV, D. V. The first results of using the *Allium* test in estimating the chemical and radiation toxicity of bottom sediments in the Yenisei River. **Doklady Biological Sciences**. v. 469, n. 1, p. 192 – 195, 2016.

BOLSUNOVSKY, A.; DEMENTYEV, D.; TROFIMOVA, E.; INIATKINA, E.; KLADKO, Y.; PETRICHENKOV, M. Chromosomal aberrations and micronuclei induced in onion (*Allium cepa*) by gamma-radiation. **Journal of Environmental Radioactivity**. v. 207, p. 1 – 6, 2019.

BONCIU, E.; PETER, F.; FONTANETTI, C. S.; WUSHENG, J.; KARASMAILIOGLU, M. C.; LIU, D.; MENICUCCI, F.; PESNYA, D. S.; POPESCU, A.; ROMANOVSKY, A. V.; SCHIFF, S.; SLUSARCZYK, J.; SOUZA, C. P.; SRIVASTAVA, A.; SUTAN, A.; PAPINI, A. An evaluation for the standardization of the *Allium cepa* test as cytotoxicity and genotoxicity assay. **Caryologia**. v. 71, n. 3, p. 191 – 209, 2018.

BUSHONG, S. C. **Ciência radiológica para tecnólogos: física, biologia e proteção**. [tradução Sandro Martins Dolghi et al.]. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

CASMIE – Comitê de avaliação de serviços de monitoração individual externa. **Desempenho de sistemas de monitoração individual: critérios e condições**. Rio de Janeiro: IRD, 1995.

CHEN, Y.; ZHOU, P.-K.; ZHANG, X.-Q.; WANG, Z.-D.; WANG, Y.; DARROUDI, F. Cytogenetic studies for a group of people living in Japan 1 year after the Fukushima nuclear accident. **Radiation Protection Dosimetry**. v. 159, n. 1 – 4, p. 20 – 25, 2014.

CORTÉS, F.; DOMÍNGUEZ, I.; MATEOS, S.; PIÑERO, J.; MATEOS, J. C. Evidence for an adaptive response to radiation damage in plant cells conditioned with X-rays or incorporated tritium. **International Journal of Radiation Biology**. v. 57, n. 3, p. 537 – 541, 1990.

CRUZ, A. D.; McARTHUR, A. G.; SILVA, C. C.; CURADO, M. P.; GLICKMAN, B. W. Human micronucleus counts are correlated with age, smoking, and cesium-137 dose in the Goiânia (Brazil) radiological accident. **Mutation Research**. v. 313, n. 1, p. 57 – 68, 1994.

d'ERRICO, F.; LUSZIK-BHADRA, M.; NATH, R.; SIEBERT, B. R.; WOLF, U. Depth dose-equivalent and effective energies of photoneutrons generated by 6–18 MeV X-ray beams for radiotherapy. **Health Phys.** v. 80, p. 4 – 11, 2001.

d'ERRICO, F.; BOS, A. J. J. Passive detectors for neutron personal dosimetry: State of the art. **Radiation Protection Dosimetry**. v. 110, n. 1 – 4, p. 195 – 200, 2004.

EISBERG, R.; RESNICK, R. **Física Quântica: Átomos, Moléculas, Sólidos, Núcleos e Partículas**. 20. ed., Editora Campus, Rio de Janeiro, 1979.

FEINENDEGEN, L. E.; POLLYCOVE, M. Biologic responses to low doses of ionizing radiation: detriment versus hormesis. Part 1. Dose responses of cells and tissues. **Journal of Nuclear Medicine**. v. 42, n. 7, p. 17N – 27N, 2001.

FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A. T.; SURRALLS, J.; CROTT, J. W.; PARRY, J.; NORPPA, H.; EASTMOND, D. A.; TUCKER, J. D.; THOMAS, P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**. v. 26 n. 1, p. 125 – 132, 2011.

FIJIKAWA, K.; ENDO, S.; ITOH, T.; YONEZAWA, Y.; HOSHI, M. Dose estimations of fast neutrons from a nuclear reactor by micronuclear yields in onion seedlings. **Journal of Radiation Research**. v. 40, n. Suppl., p. 28 – 35, 1999.

GADDE, S.; HEALD, R. Mechanisms and molecules of the mitotic spindle. **Current Biology**. v. 14, n. 18, p. 797 – 805, 2004.

GEORGE, J. T.; PATEL, B. B.; RANE, V. A.; VENU-BABU, P.; EAPEN, S.; SINGHAL, R. K.; PIUS, J.; NARULA, B.; SHANKHADARWAR, S. Non-linear dose response of a few plant taxa to acute gamma radiation. **Cytologia**. v. 79, n. 1, p. 103 – 109, 2014.

GIRI, A. K.; SINGH, O. P.; SANYAL, R.; SHARMA, A.; TALUKDER, G. Comparative effects of chronic treatment with certain metals on cell division. **Cytologia**. v. 49, p. 659 – 665, 1984.

GRANT, W. F. Chromosome aberrations in plants as a monitoring system. **Environmental Health Perspectives**. v. 27, p. 37 – 43, 1978.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: Um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. FUNPEC, São Paulo, 2002.

HALL, E. J.; GIACCIA, A. J. Radiobiology for the radiologist. 7a. Edição. 2018.

HARSHAW. TLD Bicon. Model 4500. **Manual TLD reader with WinREMS: Operator's manual.** Solon, Bicon, 2001.

HIGLEY, K. A. Integration of radiological protection of the environment into the system of radiological protection. **Ann ICRP.** v. 47, n. 3 – 4, p. 270 – 284, 2018.

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

ICRU – International Commission on Radiation Units & Measurements. **Tissue substitutes in radiation dosimetry and measurement.** ICRU – Report 44, United States, 1989.

ISO 12794:2000. Nuclear Energy – Radiation Protection. **Individual thermoluminescence dosimeters for extremities and eyes.** ed. 1, ISO/TC 85/SC 2, 2000.

KAYHAN, H.; KOCA, S.; ÖZDEMİR, M.; DAYANIR, B.; SÖYLEMEZ, B.; ÖZSUNAR, Y. Investigation of potential genotoxic effects of magnetic field used in imaging. **Meandros Medical and Dental Journal.** v. 20, n. 1, p. 57 – 63, 2019.

KITTEL, C. **Introduction to solid state physics.** New York: John Wiley & Sons, Inc., 1996.

KNOLL, G. F. **Radiation detection and measurement** – 4 ed. New York: John Willey and Sons Inc., 2010.

KÖKSAL, G.; DALCÍ, D. O.; PALA, F. S. Micronuclei in human lymphocytes: the Co-60 gamma-ray dose-response. **Mutation Research.** v. 359, n. 2, p. 151 – 157, 1996.

KOVACEVIC, N.; VRTAR, M.; VEKIC, B. A simple calibration method for ^{106}Ru – ^{106}Rh eye applicators. **Radiotherapy and Oncology.** v.74, n. 3, p. 293 – 299, 2005.

KOVALCHUK, O.; KOVALCHUK, I.; ARKHIPOV, A.; TELYUK, P.; HOHN, B.; KOVALCHUK, L. The *Allium cepa* chromosome aberration test reliably measures genotoxicity of soils of inhabited areas in the Ukraine contaminated by the Chernobyl accident. **Mutation Research.** v. 415, n. 1 – 2, p. 47 – 57, 1998.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. P. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research.** v. 682, n. 1, p. 71 – 81, 2009.

LIMA, H. R. B. R. **Síntese e caracterização de novos materiais luminescentes para detecção de radiação.** Sergipe: Universidade Federal de Sergipe, 2017, 131 p. Tese (Doutorado em Física) – Departamento de Física, Sergipe, 2017.

LUDOVICI, G. M.; SOUZA, S. O.; CHIERICI, A.; CASCONI, M. G.; d'ERRICO, F.; MALIZIA, A. Adaptation to ionizing radiation of higher plants: from environmental radioactivity to Chernobyl disaster. **Journal of Environmental Radioactivity.** v.222, p. 106375, 2020.

LUDOVICI, G. M.; CASCONI, M. G.; HUBER, T.; CHIERICI, A.; GAUDIO, P.; DE SOUZA, S. O.; d'ERRICO, F.; MALIZIA, A. Cytogenetic bio-dosimetry techniques in the detection of dicentric chromosomes induced by ionizing radiation: a review. **The European Physical Journal Plus.** v. 136, p. 482, 2021.

MATAGNE, R. Duration of mitotic cycle and patterns of DNA replication in chromosomes of *Allium cepa*. **Caryologia**. v. 21, n. 3, p. 209 – 224, 1968.

McKEEVER, S. W. S. **Thermoluminescence of Solids**. s.l: Cambridge University Press. 1988.
MEENA, D.; SINGH, S. K.; CHAUDARI, S. K. Effect of Sr^{2+} on mitotic activity and chromosomal behavior in root meristem of *Allium cepa* L. **International Journal of Agriculture Environment & Biotechnology**. v. 6, n. 2, p. 197 – 201, 2013.

MILIAN, F. M. **Estudo in vitro dos efeitos radiobiológicos no DNA plasmidial com radiações ionizantes de baixo LET**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2006, 158 p. Tese (Doutorado em Física) – Instituto de Física, São Paulo, 2006.

NORMAN, S. C. **Elements of Cytology**. second ed. Harcourt, Brace & World, Inc., 1969.

OKUNO, E.; YOSHIMURA, E. **Física das radiações**. São Paulo: Oficina de textos, 2010.

PALMIERI, M. J.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; TRENTO, M. V. C.; ELEUTÉRIO, M. W. F.; LUBER, J.; DAVIDE, L. C.; MARCUSSI, S. Cytogenotoxic effects of spent pot liner (SPL) and its main components on human leukocytes and meristematic cells of *Allium cepa*. **Water, Air & Soil Pollution**. v. 227, p. 156 – 166, 2016.

PESNYA, D. S.; ROMANOVSKY, A. V. Comparison of cytotoxic and genotoxic effects of plutonium-239 alpha particles and mobile phone GSM 900 radiation in the *Allium cepa* test. **Mutation Research**. v. 750, n. 1 – 2, p. 27 – 33, 2013.

PODGORSKAK, E. B. **Radiation oncology physics: a handbook for teachers and students**. Ed. IAEA. Vienna: International Atomic Energy Agency, 2005.

PONNAIYA, B.; JENKINS-BAKER, G.; BIGELOW, A.; MARINO, S.; GEARD, C. R. Detection of chromosomal instability in α -irradiated and bystander human fibroblasts. **Mutation Research**. v. 568, n. 1, p. 41 – 48, 2004.

REIS, G. B.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; MORAES, I. C.; CÉSAR, P. H. S.; MARCUSSI, S.; DAVIDE, L. C. Reliability of plant root comet assay in comparison with human leukocyte comet assay for assessment environmental genotoxic agents. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 142, p. 110 – 116, 2017.

REN, R.; HE, M.; DONG, C.; XIE, Y.; YE, S.; YUAN, D.; SHAO, C. Dose response of micronuclei induced by combination radiation of α -particles and γ -rays in human lymphoblast cells. **Mutation Research**. v. 741 – 742, p. 51 – 56, 2013.

RIBEIRO DA ROSA, L. A. Dosimetria termoluminescente aplicada à Física Médica. Departamento de Física Médica. **Instituto de Radioproteção e Dosimetria**. Rio de Janeiro. 2000.

SAGHIRZADEH, M.; GHARAATI, M. R.; MOHAMMADI, S.; GHIASSI-NEJAD, M. Evaluation of DNA damage in the root cells of *Allium cepa* seeds growing in soil of high background radiation areas of Ramsar – Iran. **Journal of Environmental Radioactivity**. v. 99, n. 10, p. 1698 – 1702, 2008.

SARAPUL'TZEV, B. I.; GERAS'KIN, S. A. **Genetic Basics of Radioresistancy and Evolution**. Energoatomizdat, Moscow, 1993.

SAX, K. The behavior of X-ray induced chromosomal aberrations in *Allium* root tip cells. **Genetics**. v. 26, n. 4, p. 418 – 425, 1941.

SENTHAMIZHCHELVAN, S.; PANT, G. S.; RATH, G. K.; JULKA, P. K.; NAIR, O. Biodosimetry using micronucleus assay in acute partial body therapeutic irradiation. **European Journal of Medical Physics**. v. 25, n. 2, p. 82 – 87, 2009.

SILVA, R. M. V.; BELINATO, W.; SANTOS, W. S.; SOUZA, L. F.; PERINI, A. P.; NEVES, L. P.; SOUZA, D. N. Low cost electron irradiator using $^{90}\text{Sr}+^{90}\text{Y}$ sources. **Radiation Physics and Chemistry**. v. 167, p. 108235, 2020.

SOUZA, S. O.; CARDOSO JÚNIOR, A. A.; SARMENTO, A. S. C.; d'ERRICO, F. Effectiveness of a UVC air disinfection system for the HVAC of an ICU. **The European Physical Journal Plus**. v. 137, p. 37, 2022.

STREFFER, C. Genomic instability induced by ionizing radiation. In: **International Radiation Protection Association Proceedings**, IRPA 10. Hiroshima, 2000.

TAKATSUJI, T.; TAKAYANAGI, H.; MORISHITA, K.; NOJIMA, K.; FURUSAWA, Y.; NAKAZAWA, Y.; MATSUSE, M.; AKAMATSU, S.; HIRANO, N.; HIRASHIMA, N.; HOTOKEZAKA, S.; IJICHI, T.; KAKIMOTO, C.; KANEMARU, T.; KOSHITAKE, M.; MORIUCHI, A.; YAMAMOTO, K.; YOSHIKAWA, I. Induction of micronuclei in germinating onion seed root tip cells irradiated with high energy heavy ions. **Journal of Radiation Research**, v. 51, n. 3, p. 315 – 323, 2010.

TANG, F. R.; LOGANOVSKY, K. Low dose or low dose rate ionizing radiation-induced health effect in the human. **Journal of Environmental Radioactivity**. v. 192, p. 32 – 47, 2018.

TAUHATA, L.; SALATI I. P. A.; DI PRINZIO, R.; DI PRINZIO, M. A. R. R. **Radioproteção e Dosimetria: Fundamentos**. Rio de Janeiro: IRD/CNEN, 2013.

TEDESCO, S. B.; LAUGHINGHOUSE IV, H. D. Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test. **Environmental Contamination**, 2012.

TESTA, A.; PALMA, V.; PATRONO, C. Dicentric chromosome assay (DCA) and cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay in the field of biological dosimetry. In: DHAWAN, A.; BAJPAYEE, M. (eds). Genotoxicity Assessment. **Methods in Molecular Biology**. v. 2031, n. 1, p. 105 – 119, 2019.

TKALEC, M.; MALARIC, K.; PAVLICA, M.; PEVALEK-KOZLINA, B.; VIDA KOVIC-CIFREK, Z. Effects of radiofrequency electromagnetic fields on seed germination and root meristematic cells of *Allium cepa* L. **Mutation Research**. v. 672, n. 2, p. 76 – 81, 2009.

TURNER, J. E. **Atoms, Radiation, and Radiation Protection**. Third, Completely Revised and Enlarged Edition, 2007.

ULANOVSKY, A. Dosimetry for animals and plants: contending with biota diversity. **Ann ICRP**. v. 45, n. 1 Suppl, p. 225 – 238, 2016.

UTSUNOMIYA, K. S.; BIONE, N. C. P.; PAGLIARINI, M. S. How many different kinds of abnormalities could be found in unique endogamous maize plant? **Cytologia**. v. 67, p. 169 – 176, 2002.

VAIJAPURKAR, S. G.; AGARWAL, D.; CHAUDHURI, S. K.; SENWAR, K. R.; BHATNAGAR, P. K. Gamma-irradiated onions as a biological indicator of radiation dose. **Radiation Measurements**. v. 33, n. 5, p. 833 – 836, 2001.

WALPOLE, R. E.; MYERS, R. H.; MYERS, S. L.; YE, K. **Introdução à Estatística**. 3ª ed. São Paulo: Cengage Learning, 2012.

XAVIER, M. N.; PANTALEÃO, S. M.; SCHER, R.; CIOLINI, R.; d'ERRICO, F.; SOUZA, S. O. *Allium cepa* used as a dosimetry system in nuclear and radiological emergencies. **The European Physical Journal Plus**. v. 136, p. 682, 2021.

XAVIER, M. N.; NOVAES, J. A. T.; SILVA, A. C. C.; ALVES, A. V. S.; SANTOS, M. J. B. A.; PANTALEÃO, S. M.; SCHER, R.; d'ERRICO, F.; SOUZA, S. O. Cytogenetic effects of β -particles in *Allium cepa* cells used as a biological indicator for radiation damages. **Journal of Environmental Radioactivity**. v. 259 – 260, p. 107109, 2023.

ZÖLZER, F.; SKALICKÁ, Z. F.; HAVRÁNKOVÁ, R.; HON, Z.; NAVRÁTIL, L.; ROSINA, J.; SKOPEK, J. Enhanced frequency of micronuclei in lymphocytes from current as opposed to former uranium miners. **Journal of Applied Biomedicine**. v. 9, n. 3, p. 151 – 156, 2011.

ANEXOS

Artigos publicados

Eur. Phys. J. Plus (2021) 136:682
<https://doi.org/10.1140/epjp/s13360-021-01674-8>

THE EUROPEAN
 PHYSICAL JOURNAL PLUS

Regular Article



Allium cepa used as a dosimetry system in nuclear and radiological emergencies

M. N. Xavier^{1,a} , S. M. Pantaleão², R. Scher³, R. Ciolini⁴, F. d'Errico^{4,5},
 S. O. Souza¹

¹ Department of Physics, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, SE, Brazil

² Department of Biology, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, SE, Brazil

³ Department of Morphology, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, SE, Brazil

⁴ School of Engineering, University of Pisa, Pisa, Italy

⁵ School of Medicine, Yale University, New Haven, CT, USA

Received: 10 January 2021 / Accepted: 15 June 2021

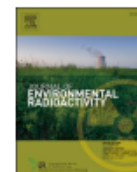
© The Author(s), under exclusive licence to Società Italiana di Fisica and Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

Abstract Effective provisions of preparedness and response are necessary to protect human life, health, property, and the environment in any nuclear and radiological emergency. Recently, the International Commission on Radiological Protection recognized the need to provide more quantitative guidance on environmental radiation protection to integrate these analyses. A required assessment is a correlation between dose and its effects in non-human biota. Plants are highly sensitive environmental monitors for the assessment of potentially genotoxic agents and avoid the controversial use of animal models. The *Allium* test is commonly used to assess genotoxicity for a wide variety of chemical and physical factors, as it allows for estimates of possible DNA damage in eukaryotes in general, including humans. In this work, onion (*Allium cepa*) seedlings were exposed to 20–200 mGy of α -radiation. We studied the possibility of using cytogenetic analyses of irradiated onion cells to determine the biological dose. It was observed that the increase in the frequencies of chromosomal aberrations, mitotic abnormalities, and micronuclei occurred proportional to the radiation dose, but a reduction in cytological damage was observed from 100 mGy, suggesting the onset of cytotoxic activity. Our research shows the potential of *Allium cepa* as a sensitive support system for dosimetry, detection, and screening of cellular effects produced by low doses of environmental radiation.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Environmental Radioactivity

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jenvrad

Cytogenetic effects of β -particles in *Allium cepa* cells used as a biological indicator for radiation damages

Magno Nogueira Xavier^{a,*}, July Anne Torres Novaes^a, Alef Cyntille Cavalcante Silva^a,
Anderson Vinicius Silva Alves^b, Maria José Bryanne Araujo Santos^c,
Silmara de Moraes Pantaleão^c, Ricardo Scher^d, Francesco d'Errico^{b,e},
Susana Oliveira de Souza^a

^a Departamento de Física, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, Brazil

^b School of Medicine, Yale University, New Haven, CT, USA

^c Departamento de Biologia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, Brazil

^d Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, Brazil

^e Scuola di Ingegneria, Università di Pisa, Pisa, Italy

ARTICLE INFO

Handling Editor: Nick Beresford

Keywords:

Beta radiation
Bioindicators
Higher plants
Ionizing radiation
Micronucleus
Non-human biota

ABSTRACT

Analysis of cytogenetics effects of ionizing radiation for flora and fauna is essential to determine the impact on these communities and may produce an efficient warning system to avoid harm to human health. Onion (*Allium cepa*) is a well-established *in vivo* standard model, and it is widely used in cytogenetics studies for different environmental pollutants. In this work, onion roots were exposed to 0.04–1.44 Gy of β -particles from a $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ source. We investigated the capacity of brief external exposures to β -particles on inducing cytogenetic damages in root meristematic cells of onion aiming to verify if onion can be used as a radiation-sensitive cytogenetic bioindicator. A nonlinear increase in the frequencies of chromosomal aberrations and cells with micronuclei was observed. Onion roots exposed to doses 0.13 Gy or higher of β -particles showed a significant difference ($p < 0.05$) in these frequencies when compared to the unirradiated group. The frequencies of these endpoints showed to be suitable to assess the difference in the dose of beta radiation received from 0.36 Gy. Our research shows the potential of using cytogenetic effects in *Allium cepa* cells as a biological indicator for a first screening of genotoxic damages induced by brief external exposures to β -particles.