

ANTONIO MARIO SAMPAIO MOURA

ESTUDO DAS ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS COMO INDICADORES DE DOSE
DE RADIAÇÕES IONIZANTES.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Esta-
dual de Campinas, para a obten-
ção do grau de Mestre em Ciên-
cias Biológicas, na área de Fi-
siologia.

Orientador: Prof. Dr. ERNESTO JOSÉ DOTTAVIANO

UNICAMP

AUTORIZAÇÃO PARA QUE A UNICAMP POSSA FORNECER, A PREÇO DE CUSTO, CÓPIAS DA TESE A INTERESSADOS

Nome do Aluno: ANTONIO MARIO SAMPAIO MOURA

Nº de Identificação:

Endereço para Correspondência: Unicamp - Deptº de Fisiologia e Biofísica

Curso: Ciências Biológicas - Área de Concentração em Fisiologia

Nome do Orientador: Dr. Ernesto José Dottaviano

Título da Dissertação ou Tese: Estudo das aberrações cromossômicas como indicadores de dose de radiações ionizantes.

Data proposta para a Defesa: 04/11/1983.

(O Aluno deverá assinar um dos 3 itens abaixo)

1) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas a partir desta data, a fornecer, a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou Tese a interessados.

13 / 10 83

Data


_____ assinatura do aluno

2) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas, a fornecer, a partir de dois anos após esta data, a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou Tese a interessados.

1 / 1
Data

_____ assinatura do aluno

3) Solicito que a Universidade Estadual de Campinas me consulte, dois anos após esta data, quanto à minha autorização para o fornecimento de cópias de minha Dissertação ou Tese, a preço de custo, a interessados.

1 / 1
Data

_____ assinatura do aluno

De acordo


_____ Orientador

Ao povo em geral, razão primeira de
toda atividade científica,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

São muitos e os fazemos com prazer.

Aos

Prof. Dr. ERNESTO JOSÉ DOTTAVIANO, pela orientação, auxílio e incentivo;

Prof. Dr. WALTER PINTO JUNIÓR, pela co-orientação, ajuda e discussões úteis;

Centro Regional de Radioterapia do Hospital Municipal "Dr. Mario Gatti", pelas instalações e equipamentos;

Laboratório de Citogenética "Dr. Walter Pinto Junior", pelas instalações e equipamentos;

Colegas do Centro Regional de Radioterapia e Nucleon Radioterapia e Física Médica, pelo incentivo;

Srtas. TILLY e ELIANA, pelo auxílio na preparação citogenética;

Srta. MARIA ELIDIA DOS SANTOS, pelos trabalhos de datilografia;

Voluntários doadores, pelo espírito científico e despreendimento;

E a todos aqueles que, de alguma forma colaboraram nesse trabalho e não foram citados, minhas excusas e meu muito obrigado.

ÍNDICE

	Pág.
INTRODUÇÃO	1
1. A física envolvida - radiações ionizantes - histó rico	2
2. Efeitos biológicos das radiações	3
3. Dosimetria das radiações	4
4. Aberrações cromossômicas	10
5. Objetivo do presente trabalho	17
MATERIAL E MÉTODOS	18
- Obtenção das amostras	20
- Cultura dos linfócitos	21
- Obtenção de metáfases a partir de cultura de leucó citos	23
- Contagem de aberrações	24
RESULTADOS	25
DISCUSSÃO	31
RESUMO E CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

INTRODUÇÃO

As radiações ionizantes desempenharam e ainda o fazem, papel relevante no aparecimento, evolução e existência das espécies vivas. Se imaginarmos um retorno ao mundo de dois milhões de anos atrás, na época do aparecimento da vida, provavelmente constataríamos que uma mistura de gases e vapor d'água, sob efeito das radiações, interagiram numa combinação feliz e puderam formar os precursores das moléculas biológicas, desencadeando o que viria, após um número infinitamente grande de tentativas, a se constituir nos primórdios da vida na Terra. Assim, as radiações contribuíram tanto para seu início como no processo de evolução das espécies. E nós, homens, frutos dessa evolução, com nosso raciocínio indutivo, descobrimo-la e instalamos uma nova seleção natural, modificamos alguns seres com objetivos estabelecidos, melhoramos nossas condições de vida, chegamos ao século XX (PAVAN & CUNHA, 1968).

E foi principalmente nesse século, o século das grandes invenções, que tivemos acesso ao interior da matéria. Descobrimos os átomos e seus constituintes, a energia do núcleo, as radiações e a radioatividade. Essas novas des

descobertas tiveram e têm as mais diversas aplicações nos mais variados ramos da atividade humana. O domínio da energia nuclear foi mais um passo na escala evolutiva do homem, importantíssimo, pois permitiu a introdução do diagnóstico e da terapêutica com radiações, da esterilização e da conservação de alimentos, da geração de energia e da criação dos engenhos de morte...

Cabe agora a nós, homens deste fim de século, fazermos com que se siga o caminho adequado na utilização das forças do átomo, pois, do uso correto ou não delas, provavelmente dependerá o futuro das espécies na Terra.

Imbuídos da esperança de que haja esse futuro, nos dispusemos a estudar uma parte do imenso campo das aplicações e efeitos de radiações, que descreveremos a seguir.

1. A física envolvida - radiações ionizantes - histórico.

Radiações ionizantes são aquelas que têm energia suficiente para arrancar elétrons dos átomos, produzindo assim, pares de íons. Podem ser de natureza eletromagnética, como os raios X, gama e ultravioleta, ou corpuscular, como os raios alfa, beta, prótons e neutrons acelerados (HALL, 1973).

Como sabemos, os raios X e as radiações alfa, beta e gama foram descobertos no início do século, e, logo em seguida, com a determinação das características e propriedades das radiações, estas acharam aplicação imediata na prática médica e nas pesquisas biológicas. Os raios X, devido à

sua capacidade de penetração em tecidos, foram inicialmente utilizados no diagnóstico. A seguir, dada a constatação de que eles eram capazes de destruir tecidos, passaram também a ser utilizados na terapia, em particular no câncer. Com a evolução da Física Nuclear, criaram-se novas máquinas geradoras de radiações, ampliando-se, assim, a faixa de seu uso. Os ciclotrons e betatrons em 1935, os reatores nucleares em 1950, os aceleradores lineares em 1955 foram permitindo o uso de novas energias de radiação e a obtenção de radionuclídeos artificiais com aplicações imediatas seja em terapia ou diagnóstico, (JOHNS & CUNNINGHAM, 1974).

Atualmente se dispõem de um número grande de aparelhos capazes de realizar procedimentos diagnósticos e terapêuticos de forma incomparavelmente melhor e mais segura do que no início, a ponto da imagenologia ser considerada o ramo da medicina que mais evoluiu nos últimos anos.

2. Efeitos biológicos das radiações

Como citamos, as radiações têm a capacidade de penetrar e ionizar tecidos. Essas ionizações fazem com que haja alterações químicas nas moléculas constituintes da matéria viva. Tais alterações químicas, dependendo da sua intensidade e da região celular atingida, podem levar a danos celulares de intensidade variável e até a morte celular.

Resultados de pesquisas indicam como provável alvo primário das radiações o núcleo celular e, nessa organela, os cromossomos como sítio mais sensível. Assim a

morte ou as alterações celulares devem advir de danos impostos aos cromossomos, provavelmente através de quebras e alterações nas grandes moléculas de DNA. O fato de que as alterações dos cromossomos são as principais responsáveis pelos danos celulares faz com que seu estudo tenha enorme importância na avaliação dos efeitos das radiações (DARYMPLE *et alii*, 1973; HALL, 1974).

Os danos das radiações dependem de um grande número de variáveis físicas e biológicas.

Assim, por exemplo, a quantidade de radiação (dose), o tipo, o tempo em que é imposta, bem como a espécie de tecido irradiado, a sua oxigenação e a fase das células no ciclo celular são alguns dos fatores que interferem com o efeito das radiações.

Além disso, os tecidos irradiados alteram as suas propriedades mitóticas e o seu estado metabólico, passando, inclusive, por processos de reparo dos danos impostos pelas radiações, o que torna difícil estabelecer com precisão os mecanismos de morte e recuperação celular.

3. Dosimetria das radiações.

O conhecimento da quantidade de radiação, sua energia, rendimento e características geométricas do feixe irradiante são fatores essenciais para a compreensão dos efeitos biológicos das radiações, uma vez que podem ser quantificadas.

Em 1928, foi definida pela "International Commission on Radiation Protection and Units" (ICRU) a pri-

meira unidade de medida de radiações, o Roentgen, que corresponde à quantidade de radiação necessária para produzir uma unidade eletrostática de carga em um volume de 1 cm^3 de ar seco.

Em 1956, a mesma entidade definiu o Rad, uma medida da quantidade de radiação absorvida pelos tecidos, estabelecida como a quantidade de radiação que libera 100 ergs de energia por grama de tecido irradiado.

O Rad surgiu da impossibilidade de se medir a exposição em roentgens para radiações de alta energia eletromagnética e para quaisquer radiações corpusculares. Atualmente, a unidade de radiação mais usada é o rad, apesar de o ICRU já recomendar a utilização do Gray, unidade do sistema MKS que equivale à liberação de energia de um joule/kilograma ($1 \text{ GRAY} = 100 \text{ RADS}$).

Além das unidades citadas, existem outras, que levam em conta o efeito biológico dos vários tipos de radiações, como o Radiation Equivalent Mammals (REM), ou o efeito do esquema de irradiação usando o Radiation Equivalent Tissue (RET), (SCAFF, 1979).

Para satisfazer as necessidades do conhecimento da quantidade da energia das radiações liberadas pelas várias fontes de radiações, foram desenvolvidos vários dosímetros que descrevemos a seguir.

a) Dosímetros Físicos: baseiam-se no fenômeno da ionização em gases, como as câmaras de ionização e os contadores tipo Geiger-Müller; na cintilação de cristais como o NaI ou na emissão termoluminiscente como o LiF, entre outros. O mais preciso deles é o que se utiliza da ionização de gases e os padrões de doses são estabelecidos em câmaras

de ionização, (ATTIX *et alii*, 1966).

b) Dosímetros Químicos: baseiam-se na produção de reações químicas induzidas por irradiações, como a impressão de películas radiográficas ou a redução de óxido férrico a ferroso em soluções aquosas, para citar alguns, (ATTIX, *et alii*, 1966).

c) Dosímetros Biológicos: um dosímetro biológico é um componente de um sistema biológico que submetido às radiações ionizantes tem uma resposta dose dependente predizível. Por isso, qualquer parâmetro biológico para o qual uma curva dose-resposta possa ser demonstrada, é "um dosímetro" potencialmente útil para o estabelecimento da quantidade de radiação imposta nos casos onde ela não é conhecida. Os intervalos de confiança, contudo, variam entre os sistemas conhecidos.

O desenvolvimento de sistemas adequados de dosimetria biológica é importante na medida em que melhora as condições de se reconhecer e tratar, por exemplo, as vítimas de acidentes radioativos. Um sistema biológico é sempre "transportado" pelo usuário de radiações, e isso é importante, uma vez que na grande maioria dos acidentes radioativos, o dosímetro físico estava em outro lugar no momento do acidente. Tal dosímetro, deslocando-se com a pessoa, torna desnecessário assumir posições durante uma exposição accidental (depois que as medidas físicas em maquetes indicarem os níveis de dose na região do acidente). Devido à natureza desses sistemas biológicos, eles são difíceis ou impossíveis de falsificar. Algumas vezes indivíduos apresentam um dosímetro físico com alta dose e reclamam disso. A ava-

liação dos sistemas biológicos pode rapidamente estabelecer se o dosímetro foi intencionalmente exposto. No caso de de sastres devido a explosões termonucleares, o dosímetro bio lógico seria o único meio prático de avaliar a provável ex posição de indivíduos da população em geral frente às radia ções. A avaliação clínica e o estabelecimento dos vários graus de injúria seria necessária para separar dentre os in divíduos expostos aqueles que seriam medicados e os que po deriam perfazer trabalho útil, (BOONE, 1966).

Dentre os vários dosímetros biológicos possíve is de serem desenvolvidos, podemos nos referir à queles que se utilizam de contagens diferenciais dos com ponentes do sangue, estudo da ativação de alguns componentes orgâni cos que venham a tornar-se radioativos no caso de exposição a neutrons (como ^{24}Na , ^{32}P) ou o estudo de catabolitos uri nários como creatinina e a creatina, entre outros.

Contudo, o estudo das aberrações cro ssômicas em linfócitos do sangue periférico parece ser o melhor método biológico para determinação da dose a que os pacien tes foram expostos (BOONE, 1966).

O método de observações cro ssômicas apre senta uma relação precisa de dose-resposta, é pouco influen ciável por fatores extrínsecos ou intrínsecos não relaciona dos com as radiações e independe do tipo de radiação.

Segundo VULPIS (1975), os linfócitos do san gue periférico oferecem as seguintes vantagens para o estu do das aberrações cro ssômicas:

a) permitem a obtenção de um número de célu las suficientemente elevado, a partir de poucos mililitros

de sangue periférico;

b) uma parte deles, mais precisamente os linfócitos T, respondem a estimulação com fitohemaglutinina - (PHA) e, portanto, constituem uma boa fonte de mitoses para análise;

c) constituem uma população celular sincronizada no estágio G1 (ou G0) da interfase e, em condições normais, raramente entram em processo proliferativo "in vivo", não estando sujeitos a alterações de sensibilidade com o ciclo celular;

d) têm uma longa vida média e, por isso, a pós certo tempo de exposição não se deve verificar redução no número de células portadoras de aberrações. A propósito, segundo NORMAN *et alii* (1966), a vida média dos linfócitos é da ordem de 788 ± 98 dias, enquanto que BUCKTON *et alii* (1977) falam em 1574 dias. Na verdade, não é possível estabelecer com precisão o tempo de vida dos linfócitos com aberrações, uma vez que PENDIC *et alii* (1980) observaram aberrações radio induzidas 19 anos após o acidente do reator Vinca na Iugoslávia. Observação semelhante foi constatada em sobreviventes das explosões atômicas de Hiroshima e Nagasaki, que apresentam aberrações cromossômicas até hoje (BLOOM *et alii*, 1966). A despeito de PANT & KAMADA (1977) terem observado aberrações cromossômicas induzidas em sangue normal pelo plasma de indivíduos expostos, tal observação não invalida a sugestão de BOONE (1966) que sugere o prazo de até 4 ou 5 semanas após a exposição para que não haja alterações significativas no número de aberrações radioinduzidas, tempo em que se deve perfazer as culturas com interesses

ses dosimétricos;

e) a incidência de aberrações espontâneas se melhantes às radioinduzidas é raríssima, tornando o método bastante seletivo. Na verdade, algumas drogas citostáticas, bem como certos agentes químicos, são radiomiméticas no tocante às aberrações cromossômicas, constituindo-se numa das limitações do método (PERRY & EVANS, 1975).

Historicamente, a citologia das radiações é uma das mais velhas atividades desenvolvidas na radiobiologia. No início do século, observações em plantas mostraram que irradiações ionizantes produzem danos nos cromossomos. Assim, SAX (1938) publicou pela primeira vez trabalhos com *Tradescantia* em Harvard. Nas duas décadas seguintes, SAX & GUILLES (1954), entre outros pesquisadores, efetivaram muitos outros trabalhos com plantas para examinar o efeito de vários fatores físicos e biológicos na produção de alterações. Esses fatores incluíam dose, taxa de dose, qualidade de radiação, idade no ciclo celular, temperatura e oxigenação, entre outros.

Em 1946, LEA propôs a teoria de que as que bras cromossômicas eram causadas, possivelmente, por várias ionizações produzidas por uma partícula ionizante quando pas sava através do cromossomo ou cromátide. A melhoria das téc nicas de cultura celular e de preparação de lâminas possibilitaram o exame de células humanas e, no final da década de 1950, a identificação dos 46 cromossomos. Contudo, o grande passo foi dado em 1960, quando MOORHEAD *et alii* publicaram um método para estimular linfócitos sanguíneos periféricos a se desenvolverem "in vitro". Devido a disponibilidade dos linfócitos e a facilidade com que eles podem ser cultivados,

essas células tornaram-se o material de escolha para muitos estudos de cromossomos humanos. As anormalidades no número e na estrutura dos cromossomos tornaram-se detectáveis, se bem que, inicialmente, apenas modificações grosseiras pudessem ser observadas.

Durante os últimos anos, avanços importantes foram obtidos nas preparações, que possibilitaram observações de outros rearranjos no material genético. Tais técnicas, como a produção de bandas Q (CASPERSSON *et alii*, 1970); bandas G (SUMMER, EVANS & BUCKLAND, 1971; SUMMER, 1972), bandas R (DUTRILLAUX & LEJEUNE, 1971), coloração arlequim (PERRY & WOLFF, 1974) abriram a possibilidade de se obter novas formas de aberrações estáveis para análise. Para citar alguns casos, PENDIC *et alii* (1980) usaram bandeamento G nos seus estudos com os expostos ao Reator Vinca; BRANDOM *et alii* (1978) estudaram os mineiros de urânio com banda G, SAVAGE & BIGGER (1978) o fizeram em aberrações obtidas de cultura de pele. Contudo, devido à peculiaridade das aberrações cromossômicas encontradas com radiação, a técnica original de MOORHEAD (1960), usando coloração Giemsa, continua a ser a mais usada mundialmente.

4. Aberrações cromossômicas

As aberrações provocadas por irradiação, sejam do tipo cromossômico, ou cromatídico, são observadas na primeira divisão mitótica do linfócito.

As aberrações cromossômicas são produzidas após as irradiações durante a fase inicial do ciclo celular,

de modo que o dano é duplicado na fase de síntese proteica, no estágio (S) e expresso na metáfase como dano simétrico envolvendo ambas cromátides.

As aberrações cromatídicas são produzidas por irradiação após o cromossomo haver se dividido em duas cromátides no estágio S ou G₂ e são assimétricas. Tal quebra em uma cromátide pode ser replicada no próximo estágio S se a célula estiver hábil para passar por outro ciclo celular. As aberrações simétricas produzidas através de danos cromatídicos são conhecidas como aberrações cromossômicas derivadas.

Quando se irradia um tecido onde há ocorrência de divisões celulares, são observadas aberrações cromatídicas e cromossômicas. No caso dos linfócitos, para fins práticos, tais células estão em intérfase "in vivo", de modo que somente aberrações do tipo cromossômicas são induzidas, o que leva os autores a discutirem apenas as aberrações desse tipo.

Nas Figuras 1 e 2 estão esquematizadas as aberrações do tipo troca cromossômica e inter cromossômica, respectivamente. No estágio G₁ o material cromossômico consiste de uma cadeia única de DNA, que pode ser quebrada por ionizações produzidas pela passagem de partículas carregadas ou próximas dos cromossomos. As partículas carregadas, geradas por raios X, são elétrons que têm baixa Transferência Linear de Energia (L.E.T.) e, portanto, ionizam pouco, enquanto que partículas pesadas, como prótons, que estão associadas com absorção de neutrons, têm alto L.E.T. e podem produzir um número maior de aberrações cromossômicas do que os elétrons.

INTERFASE (G ₁)						
METAFASE						
	NORMAL	RELAÇÃO TERMINAL	INVERSÃO PA RICÊNTRICA	DELEÇÃO INTERSTIC.	ANEL ACÊNTRICO	ANEL CENT. + FRAGMENT

FIGURA 1 - Ilustração das aberrações tipo cromossômicas intratrocas.

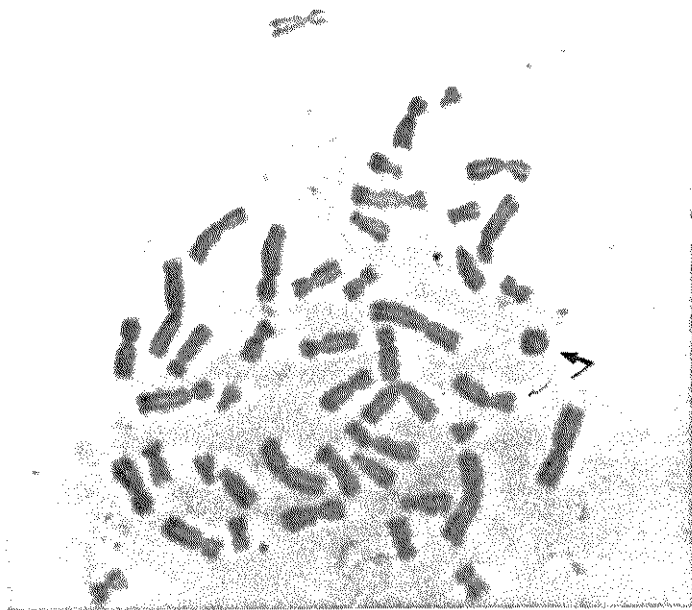


FIGURA 1a. - Fotomicrografia de uma metafase. (A seta mostra um anel).

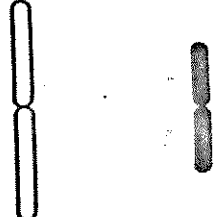
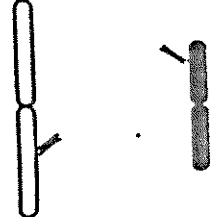
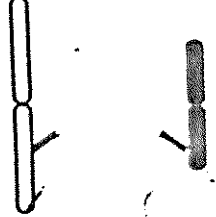
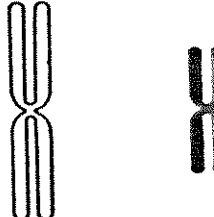
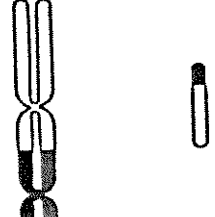
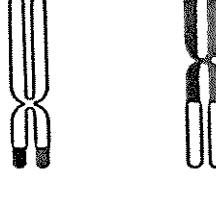
INTERFASE (G_1)			
METAFASE			
	NORMAL	DICÊNTRICO + FRAGMENTO	TRANSLOCAÇÃO RECÍPROCA

FIGURA 2 - Ilustração das aberrações tipo cromossômicas intertrocas.

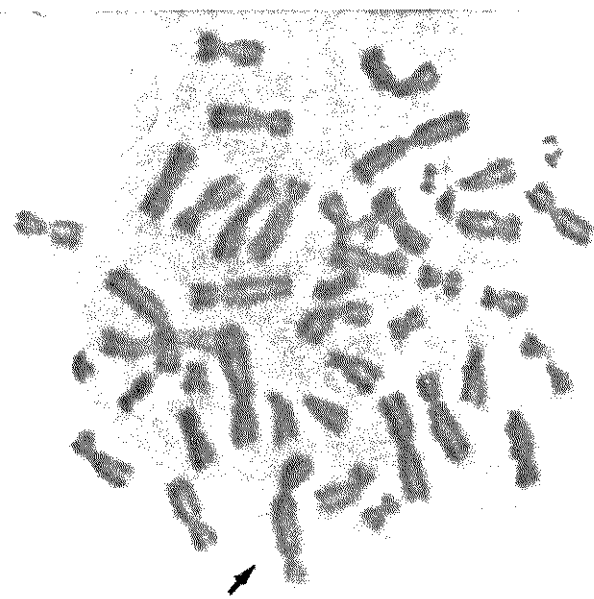


FIGURA 2a. - Fotomicrografia de uma metáfase. (A seta mostra um dicêntrico).

As aberrações cromossômicas podem ser divididas em duas categorias: as aberrações estáveis, que podem se transmitir por divisões repetidas, e as instáveis, nas quais o material cromossômico não se divide igualmente entre as células filhas, de modo que essas novas linhagens celulares eventualmente morrem.

As aberrações estáveis são representadas pela inversão pericêntrica e paracêntrica e pela translocação. Tais alterações são difíceis de serem observadas nas preparações convencionais e apesar de isso ser possível com o uso de técnicas de produção de bandas cromossômicas, a contagem é difícil e demorada.

Nas aberrações instáveis pode haver perda de material cromossômico, quando células com aberrações instáveis vão para mitose. As peças acêntricas não se ligam ao fuso e não se dividem igualmente entre as células filhas, enquanto que os dicêntricos formam pontos anafásicos. Essas aberrações instáveis são particularmente úteis na análise de dano radio-induzido, porque são facilmente observáveis na metáfase. Elas são usualmente classificadas em três tipos:

1) Dicêntrico mais fragmento: Aparecem quando há quebra em dois cromossomos que se reúnem formando uma estrutura com dois centrômeros mais um fragmento acêntrico. Ocasionalmente, mais do que dois cromossomos podem ser envolvidos, havendo a formação de aberrações policentroméricas. Os dicêntricos têm uma ocorrência natural de 1 em 3000 células de pessoas não irradiadas, constituindo-se, por isso, na mais importante aberração para determinação de dose

de radiação. Além disso, a presença de dois centrômeros faz com que os mesmos sejam facilmente distinguíveis, enquanto que o fragmento acêntrico serve como uma confirmação.

2) Anel mais fragmento: Quando duas quebras ocorrem no mesmo cromossomo, o reagrupamento incorreto pode resultar na formação de um anel mais o fragmento acêntrico. Como a formação do anel é semelhante à do dicêntrico, eles podem ser combinados na análise das doses de radiação.

3) Acêntrico: As deleções terminais, as intersticiais e os anéis acêntricos são classificados nesse grupo. Podem ocorrer separadamente ou em associação com dicêntricos e anéis cêntricos, mas não é possível distinguí-los, daí serem classificados juntos.

Para efetuar a observação das aberrações cromossômicas citadas sob microscopia óptica, é necessário a visualização dos cromossomos no estágio metafásico do ciclo celular, havendo, então, a necessidade de cultivar os linfócitos periféricos até a metáfase, com técnicas especiais.

O referido método é utilizado com frequência em praticamente todos os laboratórios de citogenética de radiações. As mais importantes curvas "in vitro" para dosimetria de radiações foram estabelecidas nos laboratórios do "National Radiation Protection Board" em Harwell, por DOLPHIN & LLOYD (1973); LLOYD & PURROTT (1974) e PURROTT *et alii*, (1975). VULPIS (1975), trabalhando no "Centro de Studi Nucleari" estabeleceu curvas semelhantes, enquanto KIRSCH-VOLDERS & SUSANNE (1977) e LEONARD (1978) trabalharam com aberrações para dosimetria na Bélgica, assim como

SCHWARZACHEN (1979) na Áustria e KIM (1979) na Coréia, também estabeleceram curvas similares para rotina de dosimetria biológica.

PANT *et alii* (1976) e PANT *et al* (1977) estudaram aberrações cromossômicas nos sobreviventes das explosões atômicas, da mesma maneira que SULLIVAN (1980) em Oklahoma.

KIRSCH-VOLDERS *et alii* (1977) estudaram aberrações cromossômicas em fetos irradiados, enquanto que TANZARELLA *et alii* (1979) estudaram alterações das trocas cromatídicas secundárias das irradiações utilizando 5-Bromodeoxiuridina.

LLOYD *et alii* (1978) também estabeleceram os efeitos produzidos por irradiação de Cf-252, emissor de neutrons que vem sendo introduzido na clínica oncológica e SCHMID *et alii* (1980) estudaram aberrações produzidas por feixes de neutrons, enquanto que PURROT (1978) levantou as curvas de calibração para mesons π^+ .

PENDIC *et alii* (1966) estudaram as aberrações nas pessoas irradiadas no acidente do reator nuclear de Vinca, Iugoslávia e BENDER (1978) publicou um trabalho sobre o estágio da dosimetria biológica na indústria nuclear.

BUCKTON *et alii* (1978) e KEMMER *et alii* (1978) estudaram aberrações cromossômicas em pacientes submetidos a radioterapia, enquanto que PROSSER & PRISEMAN (1980) estudaram a influência dos radiosensibilizantes.

Na área de radiação ambiental, POHL-RÜLING e FISCHER (1979) estudaram a relação dose efeito em popula

ções submetidas a radiação de fundo ("back-ground") aumentada.

5. Objetivo do presente trabalho.

Tendo em vista o uso crescente das fontes de radiação no nosso meio, seja na indústria, medicina ou pesquisa, e na ausência de um sistema dosimétrico biológico incorporado à rotina das instituições que perfazem esse tipo de atividade, o objetivo deste trabalho é estabelecer nas nossas condições de trabalho e laboratório, um sistema dosimétrico, que utilizando-se das aberrações cromossômicas produzidas nos linfócitos do sangue periférico, seja capaz de servir como referência para a estimativa da dose imposta a indivíduos submetidos as radiações.

A partir da experiência adquirida no nosso meio e usando a tecnologia desenvolvida nos laboratórios de citogenética do doutor Walter Pinto Junior, nos dispusemos a estudar as aberrações cromossômicas somáticas como indicadores de dose, tendo em vista as já citadas vantagens desse método.

MATERIAL E MÉTODOS

Nos refiriremos inicialmente ao método desenvolvido nos laboratórios do "National Radiological Protection Board", em Harwell, por PURROTT *et alii* (1975), o qual é, em princípio, usado por todos os laboratórios de radiogenética.

Basicamente, necessitamos obter uma curva de calibração do tipo "DOSE x Nº ABRERRAÇÕES POR CÉLULA", que é traçada a partir de dados extraídos da irradiação de sangue "in vivo".

As curvas obtidas devem ser comparadas à da literatura para verificar a precisão do método e em seguida serem testadas em indivíduos expostos a doses conhecidas de radiações.

Irradiação das Amostras

Escolhemos dois tipos de radiações: as gama, produzidas pelo Co-60 e os raios X de energia 200 Kv já que essas radiações estão disponíveis em nosso meio. Além disso, a energia de 200 Kv de raios X (com camada semiredu-

tora igual a 2mm Cu) é tida como padrão em radiobiologia, e sua Eficácia Biológica Relativa (RBE), é igual a unidade. As radiações X de baixa energia, utilizadas no diagnóstico (desde 30 até 150 Kv), bem como na terapia (de 30 até 300 Kv), comportam-se de forma semelhante à energia por nós utilizada, no tocante aos efeitos biológicos produzidos, (HALL, 1973).

A maioria dos serviços de radioterapia do mundo dispõe de unidades de Telecobaltoterapia ou aceleradores lineares de baixa e média energia (com RBE semelhante ao Co - 60). Além disso, os radionuclídeos usados na indústria são principalmente os emissores gama (Co-60; Cs-137 e Ir-192), com propriedades semelhantes no tocante a sua eficácia biológica. Daí a escolha do Co-60 para a curva de calibração. Não utilizamos de neutrons para obtenção de uma terceira curva por não dispormos dos mesmos.

As radiações gama foram obtidas de uma unidade de Telecobaltoterapia marca "Atomic Energy of Canada Limited" (A.E.C.L.), modelo "Theratron - 780" do Hospital Municipal "Dr. Mario Gatti", Campinas. Essa unidade dispõe de uma fonte de Co-60 com 4760 curies o que permite um rendimento de 124,7 Rad/min a 80 cm de distância entre a fonte e a superfície, (DFS).

As radiações X foram obtidas de uma Unidade de Radioterapia convencional marca "Siemens" modelo "Stabilipan" do mesmo Hospital. Essa unidade tem um rendimento de 49,3 Rad/min a 40 cm de DFS quando se usa a energia de 200 Kv, filtro (Sb + Cu + Al), com camada semi-redutora igual a 2,0 mm Cu.

As doses de radiação para ambas as energias foram fixadas em 70, 100, 130, 150 e 200 rads, calculadas segundo está estabelecido em "Physics of Radiology" (JOHNS e CUNMIGNAM, 1974). Antes da utilização, os aparelhos foram dosados segundo as normas estabelecidas pela Comissão Nacional de Energia Nuclear. Como as amostras foram irradiadas nas próprias seringas de colheita de sangue, o cálculo foi feito na metade do diâmetro ântero-posterior das mesmas, o que impôs uma variação de dose menor que 1,5% no volume irradiado. Tomamos o cuidado de homogeneizar a dose usando para tanto material adequado. Os materiais utilizados foram "Temex r" e acrílico, de comprovada similaridade com o tecido.

O sistema contendo a amostra e o homogeneizador ficava encerrado em recipiente de isopor fechado, uma vez que havia necessidade de controlar a temperatura das amostras.

Obtenção das amostras

Foram utilizados doadores escolhidos ao acaso, em número de 10, com a condição de que nunca tivessem se submetido a terapia com radiações ionizantes ou citostáticos, nem se envolvido em exposições ou acidentes com os diversos poluentes químicos (como inseticidas, por exemplo).

A colheita de sangue foi feita em seringas plásticas de 5 ml descartáveis da mesma marca, heparinizadas (Liquemine Roche), tomando-se, nessa fase, as devidas

precauções para não contaminar o material. O volume de sangue colhido por amostra foi fixado em 3 ml. Após a colheita o sangue foi armazenado em uma estufa bacteriológica a 37°C até a irradiação, que foi feita, no máximo, 15 min após a colheita. Durante a irradiação, as amostras estavam contidas em recipiente de paredes isolantes (isopor) a fim de manter-se estável a temperatura do sangue. A espessura das paredes do isopor era de 1 cm, o que, devido ao seu baixo coeficiente de absorção, não altera a dose calculada.

Na irradiação usou-se um feixe que englobava todas as amostras procedendo-se a retirada de cada uma delas assim que a dose requerida fosse completada. Assim, coloca - mos as cinco seringas sob o feixe e submetemo-las a 70 rads. Em seguida retiramos uma, identificamos e retornamos a estufa, impondo nas outras 4 mais 30 rads, totalizando os 100 rads para a segunda seringa, e assim sucessivamente. Tal procedimento teve como finalidade minimizar o erro de cálculo de dose e o tempo de permanência das amostras fora da estufa. Após a irradiação, as amostras foram deixadas por 2 horas na estufa a 37°C, sendo, em seguida, retiradas e envia-das para a semeadura de cultura. Durante todos os procedimentos referidos, uma seringa com sangue não foi irradiada, servindo como controle de valor de dose zero.

Cultura dos linfócitos

Para obtenção das metáfases, utilizamos o método baseado no trabalho original de MOORHEAD *et alii*, (1960), modificado por BEIGUELMAN (1977) que descrevemos sucintamen-

te a seguir:

Obtenção de metáfases a partir de cultura de leucócitos

Para a cultura são suficientes 10 a 15 gotas de sangue heparinizado (Liquemine - Roche). A colheita do sangue é feita em seringa esterilizada, com paredes heparinizadas, cujo êmbolo é fixado com esparadrapo e munida de agulha coberta com protetor, facilitando o transporte para o laboratório. O tempo decorrido entre a colheita e a transferência para o meio da cultura pode ser de várias horas ou até dias, sendo a seringa mantida a temperatura ambiente.

Não existe necessidade de sala especial para a colheita do sangue, mas é imprescindível que se faça assepsia do local onde é feita a punção venosa, podendo se utilizar para tanto álcool a 70%.

O tubo ou frasco com meio de cultura (RPMI) no qual foram inoculadas as gotas de sangue heparinizado, foi mantido em estufa a 37°C durante 72 horas, visto que é nesse período que a taxa de mitose entre os linfócitos é máxima. Após esse tempo, acrescentou-se 0,1 ml de colchicina $4 \times 10^{-5}M$ ao meio de cultura. Isso feito, a incubação continuou por mais 2 horas, ao término das quais o conteúdo do frasco ou tubo foi centrifugado a 800 Rpm por 5 minutos.

Após desprezar o sobrenadante, as células foram submetidas a hipotonia, acrescentando-se lentamente ao sedimento 3 ml de solução de KCl a 0.075M aquecido a 37°C. Ressuspendeu-se a solução delicadamente e, em seguida, o tubo voltou a estufa por mais 8 minutos.

A hipotonia foi seguida da fixação das células

las, o que foi feito centrifugando-se o tubo por 5 minutos a 800 Rpm, depois desprezou-se o sobrenadante e aspirou-se o sedimento celular, em uma pipeta Pasteur. Esse sedimento foi gotejado ao mesmo tubo depois que nele foram pipetados 3 ml de fixador (metanol - ácido acético glacial, 3:1). As células foram ressuspensas no fixador e o tubo novamente centrifugado a mesma rotação por 5 minutos, repetindo-se o mesmo ciclo de operações por 2 vezes com o fixador.

Após a última centrifugação não se esgotou o fixador, mas preservou-se 0,5 ml dele sobre o sedimento celular, a fim de poder preparar uma suspensão concentrada de células.

Assim, as células fixadas estavam prontas para serem distribuídas em lâminas limpas.

A coloração foi obtida banhando-se as lâminas durante 10 a 20 minutos em solução de corante Giemsa a 3% em tampão Sørensen com pH 6.8. A lavagem foi feita em água corrente, e a secagem realizada ao ar.

Contagem de aberrações

Uma vez obtidas as lâminas com os cromossomos metafásicos, procedeu-se à sua contagem no microscópio. Para tanto, utilizamos um aparelho marca "Zeiss", modelo II, com câmara clara.

Foram analisadas três lâminas de cada amostra, e, conseqüentemente, de cada dose, procurando-se proceder a contagem de 100 metáfases em cada lâmina. Como citamos anteriormente, nos detivemos à observação das aberrações cromossômicas instáveis dicêntricas e anéis, desprezando as que

bras cromossômicas.

Na anotação das dicêntricas, tomou-se o cuidado de localizar sempre o fragmento associado para eliminar a possibilidade de falso positivo, enquanto que, pelo mesmo motivo, procurou-se o fragmento nos anéis.

As irradiações foram repetidas duas vezes e os novos resultados adicionados aos anteriores, estabelecendo-se os valores médios de cada ponto estudado.

Em seguida, a partir dos dados obtidos, traçamos as curvas das variáveis: dose de radiação X número de aberrações cromossômicas por célula.

As curvas foram ajustadas por parábolas de mínimos quadrados, enquanto que os limites de confiança foram obtidos aplicando-se o teste "t" de Student como tratamento estatístico.

RESULTADOS

Após a obtenção dos dados pela contagem das me táfases, construímos a Tabela I onde relacionamos a dose de radiação e as aberrações obtidas para os raios X de 200 Kv.

TABELA I
Aberrações induzidas por Raios X de 200 Kv.

Dose (rads)	Nº de Anéis e dicêntricos / cel.	Desvio padrão
0	0	-
70	0,060	$\pm 0,0080$
100	0,10	0,010
130	0,16	0,015
150	0,19	0,025
200	0,34	0,030

Com os valores da Tabela I construímos o Gráfico da Figura 3. Com o ajuste estatístico da curva obtivemos uma parábola do tipo:

$$Y = \alpha D + \beta D^2 \quad (\text{equação 1}) \quad \text{onde:}$$

Y = Rendimento de aberrações para RX 200 Kv

D = Dose de Raios X 200 Kv

α e β = Constantes.

O cálculo dos coeficientes α e β propiciam os seguintes valores:

$$\alpha = 3,5 \times 10^{-4}$$

$$\beta = 6,4 \times 10^{-6}$$

Na Tabela II apresentamos uma estimativa dos intervalos de confiança para as doses utilizadas de raios X.

TABELA II

Limites de confiança de 95% para os dados obtidos com raios X de 200 Kv.

Dose corpo total (rads)	Limites de confiança (rads)
70	40 - 100
100	60 - 133
130	95 - 165
150	128 - 180
200	157 - 220

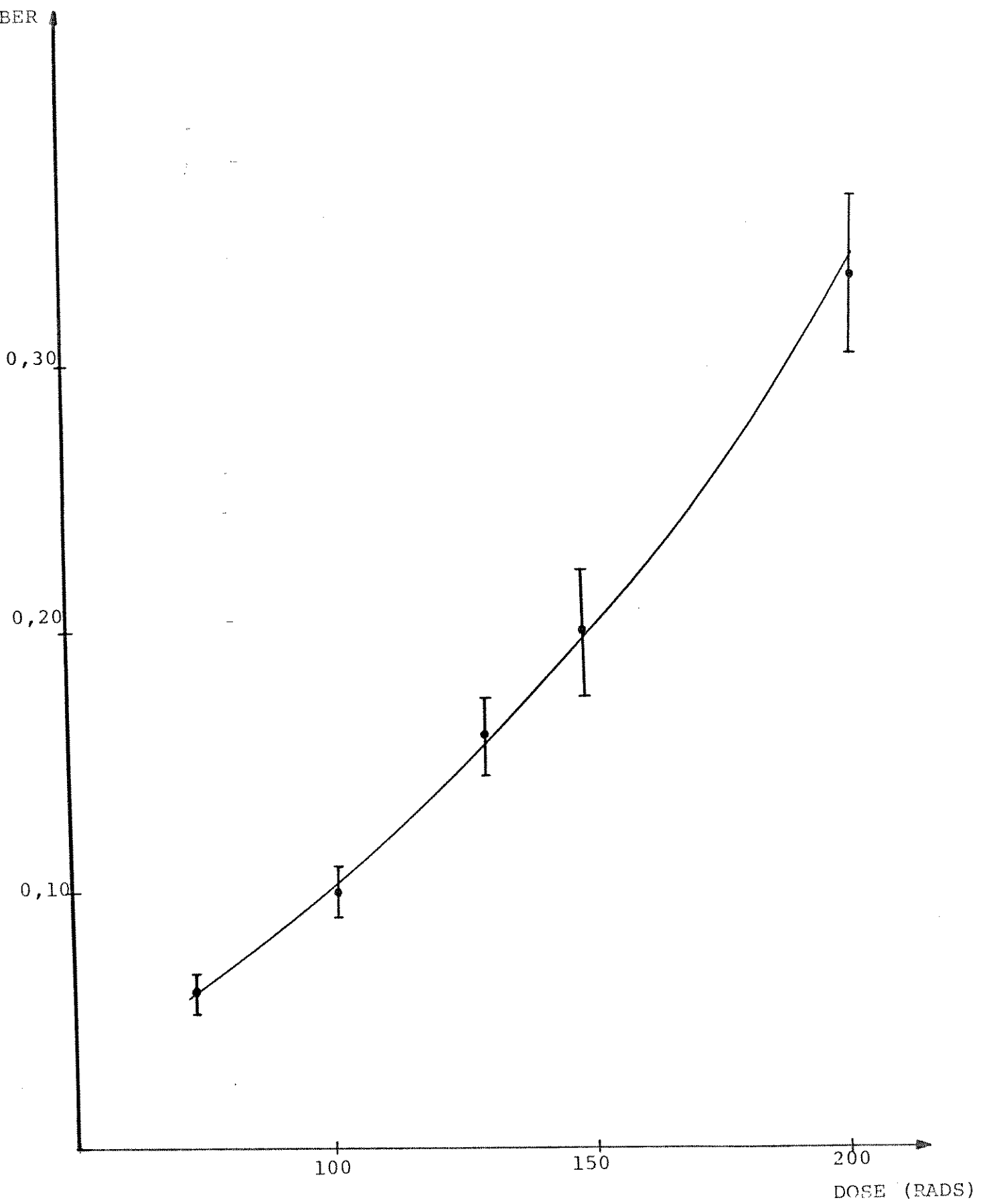


FIGURA 3 - Correlação entre o número de aberrações por célula com a dose de Raios X utilizada.

Com os dados obtidos na contagem das aberrações por Co-60, construímos a Tabela III abaixo.

TABELA III

Aberrações induzidas por raios de Co-60.

Dose	Nº de Anéis e Dicêntricos / cel.	Desvio padrão
0	-	-
70	0,040	0,010
100	0,070	0,017
130	0,11	0,020
150	0,15	0,025
200	0,23	0,030

A partir desses valores, traçamos o Gráfico da Figura 4, onde pudemos construir uma parábola do tipo descrito na equação 1, ou seja:

$$Y' = \alpha D + \beta D'^2 \quad (\text{equação 2}) \quad \text{onde:}$$

Y' = Rendimento de aberrações para raios de X de Co-60;

D' = Dose de raios X de Co-60;

α' e β' = Constantes

Agora os valores obtidos para α' e β' são os seguintes.

$$\alpha' = 2,2 \times 10^{-4}$$

$$\beta' = 4,8 \times 10^{-6}$$

A Tabela IV mostra os limites de confiança para as doses utilizadas de raios gama.

Dose corpo total (rads)	Limites de confiança (rads)
70	0 - 110
100	55 - 135
130	80 - 165
150	105 - 185
200	160 - 230

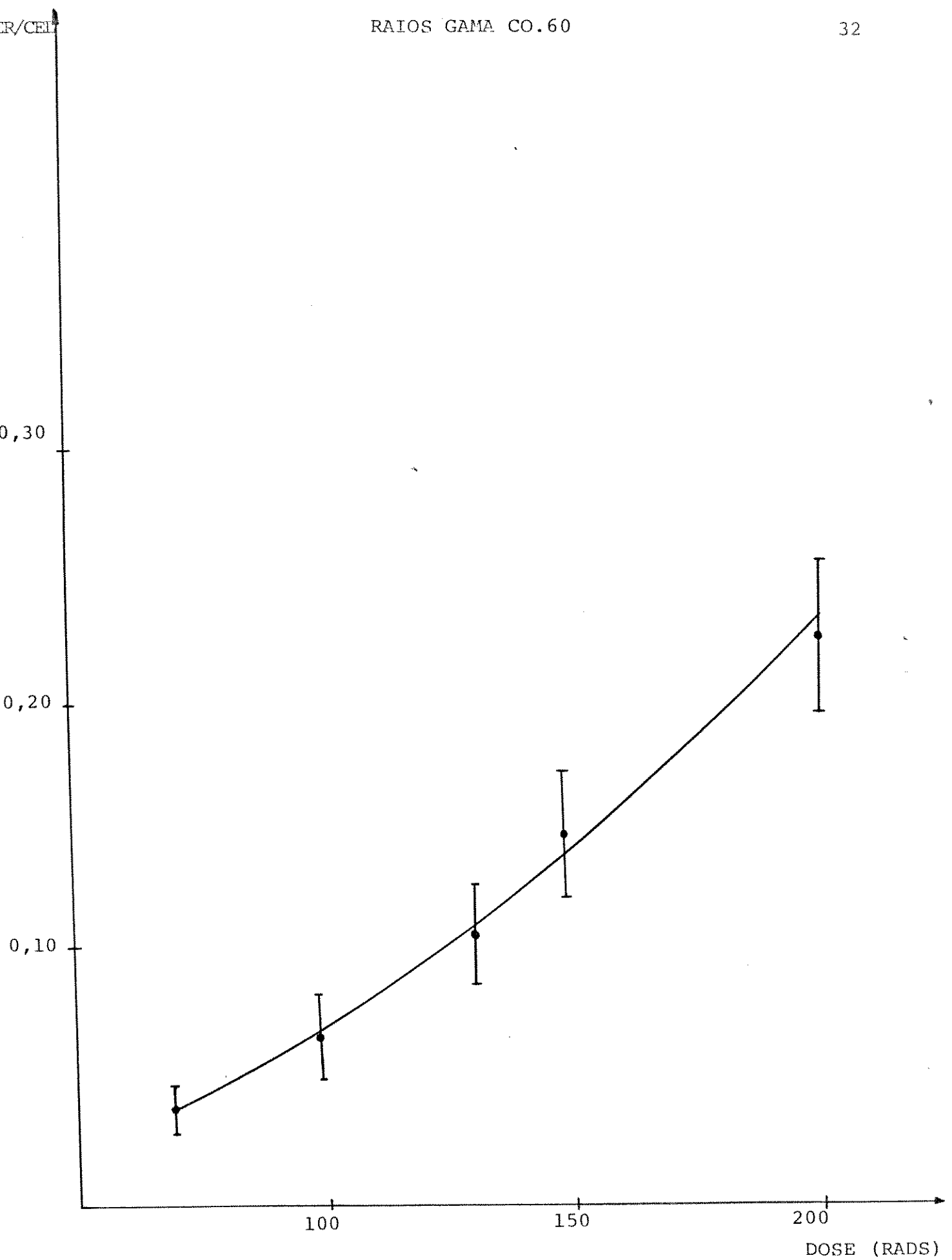


FIGURA 4 - Correlação entre o número de aberrações por célula com a dose de raios gama utilizada.

DISCUSSÃO

A partir dos valores obtidos e descritos na seção anterior, podemos constatar que as curvas obtidas em nosso laboratório estão em boa concordância com os valores obtidos por outros grupos de trabalho. Os coeficientes alfa e beta estão em boa concordância com os obtidos pelo National Radiation Protection Board.

O fato de se usar uma função quadrática para ajustar a curva permite supormos um modelo físico onde a produção de algumas aberrações é oriunda de traços ionizantes únicos e o rendimento de aberrações é proporcional à dose (αD) enquanto que as outras são produzidas por dois traços ionizantes, com rendimento proporcional ao quadrado de dose (βD^2).

Uma das propriedades da função quadrática é que o quociente α/β tem a dimensão de rads e é a dose na qual o número de aberrações produzidas por traços únicos e duplos é igual. Abaixo dessa dose as aberrações devem ser produzidas em sua maioria por traços únicos e como tais lesões são produzidas quase simultaneamente com a passagem das partículas pelo núcleo, o termo linear independe do fraciona

mento ou taxa de dose. Além disso, em doses baixas, a eficiência biológica relativa (RBE) das radiações pode ser expressa como o quociente entre os coeficientes alfa (LLOYD & DOLPHIN, 1977).

A obtenção dessas curvas de calibração "in vitro" permite que se possa estimar a dose recebida em corpo total uma vez que BUCKTON *et alii* (1971) demonstraram que aberrações induzidas "in vitro" e "in vivo" em pacientes de câncer sob tratamento com irradiações sem quimioterapia eram similares.

As vantagens do referido método dosimétrico, como já citamos, estão no fato de que os linfócitos estarão sempre disponíveis, independentemente de um indivíduo exposto estar usando um dosímetro físico e também porque esse tipo de célula está sempre na fase G_1 do ciclo, não sujeita portanto às aberrações de sensibilidade com o ciclo celular.

Como vimos, o método apresenta uma boa relação dose-resposta e uma precisão razoável na obtenção de dados, com métodos simples de obtenção de dados, como cultura de linfócitos e leitura em microscópio. É claro que a obtenção dos valores para a curva de calibração é trabalho difícil, uma vez que há necessidade de controle rigoroso das condições de cultura, sem o que há alterações no rendimento do índice mitótico. Além disso, a irradiação produz uma diminuição de linfócitos para reprodução "in vitro", o que faz com que as culturas possam ter um índice mitótico diminuído, tornando mais difíceis as contagens.

Outra vantagem do sistema, é o tempo de per

manência das aberrações no sangue periférico, pelo menos 4 semanas após a irradiação. O tipo de radiação a que a vítima foi exposta pode ser eventualmente caracterizado, uma vez que neutrons, por exemplo, produzem mais aberrações com duas quebras do que radiação eletromagnética (BOONE, 1976).

Um outro dado que pode ser obtido é a respeito da heterogeneidade da exposição, uma vez que o encontro de células com número elevado de aberrações, no caso de exposição intensa da parte do corpo faz supor que a distribuição estatística tipo Poisson não está sendo satisfeita.

O método contudo apresenta algumas limitações, como o fato da presença de dicêntricos e anéis, podem ser induzidas por outros agentes. Entretanto, tal fato poderá ser sempre tomado à guisa das considerações, desde que se faça uma anamnese nesse sentido.

Outra fonte de erro é o desvio padrão das curvas de calibração, contudo é uma fonte muito menor do que a resposta pelas contagens individuais e pode até ser ignorada para fins práticos (LLOYD & PURROTT, 1974).

Além disso, como sabemos, os linfócitos passam rapidamente do sangue periférico para várias outras regiões do corpo. Segundo SHARPE *et alii* (1968) eles não ficam mais de 5 minutos no sangue periférico. Disso resulta que, em caso de irradiação local, o que se estimará não será a dose real imposta à região, mas uma média calculada por todo o volume sanguíneo.

Outrossim, se ainda houver dúvidas na interpretação da dose, poder-se-á aumentar o número de células examinadas, uma vez que isso estreitará os limites de con

fiança da dose estimada, sendo necessário efetuarmos medidas que poderão atingir até 1000 células (como pode se ver na Tabela V, onde vemos o limite de confiança de 95% assumindo uma distribuição estatística tipo Poisson para os vários números de células examinadas.

TABELA V

Limites de confiança para número de células contadas.

Dose (rads)	Nº de células examinadas		
	200	500	1000
10	1 - 52	1 - 34	3 - 26
25	4 - 64	8 - 48	13 - 41
50	20 - 87	31 - 72	37 - 65
100	70 - 125	80 - 121	85 - 113

RESUMO

O autor estudou a correlação entre a dose de radiações ionizantes e o número de aberrações cromossômicas induzidas em linfócitos do sangue periférico humano.

Foram analisados os efeitos das radiações gama do Co-60 e radiações X de 200 Kv de energia. As técnicas de cultura e visualização dos cromossomos foram as usuais, com algumas modificações desenvolvidas durante o transcorrer do trabalho.

Concluiu-se que há uma intercorrelação precisa entre os parâmetros analisados, podendo-se estabelecer uma curva característica de respostas entre dose de radiação e aberrações induzidas. A curva que descreve o fenômeno foi ajustada por uma parábola.

Os resultados ora obtidos são similares aos de outros laboratórios de citogenética no exterior, o que faz com que se possa, a partir desse trabalho, desenvolver uma rotina de análises de doses de radiações recebidas por usuários de fontes de radiações no Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATTIX, F.H.; ROESCH, W.C. & TOCHILIN, E. *Radiation dosimetry*.
Volume II, Instrumentation, New York, U.S.A. Academic Press ,
p. 2-439, 1966.
- BEIGUELMAM, B. *Genética Médica*. São Paulo, Edart, Rio de Ja-
neiro, Fename, Brasil, p. 27-31, 1977.
- BENDER, M.A. Status of human chromossome aberrations as biolo-
gical radiation dosimeter in nuclear industry. I.B.E.A. Ad-
visory Group "Routine use of Chromossome analysis in Radia-
tion Protection", Fonte noy-aix-Roses, Paris, 1978.
- BLOOM, A.D.; NERÜSHI, S.; KAMASA, N.; ISEKI, T. & KEEHN, R.
J. Cytogenetic investigation of survivors of the atomic
bombings of Hiroxima and Nagasaki. *Lancet*, 2: 672 - 674,
1966.
- BOONE, M.L. *Biological dosimeters and assessment of damage in
radiation acidents*. New York, U.S.A., M.D. Anderson Hospi-
tal, 1966.

- BRANDOM, W.F.; BLOOM, A.D.; ARCHER, P.G.; ARCHER, V.C.; BIS
TILINE, R.W. & SACCOMANNO, G. Somatic cell genetics of
uranium and plutonium workers. I.A.E.A. - SM - 224-310 ,
1978.
- BUCKTON, K.E.; LANGLANDS, A.O. & WOODCOCK, G.E. Further stu
dies on chromossome aberration production after whose bo
dy irradiation in man. *Int. J. Rad. Biol.*, 19: 369-378 ,
1971.
- BUCKTON, K.E.; SMITH, P.G. & COUNT BROWN, W.M. *Human Radia*
tion Citogenetics. Ed. by H.J. EVANS, W.M. COUTN BROWN &
A.S. McLEAN, Amsterdan, North Holland, p. 106-114, 1977.
- BUCKTON, K.C.; HAMILTON, G.E.; PATON, L. & LANGLANDJ, A. O. .
Chromossome aberrations in irradiated ankylosyng spon-
dylits patients. Mutagen-induced chromossome damage in
man. The Britsh Lending Division, Boston SPA, Wethenby,
Yonkshine, U.K., 142-150, 1978.
- CASPERSSON, T.; ZECH, L. & JOHASSON, C. Differential bind-
ing of alkylating fluorochromes in human chromossomes.
Exp. Cell. Res., 60: 315-319, 1970.
- DALRYMPLE, G.V.; GAULDEN, M.E.; KOLLMORGEN, G.M. & VOGEL, H.
H. *Medical radiation biology*. Philadelphia, U.S.A., W.
B. Saunders Company, p. 51-83, 1973.
- DOLPHIN, G.W.; LLOYD, D.C. & PURROTT, R.J. Chromossome aber-
ration analysis as a dosimetric technique in radiological

- protection. *Health Physics*, Pergamon Press, 25: 7-15 , 1973.
- DOLPHIN, G.W. & LLOYD, D.C. The significance of radiation induced chromossome abnormalities as protection. *Journal of Medical Genetics*, 11: 181-189, 1974.
- DUTRILLAUX, B. & LEJEUNE, J. Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. *Comptes rendus hebdomadaires des sèances de l'Acadèmic des Sciences de Paris, Sèrie D*, 272: 2638-2640, 1971. Appud LLOYD, D.C. & DOLPHIN, G.W. Radiation induced cromossome damage in human limphocytes. *Britsh Journal of Industrial Medicine*, 34: 261-273, 1977.
- GILES, N.H. *Radiation Biology*. Vol. 1, pt.2. London, A. Hollaender McGraw Hill, p. 713-761, 1954.
- HALL, E.J. *Radiobiology for the radiologist*. Hagerstown , U.S.A., Harper and How, p. 1-12, 1973.
- JOHNS, H.E. & CUNNINGHAM, J.R. *The physics of radiology*. Illinois, E.U.A., Charles Thomas, Springfield, p. 103-133 e 272-372, 1974.
- KEMMER, W.; SCHMUTZLER, W. & STEINSTRASSER, A. Radiation dose and chromossome aberrations in radiotherapy patients . Mutagen induced chromossome damage in man. Edinburgh University Press, U.K., p. 115-119, 1978.

KIM, Y.J. Coordinated research on studies on the chromosome aberrations on the isozyme in the cancer radiants treated with therapeutic radiation. I.A.E.A. contract , 1885 RI/RB, 1979.

KIRSCH-VOLDERS, M. & SUSANNE, C. Chromosome aberrations and their interpretation. *Annalen Van de Belgische Vereniging Voor Stralingsbescherming*, 2(1): 105-120, 1977.

KIRSCH-VOLDERS, K.P.; VERSCHAEVE, L.; HENS, L.; VAN ELEGEM , P. & SUSANNE, C. Comparison of cytogenetic effects after occupational exposure to X-rays with those after foetal pelvimetric exposure. I.A.E.A. SM 224/803, 493 - 505 , 1977.

KUGEROVÁ, M. Chromosome analysis of an infant after intra-uterine irradiation. *Strahlentherapie*, 6: 410-413, 1966.

LEA, D.E. *Actions of Radiation on Living Cells*. London , Cambridge University Press, 1946.

LEONARD, A. Principes e Interet de la dosimetrie biologique baseé sur l'observation des anomalies chromossomiques radioinduites. *Annales de l'Association Belge de Radioprotection*, 3(2). 95-109, 1978.

LLOYD, D.C. & PURROTT, R.J. Chromosome aberration analysis in radiological protetion dosimetry. *Radiation Protec - tion Dosimetry*, 1(1): 19-28, 1974.

- LLOYD, D.C. & DOLPHIN, G.W. Radiation induced cromossome damage in human limphocytes. *Britsh Journal of Industrial Medicine*, 34: 261-273, 1977.
- LLOYD, D.C.; PURROTT, R.J.; REEDER, G.J.; EDWARDS, A.A. & DOLPHIN, G.W. Chromossome aberrations induced in human lymphocyt^s by radiation from Cf-252. *Int. J. Rad. Biol.*, 34(2): 177-186, 1978.
- MOORHEAD, P.S.; NOWELL, P.C.; MELLMAN, W.J.; BATTIPS, D. M. & HUNGENFORD, D.A. Chromossome preparations of Leukocytes cultured from human peripheral blood. *Experimental Cell Research*, 20: 613-616, 1960. Appud LLOYD, D.C. & DOLPHIN, G.W. Radiation induced cromossome damage in human limphocytes. *Britsh Journal of Industrial Medicine*, 34: 261-273, 1977.
- NORMAN, A.; SASAKI, M.S.; OTTOMAN, R.E. & FINGERHUT, A. G. Elimination of chromossome aberration from human limphocytes. *Blood*, 27: 706-714, 1966.
- PANT, G.S.; KAMADA, N. & TANAKA, R. Sister cromatid exchanges in peripheral lymphocytes of atomic bomb survivors and of normal individuals exposed to radiation and chemical agents. *Hiroshima Journal of Medical Sciences*, 25 (2): 99-105, 1976.
- PANT, G.S. & KAMADA, N. Chromossome aberrations in normal limphocytes induced by the plasma of exposed individuals.

- Hiroshima Journal of Medical Sciences*, 2(26): 149 - 154 ,
1977.
- PAVAN, C. & CUNHA, A.B. *A energia atômica e o futuro do homem*. São Paulo, Brasil, Companhia Editora Nacional, p. 9-24, 1968.
- PENDIC, B.; BARJAKTANOVIC, N. & KOSTIC, V. Chromosomal aberrations in persons accidentally irradiated in Vinca. *Rad. Res.*, 81: 478-482, 1980.
- PERRY, P. & WOLFF, S. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatid exchange. *Nature*, 251: 156-158, 1974. Appud LLOYD, D.C. & DOLPHIN, G.W. Radiation induced chromosome damage in human lymphocytes. *British Journal of Industrial Medicine*, 34: 261-273, 1977.
- PERRY, P. & EVANS, H.J. Cytological detection of mutagen carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature*, 258: 121-125, 1975.
- POHL-RÜLING, J. & FISCHER, P. The dose-effect relationship of chromosome aberrations to alpha and gamma irradiation in a population subjected to an increased burden of Natural Radioactivity. *Rad. Res.*, 80: 61-81, 1979.
- PROSSER, J.S. & PRISEMAN, S.J. The influence of two radiosensitizers on the induction of chromosome aberrations in human lymphocytes by X-radiation. *The British Journal of Radiology*, 53: 228-232.

PURROTT, R.J.; LLOYD, D.C.; PROSSER, J.S.; DOLPHIN, G.W. ,
 TIPPER, P.A.; REEDER, E.J.; WHITE, C.M.; COOPER, S.J. &
 STEPHENSON, B.D. The study of chromossome aberration yield
 in human limphocytes as a indicator of radiation doses.
 Techniques. *National Radiological Projection Board* ,
 1975.

PURROTT, R.J. The assessment of the therapeutic potential
 of high L.E.T. beans by means of chromossome aberrations
 induced in human lymphocytes. Mutagen induced chromosso-
 me damage in man. Pergamon Press, pp. 22-32, 1978.

SAVAGE, J.R.K. & BIGGER, T.R.L. Aberration distribution and in
 cromossomally marked clones in X irradiated skin. Muta-
 gen Induced Cromossome Damage in Man. Pergamon Press ,
 p. 155-169, 1978.

SAX, R. Chromossome aberration induced by X-rays. *Genetics*,
 23: 494-516, 1938. *Appud* LLOYD, D.C. & DOLPHIN, G.W. Ra-
 diation induced cromossome damage in human limphocytes .
Britsh Journal of Industrial Medicine, 34: 261-273, 1977.

SCHAWARZACHEN, H.G. Co-ordinate comparative studies on ra-
 diation induced chromossome aberrations in mammalian spe-
 cies including man. I.A.E.A. contract RC/1881. Aus. ,
 1979.

SCHMID, E.; DRESP, J. & BAUCHINGER, M. Radiation induced
 chromossome damage in patients after tumour therapy with

- 14 MeV, DT neutrons. *Int. J. Radiat. Biol.*, 38(6): 691 - 695, 1980.
- SCAFF, L.A.M. *As bases de radioterapia*. São Paulo, Brasil Ed. Sarvier, p. 109-135, 1979.
- SHARPE, H.B.A.; DOLPHIN, G.W.; DAWSON, K.B. & FIELD. Methods for computing lymphocyte kinetics in man by analysis of chromosomal aberration sustained during extracorporeal irradiation of the blood. *Cell Tissue Kinet.* 263-270, 1968.
- SULLIVAN, C.A. Chromosome aberration as a mean to determine occupational exposure: an alternative. *Radiologic Technology*, 52(2): 185-192, 1980.
- SUMMER, A.T.; EVANS, B.J. & BUCKLAND, R.A. A new technique for distinguishing between human chromosomes. *Nature New Biology*, 232: 31-32, 1971. Appud LLOYD, D.C. & DOLPHIN, G.W. Radiation induced chromosome damage in human lymphocytes. *British Journal of Industrial Medicine*, 34: 261-273, 1977.
- SUMNER, A. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell. Res.*, 75: 304-306, 1972. Appud LLOYD, D.C. & DOLPHIN, G.W. Radiation induced chromosome damage in human lymphocytes. *British Journal of Industrial Medicine*, 34: 261-273.

TANZARELLA, C.; MODESTI, R.S. & VITAGLIANO, E. Variation of the symmetrical/asymmetrical ratio in chromatid interchanges during the various phases of the cell cycle of human lymphocytes "in vitro". *Mutation Research*, 59: 135-138, 1979.

VULPIS, N. Analisi delle aberrazioni cromosomiche come tecnica dosimetrica en radioprotezione. *Com. Nat. Energ. Nucl. Nat.*, 22(12): 49-54, 1976.