

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA

NÚCLEO DE PESQUISAS REPLICON

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTUDO GENÉTICO RETROSPECTIVO DE MUTAÇÕES GERMINATIVAS EM *LOC*
STR DE INDIVÍDUOS POTENCIALMENTE EXPOSTOS À RADIAÇÃO IONIZANTE**

EMÍLIA OLIVEIRA ALVES COSTA

- MESTRANDA -

GOIÂNIA – GOIÁS – BRASIL

- JANEIRO DE 2010 -

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA

NÚCLEO DE PESQUISAS REPLICON

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTUDO GENÉTICO RETROSPECTIVO DE MUTAÇÕES GERMINATIVAS EM *LOC*
STR DE INDIVÍDUOS POTENCIALMENTE EXPOSTOS À RADIAÇÃO IONIZANTE**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS COMO REQUISITO PARCIAL E OBRIGATÓRIO PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM GENÉTICA.

EMÍLIA OLIVEIRA ALVES COSTA

- MESTRANDA -

PROF. APARECIDO DIVINO DA CRUZ, PhD

- ORIENTADOR -

GOIÂNIA – GOIÁS – BRASIL

- JANEIRO DE 2010 -



UNIVERSIDADE
Católica
DE GOIÁS

PRÓ-REITORIA DE
PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
Av. Universitária, 1069 • Setor Universitário
Caixa Postal 86 • CEP 74805-010
Goiânia • Goiás • Brasil
Fone: (62) 3946.1071 • Fax: (62) 3946.1073
www.uog.br • prope@uog.br

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM GENÉTICA
DEFENDIDA EM 12 DE JUNHO DE 2010 E APROVADA
PELA BANCA EXAMINADORA COM A NOTA

10,0 (DEZ PONTOS)

Janice
.....
Dr. Aparecido Divino da Cruz, PhD – MGene – PUC Goiás
(presidente orientador)

Daniela de Melo e Silva
.....
Drª. Daniela de Melo e Silva / MGene – PUC Goiás
(membro interno)

Alexandre Siqueira Guedes Coelho
.....
Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho / UFG
(membro externo)

“Aquele que caminha sozinho pode chegar até mais rápido, mas aquele que caminha junto, com certeza chegará mais longe”.

Érico Veríssimo

Dedico esta dissertação aos meus pais Renato e Delba, e ao meu irmão Frederico, que sempre me estimularam a dar este grande passo. Estas três pessoas com muita sabedoria, discernimento, bom senso e dedicação estiveram ao meu lado me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória. Obrigada por tudo.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, que sempre colocou em minha vida pessoas maravilhosas.

- Meu maior agradecimento aos meus pais Renato e Delba, por todo apoio e incentivo oferecidos em todos os momentos, pela confiança, carinho, pelo amor incondicional e por terem me ensinado a viver com dignidade. Vocês são tudo na minha vida!

- Ao meu irmão, Frederico, pelo seu companheirismo, pela constância do seu amor e força, sempre valorizando meus potenciais. Obrigada por ser meu grande amigo. Você também é tudo na minha vida!

- Aos demais familiares, avó, tios e primos, que sempre me apoiaram, estando ao meu lado em todos os momentos de minha vida, que mesmo distantes torcem por mim e fazem parte desta conquista.

- Ao meu orientador, Professor Dr. Aparecido Divino da Cruz, uma pessoa maravilhosa que é um exemplo de vida. Agradeço o carinho, a confiança, a oportunidade, o apoio, o aprendizado e as valiosas contribuições para o trabalho. Acima de tudo, obrigada por me permitir a continuar, por me acompanhar nesta jornada e por ter contribuído enormemente para o meu aprendizado. Por essa razão, desejo expressar sempre a minha gratidão.

- A minha co-orientadora, Professora Dra. Daniela de Melo e Silva, pela amizade, pela generosidade, pelos momentos alegres, pelo empenho e interesse de sempre me ajudar, pelo constante incentivo, sempre indicando a direção a ser tomada nos momentos de maior dificuldade. Agradeço pela confiança e pelos ensinamentos. A você também sou muito grata. Obrigada por tudo!

- Ao Professor Dr. Cláudio Carlos da Silva pela competência profissional, pela atenção, oportunidade de crescimento e aprendizado e pelo incentivo à pesquisa.

- À todos os amigos do Núcleo de Pesquisas Replicon, pelo apoio, amizade, companheirismo, convivência e pelos momentos de descontração. Todos se tornaram muito importantes em minha vida!
- Aos bolsistas e estagiários do Núcleo de Pesquisas Replicon, Aldaires Vieira de Melo e Fernanda Ribeiro Godoy, pelo esforço e dedicação na realização dos procedimentos técnicos.
- Aos funcionários do Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular (LaGene), Thais Cidália Vieira e Gutavo Pinto Silva e do Núcleo de Pesquisas Replicon, Eduardo Rocha Pedrosa, Damiana Míriam da Cruz Cunha e Cristiano Luiz Ribeiro, pela constante disponibilidade e apoio.
- A todos os professores do Mestrado em Genética da PUC-GO, pela contribuição em minha formação.
- Aos doadores voluntários das amostras, sem eles este estudo não teria sido possível.
- Às amigas de faculdade, Patrícia Ribeiro dos Santos e Flávia Juliana Neves, pela verdadeira amizade e pelos momentos de distração e pelas muitas risadas que me proporcionaram.
- À CNEN (Comissão Nacional de Energia Nuclear) pela concessão da bolsa de estudo.
- A todos que, embora não tenham sido mencionados, estiveram presentes comigo durante este percurso, estimulando a concretização desse projeto.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ANEXOS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Histórico do acidente	1
1.2. Dosimetria por ocasião do acidente.....	2
1.3. Mutação	5
1.4. Regiões hipervariáveis de DNA como marcadores moleculares de exposição à RI	8
2. JUSTIFICATIVA.....	11
3. OBJETIVOS	12
3.1 Objetivo geral.....	12
3.2. Objetivos específicos	12
4. METODOLOGIA	13
4.1. Grupo Amostral	13
4.2. Extração e Quantificação das Amostras de DNA	13
4.3. Biomonitoramento.....	14

4.4. Genotipagem dos marcadores.....	15
4.5. Análise dos dados moleculares.....	15
4.6. Estimativa das taxas de mutação.....	17
4.7. Teste Binomial duas proporções.....	18
5. RESULTADOS	19
6. DISCUSSÃO	23
7. CONCLUSÃO	28
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
9. ANEXOS	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Formas e sintomas da Síndrome aguda de Radiação.....	2
Tabela 2. Tipos de mutações cromossômicas.....	6
Tabela 3. Tipos de mutações gênicas.....	7
Tabela 4. Protocolo de termociclagem.....	14
Tabela 5. Características dos 16 marcadores STR utilizados para genotipagem dos indivíduos potencialmente expostos.....	15
Tabela 6. Dados descritivos do grupo exposto.....	19
Tabela 7. Dados dos perfis alélicos e taxa de mutação, observada no marcador D8S1179.....	19
Tabela 8. Quantidade de eventos mutacionais por <i>locus</i> STR observados no grupo de indivíduos acidentalmente exposto à RI de césio-137 em Goiânia.....	20
Tabela 9. Dados gerais dos eventos mutacionais de cada <i>locus</i> STR no grupo controle.....	22

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Exemplo da exibição dos alelos dispostos em forma de picos. Nesse caso, observamos o alelos paternos (12, 15), os alelos do filho (12, 15) e os alelos maternos (12, 15), indicando a coincidência entre geração parental e filial..... 12
- Figura 2.** Eletroferograma exibindo a mutação em D8S1179 na família 06. Observe-se que os perfis alélicos do pai (8, 13), do filho (12, 14) e da mãe (12, 15) indicam uma mutação de origem paterna..... 14

LISTA DE ANEXOS**ANEXO 1.**

Questionário..... 35

ANEXO 2.

Termo de consentimento livre e esclarecido. 39

RESUMO

O acidente radiológico de Goiânia em 1987 foi um grave episódio de contaminação por radioatividade ocorrido no Brasil. Como consequência foram contaminadas centenas de pessoas através das radiações emitidas pelo céσιο 137. Recentemente, vários estudos têm mostrado que instabilidade no genoma, como por exemplo, mutações, aberrações cromossômicas, formação de micronúcleos, instabilidade de microssatélites e atraso na morte celular são comumente relatadas em células de mamíferos expostos à radiação ionizante, sendo consideradas como o principal fator de risco em humanos para o câncer. As mutações podem ser espontâneas, sendo a frequência de ocorrência dependente do organismo, ou ainda, induzida, podendo ser ocasionadas pela exposição a agentes mutagênicos. As radiações ionizantes são exemplos de agentes físicos e mutagênicos que podem levar ao comprometimento dos mecanismos de reparo celular e ao desenvolvimento de diversos tipos de câncer. Avaliar os efeitos biológicos da radiação ionizante, em células somáticas e germinativas, com consequente determinação da taxa de mutações radio-induzidas, é extremamente importante para a estimativa de riscos genéticos, principalmente em populações expostas à radiação. Análises de seqüências repetitivas de DNA têm demonstrado que estas seqüências são sujeitas a altas taxas de mutações espontâneas. As seqüências minissatélites e microssatélites têm sido usadas para demonstrar satisfatoriamente a indução de mutação germinativa em camundongos, humanos, dentre outros organismos. O objetivo do presente estudo foi analisar a frequência de alterações em microssatélites para determinar a taxa de mutações ocorridas em células de linhagem germinativa dos progenitores expostos à radiação ionizante do Césio-137. O grupo exposto foi constituído por 10 famílias do grupo 2 e o grupo controle por 645 indivíduos provenientes de exames de vínculo genético realizados em 2010. Foi encontrada um mutação de origem paterna no *locus* D8S1179 com uma taxa de mutação de 0,003. No grupo controle, foram encontradas 01 mutação no *loci* D16S539 e no *loci* D3S1358; 02 mutações no *locus* Penta E; 04 mutações no *locus* D21S11 e 03 mutações no *locus* FGA, compreendendo um total de 11 mutações e uma taxa de mutação de 0,0009. Nesse contexto, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p= 0,15$) indicando o efeito da exposição e taxa de mutação em locos STR no grupo acidentalmente exposto ao Césio-137.

Palavras-chave: Césio-137, radiação ionizante, mutação, seqüências repetitivas e taxa de mutação.

ABSTRACT

The Brazilian radiological accident that occurred in 1987, in Goiânia, it was a terrible radiation episode. As a consequence, hundreds of people were contaminated due to the Cesium-137 radiation. Recently, many studies had shown that genome instabilities, such as, mutations, chromosomal aberrations, micronuclei formation and microsatellite instability and a delay on cellular death are usually reported on mammal cells exposed to ionizing radiation, being considered as a manly risk to humans. Mutations can be spontaneous, and the occurrence is dependent on the organism, or, induced, being associated to mutagenic exposition. Ionizing radiations are an example of physical and mutagenic agents that could harm the cell repair and could cause the development of many types of cancer. The evaluation of the biological effects of the ionizing radiation, in somatic and germline cells, with a consequent determination of the radio-induced mutations, it is extremely important to estimate the genetic risks, manly in population exposed to radiation. The analyses of repetitive DNA sequences have been demonstrated that such sequences are prone to high rates of spontaneous mutations. The minisatellites and microsatellites have been used to demonstrate the induction of germline mutation rates on mouse, humans, among others organisms. The aim of the present study was to analyze the frequency of microsatellite alterations to determine the mutation rates occurred in germ cells of the parents exposed to the ionizing radiation of the Cesium-137. The studied group was constitute of 10 families of individuals accidentally exposed to Cesium-137 and by the control group constituted by 645 healthy individuals who carried out paternity tests on 2009. We found only one mutation of paternal origin in the D8S1179 locus on the exposed group, being the mutation rate of 0.003. In the control group, we found 01 mutation on D16S539 *loci* and on D3S1358; 02 mutations on Penta E *locus*; 04 mutations on D21S11 *locus* and 03 mutations on FGA *locus*, comprising a total of 11 mutations and a mutation rate of 0.0009. In such context, we did not find significant differences ($p= 0.15$), indicating a possible exposure effect on the mutation rates of the STR loci, in the group accidentally exposed to Cesium-137.

Key-words: Cesium-137, ionizing radiation, mutation, repetitive sequences, mutation rates.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico do acidente

O acidente radiológico de Goiânia em 1987 resultou em um grave episódio de contaminação humana, animal, vegetal e ambiental por um elemento radioativo que ocorreu no Brasil Central. O acidente começou quando dois sucateiros adentraram as antigas instalações do Instituto Goiano de Radioterapia e encontraram abandonado um aparelho de radioterapia que continha uma cápsula de césio-137. O aparelho foi levado das premissas com a ajuda de um carrinho de mão. Interessados em vender as partes de metal e chumbo do aparelho para ferros-velho, romperam o cabeçote com marteladas, que provocou a liberação da cápsula que continha um sal radioativo (da Cruz *et al.*, 1994; da Cruz, *et al.*, 1996).

No período durante e subsequente a desmontagem da máquina, pessoas e ambientes foram expostos a 19,26g de cloreto de césio-137 ($^{137}\text{CsCl}$), que gerou um rastro de contaminação em uma dezena de focos espalhados pela região metropolitana de Goiânia.

O cloreto de césio é um sal que se apresenta como um pó branco semelhante ao sal de cozinha. Porém no escuro o sal radioativo brilha com um espectro de cor azul. Alguns dias depois, o aparelho foi vendido a um proprietário de um ferro-velho que relatou ter se admirado do brilho azulado emitido pelo conteúdo da cápsula. Maravilhado, o comerciante recebeu várias pessoas em sua casa, incluindo, amigos, vizinhos e parentes, para conhecer o pó brilhante, acreditando estar diante de algo sobrenatural (Ramalho, *et al.*, 1988; da Cruz, *et al.*, 1997).

Algumas horas após o contato com a substância, as pessoas desenvolviam alguns sintomas de contaminação e/ou exposição aguda à radiação ionizante. Os sintomas mais comuns incluíam vômitos, náuseas, diarreia e tonturas. Em consequência da exposição acidental, um grande número de pessoas, procurou auxílio de hospitais e farmácias locais. Os radiacidentados eram medicados como se fossem portadores de uma doença contagiosa devido ao sombreamento dos sintomas nestas condições médicas. Posteriormente, descobriu-se de que os sintomas foram identificados como referentes à Síndrome Aguda de Radiação (Tabela 1). Cerca de duas semanas após o rompimento do cabeçote, foi que os sintomas foram clinicamente qualificados como contaminação radioativa.

O acidente goiano foi o maior acidente radioativo do Brasil e o maior do mundo ocorrido fora de usinas nucleares. Como consequência foram expostas e contaminadas centenas de pessoas, sobretudo parentes e vizinhos, daqueles imediatamente envolvidos com a manipulação do cabeçote de radioterapia. Do total, foram identificadas 249 pessoas que

provavelmente receberam uma exposição significativa à radiação ionizante de Césio-137, resultando em quatro mortes. As doses individuais variaram de 0 a 7 Gy. Dos expostos, cerca de 130 exibiram contaminação externa e/ou interna, 50 necessitaram de acompanhamento médico e 14 tiveram contaminação interna comprovada e foram encaminhados a uma unidade especializada de tratamento localizada no Rio de Janeiro (da Cruz *et al.*, 1997; da Silva, 2000). Além da população, membros do corpo de Bombeiros e da Polícia Militar foram acionados para a remoção dos rejeitos radioativos, lavagem de asfalto e isolamento dos locais atingidos. A exposição acidental à RI de Césio-137 ocorrida em Goiânia afetou seriamente a saúde física e emocional de grande parte da população (Flores, 2008).

Tabela 1. Formas e sintomas da Síndrome aguda de Radiação.

FORMA	DOSE ABSORVIDA	SINTOMAS
Infraclínica	Inferior a 1 Gy	Ausência de sintomatologia na maioria dos indivíduos
Reações gerais leves	1-2 Gy	Astenia, náuseas, vômitos (3 a 6 horas após a exposição)
Hematopoiética leve	2-4 Gy	Função medular atingida: linfopenia, leucopenia, trombopenia, anemia
Hematopoiética grave	4-6 Gy	Função medular gravemente atingida
Gastrointestinal	6-7 Gy	Diarréia, vômitos, hemorragias (morte em 5 ou 6 dias)
Pulmonar	8-9 Gy	Insuficiência respiratória aguda, coma e morte entre 14 e 36 horas
Cerebral	Superior a 10 Gy	Morte em poucas horas por colapso

Fonte: Okumo, 1998.

1.2 Dosimetria por ocasião do acidente

A radiação corresponde a um tipo de energia emitida por uma fonte, que se propaga de um ponto a outro na forma de partículas, com ou sem carga elétrica, ou na forma de ondas eletromagnéticas. Quando a radiação, mediante interação com a matéria, possui energia suficiente para reverter elétrons de átomos e de moléculas e formar os pares iônicos (íons+ e

íons-) ela é chamada de radiação ionizante. A energia radioativa ionizante pode ser emitida de material particulado, como as partículas α , β , prótons, nêutrons e as partículas subatômicas, e por ondas eletromagnéticas, como os raios-X e γ (Flakus, 1995).

As radiações ionizantes podem provocar fenômenos físicos, pela ionização e excitação de átomos por absorção de energia da radiação, fenômenos físico-químicos, por meio das ligações químicas das moléculas que são rompidas e formam os radicais livres, fenômenos químicos, quando os radicais livres altamente reativos se ligam a importantes moléculas das células. E por fim, fenômenos bioquímicos e fisiológicos, capazes de produzir alterações morfológicas e/ou funcionais nas células e nos tecidos por elas constituídas (Leitão, 1994).

A exposição individual à radiação ionizante pode provocar alterações no sistema celular, com variados graus de comprometimento do sistema exposto. Estas alterações induzidas e, conseqüentemente, os efeitos da radiação nos tecidos vitais podem variar dentro de limites extremamente amplos, devido as diferentes condições físicas e biológicas. Os efeitos da exposição celular à radiação ionizante dependerão do comprimento da onda, da quantidade, duração e intensidade de exposição à energia radioativa, da idade do indivíduo, do sexo, dos hábitos, da susceptibilidade e da sua sensibilidade à energia radioativa (da Cruz *et al.*, 1997).

Os efeitos biológicos da exposição à radiação ionizante podem ser queimaduras e danos à pele. Em outros casos, em um ambiente celular, a energia da radiação é transmitida a moléculas intermediárias da célula, na maioria das vezes, para moléculas de água, provocando a rádiorradólise, gerando radicais livres que interagem ou atacam outras biomoléculas, como o DNA, causando-lhe sérios danos e que podem acarretar em doenças genéticas como o câncer (Brenner *et al.*, 2003). Dois efeitos principais da exposição à radiação são conhecidos, os classificados como determinísticos – associados a morte celular, como as queimaduras por radiação; e os estocásticos – associados a alterações genéticas e cromossômicas, capazes de aumentar a taxa de mutação nas próximas gerações, podendo gerar câncer e outras desordens genéticas (Flakus, 1995; da Silva, 2000).

A RI é um dos componentes ambientais que mais causam estresse celular em organismos complexos. Pois, a exposição celular à RI induz nos ácidos nucléicos, principalmente no DNA, quebras de fita dupla, quebra de fita simples, danos às bases e às ligações cruzadas com as proteínas. Vários estudos têm mostrado que a instabilidade no genoma decorrentes de mutações puntiformes, aberrações cromossômicas, formação de micronúcleos e mutações em microssatélites, que em consequência podem promover ou retardar a morte celular, são comumente relatadas em células de mamíferos expostos à radiação ionizante. A alteração na fisiologia celular induzida pela exposição à RI é considerada como o principal fator de risco

em humanos para o câncer (Toyokuni, *et al.*, 2009; Suzuki, *et al.*, 2009; Sutherland, *et al.*, 2000; Barber *et al.*, 2006).

O radioisótopo Césio-137 é frequentemente usado em aparelhos de radioterapia. O Césio é um metal pesado, que quando ingerido ou inalado provoca danos biológicos. O isótopo radioativo emite comumente os raios γ e, numa extensão menor, partículas β . Ambos capazes de depositar na matéria alta energia radioativa na forma de RI. Os raios β são mais radiotóxicos para o genoma que os raios γ (Bandazhevsky, 2003). As partículas β possuem uma pequena massa, e sua trajetória têm um alcance de até 1,5 cm no tecido humano, podendo ser blindadas por folhas de alumínio de poucos milímetros de espessura. Os raios γ , que provêm do núcleo atômico, são ondas com intenso poder de penetração, podendo atingir 7,2 cm de profundidade no tecido humano. Estes raios são blindados por materiais densos, como o chumbo, o concreto, o aço e o ferro (Okumo, 1988). O acidente de Goiânia envolveu uma fonte radioativa que continha Césio-137. Portanto, houve a emissão de partículas β e raios γ .

A rota de exposição à RI de césio-137 depende da proximidade e do contato individual com a fonte. A exposição externa ocorre devido ao compartilhamento do ambiente radioativo pelos indivíduos. Ela geralmente cessa ao se remover o indivíduo do local da exposição. Por outro lado, a exposição interna ocorre subsequente ao contato individual com o elemento radioativo. Para o césio-137, a ingestão ou inalação do radioisótopo é a forma mais comum de contaminação (Xavier *et al.*, 2006)

O Césio-137 é um metal alcalino, produzido pela fissão de urânio, altamente eletropositivo, que não existe livre na natureza, devido a sua grande atividade química. Esse radionuclídeo tem ponto de fusão a 26°C e ponto de ebulição a 670°C. O número atômico desse metal é 55 e tem 35 isótopos. Destes, vários apresentam meias-vidas muito pequenas, de frações de segundos a poucos segundos. O césio decai por emissão de partículas β . Isótopos com massas menores que a do isótopo estável, Césio-133, decaem por emissão de partículas β positivas. Para massas nucleares maiores que a do isótopo estável, como é o caso do césio-137, o decaimento se dá através de partículas β negativas. A meia-vida do césio-137 é de 30 anos. Do decaimento do césio se origina o bário (Ba) com a mesma massa nuclear (Collins *et al.*, 1988).

Para se entender os efeitos relacionados a exposição à radiação ionizante é necessário se conhecer as grandezas físicas utilizadas para quantificá-la. Para medir a energia depositada por um feixe de fótons de alta energia (raios X ou raios gama) em um tecido biológico e os seus efeitos sobre este tecido, existe a grandeza "dose absorvida". A dose absorvida de radiação é a energia depositada por quilograma de tecido e é expressa em rad (*radiation*

absorbed dose - dose de radiação absorvida). Pelo Sistema Internacional de Medidas utiliza-se a unidade Gy (Gray), que equivale a 100 rad. Gray é uma unidade adotada para qualquer tipo de radiação ionizante (Biral, 2002).

A estimativa de dose absorvida é um dos parâmetros mais importantes para o prognóstico e tratamento adequado de indivíduos expostos à RI em acidentes radiológicos. No entanto, devido à natureza do acidente, estimativas precisas representam um grande desafio, pois a exposição individual foi muito diversificada, e em alguns casos, de caráter fracionado. A maioria dos pacientes receberam uma dose de radiação de corpo inteiro e localizada. Alguns apresentaram contaminação interna e externa dos radionuclídeos. Todas estas peculiaridades na medida de radiação podem dificultar a estimativa de dose para a população exposta. No entanto, várias técnicas de dosimetria foram utilizadas para avaliar o nível de exposição e para fornecer informações iniciais sobre os indivíduos potencialmente expostos (da Cruz *et al.*, 1997; da Silva, 2000).

As principais abordagens usadas para estimar a dose para a população exposta em Goiânia foram: dosimetria interna, avaliada pela análise de excrementos biológicos e por um contador de corpo inteiro com um nível de detecção de 9.1 KBq, com 95% de confiança; dosimetria externa, que avaliou as propriedades radioativas de radionuclídeos, as taxas de dose e reconstrução dos eventos que levam à exposição. Para a população exposta em Goiânia, a dosimetria externa foi complicada pela mistura complexa de contaminação, irradiação externa, e os fatores de tempo preciso (da Cruz *et al.*, 1997). E finalmente, a dosimetria biológica, que foi utilizada para se estimar a dose média de corpo inteiro recebida por um indivíduo exposto à radiação ionizante, com base na frequência das aberrações cromossômicas. A análise de aberrações cromossômicas é, atualmente, o método biológico mais sensível para se estimar a exposição aguda e recente às radiações ionizantes, sendo capaz de precisar doses da ordem de 0,1 Gy (da Silva, 2000).

1.3 Mutação

Uma mutação é definida como qualquer alteração herdável e permanente na seqüência do DNA (Niwa, 2006). O ácido desoxirribonucléico (DNA) pode incorporar mutações ao longo da vida do ser humano, causadas por erros durante a replicação na divisão celular. As mutações podem ser espontâneas, sendo a frequência de ocorrência dependente do organismo, ou ainda, induzida, podendo ser ocasionadas pela exposição a agentes mutagênicos. A mutagenicidade de um agente químico, físico ou biológico pode ser avaliada de acordo com o

aumento da frequência de mutações induzidas em relação à frequência basal de mutações (Westman, 2006).

Nos organismos multicelulares, as mutações podem ocorrer em qualquer célula nucleada e em qualquer estágio do ciclo celular. Podem ser divididas em células somáticas e germinativas. As somáticas são as que ocorrem em células do corpo humano, entretanto não serão transmitida à descendência. Já as mutações em células germinativas, serão transmitidas à geração filial (Watson *et al.*, 2007).

As mutações incluem mutações cromossômicas e mutações gênicas. As cromossômicas resultam em alterações na morfofisiologia dos cromossomos. Podem afetar desde uma determinada região até um cromossomo inteiro e traduzem-se em alterações estruturais (Tabela 2), englobando as translocações, deleções e inversões, ou numéricas, como é o caso das euploidias e aneuploidias (Watson *et al.*, 2007). É uma das ferramentas mais importante no biomonitoramento de populações acidentalmente e ocupacionalmente exposta a radiação ionizante (da Silva, 2000).

Tabela 2. Tipos de mutações cromossômicas

Mutações Cromossômicas	Tipos	Função
Estruturais	Deleção	Perda de uma região do cromossomo.
	Duplicação	Uma região do cromossomo é duplicado, acarretando uma dupla leitura de genes.
	Translocação	Transferência de segmentos entre cromossomos não homólogos.
	Inversão	Remoção de um segmento de DNA e inserção numa posição invertida num outro local do cromossomo.
Numéricas	Euploidias	Envolve a alteração completa do genoma.
	Aneuploidias	Perda ou adição de cromossomos inteiros

Fonte: Griffiths 2001.

Mutações gênicas são alterações nas seqüências de nucleotídeos do DNA e ocorrem devido à mudança de uma ou mais bases nitrogenadas (Tabela 3). Podem se originar por erros incorporados durante o processo de replicação do DNA ou por falha no sistema reparo do DNA, resultando em alterações em genes individuais (Watson *et al.*, 2007).

Tabela 3. Tipos de mutações gênicas

Mutações Gênicas	Tipos	Função
Estrutural	Substituição	Uma base é trocada por outra
	Inserção	Uma ou mais base são inseridas da seqüência original
	Deleção	Uma ou mais base são removidas da seqüência original
Funcional	<i>Non-sense</i>	Resulta na formação de um códon de parada no término da tradução
	<i>Sense</i>	Resulta na substituição de base que não acarreta na mudança de aminoácido
	<i>Missense</i>	Resulta na substituição do aminoácido e altera a função da proteína

Fonte: Watson *et al.*, 2007

As mutações ocorrem em todos os seres vivos, sendo de fundamental importância para a evolução e diversidade das espécies. Após várias divisões, é possível que uma célula acumule mutações em um número elevado, acarretando a perda de controle da divisão celular. Portanto, eventos mutacionais podem estar associados ao aparecimento de câncer nas células, o que pode resultar no surgimento de neoplasias nas populações (Griffiths 2001).

Os seres humanos têm um complexo sistema de reparo do DNA. As razões que levam os genes reguladores do ciclo celular a perderem sua função são complexas e multifatoriais (Gu *et al.*, 2009). As predisposições genéticas e a exposição aos agentes físicos, químicos e biológicos estão entre as principais razões que resultam no descontrole do ciclo celular, subjacente ao desenvolvimento neoplásico. As radiações ionizantes são exemplos de agentes físicos e mutagênicos que podem levar ao comprometimento dos mecanismos de reparo celular e ao desenvolvimento de diversos tipos de câncer, incluindo os tumores de tireóide, pulmão, mama, leucemia, dentre outros (Baverstock *et al.*, 2006).

O câncer é uma doença multifatorial que resulta do complexo de interações entre os fatores genéticos e ambientais. Vários estudos epidemiológicos em populações expostas à radiação confirmam a estimativa de risco elevado de câncer nessas populações (Rothkamm *et al.*, 2003; Ivanov *et al.*, 2004). Portanto, avaliar os efeitos biológicos da radiação ionizante, em células somáticas e germinativas, com conseqüente determinação da taxa de mutações radio-induzidas, é extremamente importante para a estimativa de riscos genéticos, principalmente em populações expostas à radiação. Com exceção dos estudos, envolvendo a segunda geração, dos sobreviventes da bomba atômica de Hiroshima e Nagasaki, e, mais recentemente, estudos envolvendo crianças nascidas de famílias expostas à radiação ao

acidente de Chernobyl e um estudo preliminar de indivíduos expostos acidentalmente ao Césio-137, ocorrido em Goiânia, a maioria das informações sobre mutações induzidas em células germinativas, tem sido obtida por experimentos com animais, em sua maioria usando camundongos (Kodaira *et al.*, 1995; Dubrova *et al.*, 1998; Dubrova *et al.*, 2002; Dubrova *et al.*, 2003; Dubrova *et al.*, 2005; Dubrova *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006; da Cruz *et al.*, 2008).

Desde o acidente em 1987 até os dias de hoje têm sido realizados vários estudos sobre a saúde genética dos radioacidentados goianos. Um dos primeiros testes de biomonitoramento das populações expostas à RI do Césio-137 foi o teste de micronúcleo, que relatou um aumento na frequência de micronúcleos das pessoas envolvidas direta ou indiretamente no acidente (da Cruz *et al.*, 1994). Outros estudos que se destacaram foram o de análise dos níveis de mutação *in vivo* utilizando o parâmetro da expansão clonal do gene *hprt* para avaliar a eficácia e a eficiência do sistema de reparo do DNA dos indivíduos expostos à radiação (da Cruz *et al.*, 1997), análise de aberrações cromossômicas, avaliação de marcadores sorológicos de auto-imunidade, e atualmente, análise de mutações germinativas usando marcadores STR de indivíduos acidentalmente e ocupacionalmente expostos à RI (da Cruz *et al.*, 1994; da Cruz *et al.*, 1996; da Cruz *et al.*, 1997; da Silva, 2000).

1.4 Regiões hipervariáveis de DNA como marcadores moleculares de exposição à RI

A variabilidade genética entre indivíduos de populações humanas pode ser considerada alta, correspondendo à diversidade de alelos e genótipos em dada população. Levando-se em conta que o genoma humano tem cerca de 3 bilhões de bases, pode-se estimar que existam potencialmente 3 milhões para o genoma haplóide de diferenças entre duas pessoas (Lee *et al.*, 1990; Frankham *et al.*, 2002)

A identificação humana baseada nas diferenças individuais entre as sequências de DNA é a estratégia metodológica moderna mais comumente usada no mundo inteiro para se estabelecer o vínculo genético entre os indivíduos. Para avaliar a variação individual, usam-se marcadores genéticos ou moleculares, que caracterizarão o DNA de um indivíduo em um padrão ou perfil de fragmentos que lhe é particular. Para a estimativa do vínculo genético são utilizados marcadores polimórficos de DNA, ou seja, regiões que apresentam mais de um alelo por *locus*, cujas frequências são amplamente variadas na população (Coomber *et al.*, 2007).

Sequências de DNA repetidas *em tandem* constituem aproximadamente 10% do genoma humano e são ferramentas excelentes na análise do DNA para se detectar a variabilidade genética. De forma abrangente, as sequências *em tandem* são chamadas de DNA satélite (Li *et al.*, 2004).

O DNA satélite é constituído por sequências de DNA simples ou complexas, altamente variáveis, distribuídas ao acaso em todo o genoma. Corresponde a várias sequências com tamanhos diferentes que se repetem em blocos. Está frequentemente localizado em regiões heterocromáticas, sobretudo naquelas próximas aos centrômeros (Li *et al.*, 2004). Dentre os marcadores moleculares mais conhecidos, encontram-se os minissatélites e os microsatélites, sendo, respectivamente, as VNTRs (do inglês *Variable number tandem repeat*, ou Repetições Variáveis *em Tandem*) e as STRs (do inglês *short tandem repeats*, ou repetições curtas em tandem) os marcadores mais usados nos estudos populacionais.

Os VNTR compreendem várias unidades de repetição sucessivas, cada uma com cerca de 10 a 100 pares de base de comprimento. O número exato de repetições assim como o comprimento em uma região VNTR varia de um alelo para outro e diferentes alelos podem ser identificados pelos diferentes tamanhos de seus fragmentos após o corte do DNA com uma enzima de restrição (Bois, 2003).

Os microsatélites (STR) são seqüências de 1 a 6 pb que estão repetidas várias vezes ao longo do genoma e se caracterizam por serem altamente polimórficas. Os STR se tornaram uma poderosa ferramenta para identificação humana, uma vez que, para sua detecção, pode-se utilizar a técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR), que amplifica a região de DNA do STR adjacente aos oligonucleotídeos iniciadores que se anelam em regiões flangeadoras não repetitivas (Zane *et al.*, 2002).

VNTRs e STRs podem estar presentes em regiões codificadoras. Mas, em geral, são mais frequentemente encontrados em regiões não-codificadoras. A seqüência de bases de VNTRs e STRs podem estar relacionadas à regulação da expressão gênica (Zane *et al.*, 2002).

A característica altamente polimórfica dos VNTRs e STRs é resultante da instabilidade das repetições durante o mecanismo de replicação do DNA. Uma seqüência repetitiva está sujeita a um erro de polimerização de nucleotídeos, conhecido como *slippage* da DNA-polimerase. Em consequência regiões de DNA repetitivo apresenta uma maior probabilidade de ocorrência mutacional (Ellegren, 2004).

Até meados da década de 90, para estabelecer as estimativas dos danos genéticos em seres humanos expostos a agentes genotóxicos era necessário extrapolar os resultados dos testes obtidos de modelos animais. Análises das seqüências repetitivas de DNA demonstraram que

estas sequências são sujeitas a altas taxas de mutações espontâneas. Assim tornar-se-iam excelentes ferramentas investigativas para se estimar o dano induzido ao genoma decorrente da sua exposição a agentes genotóxicos (Jeffreys *et al.*, 1988; Sajantilla *et al.*, 1999; Bridges, 2001).

Recentemente, vários estudos desenvolveram um novo sistema para monitorar os efeitos das mutações induzida por radiação em células somáticas e germinativas em regiões hipervariáveis. Por causa da alta taxa de mutação, as sequências de DNA repetitivo, se tornaram excelentes candidatos. Com um novo método para estimar risco genético em humanos, Jeffreys, Dubrova e colaboradores (1993), estudaram a expansão de repetições minissatélites induzida por radiação, o que refletia o fenômeno de instabilidade genômica (Wu *et al.*, 2006). As sequências minissatélites e microsatélites têm sido usadas para demonstrar satisfatoriamente a indução de mutação germinativa em camundongos, humanos, dentre outros organismos (Weinberg *et al.*, 2001; Livshits *et al.*, 2001; Furitsu *et al.*, 2005; Yauk, 2004; Slebos *et al.*, 2004; Dubrova, 2003).

As taxas de mutação germinativa, em *loci* de mini e microsatélites, podem ser estimadas pela pesquisa de mutações na prole de indivíduos expostos. Caso haja um aumento na frequência de mutações nos *loci* analisados, o evento mutacional pode ser atribuído a mutações induzidas nas células das linhagens germinativas que formarão os gametas paternos e maternos. As mutações em STR e VNTR com maior significado biossimétrico retrospectivo transgeracional, são aquelas ocorridas e fixadas nas células germinativas (Chun *et al.*, 2006).

Desta forma, a população exposta à radiação gama do Césio-137, durante o acidente radioativo de Goiânia, oferece uma oportunidade única para se compreender os efeitos biológicos da radiação em células germinativas. O conhecimento da extensão dos danos genéticos causados pela exposição ao Césio-137 permitiria uma avaliação direta do risco dos descendentes.

2. JUSTIFICATIVA

Os acidentes radioativos podem envolver desde indivíduos isolados até comunidades inteiras. O efeito agudo da radiação ionizante pode não ser a morte celular, mas a alteração no DNA e, assim, a célula passa a sobreviver com alterações incorporadas ao genomas. Neste contexto, os efeitos genéticos desta exposição podem perdurar por várias gerações (da Cruz *et al.*, 1997).

Um dos principais temas de estudo envolvendo radiação ionizante é o da carcinogênese humana. Os efeitos biológicos da exposição aguda à radiação podem ser queimaduras e danos à pele. Já os efeitos da exposição crônica, podem acarretar danos ao DNA, resultando em doenças genéticas como o câncer (Brenner *et al.*, 2003).

Desta forma, a quantificação de mutações em microssatélites pode fornecer um sistema capaz de, em princípio, detectar mutações induzidas em populações relativamente pequenas, como é o caso da população exposta à radiação ionizante do césio-137 em Goiânia. Nesse contexto, a taxa de mutação em STR contribui para o aumento no conhecimento sobre os efeitos de exposição à radiação ionizante em populações humanas, possibilitando uma estimativa real do risco genético da população exposta (Dubrova *et al.*, 2006).

Durante os últimos vinte anos após a exposição à RI, vários projetos de pesquisas de acompanhamento da saúde genética a longo prazo dos radioacidentados tem sido realizados. Portanto, vale ressaltar a importância do monitoramento genético a longo prazo da população exposta acidentalmente ao Césio-137.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar de forma retrospectiva a frequência de mutações germinativas de STR em famílias das quais pelo menos um dos genitores foi diretamente exposto à radiação ionizante do Césio-137, durante o acidente de 1987 em Goiânia.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a frequência de mutações germinativas na população exposta;
- Estabelecer possíveis associações entre a frequência de mutação observada e a dose de radiação absorvida pelos pais;
- Comparar as taxas de mutações encontradas no presente estudo, com as taxas detectadas em outras populações radioexpostas.

4. METODOLOGIA

4.1 Grupo amostral, amostras biológicas e aprovação em CEP

O grupo exposto foi constituído por 10 famílias, incluindo um total de 34 indivíduos, dos quais pelo menos um dos pais foi diretamente exposto à radiação ionizante de Césio-137 apresentando distribuição semelhante por sexo e idade e combinados para efeito de comparação estatística. A dose absorvida para os indivíduos expostos foi estimada em $\leq 0,2$ Gy. Um grupo de indivíduos não-expostos à RI foi usado como controle. Este grupo foi composto por 215 casos de exames de vínculo genético provenientes dos Laboratórios Biocroma (165) e do Núcleo de Pesquisas Replicon (50), da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, com um índice de paternidade de 99,99%. As amostras biológicas dos indivíduos expostos, de seus cônjuges e de pelos menos um dos seus filhos biológicos foram coletadas por punção venosa de sangue periférico (10 mL) para análise posterior. Para cada amostra biológica, foram separadas alíquotas de plasma, anel leucocitário e hemácias, sendo armazenadas a -20°C . O anel leucocitário foi usado subseqüentemente para extração e purificação do DNA genômico. O material restante foi armazenado para estudos futuros (nos termos da Resolução CNS 340/2004 e 347/2005). No momento da coleta os participantes voluntariamente responderam a um questionário (Anexo 1) e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2).

O presente estudo foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) em julho de 2004, conforme parecer contido no ofício n. 982 CONEP/CNS/MS. O número de registro do processo na CONEP foi 10301 e o número do processo foi 205000.073183/2004-45.

4.2 Extração, purificação e quantificação das amostras de DNA

O DNA genômico foi purificado a partir de 300 μL de sangue total utilizando-se um *kit* comercial de extração de DNA (*Easy[®] DNA Purification Kit*, Invitrogen, EUA), de acordo com instruções do fabricante. A concentração de DNA ($\text{ng}/\mu\text{L}$) existente em cada amostra foi quantificada por espectrofotometria (GeneQuantTM Amersham Biociences, EUA).

4.3 Biomonitoramento

Para o biomonitoramento foram realizadas reações de amplificação por PCR (Reação em Cadeia da DNA polimerase) para um volume final de 12,5 µl de solução, contendo 100 ng de DNA, tampão de enzima 10x, 10 ng de solução contendo 16 oligonucleotídeos fluorescentes marcados com os fluoróforos FAN, HEX e NED (Tabela 2) e 0,5 U de Taq DNA polimerase. O termociclador DNA IQ5[®] (Biorad, EUA) foi utilizado para reações de amplificação. O protocolo de termociclagem usado no presente estudo incluíram um passo de desnaturação inicial de 11 minutos a 95°C e posteriormente de 2 minutos a 96°C; 10 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C e 1 minuto e 30 segundos a 70°C cada; seguidos de 22 ciclos de 1 minuto a 90°C, 1 minuto a 60°C e 1 minuto e 30 segundos a 70°C e finalmente, extensão final de 30 minutos a 60°C (Tabela 4).

Tabela 4. Protocolo de termociclagem

Etapas	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (min)
Desnaturação Inicial	1	95°C	11
Desnaturação cíclica	1	96°C	2
		94°C	1
		60°C	1
Anelamento	10	70°C	1:30
		90°C	1
Extensão Cíclica	22	60°C	1
		70°C	1:30
Extensão final	22	60°C	30
Armazenamento	∞	4°C	∞

Fonte: PowerPlex 16Bio – Tutorial, GE HealthCare, 2007 (promega).

Tabela 5: Características dos 16 marcadores STR utilizados para genotipagem dos indivíduos potencialmente expostos.

Locus STR	Localização Cromossômica	Seqüência repetitiva 5' → 3'	Tamanho esperado do amplicom (pb)
TPOX	2p23.2pter	AATG	262-290
D3S1358	3p	TCTA Complexo	115-147
FGA	4q28	TTTC Complexo	322-444
D5S818	5q23.3.32	AGAT	119-155
CSF1PO	5q33.3.34	AGAT	321-357
D7S820	7q11.21.22	GATA	215-247
D8S1179	8q	TCTA Complexo	203-247
TH01	11p15.5	AATG	156-195
vWA	12p12.pter	TCTA Complexo	123-171
D13S317	13q22.q31	TATC	176-208
Penta E	15q	AAAGA	379-474
D16S539	16q24.qter	GATA	264-304
D18S51	18q21.3	AGAA	290-366
Penta D	21q	AAAGA	376-449
D21S11	21q11.21q21	TCTA Complexo**	203-259
Amelogenin2*	Xp22.1.22.3 e Y	Não se Aplica	106(X), 112(Y)

Fonte: PowerPlex 16Bio – Tutorial, GE HealthCare, 2007 (promega).

* identificação do sexo.

** repetições de bases tetranucleotídicas, nas quais há duas seqüências distintas (nesse caso, TC e TA).

4.4 Genotipagem dos marcadores

Para a análise dos produtos de PCR foi utilizado um sequenciador automático de DNA (Megabace 1000[®], GE Healthcare, EUA). Para tanto, 2 µL de produto da PCR foi diluído em 8 µL de uma solução contendo 7,75 µL de solução de Tween 20 a 0,1% e 0,25 µL de ET-ROX[®] (GE Healthcare, EUA). O ET-ROX consiste em um padrão de peso molecular, usado para alinhar as diferentes corridas dos diversos capilares. Antes da aplicação, as amostras diluídas foram aquecidas a 95°C durante 5 minutos, sendo logo em seguida colocadas em gelo, para a manutenção da desnaturação das fitas de DNA. Os parâmetros utilizados para

injetar as amostras nos capilares e fazer a separação eletroforética dos fragmentos de PCR foram 3kV por 80 segundos e 9kV por 75 minutos, respectivamente.

4.5 Análise dos dados moleculares

Para a análise dos dados obtidos com a corrida eletroforética no sequenciador automático foi utilizado o software *Fragment Profiler*[®] v1.2 (GE Healthcare, EUA). Uma vez configurados os parâmetros da leitura, o programa exibe o padrão de leitura e os dados dos eletroferogramas obtidos para cada amostra na forma de gráficos.

Inicialmente, foi selecionado o procedimento para a genotipagem (*Binning_AdvMicrosat_PeakPostProcessor*). Em seguida, um filtro para a definição do padrão foi importado, visando estabelecer um referencial de leitura por peso molecular (*PowerPlex16bio_ET550.peakfilter.xml*). Para realizar as análises das amostras, os picos dos fragmentos do marcador ET-ROX (ET-550 *Size Standard*) foram selecionados e utilizados como parâmetros para cada leitura.

Em seguida, foram exibidos os eletroferogramas das amostras, nos quais os alelos foram dispostos em formas de picos, com seus respectivos pesos moleculares. Após o alinhamento dos picos, os perfis alélicos foram comparados para cada família visando à pesquisa de possíveis mutações germinativas (Figura 1).

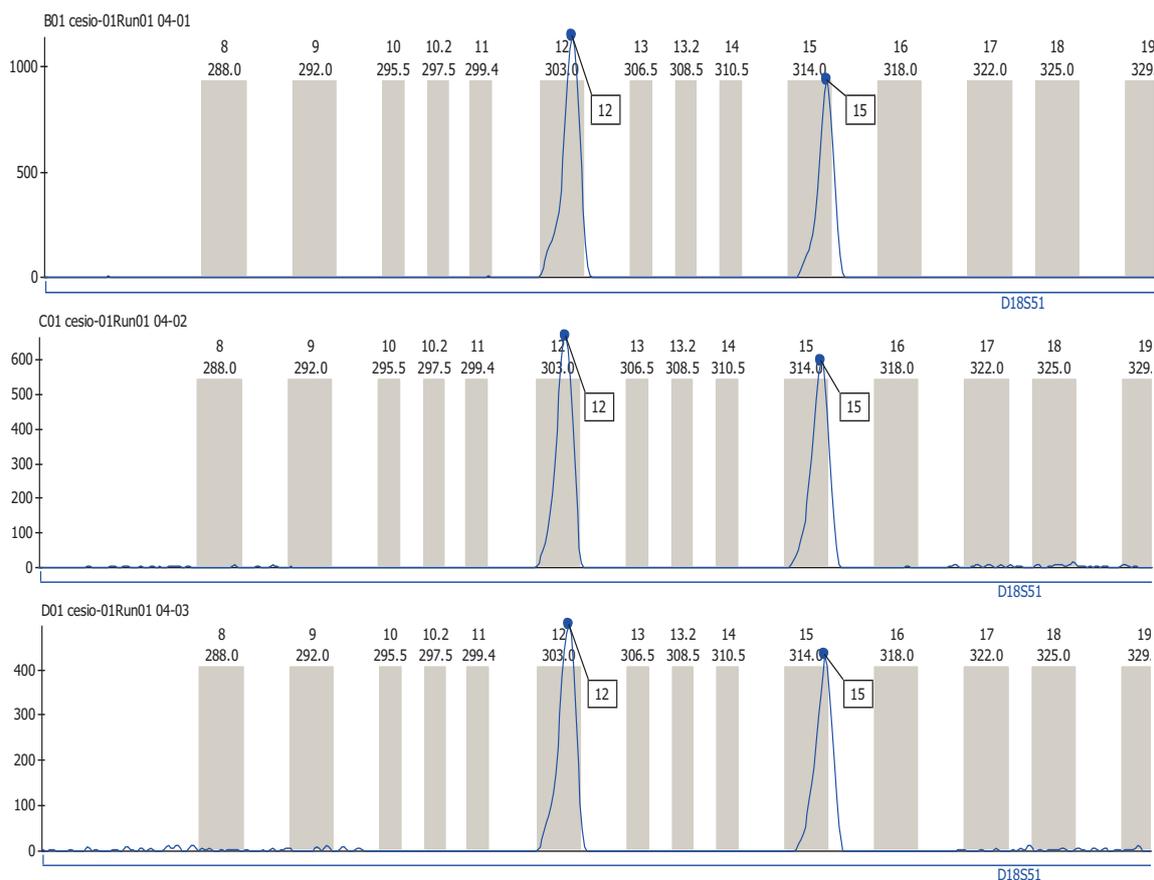


Figura 1. Exemplo da exibição dos alelos dispostos em forma de picos. Nesse caso, observamos os alelos paternos (12, 15), os alelos do filho (12, 15) e os alelos maternos (12, 15), indicando a coincidência entre os alelos paternos e maternos obrigatórios, observados no genótipo filial.

4.6 Estimativa das taxas de mutação

Para o cálculo das taxas de mutação em *loci* STR foi considerado o número total de progenitores analisados neste estudo. Este número foi multiplicado por dois, considerando-se a bialelia observada na espécie humana e pelo número de marcadores analisados. Esse cálculo pode ser representado pela equação 1, a seguir:

$$\text{Eq1: número total de alelos} \\ X = n \times 2 \times y$$

Onde,

- X= número total de alelos amostrados;
- n = número total de progenitores;
- 2 = constante bialélica;
- y = número de marcadores analisados.

Para se obter a taxa de mutação germinativa, por loco amostrado, aplicou-se a equação 2 a seguir:

$$\text{Eq2: Taxa de mutação/loco} \\ \text{TM} = \text{tml}/\text{Eq1}$$

Onde,

- TM = Taxa de mutação por loco;
- Tml = número total de mutações por loco.

Finalmente, para se determinar o número total de mutações germinativas, aplica-se a Eq3, abaixo:

$$\text{Eq3: número total de mutação} \\ \sum_{\text{TM}} = \text{TM}_1 + \text{TM}_2 + \dots + \text{TM}_n$$

4.6 Teste Binomial duas proporções

Para avaliar se a exposição tem algum efeito sobre a taxa de mutação foi realizado o teste binomial duas proporções, com o auxílio do BioEstat 5.0[®]. Este teste analisa a diferença entre duas proporções amostrais independentes, procurando-se determinar se a diferença é de tal grandeza que permita rejeitar a hipótese de nulidade.

5. RESULTADOS

A média das idades dos pais quando o acidente ocorreu era de 29 anos ($DP \pm 10,2$) e a média da idade das mães era de 28 anos ($DP \pm 6,1$). Como grupo controle foram utilizados 215 trios, ou seja, 645 indivíduos, residentes da cidade de Goiânia, Goiás, que realizaram exames de vínculo genético, visando estabelecer a frequência de mutação germinativa em 15 *loci* STR.

O grupo acidentalmente exposto continha 34 indivíduos, perfazendo um total de 330 alelos analisados (Tabela 6). Foi encontrada apenas 1 mutação germinativa de origem paterna no *locus* D8S1179 (Tabela 7 e Tabela 8), com uma taxa de mutação de aproximadamente 0,003. Nesta mutação observada apresentou ganho de um cerne de repetição (Figura 2).

Tabela 6. Dados descritivos do grupo exposto.

Idade Paterna $\pm DP$ (n= 10)	Idade Materna $\pm DP$ (n= 11)	Total de indivíduos	Dose absorvida (Gy)	Total de alelos	Locus mutado
29 \pm 10,2	28 \pm 6,1	34	$\leq 0,2$	330	D8S1179

Tabela 7. Dados dos perfis alélicos e taxa de mutação, observada no marcador D8S1179.

Caso	Família 06
Exposição	Paterna
Dose absorvida	$\leq 0,2$ Gy
Alelos paternos	8, 13
Alelos do filho	12, 14
Alelos maternos	12, 15
Locus mutado	D8S1179
Sequência repetitiva	TCTA Complexo
Tamanho da repetição	203-247
Taxa de mutação	0,003

Tabela 8. Quantidade de eventos mutacionais por *locus* STR observados no grupo de indivíduos acidentalmente exposto à RI de césio-137 em Goiânia.

<i>Locus</i> STR	Número de mutações paternas	Número de mutações maternas	Número de mutações paternas e/ou maternas
Penta E	-	-	-
D18S51	-	-	-
D21S11	-	-	-
TH01	-	-	-
D3S1358	-	-	-
FGA	-	-	-
TPOX	-	-	-
D8S1179	1	-	-
vWA	-	-	-
Amelogenina	-	-	-
Penta D	-	-	-
CSF1PO	-	-	-
D16S539	-	-	-
D7S820	-	-	-
D13S317	-	-	-
D5S818	-	-	-
TOTAL	1	0	0

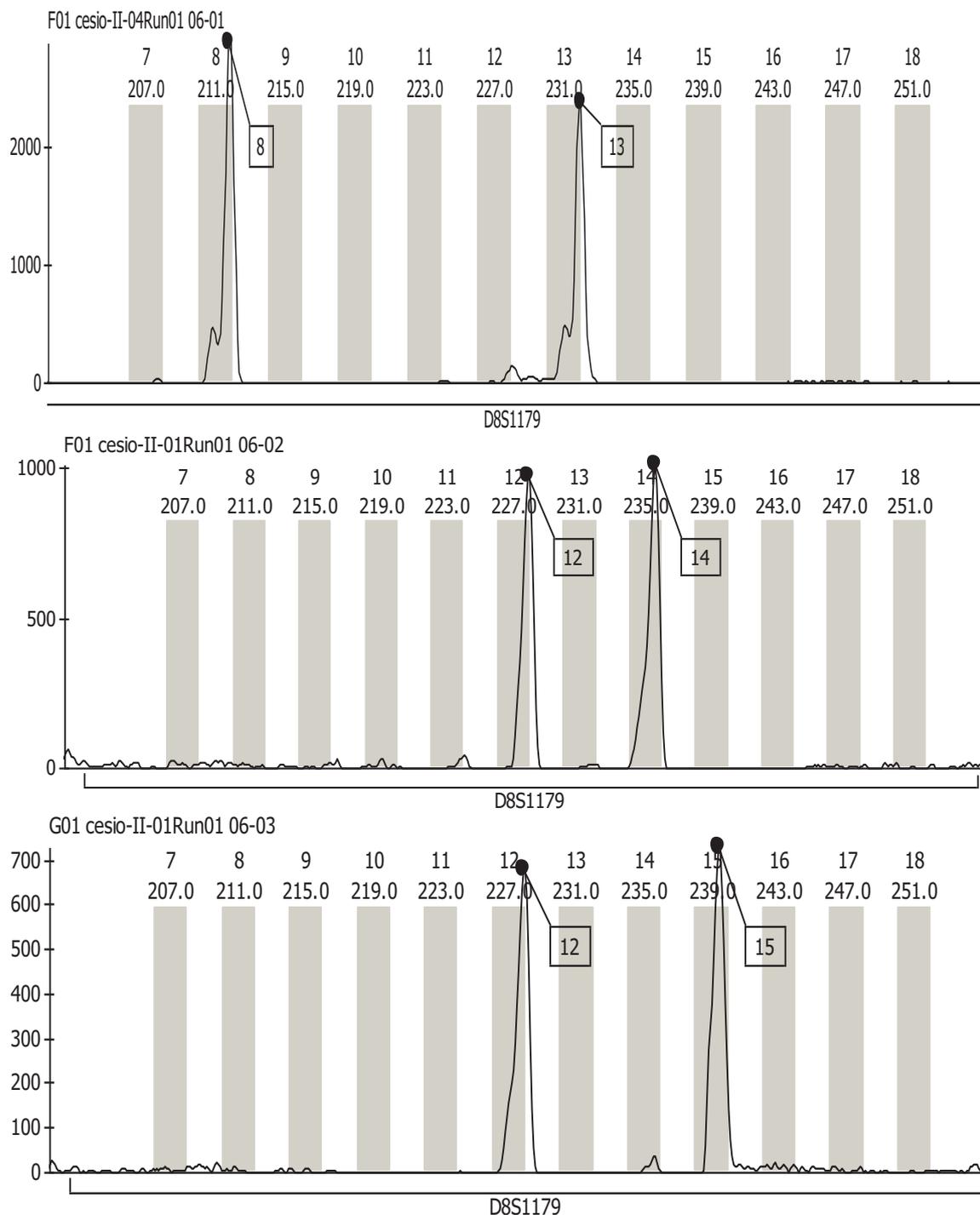


Figura 2. Eletroferograma exibindo a mutação em D8S1179 na família 06. Observa-se que os perfis alélicos do pai (8, 13), do filho (12, 14) e da mãe (12, 15) indicam uma mutação de origem paterna.

No grupo controle, dos 645 indivíduos participantes foram analisados um total de 12.900 alelos. Foram encontradas 11 mutações distribuídas nos *loci* D16S539, D3S1358, FGA, Penta E e D21S11 (Tabela 9), apresentando uma taxa de mutação de 0,0009. Neste grupo, 6 mutações eram de origem materna e 5 de origem paterna.

Tabela 9. Dados gerais dos eventos mutacionais de cada *locus* STR no grupo controle.

<i>Locus</i> STR	Número de mutações paternas	Número de mutações maternas	Número de mutações paternas e/ou maternas
Penta E	-	2	-
D18S51	-	-	-
D21S11	2	2	-
TH01	-	-	-
D3S1358	-	1	-
FGA	3	-	-
TPOX	-	-	-
D8S1179	-	-	-
vWA	-	-	-
Amelogenina	-	-	-
Penta D	-	-	-
CSF1PO	-	-	-
D16S539	-	1	-
D7S820	-	-	-
D13S317	-	-	-
D5S818	-	-	-
TOTAL	5	6	0

Dessa forma, a taxa de mutação observada para o grupo controle foi 4 vezes maior que a taxa encontrada para o grupo acidentalmente exposto à RI de césio-137, durante o acidente ocorrido em Goiânia em 1987. O tamanho do fragmento do *locus* D8S1179 pode variar de 203-247pb. Esta única mutação observada foi de origem paterna e apresentou ganho de apenas um cerne de repetição no alelo mutado, envolvendo 4 nucleotídeos. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre a taxa de mutação do grupo exposto e do grupo controle ($p=0,15$).

6. DISCUSSÃO

Numerosos estudos têm avaliado os efeitos adversos da saúde humana em populações que foram diretamente expostas à radiação ionizante (Dubrova *et al.*, 2005). Alguns destes estudos usam estratégias experimentais de exposição *in vivo* e *in vitro* geralmente de modelos animais, em sua maioria usando camundongos (Dubrova *et al.*, 2003). Recentemente, os resultados de estudos *in vitro* demonstraram que as taxas de mutação induzida em células germinativas permaneceram elevadas durante um considerável período de tempo após a exposição inicial, uma característica comum associada com a instabilidade genômica, refletindo um aumento no risco de câncer (Barber e Dubrova, 2006).

O estabelecimento de biomarcadores para a avaliação de efeitos genéticos em linhagens germinativas decorrentes da exposição individual de corpo inteiro à RI usando STRs tem progredido de forma constante desde que foi primeiramente proposto por Dubrova e colaboradores em 1993. A época, marcadores STRs já eram usados rotineiramente na identificação individual em ciência forense. Dubrova e colaboradores (1993) demonstraram claramente que as taxas de mutações germinativas de sequências repetidas em *tandem* em camundongos estavam relacionadas à exposição de agentes mutagênicos. (Dubrova *et al.*, 1993; Yauk 2004).

Uma das maiores vantagens do uso de STR, como biomarcadores de exposição reside no fato de eles serem altamente polimórficos e apresentam taxas de mutação maiores do que sequências codificantes. Assim, as características particulares dos STRs os tornam eficientes nos rastreamento de efeitos genéticos induzidos nos genomas por agentes mutagênicos. A exposição humana à radiação ionizante aumenta a frequência de mutações somáticas em estudos experimentais. Por outro lado, os efeitos da radiação ionizante na indução de mutações germinativas em humanos ainda não estão bem definidos. Há evidências em estudos recentes que a taxa de mutações germinativas pode ser usada satisfatoriamente no estudo retrospectivo de populações expostas à RI, com bom poder discriminatório de exposição parental (da Cruz *et al.*, 2008; Dubrova *et al.*, 2006; Furitsu *et al.*, 2005; Kodaira *et al.*, 2004).

Os resultados dos estudos de Dubrova e Plumb (2002) destacam a vantagem única em *loci* STR para detectar mutações germinativas induzidas por radiação em camundongos, revelando vantagens para a estimativa de risco genético em populações expostas a baixa dose de radiação. Também demonstraram que *loci* minissatélite são sensíveis para identificar mutações induzidas por radiação em linhagem de células germinativas, fornecendo o primeiro

experimento evidente no aumento de taxa de mutação germinativa induzida por radiação (Dubrova, 2002).

Dubrova e colaboradores (2003) usaram marcadores minissatélites em famílias Ucrânicas e Bielorrussos que habitavam as áreas ao redor de Chernobyl durante o acidente nuclear. Essas famílias foram pareadas por idade e ocupação, e constataram que os filhos de pais expostos tinham uma taxa de mutação mais elevada do que os filhos de pais não expostos. Esta taxa foi atribuída pelo fato da exposição à radiação durante o acidente nuclear de Chernobyl.

Outro relato de Dubrova e colaboradores (2006) em populações Techa mostraram que as taxas de mutação na linhagem germinativa de pais irradiados em *loci* minissatélite é significativamente elevado. Os grupos expostos e controles comparados neste estudo foram pareados por etnia, idade dos pais, ocupação e hábito de fumar. Este aumento não foi atribuído a esses fatores. O aumento da taxa de mutação encontrada nessas famílias foi atribuído à exposição da radiação ionizante, pois várias descargas de resíduos radiativos no rio Techa resultando em uma considerável exposição interna e externa da população local.

A taxa de mutação nos descendentes é estimada usando marcadores minissatélites e microssatélites. O aumento observado na frequência de mutações induzidas em *loci* minissatélites ocorre tanto em células germinativas como nos tecidos somáticos do embrião em desenvolvimento. Várias pesquisas mostram que numerosas mutações nesses *loci*, são quase restritas as células de linhagem germinativa, com raros eventos mutacionais em células somáticas. No entanto, muitos estudos relacionados a mutações germinativas com filhos de pais expostos pode não ter surgido de células germinativas, mas nos tecidos somáticos da prole durante os estágios iniciais de desenvolvimento (Tamaki *et al.*, 1999; Berg *et al.*, 2003).

Resultados de outros estudos sobre os filhos de sobreviventes da bomba atômica de Hiroshima e Nagasaki, filhos de trabalhadores na limpeza do acidente de Chernobyl e pacientes com câncer expostos à radioterapia não encontraram diferenças estatisticamente significativa em taxas de mutação minissatélite e microssatélites entre os grupos expostos e grupo controle (Kiuri *et al.*, 2003; May *et al.*, 2000).

Alguns desses estudos foram realizados por Furitsu e colaboradores (2005), que usaram marcadores microssatélites, e não encontraram nenhum aumento na frequência de mutação em células germinativas em filhos de trabalhadores do acidente nuclear de Chernobyl expostos as radiações ionizantes.

Os outros dois que também utilizaram marcadores microssatélites também foram negativos. Um deles era um estudo piloto sobre os filhos de sobreviventes da bomba atômica

de Hiroshima e Nagasaki, no qual três locos autossômicos (DM, CSF1R-CCTT/CTTT, CSF1R-TAGA) e dois locos microssatélites ligados ao X (FMR1, AR) foram examinados para 65 expostos e 183 não expostos. A média da taxa de mutação (loco por gameta) foram de 0% para o grupo exposto e de 0,5% para o grupo controle não exposto nos cinco *loci* microssatélites, mostrando nenhum aumento na taxa de mutação (Satoh *et al.*, 1996).

O outro estudo similar foi examinar 72 filhos de trabalhadores envolvidos na limpeza dos rejeitos radiativos do acidente de Chernobyl, nascidos após o acidente e 38 filhos nascidos antes do acidente. Cinco locos microssatélites autossômicos (D3S1531, D7S1482, D20S82, D21S1245, CSF1R-CCTT) e um ligado ao X (DXS981) foram analisados neste experimento, e não encontraram nenhum efeito positivo da exposição aos descendentes (Seblos, 2004).

Yauk (2004) revisou toda a literatura de trabalhos envolvendo mutações induzidas em *loci* de minissatélites em humanos e ESTR (repetições em *tandem* expandidas) em camundongos e conclui que a aplicação de seqüências repetitivas de DNA em *tandem* para o estudo de populações expostas a radiação, ainda requer validação e muita pesquisa ainda é necessária para estabelecer a relação de desestabilização de repetições em *tandem* e o potencial risco genético.

É bom salientar que todos os dados sobre mutações induzida por radiação em *loci* minissatélite foram derivados de um número relativamente pequeno de pessoas expostas a diferentes fontes de radiações ionizantes. Esta variedade de fontes impede qualquer comparação confiável entre os resultados destes estudos pilotos. Exames complementares são, portanto claramente necessário para avaliar a indução de mutação induzida em humanos nos *loci* minissatélites.

Das 10 famílias analisadas neste estudo, foi encontrada 1 mutação de origem paterna nos indivíduos expostos acidentalmente ao césio-137. O grupo exposto foi composto por 34 famílias e o grupo controle por 645 indivíduos. De acordo com os resultados obtidos, a taxa de mutação foi maior no grupo controle do que no grupo exposto.

Esses dados são semelhantes aos resultados de Furitsu *et al.*, 2005, Satoh *et al.*, 1996 e Seblos *et al.*, 2003, que não encontraram nenhum aumento na freqüência de mutações germinativas.

Os resultados deste estudo não foram semelhantes com os estudos de Flores 2008 e Da Cruz *et al.*, 2008, que também analisaram a freqüência e a taxa de mutação germinativa em indivíduos ocupacionalmente e acidentalmente expostos ao césio-137.

No estudo de Flores (2008), foram encontradas 11 mutações e uma taxa de mutação de 0,02 nos descendentes de pais expostos ocupacionalmente ao Césio-137. Esses indivíduos ocupacionalmente expostos eram militares envolvidos no socorro das vítimas durante o acidente. O grupo exposto foi composto por 39 indivíduos e o grupo controle por 900 indivíduos, evidenciando que a radiação aumentou a frequência de mutações nos *loci* STR na prole dos indivíduos expostos. As mutações encontradas eram de origem paterna.

Já os resultados de Flores (2008) foram bastante semelhante aos resultados de da Cruz *et al.*, 2008, que detectaram 10 mutações na prole, da qual ambos os genitores haviam sido expostos acidentalmente à radiação ionizante de césio-137. De acordo com da Cruz *et al.*, 2008, o aumento das taxas de mutação nos *loci* microssatélites de origem parental, exposta ao Césio-137, estaria relacionado a exposição a radiação.

Não houve diferenças estatísticas significativas pelo teste binomial duas proporções ($p=0,15$). Uma possível razão para uma pequena taxa de mutação observada no presente estudo pode estar relacionada às baixas doses de radiação absorvida estimada para a população exposta que compõe o grupo de estudo. A taxa de mutação aumenta linearmente com a dose da radiação absorvida, portanto uma taxa de mutação elevada reflete proporcionalmente mais danos ao DNA. Por outro lado, a exposição dos sistemas biológicos a doses discretas de RI parecem estimular o sistema de reparo de DNA, que se comporta de forma mais eficiente. Assim, a exposição parental a doses inferiores a 0,2 Gy justificariam a reduzida taxa de mutação na geração F1 (da Cruz, 1997). No entanto, os STRs estudados foram marcadores genômicos neutros e seus resultados não podem ser usados para se inferir os danos à saúde genética da geração filial. Ainda neste contexto, prevalece o paradigma transgeracional e as controvérsias sobre o efeito da exposição parental na saúde genética da prole, como apontado por Barber e Dubrova (2006). Os riscos transgeracionais parecem ser aumentados na geração filial, como foi ilustrado pelo estudo de Gardner e colaboradores (1990) sobre o agrupamento de leucemias e linfomas em uma população jovem da vizinhança da Usina Nuclear de Sellafield. Em geral, os efeitos da exposição humana à RI ainda continua muito controverso. Em parte, porque os dados experimentais ou de exposição *in vivo* de populações humanas ainda é limitado, mas também porque os mecanismos subjacentes as respostas celulares decorrentes do estresse provocado pela exposição celular à energia radiativa ainda permanecem pouco elucidados.

Desta forma, a quantificação de mutações em microssatélites pode fornecer um sistema capaz de, em princípio, detectar mutações induzidas em populações relativamente pequenas, como é o caso da população exposta à radiação gama do césio-137 em Goiânia.

Nesse contexto, a taxa de mutação em STR contribui para o aumento no conhecimento sobre os efeitos de exposição à radiação ionizante em populações humanas.

7. CONCLUSÕES

A análise retrospectiva da frequência de mutações germinativas de STR em famílias das quais pelo menos um dos progenitores foi diretamente exposto à radiação ionizante do Césio-137, durante o acidente de 1987 em Goiânia, permitiu chegar as seguintes conclusões:

- A taxa de mutação germinativa no locus D8S1179 foi de 0,003;
- A taxa de mutação observada neste estudo não foi semelhante aos de outros estudos da população goiana, da qual também foi analisada a frequência e a taxa de mutação germinativa em indivíduos ocupacionalmente e acidentalmente expostos ao césio-137;
- Não houve diferença estatística significativa entre a tm do grupo exposto e controle.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bandazhevsky YI. Chronic Cs-137 incorporation in children's organs. *Swiss Med Wkly* 133, 488-490, 2003.

Barber RC, Dubrova YE. The offspring of irradiated parents, are they stable? *Mutation Research* 598, 50 - 60, 2006.

Baverstock K, Wiliam D. The Chernobyl Accident 20 years on: An assessment of the health consequences and the international response. *Environmental Health Perspectives* 114(9), 1312-1317, 2006.

Berg I, Neumann H, Cederberg R, Rannug U, Jeffreys AJ. Two modes of germline instability at human minisatellite MS1 (locus D1S7): complex rearrangements and paradoxical hyperdeletion. *Am. J. Hum. Genet.* 72, 1436-1447, 2003.

Biral A. R. Radiações ionizantes para médicos, físicos e leigos. 1.ed., Florianópolis: Insular, pp.232, 2002.

Bois PRJ. Hypermutable minisatellites, a human affair? *Genomics* 81, 349-355, 2003.

Brenner DJ, et al. Cancer risk attributable to low doses of ionizing radiation: Assessing what we really know. *Proceedings of the national academy of sciences of United States of America*, 100(24) 13761-13766, 2003.

Bridges BA. Radiation and germline mutation at repeat sequences: Are we in the middle of a paradigm shift? *Radiation research* 156, 631-641, 2001.

Chun LY et al. Microsatellite: genomic distribution putative functions and mutational mechanism: a review. *Molecular ecology* 11, 2453-2465, 2002.

Collins KE, Jardim ICSF, Collins CH. O que é Césio? *Química nova* 11(2) 169-178, 1988.

Coomber N, David VA, O'Brien SJ, Menotti-Raymond M. Validation of a short Tandem Repeat Multiplex Typing System for Genetic Individualization of domestic Cat Samples. *Forensic Science* 48, 547-555, 2007.

Da Cruz AD, Curry J, Curado MP, Glickman BW. Monitoring *hprt* Mutant Frequency Over Time in T-Lymphocytes of People Accidentally Exposed to High Doses of Ionizing Radiation. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 27, 165-175, 1996.

Da Cruz AD, McArthur AG, Silva CC, Curado MP, Glickman BW. Human micronucleus counts are correlated with age, smoking, and cesium-137 dose in the Goiânia (Brazil) radiological accident. *Mutation research* 313, 57-68, 1994.

Da Cruz AD, Silva DM, da Silva CC, Nelson RJ, Ribeiro LM, Pedrosa ER, Jaime JC, Curado MP. Microsatellite mutations in the offspring of irradiated parents nineteen years after the Cesium-137 accident. *Mutation Research* 652, 175-179, 2008.

Da Cruz AD, Volpe JP, Saddi V, Curry J, Curado MP, Glickman BW. Radiation risk estimation in human populations: Lessons from the radiological accidente in Brazil. *Mutation research* 373, 207-214, 1997.

Da Cruz, AD (1997): Monitoring the Genetic Health of Humans Accidentally Exposed to Ionizing Radiation of Cesium-137 in Goiânia (Brazil). Tese (Doutorado) – Department of Biology, University of Victoria.

da SILVA, CC (2000): Avaliação Citogenética de Indivíduos Expostos Acidentalmente à Radiação Ionizante de Césio-137 em Goiânia (Brasil). Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

Dubrova YE & Plumb MA. Ionizing radiation and mutation induction at mouse minisatellite loci. The story of the two generations. *Mutation Research* 499(2), 143-150, 2002.

Dubrova YE et al. Elevated Minisatellite Mutation Rate in the Post-Chernobyl Families from Ukraine. *Am. J. Hum. Genet.* 71, 801-809, 2002.

Dubrova YE *et al.* Minisatellite germline mutation rate in the Techa River population. *Mutation Research* 602, 74-82, 2006.

Dubrova YE et al. Stage specificity, dose response, and doubling dose for mouse minisatellite

germline mutation induced by acute radiation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95, 6251-6255, 1998.

Dubrova YE, Jeffreys AJ, Malasshenko AM. Mouse minisatellite mutations induced by ionizing radiation. Nat. Genet. 5, 92-94, 1993.

Dubrova YE. *et al.* Radiation-induced germline instability at minisatellite loci. International Journal of radiation biology 74(6), 689-696, 1998.

Dubrova YE. Long-term genetic effects of radiation exposure. Mutation research 544, 433-439, 2003.

Dubrova YE. Monitoring of radiation – induced germline mutation in humans. Swiss Medical Weekly 133, 474-478, 2003.

Dubrova, YE. Radiation-induced mutation at tandem repeat DNA loci in the mouse germline: spectra and doubling doses. Radiation Research 163(2) 200, 2005.

Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. Nature Reviews – Genetics 5, 435-445, 2004.

Flakus FN, Radiation in perspective: Improving comprehension of risk. IAEA Bulletin – Quarterly Journal of the International Atomic Energy Agency 37(2), 7-11, 1995.

Flores BC. Monitoramento Genético Retrospectivo de população ocupacionalmente exposta à radiação ionizante utilizando marcadores moleculares. 2008. Dissertação (Mestrado) – Mestrado em genética, Universidade Católica de Goiás.

Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, 2002.

Furitsu K et al. Microsatellite mutations show no increase in the children of the Chernobyl liquidators. Mutation research 581, 69-82, 2005.

Gardner MJ, Snee MP, Hall AJ, Powell CA, Downes S, Terrell JD. Results of case-control

study of leukaemia and lymphoma among young people near Sellafield Nuclear Plant in West Cumbria. *BMJ* 300, 423-429, 1990.

Gu D, Wang M, Wang M, Zhang Z, Chen J. The DNA repair gene *APE1* T1349G polymorphism and cancer risk: a meta-analysis of 27 case-control studies. *Mutagenesis* 24(6), 507-512, 2009.

Ivanov V, Ilyin L, Gorski A, Tukov A, Naumenko R Radiation and Epidemiological Analysis for Solid Cancer Incidence among Nuclear Works Participated in Recovery Operations Following the Accident at the Chernobyl NPP. *J. Radiat.Res.*, 45, 41-44, 2004.

Jeffreys AJ, et al. Spontaneous mutation rates to new length alleles at tandem-repetitive hypervariable loci in human DNA. *Nature* 332, 278-281, 1998.

Kiuri A et al. Hereditary minisatellite mutations among the offspring of Estonian Chernobyl cleanup works. *Radiation Research* 159, 651-655, 2003.

Kodaira M. *et al.* Lack of effects of atomic bomb radiation on genetic instability of tandem repetitive elements in human germ cells. *Am J Hum Genet* 57, 1275-1285, 1995.

Lee HC, Gaensslen RE. DNA and other polymorphism in forensic science. *Mosby Yearbook*, 114-134, 1990.

Leitão AC, Gomes RA. *Radiobiologia e Fotobiologia – Respostas celulares às lesões induzidas por agentes físicos e químicos.* Instituto de biofísica Carlos Chagas Filho. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1994.

Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E. Microsatellites Within Genes: Structure, Function and Evolution. *Molecular Biology Evolution* 21(6), 991-1007, 2004.

Livshits LA et al. Children of Chernobyl cleanup works do not show elevated rates of mutations in minisatellite alleles. *Radiation research* 155, 74-80, 2001.

May CA et al. Minisatellite mutation frequency in human sperm following radiotherapy. *Mutation research* 453, 67-75, 2000.

Niwa O. Indirect mechanisms of genomic instability and the biological significance of mutations at tandem repeat loci. *Mutation research* 598, 61-72, 2006.

Okumo E. *Radiação: Efeitos, Riscos e Benefícios*, Editora Herba LTDA, 1998.

Ramalho AT, Nascimento ACH, Natarajan AT. Dose assessments by cytogenetic analysis in the Goiânia (Brazil) radiation accident. *Radiat Protect Dosimetry* 25, 97-100, 1988.

Rothkamm K, Löbrich M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *PNAS* 100(9), 5057-5062, 2003.

Sajantilla A et al. Experimentally observed germline mutations at human micro and minisatellite loci. *European Journal of Human Genetics* 7, 263-266, 1999.

Satoh C, Takahashi N, Asakawa J, Kodaira M, Kuick R, Hanash SM, Neel JV. Genetic analysis of children of atomic bomb survivors. *Environ. Health Perspect.* 104, 511-519, 1996.

Slebos RJC et al. Mini-and microsatellite mutations in children of Chernobyl accident cleanup workers. *Mutation research* 559, 143-152, 2004.

Sutherland BM, Bennett PV, Sidorkina O, Laval J. Clustered DNA damages induced in isolated DNA and in human cells by low doses of ionizing radiation. *PNAS* 97, 103-108, 2000.

Suzuki M, Tsuruka C, Uchihori Y, Kitamura H, Liu CH. Radiation-quality Dependent Cellular Response in Mutation Induction in Normal Cells. *J. Radiat. Res.* 50, 395-399, 2009.

Tamaki K, May CA, Dubrova YE, Jeffreys AJ. Extremely complex repeat shuffling during germline mutation at human minisatellite. *Hum. Mol. Genet.* 8, 879-888, 1999.

Toyokuni H, Maruo A, Suzukib K, Watanabea M. The Contribution of Radiation-Induced Large Deletion of the Genome to Chromosomal Instability. *Radiation Research* 171, 198-203, 2009.

Watson JD *et al.* *Recombinant DNA. Genes and Genomes – A short course.* Third Edition. W. H. Freeman and Comoany, New York, 2007.

Weinberg HSh et al. Very high mutation rate in offspring of Chernobyl accident liquidators. *The Royal Society* 268, 1001-1005, 2001.

Westman JA. *Genética Médica*. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro – RJ, 2006.

Wu J. *et al.* Radiation-induced germline mutations detected by a direct comparison of parents and first-generation offspring DNA sequences containing SNPs. *Mutation Research* 596, 1-11, 2006.

Xavier AN, Moro JT, Heilbron PF. *Princípios básicos de segurança e proteção radiológica*. Terceira Edição. Rio Grande do Sul, 2006.

Yauk CL. Advances in the application of germline tandem repeat instability for in situ monitoring. *Mutation research* 566, 169-182, 2004.

Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11(1), 1-16, 2002.

9. ANEXOS

ANEXO 1

**QUESTIONÁRIO PARA O MONITORAMENTO DOS INDIVÍDUOS
RADIOACIDENTADOS DO CÉSIO-137
(GRUPO 2)**

Família nº: _____

Iniciais: _____

DADOS

Nome: _____

Data de nascimento: ___/___/___ Idade: ___ Sexo: _____

Documento de Identidade: _____ Org. Exp. _____

CPF: _____ Profissão: _____

Estado Civil: _____

Cônjuge: _____ Grupo: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ Estado: _____

CEP: _____ Telefone: _____ Celular: _____

Naturalidade: _____ Nacionalidade: _____

Filiação:

Pai: _____ Grupo: _____

Mãe: _____ Grupo: _____

1. Foi contaminado (a) pela fonte de radiação do Césio-137 ou dos rejeitos radioativos? Sim Não

Por quanto tempo? _____

Como se aproximou? _____

Observação:

2. Possui filhos: Sim Não Quantos? _____

Antes ou depois do acidente? _____

Com quantas mulheres ou homens? _____

Nome(s) do filho(s):

1. _____ Grupo: _____

2. _____ Grupo: _____

3. _____ Grupo: _____

4. _____ Grupo: _____

3. Seu(s) filho(s) apresentou (apresentaram) distúrbio(s) de saúde?

Sim Não

Se sim, qual ditúrbio? _____

4. É fumante?

Sim Não

Por quanto tempo? _____

Já fumou?

Sim Não

Se sim, por quanto tempo fumou? _____

Por quanto tempo parou de fumar? _____

5. Utiliza bebida alcoólica?

Sim Não

Quanto tempo? _____

Já utilizou?

Sim Não

Se sim, qual a frequência? Diariamente Socialmente Ocasionalmente

6. Usa algum medicamento?

Sim Não

Por quanto tempo? _____

Já usou?

Sim Não

Por quanto tempo? _____

7. Possuía alguma doença antes do acidente?

Sim Não Qual (is)? _____

Usou medicamentos antes do acidente?

Sim Não Qual (is) ? _____

8. Possui alguma doença depois do acidente?

Sim Não Qual (is)? _____

Em caso afirmativo, utiliza algum medicamento?

Sim Não Qual (is)? _____

9. Já usou outras substâncias incomuns:

Sim Não

Se sim qual e a quanto tempo? _____

10. Trabalha:

sim não

Se sim, há quanto tempo e qual profissão? _____

ANEXO 2**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****Dados de identificação**

Título do Projeto: Estudo genético retrospectivo de mutações em locos STR dos indivíduos potencialmente expostos ao Césio-137

Pesquisadores Responsáveis: Aparecido Divino da Cruz, Daniela de Melo e Silva e Cláudio Carlos da Silva

Nome do voluntário: _____

Telefone: _____ Celular: _____

Idade: _____ anos R.G. _____

Responsável legal (quando for o caso): _____

Grau de parentesco: _____

R.G. Responsável legal: _____

1. Este projeto tem o objetivo de avaliar e monitorar a saúde genética dos radioacidentados do Césio-137.
2. Para tanto será necessário realizar os seguintes procedimentos:
 - responder um questionário
 - doação de 10 mL de amostra de sangue periférico
3. Os procedimentos da pesquisa oferecem risco mínimo de ocorrência de algum dano imediato ou tardio para o paciente (hematomas locais após a coleta).
4. Caso você apresente algum problema em seus resultados da pesquisa, você será acompanhado(a) e encaminhado(a) para o tratamento adequado ao tipo de doença.
5. A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional.
6. Você será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.

O(s) pesquisador(es) irá(ão) tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo e as informações colhidas serão utilizadas somente para fins científicos. Os resultados da pesquisa serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

Eu, _____, RG n° _____ declaro ter sido suficientemente esclarecido sobre os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Estou ciente de que todas as informações prestadas durante a entrevista serão de caráter confidencial e os dados colhidos serão utilizados somente para fins científicos. Concordo voluntariamente em participar desta consulta, sendo que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido durante o atendimento neste Serviço.

Ou,

Eu, _____,
 RG n° _____, responsável legal por _____,
 RG n° _____ declaro ter sido informado e concordo com a sua participação, como voluntário, no projeto de pesquisa acima descrito.

Goiânia, ____ de _____ de _____

Nome e assinatura do paciente ou seu responsável legal

Nome e assinatura do responsável por obter o consentimento