



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
MESTRADO EM GENÉTICA

**Mutações Germinativas na Prole de Pessoas Expostas  
Ocupacionalmente à Radiação Ionizante de Césio-137**

Juliana Ferreira da Silva

Goiânia-GO  
©2016



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
MESTRADO EM GENÉTICA

## **Mutações Germinativas na Prole de Pessoas Expostas Ocupacionalmente à Radiação Ionizante de Césio-137**

Juliana Ferreira da Silva

**Orientador:** Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz, PhD

Dissertação apresentada ao  
Programa de Mestrado em  
Genética da Pontifícia  
Universidade Católica de Goiás,  
como parte dos requisitos para a  
obtenção do título de Mestre em  
Genética.

Goiânia-GO  
©2016

S586m Silva, Juliana Ferreira da  
Mutações germinativas na prole de pessoas expostas  
ocupacionalmente à Radiação Ionizante de Césio - 137  
[manuscrito] / Juliana Ferreira da Silva.-- 2016.  
112 f.; il.; 30 cm

Texto em português com resumo em inglês.  
Dissertação (mestrado) -- Pontifícia Universidade  
Católica de Goiás, Programa de Pós-Graduação STRICTO  
SENSU em Genética, Goiânia, 2016  
Inclui referências

1. Radiação ionizante. 2. Exposição ocupacional -  
Aspectos genéticos. 3. Mutagênese. 4. Césio. I.Cruz,  
Aparecido Divino da. II.Pontifícia Universidade Católica  
de Goiás. III. Título.

CDU: 614.876(043)



**PUC  
GOIÁS**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Av. Universitária, 1069 ● Setor Universitário  
Caixa Postal 86 ● CEP 74605-010  
Goiânia ● Goiás ● Brasil  
Fone: (62) 3946.1070 ● Fax: (62) 3946.1070  
www.pucgoias.edu.br ● prope@pucgoias.edu.br

**ATA COMPLEMENTAR Nº 116/2016**

**MESTRADO EM GENÉTICA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS**

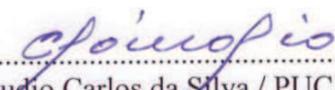
**DISCENTE: JULIANA FERREIRA DA SILVA**

**DEFENDIDA EM 15 DE MARÇO DE 2016 E APROVADA COM CONCEITO A**

O título foi alterado ( ) não (  ) sim Mutação germinativa na prole de pessoas  
expostas ocupacionalmente à radiação ionizante de  
Césio - 137.

**BANCA EXAMINADORA**

  
.....  
Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz / PUC Goiás  
(presidente-orientador)

  
.....  
Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva / PUC Goiás  
(Membro interno)

  
.....  
Profa. Dra. Thais Cidália Vieira Gigonzac/UEG  
(membro externo)

**Dedicatória**

À minha mãe Ledir Maria da Silva,  
Pelo amor e dedicação incondicionais.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar, pela minha vida e da minha família, pela graça de poder chegar até aqui pela experiência adquirida no trajeto, por me fortalecer em todos os momentos.

Agradeço minha mãe Sra. **Ledir Maria da Silva**, por sempre estar ao meu lado me apoiando em todos os momentos, pela compreensão, pela mãe maravilhosa sempre presente em todos os momentos, que por vezes renunciou algo em meu favor, pelo amor incondicional. Muito obrigada, e tudo que tenho devo a ti, te amo muito. Ao meu padrasto Sr. **José Aliandro Pereira Nunes**, por ter dado apoio durante esses dois anos, pela preocupação constante.

Ao meu orientador Professor **Aparecido Divino da Cruz, PhD. (Peixoto)**, pessoa que admiro profundamente, a quem aprendi a amar a cada dia mais e a respeitar. Obrigada professor, por todo o ensinamento e pelos conselhos não apenas na academia, mas também fora dela.

Ao Professor Dr. **Cláudio Carlos da Silva**, uma pessoa de valor imensurável, admiro muito, tanto como professor como pessoa. Agradeço pela disposição, pelos conselhos, pelos ensinamentos.

À **Irene Plaza Pinto** pela amizade, pelos momentos de discussões construtivas, pelo auxílio na realização e na análise dos dados.

À **Emília Oliveira Alves Costa** pelos momentos de descontração, pelo apoio durante a elaboração desse documento. Obrigada pela sua amizade.

Aos amigos do Laboratório **REPLICON-PUC-GO e LAGENE-SES-GO**, por partilharem os dias comigo, pelos momentos de descontração, pela amizade e carinho.

Aos Professores do Programa de Mestrado em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, pelos momentos de aprendizado, pela troca de conhecimento. E à **Alessandra Malta** por sempre nos auxiliar nas dúvidas cotidianas.

Ao meu pai Sr. **Sebastião Ferreira da Silva**, pelo amor e ensinamento.

Ao meu namorado, **Pedro Rafael da Silva Pereira**, pelo apoio, incentivo, pela companhia, pelo conforto nas angústias.

Aos **militares** que participaram da pesquisa, que superaram seus traumas em prol do desenvolvimento científico.

Ao **capitão Bráulio Cançado Flores** do corpo de bombeiro do estado de Goiás, por um dia ter sonhado em fazer ciências com um grupo de pessoas ocupacionalmente

exposto à radiação ionizante, e que deste sonho surgiu à oportunidade de outras pessoas poderem trabalhar com esse grupo, disponibilizando as amostras.

Ao doutorando **Macks Wendhell Gonçalves**, pelo auxílio na tabulação dos dados análise estatística.

A **CNEN** pela bolsa de estudos e a **FAPEG** e ao **CNPq** pelo fomento à pesquisa que garantiram a conclusão do curso e a realização deste estudo. A **Pontifícia Universidade Católica de Goiás** pelo apoio e pela infraestrutura disponibilizada para o desenvolvimento do estudo.

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	v
AGRADECIMENTOS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS.....	xiii
1. Resumo.....	16
2. Abstract.....	17
3. INTRODUÇÃO.....	18
4. REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	22
4.1. Radiação Ionizante.....	22
4.2. Histórico do Acidente.....	28
4.3. Mutação.....	33
4.4. Variação no Número de Cópias (CNVs).....	35
4.5. Formação das CNVs.....	37
4.6. Análise Cromossômica Por Microarranjos.....	40
5. OBJETIVOS.....	41
5.1. Objetivo Geral.....	41
5.2. Objetivos específicos.....	41
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
6.1. Caracterização do Grupo Amostral.....	42
6.2. Coleta e Processamento das Amostras.....	42
6.3. Isolamento do DNA Genômico.....	42
6.4. Análise Cromossômica pro Microarray.....	43
6.4.1. Método de Genotipagem por SNP-Array.....	43
6.4.2. Tratamento e Análise dos Dados Obtidos na Genotipagem dos SNPs.....	44
6.5. Cálculo da Taxa de Mutação Germinativa em CNVs ( $TM_{CNV}$ ).....	46
6.6. Análise Estatística.....	47
7. RESULTADOS.....	48
8. DISCUSSÃO.....	58
9. CONCLUSÃO.....	64
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	65
11. ANEXOS.....	76
ANEXO I.....	76
ANEXO II.....	80
ANEXO III.....	83

ANEXO IV .....	86
ANEXO V.....	88
ANEXO VI.....	95
ANEXO VII.....	102
ANEXO VIII.....	110

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Radiohidrólise. A energia da radiação é transmitida para a molécula de água (A), provocando a sua quebra e gerando radicais livres (B) que vão atacar as biomoléculas, causando danos (C)..... 23
- Figura 2.** Acometimento cutâneo de alguns indivíduos expostos à radiação do céσιο-137, durante o acidente radiológico de Goiânia. As fotografias mostram sinais comuns da doença aguda da radiação e as radiolesões (SuLeide<sup>©</sup> 1988). ..... 24
- Figura 3.** Decaimento do Césio-137 (<sup>137</sup>Cs). Por fissão nuclear espontânea ou induzida, os radioisótopos de céσιο são produzidos de radionuclídeos pesados como os de urânio e plutônio. A meia-vida do <sup>137</sup>Cs é de cerca de 30,2 anos, sendo que aproximadamente 95% decai por emissão de partículas beta para um isômero nuclear metaestável de bário-137 (Ba-137m), cuja meia-vida é de 153 segundos. Ba-137m emite os raios gamas nas amostras de <sup>137</sup>Cs. Cerca de 5% decai diretamente para o estado fundamental de Bário-137, que é estável (Collins et al., 1988). ..... 26
- Figura 4.** Imagens do antigo Instituto Goiano de Radioterapia (IGR) abandonado no ano de 1987, mostrando as condições precárias onde havia sido abandonada a unidade de radioterapia (SuLeide<sup>©</sup> 1987). ..... 28
- Figura 5.** Aparelho de radioterapia responsável pelo acidente radiológico em Goiânia. Na figura A e B: cabeçote violado após desmonte no ferro velho. Na figura C e D: estocagem e isolamento da unidade radioativa após as medidas emergenciais (SuLeide<sup>©</sup>1987 A e B; 1988 C e D)..... 29
- Figura 6.** Mapa da situação municipal de Goiânia dividido por bairros. O símbolo amarelo indica a localização inicial da fonte na região central de Goiânia. Os símbolos vermelhos indicam os focos primários. Os símbolos em azul indicam os focos secundários das regiões contaminadas pelo céσιο-137, adaptado de Da Silva (2000). .. 31
- Figura 7.** Interface de análise dos dados no *ChAS*<sup>®</sup> 2.0 (Affymetrix – EUA). A plataforma de análise dos dados gerados interpreta os dados produzidos pelo escaneamento do GeneChip<sup>®</sup> HD. A interface registra visualmente as microalterações estruturais observadas ao longo do genoma humano. O *ChAS*<sup>®</sup> foi a plataforma de análise escolhida para o estudo de mutações germinativas em CNVs na prole de trabalhadores expostos ocupacionalmente à radiação ionizante de céσιο-137, em Goiânia. .... 45
- Figura 8.** Teste de comparações múltiplas por ANOVA fatorial (Tukey) para as variâncias observadas em A: A taxa de *burden* em CNVs e B: Total de CNVs por cromossomo, entre os grupos controle e casos expostos à RI de céσιο-137 em Goiânia-GO..... 49
- Figura 9.** A distribuição das variáveis tamanho das CNVs, número de marcadores na CNV e o número de genes na CNVs entre os grupos controle (1) e casos (2) expostos à RI de céσιο-137 em Goiânia-GO. .... 51

<b>Figura 10.</b> Análise discriminante: número de meioses, idade materna e o número de marcadores, genes e tamanho (Kb) observados na geração F1 de controles e casos expostos ocupacionalmente a RI de césio-137 em Goiânia (Brasil). .....	52
<b>Figura 11.</b> Distribuição das frequências das diferentes classes do tamanho do fragmento (Kb) entre os grupos controle e o caso, para a microdeleção e microduplicação, no estudo sobre a indução de mutações novas na prole de indivíduos expostos à RI de Goiânia-GO. ....	52
<b>Figura 12.</b> Distribuição das frequências das diferentes classes do número de marcadores (CNVs) entre os grupos controle e o caso, para a microdeleção e microduplicação, no estudo sobre a indução de mutações novas na prole de indivíduos expostos à RI de Goiânia-GO. ....	53
<b>Figura 13.</b> Frequência percentual da distribuição das CNVs em função das variantes depositadas no DGV e no CytoScan HD no estudo sobre a indução de mutação germinativa na geração F1 de indivíduos expostos à RI em Goiânia-GO. ....	54
<b>Figura 14.</b> Regressão linear simples entre o número de mitoses e a taxa de mutação germinativa em CNVg da progênie de controles.....	57

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Dados descritivos dos grupos caso e controle para as gerações parental e F1 incluídos no estudo da sobre a indução de mutação germinativa na prole de indivíduos expostos acidentalmente a doses baixas de radiação ionizante de césio-137. ....	48
<b>Tabela 2.</b> Distribuição das CNVs entre casos e controles para o estudo do impacto da exposição acidental a doses baixas de RI na frequência de mutações germinativas na progênie de pessoas expostas à radiação ionizante de Cs <sup>137</sup> . ....	50
<b>Tabela 3.</b> Comparação da frequência de mutação de microdeleção entre o caso e o controle para cada cromossomo. ....	55
<b>Tabela 4.</b> Comparação da frequência de mutação de microduplicação entre o caso e o controle para cada cromossomo. ....	56

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

$^{137}\text{Cs}$  – Césio-137

AGCC – *Array Genechip Command Console Software*

AIEA – Agência Internacional de Energia Atômica

C.A.R.A. – Centro de Assistência ao Radioacidentado

CEEPP-LNF – Centro de Excelência em Ensino, Pesquisa e Projetos Leide das Neves Ferreira

ChAS – *Chromosome Analysis Suite*

Ci – Curie

CMA – do inglês, Chromosomal Microarray – Análise Cromossômica por Microarranjos

CNEN – Comissão Nacional de Energia Nuclear

CNVg – do inglês, *Copy Number Variation*, microduplication – Variação do Número de Cópias, microduplicação

CNVp – do inglês, *Copy Number Variation*, microdeletion – Variação do Número de Cópias, microdeleção

CNVs – do inglês, *Copy Number Variation* – Variação do Número de Cópias

CODAR – Codificação Brasileira de Desastres, Ameaças e Riscos

DGV – do inglês, *Database of Genomic Variants* – Banco de Dados de Variantes Genômicas

DNA – do inglês, *Desoxirribonucleic Acid* – Ácido Desoxirribonucleico

DSBs – do inglês, *Double Strand Breaks* – Quebras de Fita Dupla

EROs – Espécies Reativas do Oxigênio

FunLeide – Fundação Leide das Neves

FURNAS – Furnas Centrais Elétricas S/A

GWAS – do inglês, *Genome Wide Association Studies*– Associação Genômica Ampla

Gy – Gray

HGG – Hospital Geral de Goiânia

HNMD – Hospital Naval Marcílio Dias

*hprt* – *Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*

HR – do inglês, Homologous Recombination – Recombinação homóloga

IGR – Instituto Goiano de Radioterapia

Kb – Quilobase

KBq – Quilobecquerel

LCRs – do inglês, *Low Copy Repeats*– Repetições de poucas cópias

MAPD – do inglês, *Median Absolute Pairwise Difference* – Mediana Absoluta da Diferença Pareada

NAHR–do inglês, *Non-Allelic Homologous Recombination* – Recombinação Homóloga não Alélica

NHEJ – do inglês, *Non-Homologous End Joining*– Junção de Extremidades não Homólogas

NUCLEBRÁS – Empresas Nucleares Brasileiras S/A

pb – Pares de Bases

PUC-Goiás – Pontifícia Universidade Católica de Goiás

Rad – do inglês, *Radiation Absorbed Dose* – Dose de Radiação Absorvida

RI - Radiação Ionizante

SES/GO – Secretaria de Estado da Saúde do Estado de Goiás

SNP – do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism* – Polimorfismo de Nucleotídeo Único

SNP-Array – do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism Array* – Array de Polimorfismo de Nucleotídeo Único

SNP-QC – do inglês, *SNP- Quality Control* – Controle de qualidade do SNP

SSBs – do inglês, *Single-Strand-Break* – Quebras de Fita Simples

SULEIDE – Superintendência Leide das Neves Ferreira

TBq – Terabecquerel

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TM<sub>CNV</sub> – Taxa de Mutação em CNV

$\beta$  – Partícula Beta

$\gamma$  – Raio Gama

## 1. RESUMO

O acidente radiológico de Goiânia em 1987, resultou em um grave episódio de contaminação humana, animal, vegetal e ambiental foram expostos ao cloreto de céσιο-137 ( $^{137}\text{CsCl}$ ), que ocasionou contaminação e exposição acidental e ocupacional à radiação ionizante. A radiação ionizante é um dos componentes ambientais que mais causam estresse celular em organismos complexos, pois a exposição celular à radiação ionizante 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. A análise cromossômica em microarranjo é uma ferramenta importante para a detecção de microdeleções e microduplicações de um amplo espectro do genoma. No presente estudo, propomos analisar o efeito da exposição à RI sobre a formação de CNVs em uma população humana exposta ocupacionalmente à radiação ionizante de Césio-137 durante o acidente em Goiânia. O grupo exposto foi constituído por 07 famílias, dos quais pelo menos um dos progenitores foi exposto ocupacionalmente à radiação ionizante de Césio-137, incluindo um total de 25 indivíduos. Foi utilizado um grupo com 11 famílias de indivíduos não expostos à RI foram usadas como controle, incluindo um total de 33 indivíduos sem histórico de exposição à RI. A genotipagem em microarranjo foi conduzida no sistema *CytoScan HD* (Affymetrix®), sem seguida as análises foi realizadas no *software ChAS*®. Os testes estatísticos utilizados foram: Shapiro-Wilk, Mann-Whitney U, correlação de Spearman, análise da função discriminante, teste binomial, teste  $\chi^2$ . Todas as análises foram realizadas utilizando o pacote estatístico SPSS® 21.0, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). As frequências de CNVs foram estimadas por perdas/geração, ganho/geração e burden/geração, representando  $3,9 \times 10^{-5}$ ,  $6,8 \times 10^{-6}$ , e  $4,6 \times 10^{-5}$ , respectivamente, para o grupo exposto. Para o grupo controle, as frequências foram  $2,1 \times 10^{-5}$ ,  $5,9 \times 10^{-6}$  e  $3,1 \times 10^{-5}$ , respectivamente. Assim, as frequências de CNVs mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos expostos e controle pelo teste de Mann-Whitney U. Sendo assim, nossos dados mostraram que CNVs são induzidas por exposição de RI em uma população humana, enquanto as perdas foram mais frequentes do que os ganhos dentro do grupo exposto. Além disso, a progênie de uma população ocupacionalmente expostas à RI mostrou  $\sim 1.15x$  mais CNVs *de novo* que os controles. Portanto, com o presente estudo foi possível validar o uso de uma metodologia de alta resolução para descrever uma assinatura de exposição mutagênica por RI, legitimando assim, o uso de CNVs como biomarcador útil para avaliar mutação germinativa de militares expostos ocupacionalmente a RI. Além de validar o uso deste marcador, o estudo também foi pioneiro na investigação de mutação germinativa em humanos expostos à RI.

**Palavras Chaves:** CNVs, exposição ocupacional, microarranjos, microdeleções, microduplicações.

## 2. ABSTRACT

The radiological accident in Goiania in 1987, resulted in a serious episode of human contamination, animal, plant and environmental were exposed to cesium-137 chloride ( $^{137}\text{CsCl}$ ) that caused contamination and accidental and occupational exposure to ionizing radiation. Ionizing radiation is one of the environmental components that causes most cellular stress in complex organisms. Exposure to ionizing radiation induces breaks in nucleic acids, especially, DNA double and single strand breaks. Chromosomal microarray analysis is an important tool for the detection and microdeletion and microduplications in the genomes. In this study we proposed to analyze the effect of exposure to RI on the formation of CNVs in an exposed human population occupationally to ionizing radiation from Cesium-137 during the accident in Goiania. The exposed group consisted of 07 families, of which at least one parent was occupationally exposed to ionizing radiation from Cesium-137, including a total of 25 individuals, do not know the absorbed dose of the military who were occupationally exposed to ionizing radiation. 11 families with a group of individuals not exposed to IR was used as control were used including a total of 33 individuals with no history of exposure to RI. The genotyping microarray was conducted in CytoScan HD system (Affymetrix®) without then analyzes was performed in ChAS® software. The statistical tests used were: Shapiro-Wilk, Mann-Whitney U, Spearman correlation, discriminant function analysis, binomial test,  $\chi^2$  test. All analyzes were performed using the statistical package SPSS 21.0, with a significance level of 5% ( $p < 0.05$ ). The frequency of CNVs were estimated loss / generation, gain / generation and burden / generation, representing  $3,9 \times 10^{-5}$ ,  $6,8 \times 10^{-6}$  and  $4,6 \times 10^{-5}$  respectively for the exposed group. For the control group, the frequencies were  $2,1 \times 10^{-5}$ ,  $5,9 \times 10^{-6}$  and  $3,1 \times 10^{-5}$  respectively. Thus, the frequency of CNVs showed statistically significant differences between exposed and control groups using the Mann-Whitney U test. Thus, our data showed that CNVs are induced by IR exposure in a human population, while the losses were more frequent the gains in the exposed group. In addition, progeny from a population occupationally exposed to IR  $\sim 1.15x$  showed CNV more new than healthy controls. Therefore, with the present study was possible to validate the use of a high resolution method to describe a mutagenic exposure by IR signature, thus legitimized the use of CNVs as a useful biomarker to assess germline mutation military occupationally exposed to RI. In addition to validating the use of this marker, the study also pioneered research germline mutation in humans exposed to RI.

**Key words:** CNVs, occupational exposure, microarrays, microdeletions, microduplications

### 3. INTRODUÇÃO

A radiação corresponde um tipo de energia emitida por uma fonte, que se propaga de um ponto a outro na forma de partícula, 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 moléculas e de átomos e formar os pares iônicos (íons+ e íons-) ela é chamada de radiação ionizante (RI). A energia radioativa ionizante pode ser emitida na forma de material particulado, como as partículas  $\alpha$ ,  $\beta$ , prótons, nêutrons ou na forma de partículas subatômicas, e por ondas eletromagnéticas, como os raios-X e  $\gamma$  (FLAKUS, 1995; PINO, et al., 2005; SHARMA, et al., 2010; CRUMP, et al., 2012; TASHIRO; SUN, 2012; OKUNO, 2013).

Estudos de Adewoye e colaboradores (2015) têm como objetivo prever as consequências fisiológicas decorrentes da exposição do sistema biológicos à radiação ionizante, em nível celular ou orgânico. A exposição de uma célula à radiação ionizante resulta em diferentes tipos de lesões no material genético, geralmente caracterizado inicialmente quebra de fita dupla (do inglês, Double Stand Breaks - DSBs) ou quebras de fitas simples (do inglês, Single Stand Breaks -SSBs). Os efeitos mutagênicos da RI sobre a linhagem germinativa são preocupantes, pois podem permanecer por várias gerações, levando assim ao acúmulo de mutações adicionais em filhos de pais expostos à RI.

Pouco se sabe sobre os efeitos e consequências da exposição à RI em seres humanos. Assim, é importante avaliar os efeitos da deposição sobre a linhagem germinativas da energia radioativa no material genético da célula, com consequente determinação da taxa de mutações para a estimativa de riscos genéticos, principalmente em populações que foram expostas à radiação. Com exceções dos estudos envolvendo a segunda geração, dos sobreviventes da bomba atômica de Hiroshima e Nagasaki, além de estudos com crianças nascidas de famílias expostas à radiação no acidente de Chernobyl e um estudo preliminar de indivíduos expostos acidentalmente ao Césio-137, à maioria das informações sobre mutações induzidas em células germinativas, têm sido produzidas a partir da extrapolação de dados obtidos em experimentos com modelos animais, em sua maioria com camundongos, ou, com linhagens celulares (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; ARLT, et al., 2014).

Radioatividade é um fenômeno físico que desperta bastante atenção e grande curiosidade nas pessoas há muitos séculos. A história da descoberta e do uso da energia nuclear envolveu acontecimentos desastrosos, ao longo do tempo, que tem como consequência sérios danos às populações e ao meio ambiente, expostos. O uso frequente de fontes de radiação na medicina, na indústria e em usinas nucleares propicia um cenário adequado para a ocorrência de um desastre e acidente radioativo. No mundo moderno, tais episódios assumem importância político-social de proporções imensuráveis e ocupam lugar de evidências e destaque junto às mídias leigas e especializadas, mas contraditoriamente, os cuidados com a radioproteção, prevenção e controle da exposição humana e ambiental à radiação passaram a ser valorizados no território nacional há pouco tempo (DA SILVA, 2000).

Em relação ao socorro às populações de desastres é relevante conhecer os riscos populacionais deste tipo de acidente e os efeitos biológicos da exposição para que sejam propostas ferramentas e protocolos úteis nos planejamentos de contingência, que correspondem às estratégias elaboradas a partir de uma hipótese de desastre, reduzindo assim os riscos relativos da população (BRASIL, 2008).

Segundo Flores, (2008) a Codificação Brasileira de Desastres, Ameaças e Riscos (CODAR), definiu o acidente ocorrido em Goiânia em 1987 como parte integrante da categoria de desastres humanos de natureza tecnológica, essa categoria inclui acidentes que ocorrem por consequência indesejável do desenvolvimento econômico, tecnológico e industrial, que podem ser reduzidas em função de medidas preventivas. Esse tipo de desastre é mais comum quando se está transportando produtos perigosos, de qualquer natureza. O uso ou armazenamento irresponsável do produto também pode acarretar em um acidente.

A ocorrência dos desastres tecnológicos costuma provocar maiores danos nos países em desenvolvimento, pois uma vez que, a sociedade melhora seu senso de percepção de risco desenvolve um padrão de exigência mais acentuado e o governo é levado a priorizar seus deveres com a segurança global da população (FLORES, 2008).

Desde o acidente em 1987 até os dias atuais, vários estudos têm sido conduzidos sobre a saúde genética dos radioacidentados goianos. Inicialmente a dosimetria biológica foi feita em parte da população exposta mediante a estimativa da frequência de aberrações cromossômicas na população (DA CRUZ, et al., 1994). Subsequente, um dos primeiros testes de biomonitoramento da população exposta ao Césio-137 foi o teste de micronúcleo, que descreveu um aumento na frequência de micronúcleos da

população envolvida direta ou indiretamente no acidente. Outros estudos que se destacaram foram o de análise dos níveis de mutação *in vivo* utilizando o parâmetro da expansão clonal de linfócitos T com mutações no gene *hprt*, que possibilita inferir sobre eficácia e a eficiência do sistema de reparo do Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, Desoxirribonucleic Acid – DNA) dos indivíduos expostos à RI (DA CRUZ, et al., 1997). Posteriormente, análise de translocações cromossômicas, avaliação de marcadores sorológicos de autoimunidade e análise de mutações germinativas usando marcadores STR de indivíduos acidentalmente e ocupacionalmente expostos à RI, foram realizadas (DA CRUZ, et al., 1994; DA CRUZ, et al., 1996; DA CRUZ, et al., 1997; DA SILVA, 2000; CRUVINEL, et al., 2014).

Indução de mutação em células expostas diretamente a RI é considerado como um componente de risco genético para os seres humanos. Estudos mostram que a exposição a RI eleva a taxa de mutação na descendência de células que não foram expostas desafiando assim o paradigma na biologia da radiação (BARBER, et al., 2006).

Atualmente, a análise cromossômica em microarrajnos (CMA), uma ferramenta da citogenômica, tem merecido destaque devido a sua capacidade de detectar deleções e duplicações no genoma humano (LU, et al., 2008; KONG, et al., 2013). O CMA é capaz de detectar erros genômicos em regiões críticas dos cromossomos, com resolução 10 vezes maior que a citogenética tradicional. Os chips de DNA usados na rotina do CMA para a hibridização genômica investigam o aumento ou diminuição da dosagem de várias regiões cromossômicas, permitindo a detecção de variações no número de cópias (CNVs, do inglês, *Copy Number Variation*) do genoma (COULTER, et al., 2011; ARLT, et al., 2014).

CNVs são segmentos de DNA definidos como deleções ou duplicações que podem variar de 50 pares de bases (pb) para megabases, presentes em um número variado de cópias em diferentes indivíduos e são amplamente distribuídos por todo o genoma. Em um estudo abrangente, estimou-se que cerca de 12% de todo o genoma é composto por CNVs. A função biológica ainda não está totalmente compreendida, e a descoberta está vinculada ao advento de novas tecnologias, que permitiu o aumento de resolução na análise cromossômica, a partir da análise de microarrajnos de oligonucleotídeos (REDON, et al., 2006; ARLT, et al., 2014; CHUNG, et al., 2014).

Apesar de sua grande relevância, ainda existe uma compreensão limitada e pouco conhecimento de como as CNVs, são formadas e dos riscos envolvidos nas suas

origens. O conhecimento atual dos mecanismos envolvidos na formação de CNVs nos permite identificar a possibilidade da avaliação de fatores de risco genéticos e ambientais. Erros de replicação do DNA têm sido implicados na formação de CNVs durante a divisão celular (ARLT, et al., 2012; ARLT, et al., 2012e; ARLT, et al., 2014).

Estudos relatam que agentes que perturbam a replicação induz uma frequência alta de CNVs em células normais. Estes agentes incluem o afidicolina polimerase e o inibidor da ribonucleotídeo redutase, a hidroxauréia, o qual é normalmente utilizado no tratamento da doença de células falciformes e outras desordens (DURKIN, et al., 2008; ARLT, et al., 2009). Muitos agentes ou condições que levam ao estresse da replicação podem ter o potencial de induzir a formação de CNVs. Sabe-se que a formação de CNVs pode ser elevada por predisposição genética herdada e pela exposição a agentes mutagênicos. Embora se conheça que os inibidores da replicação pode levar a formação de CNVs *de novo*, os diferentes tipos de efeito de agentes mutagênicos sobre a indução de CNVs ainda permanecem desconhecidos (ARLT, et al., 2014).

O estudo do impacto de CNV em abordagens biológicas, principalmente, após a exposição à radiação, é um campo pouco investigado *in vivo* ou *in vitro*. Certos CNVs mostram claramente associações com respostas à radiação e podem ser utilizados como biomarcadores de exposição. No entanto, existe ainda a necessidade de validar biomarcadores potenciais de exposição para avaliação dos efeitos tardios da exposição à radiação. Dessa forma, a avaliação de variações genéticas, assim como a extrapolação dessa informação para o desenvolvimento e uso de CNVs como biomarcadores devem ser estabelecidas (PERNOT, et al., 2012).

O presente estudo apresenta os resultados da análise do efeito da exposição ocupacional à RI sobre a formação de CNVs na progênie de um grupo de militares expostos ocupacionalmente ao à RI de doses desconhecidas de Césio-137, durante o acidente radiológico em Goiânia (Brasil).

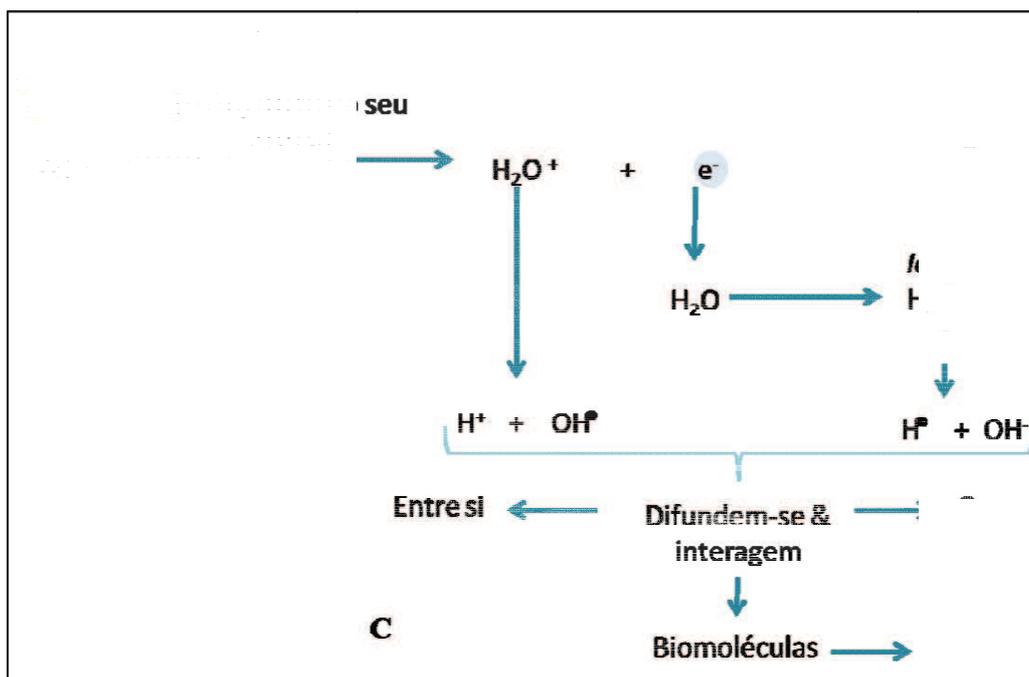
Os avanços na tecnologia de análise genômica tem possibilitado a avaliação, com alto grau de precisão, de mutações genéticas de diversos tipos, em nível individual ou populacional. Neste contexto, quantificar a frequência e a taxa de mutação na população possibilita uma estimativa real dos riscos genéticos da população exposta. A proposta é pioneira e inovadora no estudo da indução de CNVs em consequência de exposição à radiação ionizante em populações humanas e na determinação da frequência de mutações germinativas induzidas pela exposição parental.

## **4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **4.1. Radiação Ionizante**

A radiação ionizante (RI) é um exemplo de agente mutagênico que pode levar ao comprometimento de mecanismo de reparo da célula. Nenhum tecido humano é totalmente radio resistente, assim, à RI é capaz de provocar danos em qualquer célula do organismo (EOTHOULLIER, 2005). Quando as células são expostas à RI, os danos resultantes são devido, aos eventos físicos, químicos e biológicos, decorrentes da exposição. Os eventos físicos são produzidos pela excitação e ionização de átomos que absorvem a energia da radiação. Os eventos físico-químicos ocorrem por meio do rompimento ligações químicas das moléculas, formando radicais livres, que por sua vez são espécies extremamente reativas, que perturbam a estabilidade e a integridade das biomoléculas. Os eventos químicos resultam da ligação dos radicais livres, altamente reativos, às biomoléculas. E, por consequência, se instalam os eventos biológicos que produzem alterações morfológicas e/ou funcionais nas células e nos tecidos por elas constituídas (LEITÃO, 1994; HAN; YU, 2010).

A absorção da RI pode perturbar diretamente estruturas atômicas, e moléculas e, assim, produz mudanças biológicas. Um fenômeno importante decorrente da exposição de um sistema biológico à RI é uma radiolise das moléculas de água (Figura 1), que forma diferentes espécies reativas do oxigênio (ERO). As EROs atacam direta ou indiretamente as biomoléculas: ácidos nucleicos, proteínas e lipídios (HALL, et al., 2006). Os efeitos diretos e indiretos da radiação podem iniciar uma série de eventos de sinalização bioquímicas e moleculares que ajudam ou dificultam no reparo do dano tendo como consequência, alterações fisiológicas nas células e tecidos ou até mesmo morte celular pode ocorrer (SPTZ, et al., 2004).



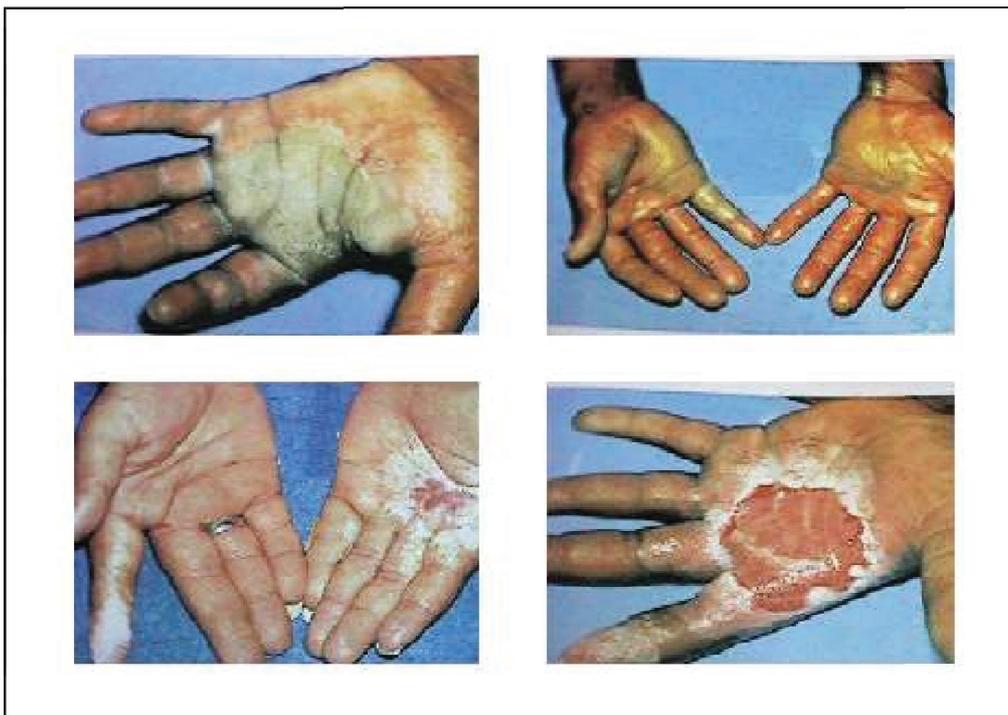
**Figura 1.** Radiohidrólise. A energia da radiação é transmitida para a molécula de água (A), provocando a sua quebra e gerando radicais livres (B) que vão atacar biomoléculas, causando danos (C).

As modificações bioquímicas iniciais, que ocorrem pouco depois ou durante a exposição, são responsáveis pela maior parte dos efeitos da RI em células de mamíferos. Entretanto as alterações oxidativas podem surgir durante um período de tempo, sendo de dias ou até meses após a exposição inicial (PETKAU, 1987). Contudo, estes processos ocorrem não apenas nas células irradiadas, mas nas suas descendentes (SPTZ, et al., 2004; KRYSTON, et al., 2011; TAMMINGA, et al., 2011).

A exposição individual à RI pode ocasionar alterações no sistema celular, com vários graus de comprometimento do sistema exposto. Devido às diferentes condições físicas e biológicas, as alterações induzidas e os efeitos da radiação nos tecidos podem variar dentro de limites variados. Os efeitos prejudiciais da RI dependem do tipo de radiação, comprimento de onda, da duração da exposição, da quantidade, intensidade e grau de exposição à energia radioativa, da distância do radioexpostos à fonte de radiação, da idade e sexo dos radioexpostos, da susceptibilidade e da sensibilidade individual à energia radioativa dos radioexpostos e do local (tecido) exposto à radiação (DA CRUZ, et al., 1997; HAN; YU, 2010; OKUNO, 2013).

Nos organismos expostos são conhecidos dois efeitos principais devido à deposição radioativa sobre as células e tecidos: os efeitos determinísticos e estocásticos.

Os efeitos determinísticos estão associados com a morte celular, como queimaduras provocadas pela radiação (radiolesão) (Figura 2). Os efeitos estocásticos estão associados às alterações genéticas e cromossômicas, capazes de aumentar a taxa de mutação nas próximas gerações, podendo gerar câncer e outras desordens genéticas, incluindo os efeitos transgeracionais (FLAKUS, 1995; DA SILVA, 2000; BARBER, et al., 2006; NIWA, 2010; KOL'TOVER, 2010; SOKOLOV; NEUMANN, 2010).



**Figura 2.** Acometimento cutâneo de alguns indivíduos expostos à radiação do césio-137, durante o acidente radiológico de Goiânia. As fotografias mostram sinais comuns da doença aguda da radiação e as radiolesões (SuLeide<sup>©</sup> 1988).

A exposição a RI pode induzir diferentes formas de instabilidade genômica, sendo que as mutações são consideradas como um possível marcador para distinguir o efeito tardio da exposição à radiação (NIKIFOROV, et al., 1998). O risco de desenvolver câncer e outras doenças pode aumentar devido a exposição à RI (PRESTON, et al., 2007; SHIMIZU, et al., 2010). Os riscos de distúrbios hereditários podem aumentar quando se expõe células germinativas à radiação. Por ter sido confirmada os efeitos genéticos da exposição à RI, das células germinativas à radiação em várias espécies, é prudente admitir que os seres humanos não sejam uma exceção (NAKAMURA, 2006; WINTHER, et al., 2009; GREEN, et al., 2010).

A radiação ionizante é um dos componentes que mais causa estresse celular em organismos complexos, pois a energia radioativa depositada sobre o sistema biológico

induz nos ácidos nucléicos, principalmente no DNA, quebras de fita dupla e de fita simples, danos às bases e ligações cruzadas com as proteínas. Estudos demonstram que a instabilidade no genoma derivado de mutações puntiformes, aberrações cromossômicas, formação de micronúcleos e mutações em microssatélites podem provocar ou retardar a morte celular e são relatadas em frequências elevadas nas células expostas à RI. Alterações fisiológicas celulares induzidas por RI são consideradas o principal fator de risco em humanos para o desenvolvimento de câncer (SUTHERLAND, et al., 2000; BARBER; DUBROVA, 2006; TOYOKUNI, et al., 2009; SUZUKI, et al., 2009). As consequências da exposição de uma pessoa ou de uma população à radiação que vão muito além dos efeitos físicos, resultando em agravos emocionais, promovendo assim um acréscimo da ocorrência de doenças psicológicas e um nível elevado de estresse dos indivíduos que se envolveram de alguma forma no evento originado pela exposição à radiação e conseqüentemente, piora na qualidade de vida dos radioexpostos (KOSCHEYEV, et al., 1993; MIRANDA, et al., 2005).

O Césio-137(<sup>137</sup>Cs) é um metal alcalino, que é produzido a partir da fissão de urânio, é altamente eletropositivo, e não existe em forma livre na natureza. Seu ponto de fusão é de 26°C e o ponto de ebulição a 670°C. Seu número atômico é 55 e têm 35 isótopos, todos esses isótopos ou são radioativos ou estão instáveis, que apresentam meias-vidas variando de um segundo os vários anos. O <sup>137</sup>Cs decai por emissão de partículas β, o decaimento se dá através de partículas β negativas. A meia vida do césio-137 é de aproximadamente 30 anos (Figura 3)(COLLINS, et al., 1988; VIEIRA, 2013).

Um exemplo de RI é a radiação gama de <sup>137</sup>Cs, que é frequentemente usada em aparelhos de radiodiagnóstico. Na maioria dos acidentes que envolvera algum equipamento de radiologia, o episódio foi relacionado com erros humanos e/ou com o descumprimento de normas de segurança estabelecidas por instituições reguladoras nacionais e internacionais para o uso da radiação (BRASIL, 2003). O radioisótopo <sup>137</sup>Cs é um radionuclídeo que se ingerido ou inalado provoca danos biológicos. O isótopo radioativo emite raios γ e em uma extensão menor partículas β durante o seu decaimento. Tanto na forma de onda quanto na particulada, a radiação é capaz de depositar na matéria uma grande quantidade de energia radioativa, promovendo a ionização de moléculas no seu trajeto. Os raios β são mais radiotóxicos para o genoma que os raios γ (BANDAZHEVSKY, 2003).



**Figura 3.** Decaimento do Césio-137 ( $^{137}\text{Cs}$ ). Por fissão nuclear espontânea ou induzida, os radioisótopos de césio são produzidos de radionuclídeos pesados como os de urânio e plutônio. A meia-vida do  $^{137}\text{Cs}$  é de cerca de 30,2 anos, sendo que aproximadamente 95% decai por emissão de partículas beta para um isômero nuclear metaestável de bário-137 (Ba-137m), cuja meia-vida é de 153 segundos. Ba-137m emite os raios gamas nas amostras de  $^{137}\text{Cs}$ . Cerca de 5% decai diretamente para o estado fundamental de Bário-137, que é estável (Collins et al., 1988).

As partículas  $\beta$  possuem uma pequena massa, e tem uma trajetória com alcance de até 1,5 cm no tecido humano, podendo ser blindado com folhas de alumínio de milímetros de espessura. Os raios  $\gamma$ , provém do núcleo atômico, ao contrario dos raios  $\beta$ , tem ondas com intenso poder de penetração, podendo atingir 7,2 cm de profundidade no tecido humano. São blindados com material mais densos, como o chumbo, o concreto, aço e o ferro (OKUNO, 1998; OKUNO, 2013). O acidente ocorrido em Goiânia envolveu uma fonte radioativa cujo radionuclídeo era o  $^{137}\text{Cs}$ . Portanto houve a emissão tanto de partículas  $\beta$  e raios  $\gamma$ , após a retirada da blindagem da fonte de radioterapia (IAEA, 1988).

A exposição à RI de  $^{137}\text{Cs}$  depende da proximidade e do contato individual que se tem com a fonte radioativa. A exposição extrema se dá quando há compartilhamento do ambiente radioativo pelos indivíduos. Geralmente ela se cessa quando os indivíduos são retirados do local da exposição. No entanto, a exposição interna ocorre subsequente ao contato individual com elemento radioativo, no caso do acidente com césio-137, a forma mais comum de contaminação foi à ingestão ou inalação do radioisótopo (XAVIER, et al., 2006).

Para entender os efeitos a exposição à RI é necessário conhecer as grandezas físicas que são utilizadas para quantificá-la. Existe uma grandeza de medida que é denominada por “dose absorvida”, que é a grandeza utilizada para medir a energia depositada por um feixe de fótons de alta energia (raio X ou gama) em um tecido biológico e os seus efeitos sobre este tecido. A dose absorvida de radiação é considerada

como a energia depositada por quilograma de tecido, sendo expressa originalmente em dose de radiação absorvida (do inglês, *Radiation Absorbed Dose* - rad). Mas, o Sistema Internacional de Medida utiliza a unidade Gy (Gray), que é similar a 100 rad, como unidade de dose absorvida. Gray é uma unidade adotada para qualquer tipo de RI (BIRAL, 2002).

Um dos parâmetros mais importantes para o prognóstico é o tratamento adequados de indivíduos expostos à RI é conhecer a estimativa de dose absorvida individual. Em relação ao acidente radiológico de Goiânia, devido à natureza do acidente, estimativas precisas representaram um desafio enorme, pois a exposição individual foi muito diversificada e em alguns casos foi fracionado. Os indivíduos foram expostos à radiação de corpo inteiro ou localizada, resultando em diferentes doses absorvidas, que variam de 0 a 7 Gy. Alguns apresentaram tanto contaminações internas como externas. Todos esses aspectos na medida da radiação podem ter dificultado a estimar a dose absorvida pela população exposta. Foram utilizadas várias técnicas de dosimetria para avaliar o nível de exposição e também para fornecer informações iniciais sobre os indivíduos expostos (DA CRUZ, et al., 1997; DA SILVA, 2000; IAEA, 2011).

As principais abordagens utilizadas para estabelecer a dose absorvida para a população exposta em Goiânia foi: dosimetria externa, avaliada pelas propriedades radioativas de radionuclídeos, as taxas de dose e reconstrução dos eventos que levaram à exposição; dosimetria interna, avaliado pela análise de excremento biológico e por um contador de corpo inteiro com um nível de detecção de 9.1 KBq, com 95% de confiança. Para o acidente em Goiânia a dosimetria externa foi complicada pela mistura complexa de contaminação, irradiação externa e os fatores climáticos e ambientais da região (DA CRUZ, et al., 1997) e, finalmente, dosimetria biológica, que foi utilizada para estimar a dose média de corpo inteiro recebida por um indivíduo exposto à radiação ionizante, com base na frequência das aberrações cromossômicas (DA SILVA, 2002). A biodosimetria determinada pela frequência de aberrações cromossômicas em linfócitos T dos radioexpostos foi considerada extremamente eficiente à análise de aberrações cromossômicas é um método citogenético utilizado como um biomarcador de exposição com um alto grau de sensibilidade e especificidade, sendo um método de estimativa de exposição aguda e recente à RI, capaz de precisar doses absorvidas na ordem de 0,1 Gy (MOSSE, 2012).

#### 4.2. Histórico do Acidente

Em setembro de 1987, em Goiânia-Goiás (Brasil), houve o maior acidente envolvendo um produto radioativo no país, fora de uma usina nuclear. Em decorrência do manuseio indevido de um aparelho de radioterapia abandonado, ocorreu um grave acidente radiológico, gerando um grande rastro de contaminação por um único radionuclídeo, que envolveu direta e indiretamente centenas de pessoas. O acidente começou quando dois sucateiros adentraram os escombros do antigo Instituto Goiano de Radioterapia (IGR) (Figura 4), e encontraram um aparelho de radioterapia abandonado (Figura 5). Parte do aparelho continha um cabeçote de metal pesando cerca de 100kg. No interior deste cabeçote blindado com o chumbo havia uma cápsula de cloreto de cério-137. Os sucateiros retiraram o cabeçote do IGR com a ajuda de um carrinho de mão, pois estavam interessados em vender as partes de metal para os ferros-velhos da região. Posteriormente, romperam o cabeçote sem saber o que havia no seu interior. A desmontagem da blindagem de chumbo seu deu com marteladas, perfurando a placa de lítio que isolava o material radioativo, provocando assim a liberação da cápsula que continha o sal radioativo (DA CRUZ, et al., 1994; DA CRUZ, et al., 1996; DA CRUZ, et al., 2008; FLORES, 2008; COSTA, et al., 2011).



**Figura 4.** Imagens do antigo Instituto Goiano de Radioterapia (IGR) abandonado no ano de 1987, mostrando as condições precárias onde havia sido abandonada a unidade de radioterapia (SuLeide<sup>©</sup> 1987).



**Figura 5.** Aparelho de radioterapia responsável pelo acidente radiológico em Goiânia. Na figura A e B: cabeçote violado após desmonte no ferro velho. Na figura C e D: estocagem e isolamento da unidade radioativa após as medidas emergenciais (SuLeide<sup>®</sup>1987 **A e B**; 1988 **C e D**).

Subsequente à desmontagem, pessoas, plantas, animais e ambientes foram expostos a 19,26g de  $^{137}\text{CsCl}$ , que gerou uma dezenas de focos de contaminação em diversos locais, especificamente naqueles onde foram levadas as várias partes do aparelho de radioterapia. Em alguns focos, foi feita a distribuição de fragmentos do material para parentes e amigos que os espalharam pela cidade de Goiânia (DA CRUZ, et al., 2008; COSTA, 2010). A atividade total do césio-137 na época do rompimento do equipamento era cerca de 51TBq (1375 Ci), o que fornecia uma taxa de dose de 4,6 Gy/h a 1 metro de distância da fonte de radiação (IAEA, 1988).

O cloreto de césio é um sal branco que se assemelha com o sal de cozinha. No entanto, no escuro o sal radioativo brilha com um espectro de cor azul. Poucos dias depois de encontrarem a cápsula, o aparelho foi vendido para um ferro-velho, que segundo o proprietário, ele ficou admirado com o brilho azulado emitido pela cápsula. Impressionado, o comerciante recebeu várias pessoas em sua casa para conhecer o pó brilhante, acreditando estar diante de algo sobrenatural (RAMALHO, et al., 1988; DA CRUZ, et al.,1997; COSTA, 2010).

Após algumas horas de contato com o cloreto de césio radioativo, apresentaram-se com sintomas de contaminação e/ou exposição aguda à radiação ionizante. Os sintomas mais comuns eram vômitos, náuseas, diarreia e tonturas. Um grande número de pessoas procurou auxílio de hospitais e farmácias em consequência da exposição

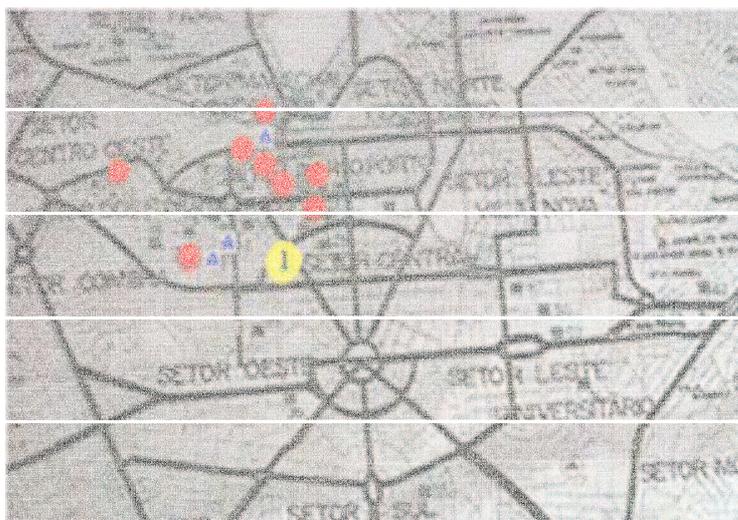
acidental. Como não se sabia ao certo o que essas pessoas tinham, eles eram medicados como se fossem portadores de alguma doença contagiosa. Subsequentemente descobriu-se que os sintomas eram referentes a síndrome aguda de radiação. Por volta de duas semanas após o rompimento do cabeçote, foi que os sintomas foram clinicamente identificados como sendo causadas por uma contaminação radioativa (COSTA, et al., 2011).

A fonte radioativa foi transportada e manipulada indevidamente por volta do dia 13 de setembro. No dia 28 de setembro o remanescente da fonte radioativa foi encaminhado à Divisão de Vigilância Sanitária da cidade de Goiânia, possibilitando assim com que fosse identificada a natureza do material. As providências cabíveis e emergenciais foram iniciadas para conter a exposição. A fase inicial, começou a ser feita a comunicação à Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), que notificou a Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA), acionando um plano de emergência do qual teve a participação da CNEN, Furnas Centrais Elétricas S/A (FURNAS), Empresas Nucleares Brasileiras S/A (NUCLEBRÁS), Defesa Civil do Estado de Goiás, ala de emergência nuclear do Hospital Naval Marcilio Dias (HNMD), Secretaria de Saúde de Goiás (SES/GO), Hospital Geral de Goiânia (HGG), dentre outras instituições nacionais e internacionais que auxiliaram na “Operação Césio-137” (DA SILVA, 2000; WASCHECK, 2007).

As providências tomadas foram: identificar, monitorar, descontaminar e tratar a população envolvida. As áreas identificadas como sendo focos principais de contaminação foram isoladas iniciando-se a triagem de pessoas no Estádio Olímpico. A descontaminação dos focos principais era realizada removendo-se grandes quantidades de solo e as construções foram demolidas. Ao mesmo tempo estava sendo realizada o monitoramento para quantificar a dispersão do  $^{137}\text{CsCl}$  no ambiente. Foram identificados e isolados um foco principal, oito focos sendo considerados como primários e três como focos secundários, onde houve a contaminação de pessoas e do ambiente com altas taxas de exposição (Figura6) (WASCHECK, 2007).

O acidente com o césio-137 ocorrido em Goiânia foi considerado o maior acidente radioativo do Brasil e, a época, o maior do mundo que ocorreu fora de uma usina nuclear. Consequentemente foram expostas e contaminadas centenas de pessoas, principalmente parentes e vizinhos daqueles envolvidos imediatamente com a manipulação do cabeçote. Foram consideradas expostas um total de 249 pessoas, que provavelmente tiveram contato direta ou indiretamente com o elemento radioativo. Dos

expostos, 14 pessoas tiveram contaminação interna comprovada e apresentavam danos graves a saúde, necessitando assim, de uma unidade especializada, foram transferidos para o Hospital Naval Marcílio Dias no Rio de Janeiro, dos quais quatro vieram a óbito. Os casos de óbito ocorreram cerca de quatro a cinco semanas após a exposição ao material radioativo. As doses absorvidas pela população acidentalmente exposta variaram de 0 a 7 Gy (DA CRUZ, et al., 1997; DA SILVA, 2000; COSTA, 2010).



**Figura 6.** Mapa da situação municipal de Goiânia dividido por bairros. O símbolo amarelo indica a localização inicial da fonte na região central de Goiânia. Os símbolos vermelhos indicam os focos primários. Os símbolos em azul indicam os focos secundários das regiões contaminadas pelo céσιο-137, adaptado de Da Silva (2000).

Não foi apenas a população que teve envolvimento com o acidente, mas também os trabalhadores de defesa civil, entre eles: bombeiros e policiais militares, que foram chamados para iniciar atendimentos ao desastre que, a princípio, foi considerado, como um possível “vazamento de gás tóxico”. Com isso, a principal preocupação dos trabalhadores era com o que respiravam, e não com a exposição de corpo inteiro à RI, sendo uma situação que só seria identificada cerca de 14 dias após a remoção do cabeçote de blindagem (FLORES, 2008).

Ao longo das ações de socorro, bombeiros e policiais militares do Estado de Goiás foram destinados para diversos serviços durante o atendimento à ocorrência. Os bombeiros foram empregados, principalmente, na lavagem das ruas onde havia focos de material radioativo e nos locais onde havia rejeitos do material radioativo, além da remoção das vítimas e atenção as pessoas próximas dos focos que, tivessem ou não expostas à radiação, precisassem de atendimento pré-hospitalar ou transferência para

algum centro especializado de saúde. Os policiais militares foram, incumbidos prioritariamente da segurança dos locais e dos materiais e rejeitos, dos comboios que transportavam as vítimas e os rejeitos, e também assegurar os depósitos provisórios e definitivos dos rejeitos radioativos, além, de conter revoltas que aconteciam pontualmente de uma população assustada, amedrontada e enfurecida pelo ocorrido (FLORES, 2008).

Os militares declararam que nem todos que trabalhavam nas zonas irradiadas, principalmente eles, não tinham equipamentos e vestimentas apropriadas para desempenhar suas funções adequadamente. Eles relataram que por várias vezes suas fardas chegavam sujas de rejeitos e eram misturadas com outras roupas usadas por seus familiares, que eram então lavadas pelas mães ou esposas desses militares. Alegaram também que não foram assistidos do ponto de vista de saúde e que não foram submetidos a nenhum tipo de dosimetria durante o acidente, para que ficasse registrado em suas fichas a exposição a doses de radiação (FLORES, 2008).

Durante o acidente radioativo do césio-137 em Goiânia em 1987, não foi possível determinar com precisão o número real de militares potencialmente expostos à radiação, pois o Corpo de Bombeiros Militar do Estado de Goiás era apenas uma fração da Polícia Militar do Estado. Na época, ocorria também um Curso de Formação de Soldados da Polícia Militar, que era habitual, e em casos de necessidade emergencial esses alunos poderiam ser escalados para o trabalho sem aviso prévio, no intuito de buscarem uma melhor resposta às ocorrências e oferecer uma atuação mais eficaz. E foi isso que ocorreu em Setembro de 1987 (FLORES, 2008).

Mesmo após a identificação da natureza do acidente, que envolvia RI e o risco de exposição ocupacional, os membros do Corpo de Bombeiros e da Polícia Militar permaneceram nos locais designados cumprindo suas atividades laborais. Executavam as atividades de lavagem de asfalto e remoção de rejeitos, cuidavam da segurança dos locais atingidos e também no isolamento desses locais, juntamente com a equipe da CNEN, que foi acionada para o atendimento emergencial e nos cuidados iniciais com a saúde da população (FLORES, 2008).

O acidente ocorrido com o césio-137 foi classificado como um desastre relacionado com substância e equipamentos de uso na medicina, categoria CODAR: HT.PRM/21.507, em atividade de radiodiagnóstico, radioterapia ou medicina nuclear (BRASIL, 2003).

Quando se tem um acidente que envolve riscos de exposição ocupacional à radiação, os trabalhadores de segurança pública podem receber altas doses de radiação, particularmente quando se desconhece a natureza do material (SCOTT, 2005). No episódio goiano, o Governo do Estado de Goiás, criou a Lei 14.226/202 (ANEXO I), que diz que o pessoal envolvido na defesa civil durante o acidente deveria ser assistido (FLORES, 2008).

Após o acidente, foi criada a unidade de assistência aos radioacidentados "Fundação Leide das Neves Ferreira (FunLeide) pelo Governador do Estado de Goiás através do decreto nº 2.897 de 11 de Fevereiro de 1988, com o propósito de estudar as consequências à longo prazo do acidente em Goiânia, incluindo as consequências médicas, psicológicas, epidemiológicas, citogenéticas e aspectos sociais (DA CRUZ, 2007). No ano de 2004 deixou de ser fundação e passou a ser Superintendência Leide das Neves Ferreira (Suleide). Em 2011, a Lei 17.257 desmembrou a Suleide em duas unidades: o centro de Assistência ao Radioacidentado (C.A.R.A.) e o centro de Excelência em Ensino, Pesquisa e Projetos Leide das Neves Ferreira (CEEPP-LNF). O C.A.R.A. é o sucessor de parte das atribuições da extinta Suleide, sendo uma unidade de assistência da Secretaria Estadual da Saúde de Goiás. O CEEPP-LNF é uma unidade administrativa vinculada diretamente ao Gabinete da Secretaria da Saúde de Goiás.

A identificação dos trabalhadores candidatos à realização dos testes de biomonitoramento foi feita mediante busca ativa aos registros do Corpo de Bombeiros, da Polícia Militar do Estado de Goiás e da Superintendência Leide das Neves Ferreira (SULEIDE) feitos por ocasião do acidente. Dessa forma, foram selecionados militares que teriam trabalhado nas ações de defesa civil durante o acidente com o césio-137, em 1987 (FLORES, 2008).

### **4.3. Mutação**

O DNA ao longo da vida de um indivíduo pode sofrer alterações denominadas de mutações, que são causadas por erros durante a replicação na divisão celular (RIBEIRO; MARQUES, 2003). As mutações podem ser uma alteração gênica ou cromossômica que podem ou não causar mudanças no fenótipo trazendo aspectos favoráveis ou desfavoráveis. As mutações podem ser espontâneas, sendo a frequência que ocorre dependente de cada organismo, ou ainda mutações induzidas, ocasionadas por exposição à agentes mutagênicos (WESTMAN, 2006). Muitas mutações não implicam

mudanças detectáveis na atividade metabólica da célula ou do organismo e, portanto, passa despercebida (SALVADORI, 2003).

O aparecimento de mutações ocorre em todos os seres vivos, sendo um processo fundamental para a evolução e diversidade das espécies (SALVADORI, 2003). Em organismos multicelulares as mutações são divididas em somáticas e germinativas, onde as somáticas são as que ocorrem em células do corpo podendo afetar seu portador, entretanto não será transmitida à prole, e as germinativas são transmitidas à prole (SEGAL, et al., 2001).

Mutações gênicas são mudanças nas sequências de nucleotídeos do DNA e ocorrem devido à mudança de uma ou mais bases nitrogenadas. São fundamentais por dois motivos: são responsáveis por desordens herdáveis e doenças como o câncer e segundo, são fontes de variações fenotípicas (WATSON, et al., 2007).

A frequência de mutações germinativas em STR tem sido utilizada para determinar a exposição de indivíduos a RI (DUBROVA, 2003; DA CRUZ, et al., 2008), visto que as regiões de repetições em tandem têm alta sensibilidade para sofrer mutações causadas pela exposição à radiação (JEFFREYS, 1997; JEFFREYS, et al., 2005).

Vários estudos desenvolveram um sistema para monitorar os efeitos das mutações induzidas por radiação em células somáticas e germinativas. Devido à alta taxa de mutação, as sequências de DNA repetitivo, se tornaram excelentes candidatos (WU, et al., 2006). Os marcadores minissatélites e microssatélites são utilizados para demonstrar satisfatoriamente a indução de mutação germinativa em camundongos, humanos, dentre outros organismos (COSTA, 2010).

As taxas de mutação germinativa em *loci* de mini e microssatélites podem ser estimadas por pesquisas de mutações na prole de indivíduos expostos, e se houver um aumento na frequência de mutações nos *loci* analisados, o evento mutacional pode ser atribuído a mutações induzidas nas células das linhagens germinativas (CHUN et al., 2006).

Estudos de Barber e colaboradores (2006) com dados *in vitro* forneceram provas dos efeitos tardios sendo manifestada na progênie de células que foram irradiadas. A prole de pessoas expostas à radiação ionizante pode ser geneticamente instável e mostra uma grande variedade de efeitos transgeracionais, incluindo taxas de mutações elevadas, aumento da predisposição ao câncer, dentre outras.

#### 4.4. Variação no Número de Cópias (CNVs)

As CNVs alteram o balanço biológico normal da diploidia em um determinado locus, devido a adições e deleções de sequências de nucleotídeos na região (REDON, et al., 2006; HASTING, 2009; SHEN, et al., 2010; STANKIEWICZ; LUPSKI, 2010; GIRIRAJAN, et al., 2011). As regiões com número de cópias variável possuem segmentos de DNA maiores que 50 pb (ZARREI, et al., 2015).

CNVs são amplamente distribuídas no genoma humano, ocupando aproximadamente 30% do genoma, sendo 100.000 já identificadas e caracterizadas. Estão presentes em diferentes números de cópias entre os indivíduos, podendo surgir tanto por meiose como em células somáticas, sendo que seus mecanismos de formação ainda não estão completamente elucidadas. As CNVs colaboram para a variação genética e a diversidade fenotípica em relação à evolução, suscetibilidade e etiologia de doenças individuais (IAFRATE, et al., 2004; CONRAD, et al., 2006; COPER, et al., 2007; WONG, et al., 2007; LEE, et al., 2007; FRIEDMAN, et al., 2009; HASTING, 2009; ZHANG, et al., 2009; OLDRIDGE, et al., 2010; XU, et al., 2011; ARLT, et al., 2012; CASTELLANI, et al., 2014; CONNOLLY, et al., 2014). As CNVs podem funcionar direta ou indiretamente como um fator de susceptibilidade em doenças genéticas complexas (ALKAN, et al., 2011).

As regiões variáveis do genoma podem conter partes de um ou mais genes e também elementos regulatórios ou elementos que sejam desconhecidos, afetando a função de genes envolvidos por disrupção da região codificadora ou reguladora por um efeito de posição ou até mesmo um gene quimérico (COOK, et al., 2008; LEE; SCHERER, 2010).

Estudos observaram a complexidade do número de cópias e identificaram que várias CNVs não são decorrentes de um único evento mutacional ou por duas ou três mutações simples (MCCARROL, et al., 2008). Quando em regiões próximas tem ocorrência de CNVs, pode levar a uma compreensão de que são uma única CNV, sendo caracterizado como uma variação de origem complexa, tendo sua taxa de mutação estimada em aproximadamente  $10^{-8}$  (PINTO, et al., 2007). Alterações de pares de bases são bem conhecidas, aquelas que apresentam uma frequência maior que 1% na população são referido como polimorfismo de nucleotídeo único (do inglês, *Single Nucleotide Polymorphisms* - SNPs) (ZHANG, et al., 2009).

Existem CNVs que são comuns e transmitidas entre gerações, no entanto existem outras que aparecem *de novo* e estão associadas a várias doenças humanas complexas com uma maior probabilidade de serem patogênicas (REDON, et al., 2006; STANKIEWICZ; LUPSKI, 2010; SILVERSIDES, et al., 2012). Contudo, as CNVs podem ser herdadas e dessa forma estar presente em quase todas as células do organismo, ou podem ter origem somática, com variações adquiridas que podem estar limitadas a um conjunto de células específicas (LEE; SCHERER, 2010).

Uma alteração herdada ou *de novo* de um genitor afetado tem uma probabilidade maior de ser patogênica. Por outro lado não se pode afirmar que alterações herdadas de genitores saudáveis não estejam influenciando a manifestação de um fenótipo. Pois, fenômenos de pleiotropia, epistasia e interações gênicas não epistáticas podem contribuir para o desfecho final do fenótipo. Adicionalmente penetrância e expressividade variável são possíveis de afetarem a funcionalidade dos genes contidos em uma CNV (LEE, et al., 2007).

Variações benignas de CNVs são consideradas como aquelas que não acarretam algum tipo de prejuízo fenotípico, tendo assim uma contribuição maior com a heterogeneidade genética. Já variações patogênicas podem ser consideradas como uma das causas de algumas doenças genômicas raras e também de doenças mendelianas (PINTO, et al., 2007).

As CNVs não estão distribuídas aleatoriamente no genoma humano, mas tendem a se concentrar nas regiões da arquitetura genômica complexa. Em geral, cerca de 25% das CNVs são flanqueadas por LCRs (do inglês, *Low Copy Repeats* - LCRs). O efeito significativo da arquitetura é que alterações mediadas por NAHR ocorrem onde existem LCRs pré-existentes que fornecem a homologia necessária para a recombinação durante o reparo de SSBs e DSBs (HASTINGS, et al., 2009).

As CNVs são classificadas em dois grandes grupos: as recorrentes e as não recorrentes. As recorrentes são mediadas por sequências repetitivas de DNA maiores que 1 Kb, com similaridade de  $\geq 90\%$ , chamadas de duplicações segmentares ou repetições de poucas cópias. Uma grande parte das CNVs patogênicas são não-recorrentes (KUROTAKI, 2005; HASTINGS, et al., 2009; ARLT, et al., 2012). As CNVs recorrentes surgem durante a meiose por recombinação homóloga não alélica (do inglês: *Non-Allelic Homologous Recombination* - NAHR) mediadas por duplicações segmentares, enquanto, que CNVs não recorrentes são amplamente distribuídas ao longo do genoma em regiões que não possuem sequências homólogas (LUO, 2011).

As CNVs, embora presente em todo o genoma encontra-se em abundância nas regiões próximas aos telômeros. A alta prevalência de CNVs nas regiões subteloméricas é devido à presença de sequências repetitivas nestes locais (RIETHMAN, et al., 2005; RIETHMAN, 2008; KLOPOCKI; MUNDLOS, 2011). As deleções subteloméricas terminais em sua maioria parecem ocorrer devido a uma quebra na dupla fita de DNA, que, conseqüentemente, resulta na perda do telômero (VARGA, et al., 2005).

As CNVs têm sido reconhecidas como uma das principais contribuições para a variação genômica humana e também pela diversidade fenotípica intrapopulacional (IAFRATE, 2004; SEBAT, 2004; SHARP, 2005; REDON, 2006; CONRAD, 2010). Embora haja um crescente apreço pela importância das CNVs, pouco ainda foi elucidada sobre suas origens e mecanismos de formação.

CNVs ocorre normalmente como polimorfismo herdado, mas também surgem *de novo* numa taxa significativa, sendo evidente que CNVs surgem tanto em linhagem germinativa e células somáticas (TURNER, 2008).

As CNVs *de novo* são uma causa importante e frequente de doenças genéticas e de desenvolvimento e surgem com uma frequência alta nas células cancerosas. A frequência com que as CNVs *de novo* surgem sugere uma alta taxa de mutação *de novo*. Ao contrário de muitos outros tipos de mutação, pouco se sabe sobre os fatores de risco genéticos e ambientais para a indução de CNVs *de novo* (EGAN, 2007; LUPSKI, 2007; ZHANG, et al., 2009; KIROV, et al., 2009; CONRAD, 2010; ITSARA, 2010; ARLT, et al., 2012).

Segundo Mills e colaboradores (2011) o advento de novas tecnologias genômicas que permitiram análises de alta resolução estão ligados a descoberta de CNVs, dentre essas tecnologias está a análise por microarranjos. Com um número alto de CNVs, sendo 25.000 polimórficas e destes, 1.000 são consideradas CNVs grandes com tamanho superior a 500 Kb descritas em indivíduos normais, ficando claro que, a variação genética humana é profundamente influenciada por mudanças estruturais de grande escala.

#### **4.5. Formação das CNVs**

Rearranjos cromossômicos constitutivos são aqueles que podem ser herdados de um genitor portador, ou, que ocorrem *de novo* nas células precursoras dos gametas. Enquanto que anormalidades cromossômicas somáticas são as que surgem durante o desenvolvimento ou durante a vida do organismo, sendo, portanto, pós zigóticos

(SHAFFER; LUPSKI, 2000). Mudanças na estrutura dos cromossomos podem ocorrer por dois mecanismos gerais, a recombinação homóloga (do inglês, *Homologous Recombination* – HR) e recombinação não homóloga, sendo que HR requer uma extensa identidade da sequência de DNA (HASTINGS, et al., 2009).

Rearranjos genômicos são rearranjos cromossômicos que acontecem em regiões associadas com a instabilidade genômica e são uma fonte importante de doenças genômicas e variabilidade genética na forma de CNVs (LUPSKI, 1998; SHAW; LUPSKI, 2004; IAFRATE, et al., 2004; LUPSKI, 2007).

Os rearranjos genômicos resultam de falhas no reparo de DSBs (ILIAKIS, et al., 2004; GRIFFIN; THACKER, 2004). Danos ao DNA provocam ativação de processos de reparo que são controlados geneticamente. Sendo assim, as células normais podem reparar o dano com fidelidade ou introduzir erros durante o reparo, dependendo de qual o tipo de lesão ocorrido e do mecanismo utilizado para o reparo (MOUSTACCHI, 2000).

As DSBs são consideradas lesões primárias na formação de alterações cromossômicas, sendo a principal fonte de instabilidade genômica (AGUILERA; GÓMEZ-GONZÁLEZ, 2008). Essas quebras podem ser induzidas por agentes externos, como a RI, mas também podem ocorrer espontaneamente como uma consequência de processo normal da célula (SANKARANARAYANAN; WASSOM, 2005).

As DSBs, induzidas ou espontâneas, podem ser reparadas na célula eucariótica por dois principais processos de reparo: NAHR ou a junção de extremidades não homólogas (do inglês, *Non-Homologous End Joining* – NHEJ) (MOUSTACCHI, 2000; HABER, 2000; GU, et al., 2008; MERIKANGAS, et al., 2009; STANKIEWICZ; LUPSKI, 2010).

Recentemente verificou-se que células de mamíferos também são capazes de reparar o DNA por recombinação homóloga. No mecanismo de HR, uma sequência homóloga é utilizada como molde para que o reparo ocorra num processo semelhante ao da recombinação meiótica, mas existem diferenças fundamentais. Na meiose a recombinação ocorre preferencialmente entre cromossomos homólogos. Em células somáticas, a cromátide irmã é utilizada como molde para o reparo, além disso, o processo de reparo na meiose da quebra na dupla fita pode resultar tanto em troca entre as cromátides como em conversão gênica por *crossing-over* (HABER, 2000; MOENS, 2003).

Durante uma divisão celular, as células direcionam DSBs e SSBs para o mecanismo de reparo por HR, evitando assim as ocorrências de *crossing-over*. Tanto na meiose quanto na mitose, a recombinação normalmente acontece entre sequências alélicas. Sequências homólogas podem ser usadas eventualmente como moldes para o reparo, e o uso dessas sequências moldes associadas à ocorrência de *crossing-over* pode levar à formação de alterações cromossômicas. Quando a sequência homóloga da cromátide é o molde para o reparo, não haverá erros. O tipo de sequência que será utilizada como molde para o reparo define se o reparo será conservador ou se introduzirá erros (SHAFFER; LUPSKI, 2000). Se a sequência molde for do cromossomo homólogo, pode haver conversão gênica, restabelecendo a integridade genômica de maneira conservadora. Nesse contexto, a NAHR, resulta mais frequentemente em rearranjos cromossômicos (HABER, 2000; MOENS, 2003).

A formação de uma alteração estrutural na visão clássica propõe a aleatoriedade dos pontos de quebra da dupla fita com a junção das extremidades quebradas não homólogas. No entanto, a existência de segmentos cromossômicos que estão mais susceptíveis à formação de rearranjos tem sido objetivo de investigação há bastante tempo. Pode-se considerar a distribuição dos pontos de quebra ao longo do genoma como o reflexo de uma estrutura do DNA ou da cromatina em certos segmentos cromossômicos, predispondo assim, à ocorrência de quebras no DNA e a formação de rearranjos cromossômicos (LUPSKI, 1998). Evidências moleculares da participação dos mecanismos específicos de recombinação intra ou intercromossômica promove a formação de rearranjos estruturais. A recombinação poderia ocorrer como parte do mecanismo de reparo das quebras. O emparelhamento de sequências com homologia que não estão na mesma região do cromossomo homólogo, poderia levar à formação de alterações cromossômicas por *crossing-over* desigual (KURAHASHI, et al., 2000).

Rearranjos genômicos dão origem às doenças genômicas quando levam a alterações na dosagem ou interferem na regulação dos genes, por fusão gênica, efeito de posição, mutação recessiva em regiões codificantes ou em polimorfismos funcionais, dentre outros mecanismos (LUPSKI; STANCKIEWICZ, 2005). Os rearranjos genômicos podem ser recorrentes ou não recorrentes, os recorrentes acontecem com tamanhos comuns e pontos de quebra organizada em clusters, que é o resultado do mecanismo de NAHR. Os não recorrentes apresentam-se com extensões variáveis e pontos de quebra dispersos, sem que haja necessariamente um *hotspot* para que a recombinação ocorra

(STANKIEWICZ; LUPSKI, 2002; SHAW; LUPSKI, 2004; LEE, et al., 2007; GUN, et al., 2008; VERDIN, ET AL., 2013).

#### **4.6. Análise Cromossômica Por Microarranjos**

Os avanços tecnológicos para a investigação molecular dos genomas possibilitaram a identificação de polimorfismos em todo o genoma humano e não apenas em genes alvos. Com o advento das análises usando microarranjos de polimorfismo de base única (do inglês: *Single Nucleotide Polymorphism Array*– SNP-array), foi possível ampliar a possibilidade de estudos de associação genômica ampla (do inglês, *Genome-Wide Association Studies*– GWAS), nos quais se analisa todo o genoma ao invés de analisar apenas regiões específicas ou genes candidatos (MILER, et al., 2010).

A análise de número de cópias baseada em microarray é um método da citogenômica. A resolução e a precisão dos ensaios são determinadas pela quantidade e tamanho das sondas contidas no chip e pela distância entre as sonda, a no mapa físico do genoma. A especificidade e a sensibilidade da CMA são cerca de dez vezes mais alta que as dos métodos utilizados na Citogenética convencional (SHINAWI, et al.,2008).

Os microarranjos possuem sondas específicas para cada um dos alelos dos SNPs, marcadas com as quatro variantes (A, C, T e G) que permitem a identificação de rearranjos cromossômicos, como também a genotipagem (SPEICHER; CARTER, 2005). No SNP-array, a amostra é hibridizada com o array genômico e alterações no número de cópias são detectadas com base na intensidade do sinal de cada sonda em comparação com a amostra referência (DHAWAN; PADH, 2009).

A tecnologia de alta densidade da plataforma do CMA concilia o poder de alta resolução para a detecção de CNVs com a sensibilidade de detecção de consanguinidade, dissomia uniparental e uma maior sensibilidade para detectar baixos níveis de aneuploidias em mosaico pelos SNP-arrays (GIJSBERS, et al., 2009; KOOLEN, et al., 2009; MILLER, et al., 2010).

A tecnologia utilizada no presente estudo foi a plataforma CytoScanHD<sup>®</sup> Array (Affymetrix, Santa Clara, USA), que avalia alterações com um grau de confiabilidade e sensibilidade maior que 99%, apresentando uma das maiores resoluções disponíveis no mercado atual.

## **5. OBJETIVO**

### **5.1. Objetivo Geral**

Estimar a frequência de mutações germinativas na prole de indivíduos expostos ocupacionalmente ao Césio-137, estabelecendo um método de identificação de CNVs por microarranjos de alta densidade.

### **5.2. Objetivos Específicos**

1. Determinar a frequência de CNVs na geração F1 de indivíduos expostos a radiação ionizante do Cs<sup>137</sup>;
2. Estabelecer as frequências de CNVs *de novo* que ocorrem na geração F1 de indivíduos ocupacionalmente expostos à radiação ionizante do Cs<sup>137</sup>;
3. Estabelecer a taxa de frequência de mutação germinativa de CNVs induzida pela exposição parental à RI;
4. Contribuir com o aumento do conhecimento sobre os efeitos biológicos de exposição à radiação ionizante;
5. Continuar com os estudos de monitoramento genético da população ocupacionalmente exposta ao Césio-137 em Goiânia-Goiás.

## **6. MATERIAL E MÉTODOS**

### **6.1. Caracterização do Grupo Amostral**

O grupo exposto foi constituído por sete famílias, de bombeiros e policiais militares que atuaram durante o acidente radiológico de Goiânia em 1987. No grupo exposto todos os pais foram expostos ocupacionalmente à radiação ionizante do Césio-137, mas não há registro de doses absorvidas por estes trabalhadores. No grupo exposto foram incluídos 25 indivíduos. O grupo controle foi composto por 11 famílias goianas sem histórico de exposição à radiação ionizante

### **6.2. Coleta e Processamento das Amostras**

As amostras biológicas dos militares expostos, de suas esposas e de pelo menos um dos filhos biológicos do casal foram colhidas por punção venosa 10 mL de sangue periférico. Para cada amostra foram separadas alíquotas de plasma, anel leucocitário e hemácias, que foram armazenadas a -20°C. O anel leucocitário foi usado para a extração e a purificação de DNA genômico. No momento da coleta, os participantes responderam voluntariamente a um questionário e assinaram a um Termo de Consentimento Livre Esclarecido (Anexo II, III e IV), e responderam voluntariamente a um questionário (Anexo V). Todas as amostras foram processadas no laboratório de genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás no Núcleo de Pesquisas Replicon. Os estudos foram conduzidos nos termos das Resoluções CNS N° 441, DE 12 DE MAIO DE 2011, 340/2004 – CNS/MS e 347/2005 – CNS/MS (Anexo VI, VII e VIII). O presente estudo foi submetido e aprovado pelo comitê de ética e pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-Goiás), sob o registro de número CAAE 49338615.2.0000.0037, e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), conforme parecer contido no ofício n° 982 CONEP/CNS/MS. O número de registro do processo no CONEP é 10301 e o número do processo 205000.073183/2004-45.

### **6.3. Isolamento do DNA Genômico**

O DNA genômico foi extraído com o Kit de extração de DNA Illustra Blood GenomicPrep® Mini Kit (GE Healthcare, EUA). A quantificação da concentração (ng/µL) do DNA isolado de cada amostra foi feita em um espectrofotômetro NanoVue® Plus (GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido). Os procedimentos foram realizados de acordo com os protocolos propostos pelos fabricantes.

#### **6.4. Análise Cromossômica por Microarray**

A CMA foi conduzida em um Gene ChipCytoScan HD<sup>®</sup> (Affymetrix – Estados Unidos da América, EUA) de alta resolução, fazendo com que essa técnica apresente maior robustez quando comparada com outras técnicas de citogenética. O chip possui uma matriz de genotipagem bastante abrangente para o genoma humano, com ampla cobertura do genoma e maior desempenho para a análise de alterações cromossômicas humanas. A matriz usada detecta variações genéticas estruturais, correspondendo a ganhos e perdas genômicos. O CytoScan HD<sup>®</sup> possui mais de 99% de sensibilidade na detecção de CNVs, determinação de perda de heterozigose (LOH) e baixos níveis de mosaicismos. A matriz do chip possui cerca de 2,6 milhões de cópias de marcadores, incluindo aproximadamente 750 mil SNPs e cerca de 2 milhões de sondas não polimórficas. As sondas que integram o chip apresentavam tamanho de 25 pb.

##### **6.4.1. Método de Genotipagem por SNP-Array**

A metodologia consiste em um ensaio composto por múltiplas sondas de hibridização alelo-específicas que são complementares às regiões de SNP presentes na fração reduzida do genoma amplificado no ensaio. As sondas são constituídas de 25 oligonucleotídeos, com o SNP variável localizado no 13º nucleotídeo. Elas são redundantes e espalhadas ao longo do chip, para atenuar quaisquer efeitos da variação devido à localização física na matriz. Cada sonda tem uma localização fixa no arranjo do chip.

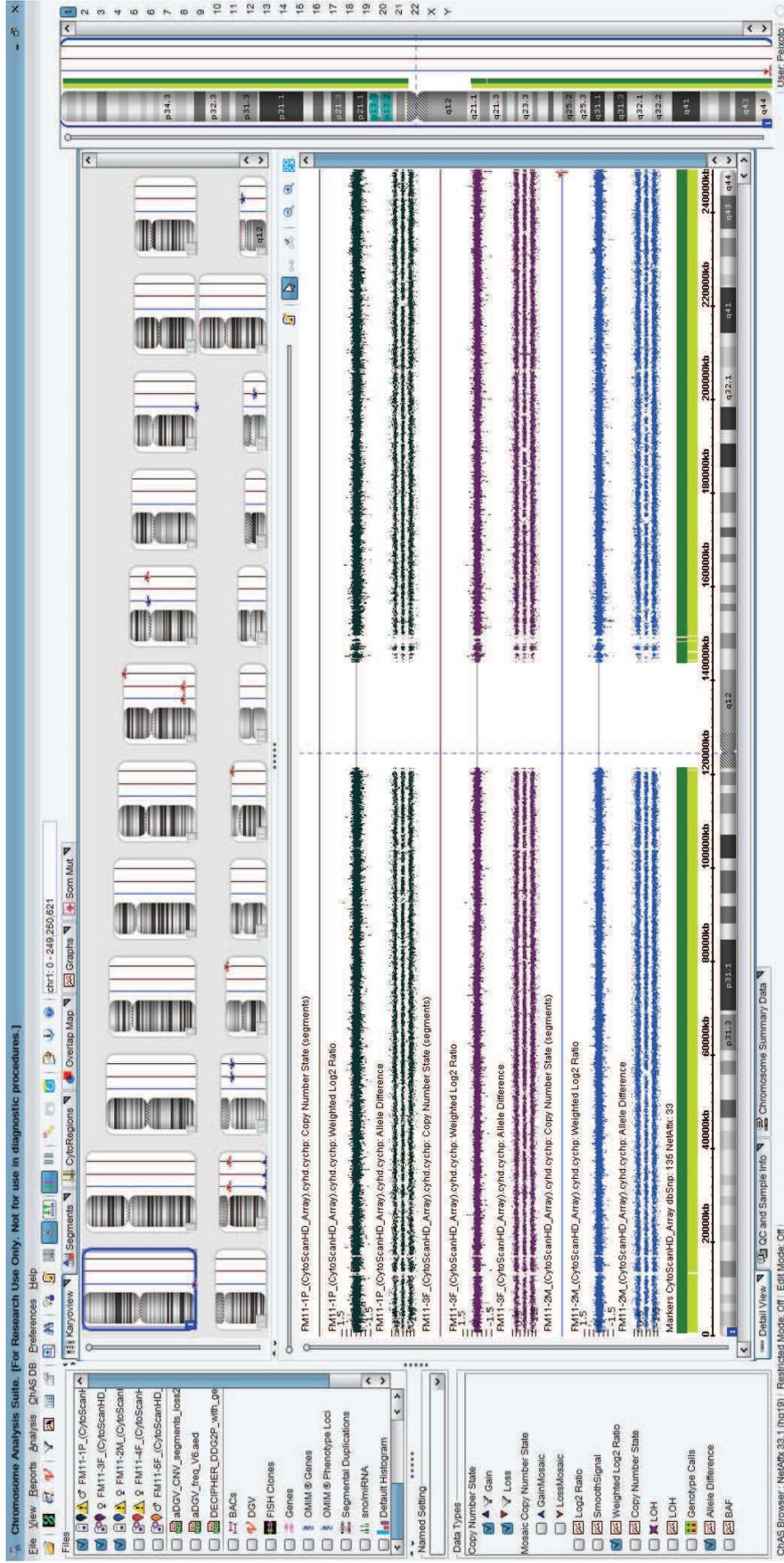
A metodologia se iniciou com uma digestão do DNA amostral com uma enzima de restrição (*NspI*) fornecida pelo fabricante. Este passo requer aproximadamente 250 ng de DNA. Em seguida, o DNA digerido foi ligado a adaptadores específicos e, amplificados por PCR, mediante o uso de primers universais. O DNA fragmentado por digestão enzimática e amplificado foi marcado com biotina e hibridado no GeneChip<sup>®</sup> HD por 18 horas. Após a hibridização, os chips foram digitalizados no GeneChip<sup>®</sup> Scanner 3.000 7G (Affymetrix, Estados Unidos da América). Ao final da digitalização, os sinais luminosos foram lidos e capturados pelo software ArrayGenechip<sup>®</sup> Command Console<sup>®</sup> Software (AGCC<sup>®</sup>) (Affymetrix, EUA) gerando arquivos CEL, e as análises dos dados foram realizadas pelo software Chromosome Analysis Suite<sup>®</sup> 2.0 (ChAS<sup>®</sup>, Affymetrix, EUA). Os arquivos CEL obtidos pelo escaneamento dos chips foram usadas para estabelecer os genótipos dos SNPs constitutivos das CNVs.

As duas principais métricas de controle de qualidade do ArrayGeneChipHD<sup>®</sup> foram *Median Absolute Pairwise Difference* (MAPD) e *SNP-Quality Control* (SNP-QC), escores que se aplicam para marcadores de número de cópias e SNP, respectivamente. Para o cenário do presente estudo foram usados os parâmetros de MAPD  $\leq 0.25$  e de SNP-QC  $\geq 15$ .

#### **6.4.2. Tratamento e Análise dos Dados Obtidos na Genotipagem dos SNPs**

A grande quantidade de informações disponibilizadas pelo uso do GeneChip<sup>®</sup> HD faz com que sejam necessárias análises complexas para o tratamento dos dados. A análise dos resultados foi executada no Software *Chromosome Analysis Suite* (ChAS<sup>®</sup>) que possibilita investigar alterações estruturais ao longo do genoma, tais como variações no número de cópias, como duplicações e deleções de segmentos de DNA de regiões gênicas presentes nas amostras estudadas de modo comparativo, facilitando as interpretações dos resultados (Figura 7).

Foram fixados como filtros: 15 e 8 marcadores de SNPs para se detectar microduplicações e microdeleções, respectivamente, distribuídos com uma média de marcadores  $\leq 2.000$  Kb, limitando-se a fragmentos  $\geq 1$ Kb (Affymetrix<sup>®</sup> Chromosome Analysis Suite 2.0<sup>™</sup> Software User Manual). Foram incluídas nas análises subsequentes as CNVs que apareciam nos bancos de dados do Cytoscan HD<sup>®</sup> (Affymetrix, EUA) e do DGV (*The Data Base of Genomic Variants*).



**Figura 7.** Interface de análise dos dados no *CHAS*® 2.0 (Affymetrix – EUA). A plataforma de análise dos dados gerados interpreta os dados produzidos pelo escaneamento *GeneChip*® HD. A interface registra visualmente as microalterações estruturais observadas ao longo do genoma humano. O *CHAS*® foi a plataforma de análise escolhida para o estudo de mutações germinativas em CNVs na prole de trabalhadores expostos ocupacionalmente à radiação ionizante de césio-137, em Goiânia.

### 6.5. Cálculo da Taxa de Mutação Germinativa em CNVs ( $TM_{CNV}$ )

A taxa de CNVs *de novo* foi estimada para representar a frequência de formação de CNV por *locus* por geração. No presente estudo foram incluídas somente CNVs *de novo*. A  $TM_{CNV}$  foi estimada aplicando-se a equação 1 (DA CRUZ, et al., 2008; COSTA, et al., 2011):

$$\text{Equação 1}$$
$$TM_{CNV} = \frac{\sum T_{CNV}}{\rho! \times a \times tgh}$$

Onde:

$\sum T_{CNV}$ : Tamanho total das CNVs (bp)

$\rho!$ : Número de meioses (2)

a: bialelia (2)

tgh: tamanho do genoma haplóide ( $2,9 \times 10^9$ ), segundo a montagem da sequência humana de referência (GRCh37/hg19).

A Equação 1 foi aplicada para as CNVp e CNVg. Para se avaliar o impacto acumulado dos ganhos e perdas genômicos, foi analisado o *burden* das CNVs, que correspondeu à  $TM_{CNV}$  total, somando-se as taxas individuais de ganho e perda genômicos.

A Equação 2 foi usada para estimar o número de meioses paternas para casos e controles em função da idade dos pais à época da concepção da prole.

$$\text{Equação 2}$$
$$No.\rho! = (((IP \times m) - (tg + Iad)) \times d/m) \times tp!d$$

Onde:

No. $\rho!$ : Número de meioses paternas

IP: Idade paterna (anos)

m: meses/ano

tg: tempo de gestação (meses)

Iad: Média de idade do início da produção de espermatozoides na adolescência, que em humanos é de 12 anos (meses)

d/m: Total de dias no mês

tp!d: Número total de médio de meioses estimadas por dia em humano

## 6.6. Análise Estatística

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a normalidade dos dados. Não sendo verificada a normalidade dos dados para esse conjunto amostral foram aplicados testes estatísticos não paramétricos.

As diferenças na frequência de mutação por locus/geração,  $TM_{CNV}$  e tamanho das CNVs em cada cromossomo para microdeleção e microduplicação entre os grupos caso e controle foi realizado utilizando o teste Mann-Whitney U. A correlação de Spearman foi realizada para analisar o efeito da idade parental à concepção na frequência de mutação (*burden*). O teste binomial foi usado para testar a frequência de CNVs na microdeleção e microduplicação entre os grupos caso e controle.

A análise da função discriminante foi realizada utilizando o grupo exposto e controle como variável dependente e o número de meioses paternas à época da concepção, a frequência de CNVp e CNVg e a média da idade parental à época da concepção como variáveis explicativas (preditores). Os coeficientes da função discriminante foram utilizados para verificar qual variável teve maior contribuição para a função discriminante.

O teste  $\chi^2$  foi utilizado para testar as diferenças na frequência das diferentes classes do tamanho e número de marcadores e também para avaliar se houve diferença na distribuição das frequências dos hotspots entre caso e controle considerando as microdeleções e as microduplicações.

Todas as análises foram realizadas utilizando o pacote estatístico SPSS<sup>®</sup> 21.0, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 7. RESULTADOS

A média das idades dos progenitores à época da concepção para os pais foi de 25 para os casos e de 30,2 para os controles, respectivamente. Para as mães, foram de 27,2 nos casos e 27,7 nos controles, respectivamente. Os participantes do grupo controle não apresentavam história de exposição ocupacional ou acidental, nem para fins terapêuticos ou de diagnósticos, à radiação. Os controles residiam na cidade de Goiânia-GO. As médias de idade da geração F1 foram de 13,1 e 12,8 para casos e controle, respectivamente. A Tabela 1 contém os dados descritivos dos grupos participantes do presente estudo na coleta das amostras.

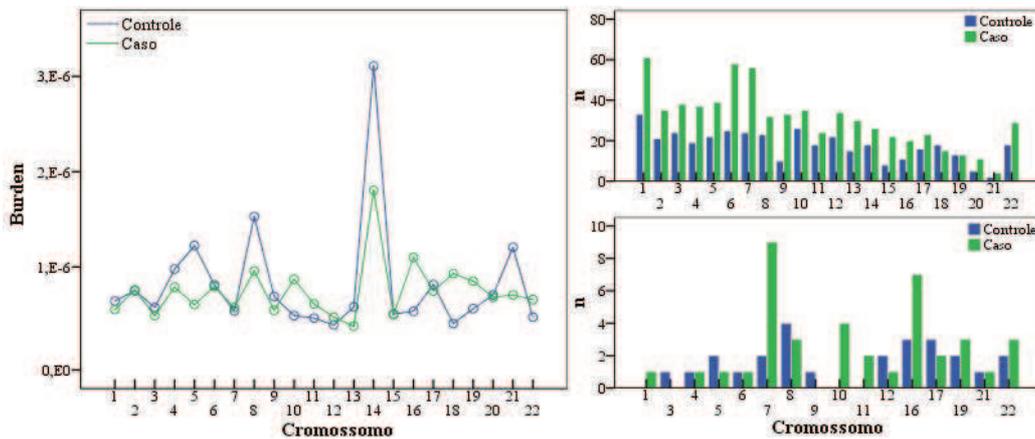
**Tabela 1.** Dados descritivos dos grupos caso e controle para as gerações parental e F1 incluídos no estudo da sobre a indução de mutação germinativa na prole de indivíduos expostos ocupacionalmente à radiação ionizante de césio-137.

Geração		Variáveis	Controles	Casos
		n	22	14
		Faixa etária	19 a 47	19 a 39
Parental	Média das idades na concepção ( $\pm$ DP)	Pais	30,2 (9,5)	31(5,2)
		Mães	27,7 (6,2)	27,2 (5,6)
	Dose (Gy)	na	na	
		n	11	11
		Faixa etária	5 a 25	5 a 18
		Média das idades( $\pm$ DP)	12,8 (8,1)	13,1(3,8)
F1	Proporção entre os sexos (H/M)		4/7	5/6
	Média populacional de $TM_{CNV_{perda/ger}}$		$2,5 \times 10^{-5}$	$3,9 \times 10^{-5}$
	Média populacional de $TM_{CNV_{ganho/ger}}$		$5,9 \times 10^{-6}$	$6,8 \times 10^{-6}$
	Média populacional de $TM_{CNV_{\beta}}$		$3,1 \times 10^{-5}$	$4,6 \times 10^{-5}$

DP: Desvio Padrão; H: Homens; M: Mulheres; ger: geração;  $\beta$ : *Burden*, na: não se aplica

As microdeleções e microduplicações foram mais frequentes no grupo exposto, com um aumento de 1,6x para microdeleção e 1,15x para microduplicação em relação ao grupo controle. Neste contexto, o *burden* da taxa de mutação germinativa em CNVs ( $TM_{CNV_{\beta}}$ ) foi de 1,5x para a progênie dos indivíduos expostos em relação ao controle saudável de Goiânia. A diferença na distribuição das frequências da  $TM_{CNV}$  entre casos e controles (Figura 8) pelo

teste não paramétrico de Mann-Whitney U mostrou-se estatisticamente significativa, para microdeleções ( $p=0,006$ ), mas não mostrou estatisticamente significativa para microduplicações ( $p= 0,511$ ).



**Figura 8.** Teste de comparações múltiplas por ANOVA fatorial (Tukey) para as variâncias observadas em A: A taxa de *burden* em CNVs e B: Total de CNVs por cromossomo, entre os grupos controle e casos expostos à RI de césio-137 em Goiânia-GO.

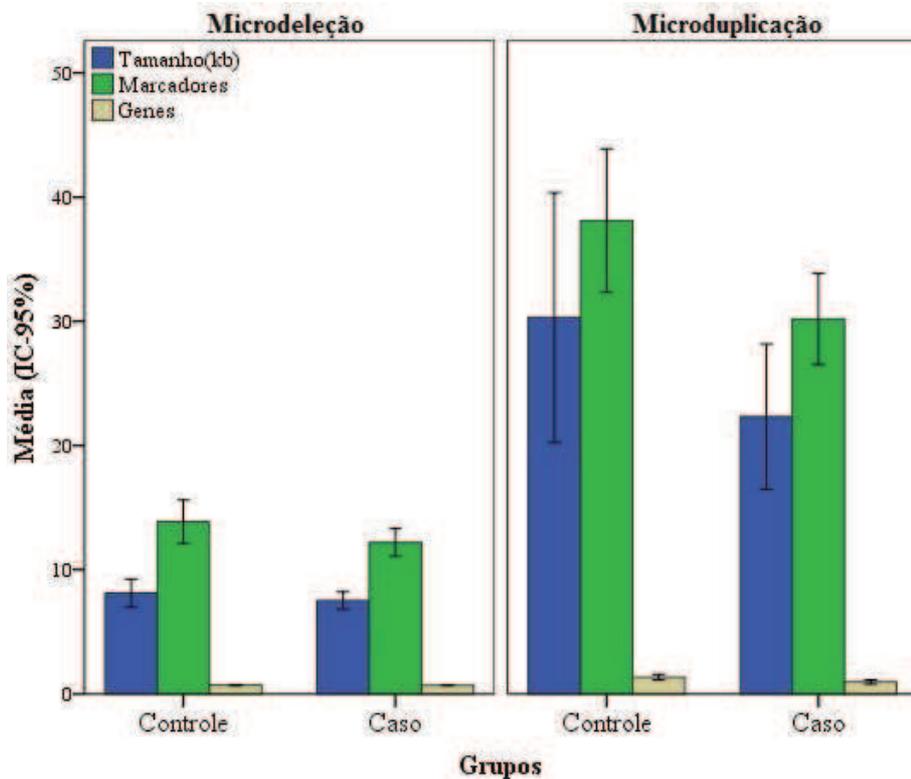
A distribuição das CNVs entre os grupos pode ser observada na Tabela 2. A análise dos dados permitiu a identificação de 416 e 714 CNVs no total, para os grupos controles e casos, respectivamente. Nenhuma das CNVs observadas apresentou tamanho  $\geq 500$ Kb, todas as CNVs observadas tanto no grupo caso e no grupo controle foram incluídas nas análises estatísticas. A menor CNV encontrada para as microdeleções foi de 1Kb e a maior foi 331Kb. Nas microduplicações, a menor foi 1Kb e a maior foi 140Kb. O tamanho total de microdeleção para o grupo exposto foi de 5.084Kb e de microduplicação foi de 871Kb. Enquanto que no grupo controle, o total de microdeleção foi de 3.175Kb e as microduplicações foram de 758 Kb (Tabela 2). O teste binomial mostrou que o tamanho total do genoma afetado por microdeleção ( $\chi^2=315$ ;  $p=2,2^{-16}$ ) e microduplicação ( $\chi^2= 477,66$ ;  $p=2,2^{-16}$ ) entre casos e controles não foi estatisticamente significativa.

**Tabela 2.** Distribuição das CNVs entre casos e controles para o estudo do impacto da exposição acidental a doses baixas de RI na frequência de mutações germinativas na progênie de pessoas expostas à radiação ionizante de Cs<sup>137</sup>.

Grupo	CNV	Ganhos	Perdas	Total
Caso	Intervalo (Kb)	1 a 137	1 a 331	1 a 331
	n	39	675	714
	Média do tamanho da CNV (Kb)	22,33	7,53	na
	$\Sigma T_{CNV}$ (Kb)	871	5.084	5.955
Controle	Intervalo (Kb)	1 a 140	1 a 225	1 a 225
	n	25	391	416
	Média do tamanho da CNV (Kb)	30,32	8,12	na
	$\Sigma T_{CNV}$ (Kb)	758	3.175	3.933

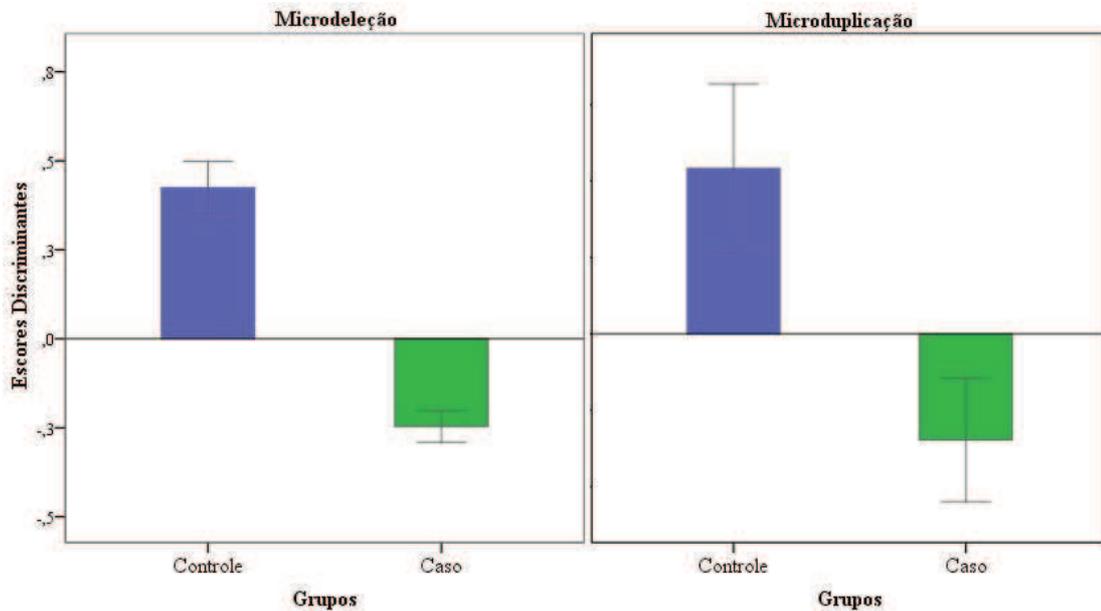
$\Sigma T_{CNV}$ : Tamanho total das CNVs (Kb); na: não se aplica.

Não houve diferença estatística significativa entre o tamanho das CNVs, o número de marcadores e o número de genes nas CNVs ( $p \geq 0,05$ ). A diferença entre os grupos foi caracterizada pelo aumento do número de eventos de perdas e ganhos (*burden*) em casos e controles pelo teste de Mann-Whitney U ( $p=0,005$ ). A Figura 9 ilustra os resultados apresentados para esta análise.



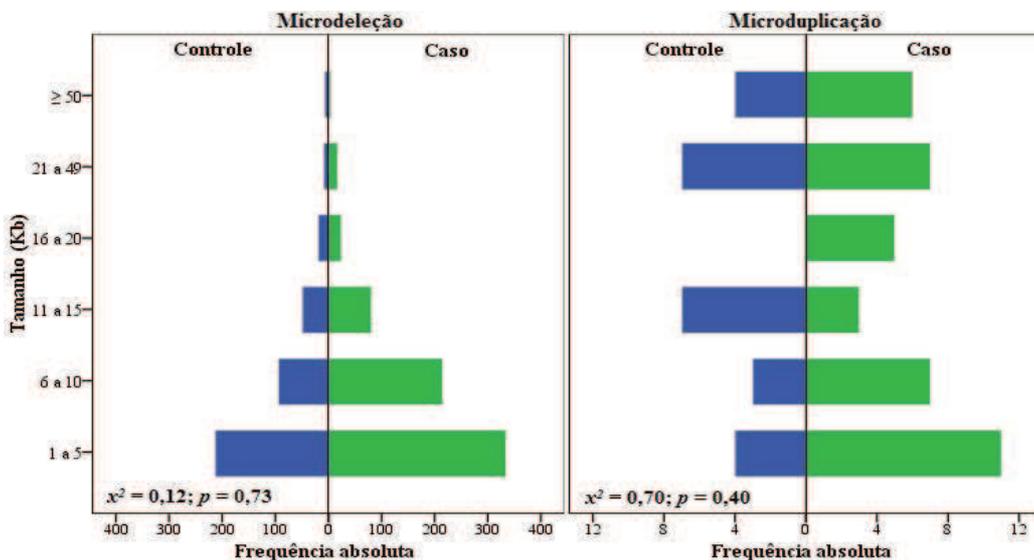
**Figura 9.** A distribuição das variáveis tamanho das CNVs, número de marcadores na CNV e o número de genes na CNVs entre os grupos controle (1) e casos (2) expostos à RI de césio-137 em Goiânia-GO.

A análise discriminante identificou diferenças significativas entre os escores associados ao grupo exposto e controle, mediados pelos preditores. Dentre todas as variáveis analisadas, as que mais contribuíram para discriminar os grupos foram: número de meioses, idade materna e o número de marcadores nas CNVs (Figura 10). As diferenças foram significativas tanto para microdeleção quanto para microduplicação ( $p=0,0001$ ;  $r^2=0,9$ ).



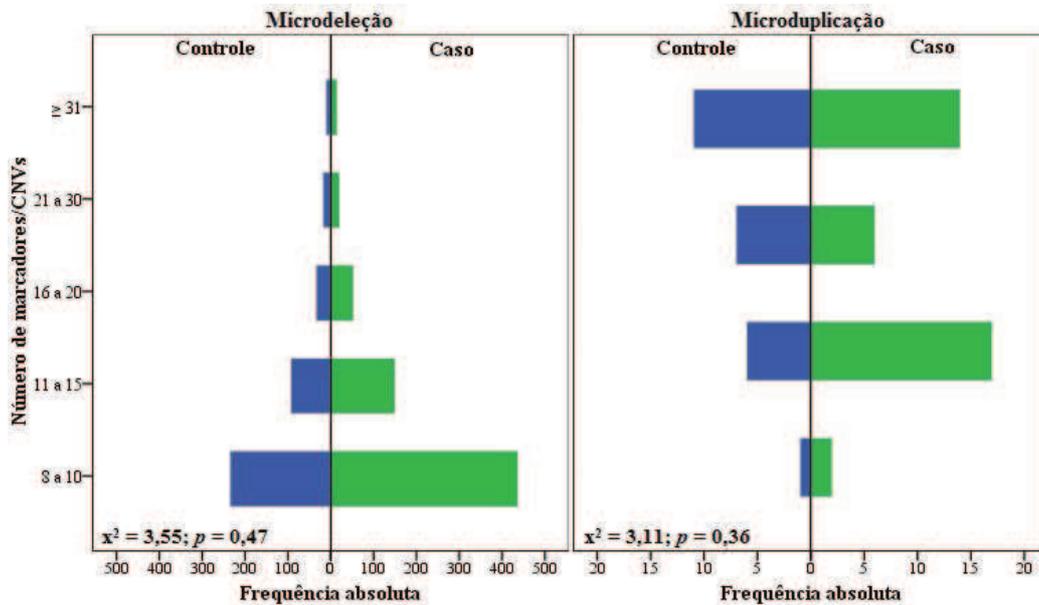
**Figura 10.** Análise discriminante: número de meioses, idade materna e o número de marcadores, genes e tamanho (Kb) observados na geração F1 de controles e casos expostos ocupacionalmente a RI de césio-137 em Goiânia (Brasil).

Em relação aos tamanhos das CNVs, não houve diferença estatística significativa entre os grupos (Figura 11) pelo teste do  $\chi^2$ .



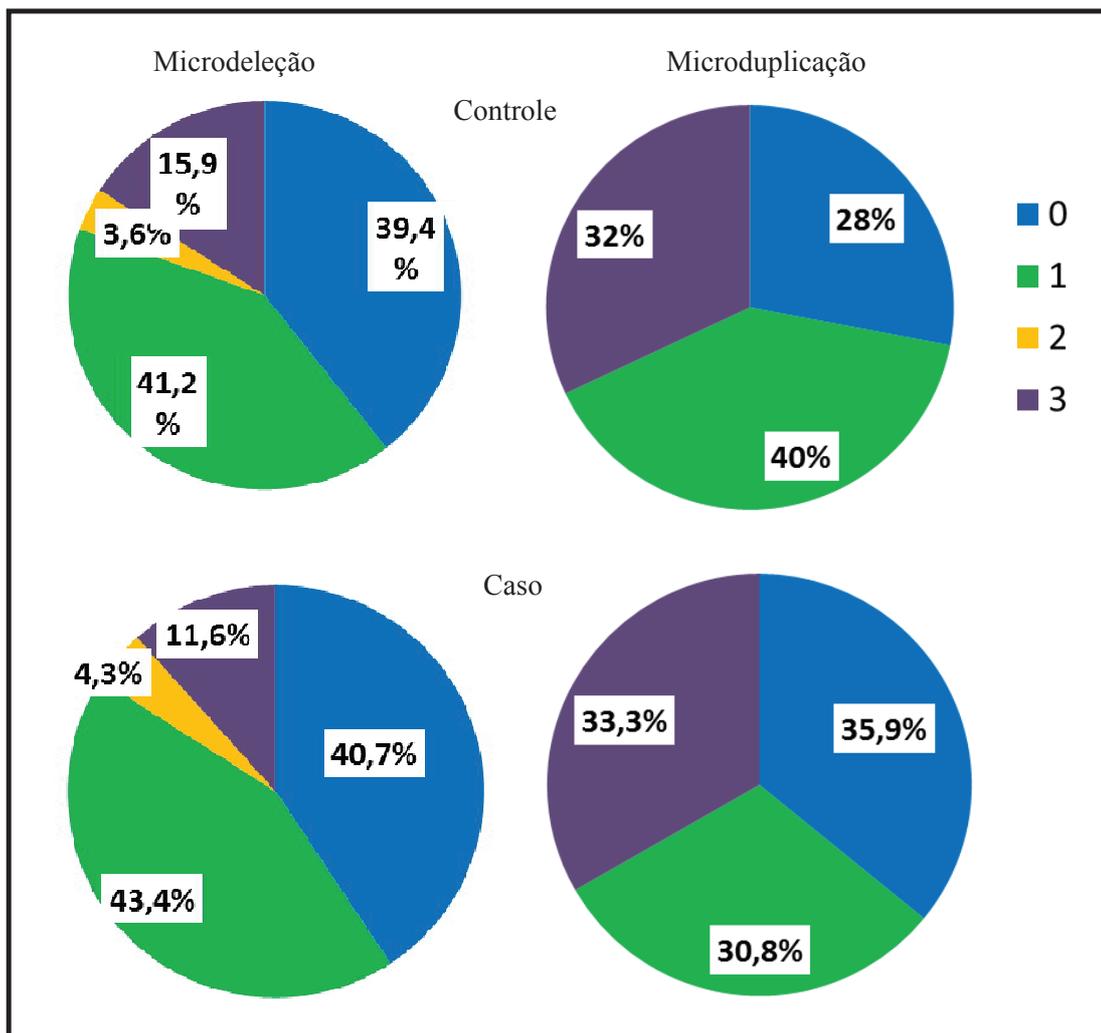
**Figura 11.** Distribuição das frequências das diferentes classes do tamanho do fragmento (Kb) entre os grupos controle e o caso, para a microdeleção e microduplicação, no estudo sobre a indução de mutações novas na prole de indivíduos expostos à RI de Goiânia-GO.

Em relação ao número de marcadores das CNVs, Nas frequências das diferentes classes do número de marcadores não houve diferença estatística significativa entre os grupos (Figura 12) pelo teste do  $\chi^2$ .



**Figura 12.** Distribuição das frequências das diferentes classes do número de marcadores (CNVs) entre os grupos controle e o caso, para a microdeleção e microduplicação, no estudo sobre a indução de mutações novas na prole de indivíduos expostos à RI de Goiânia-GO.

A Figura 13 mostra a distribuição das CNVs em função da presença ou ausência da variante em bancos de dados, especificamente, sobre a ocorrência da CNVs no DGV e no banco do próprio CytoScanHD<sup>®</sup> pelo teste do  $\chi^2$ .



**Figura 13.** Frequência percentual da distribuição das CNVs em função das variantes depositadas no DGV e no CytoScan HD no estudo sobre a indução de mutação germinativa na geração F1 de indivíduos expostos à RI em Goiânia-GO. Onde: 0 – não aparece em nenhum dos bancos de dados; 1 – só aparece no DGV; 2 – aparece só no CytoScan HD; 3 – aparece nos dois bancos de dados.

As diferenças na variância das frequências de mutação de CNVs por locus por geração por cromossomo observadas nos grupos exposto e controle foram estatisticamente significativas para os cromossomos 5 e 18 para as microdeleções. Para as microduplicações não houve diferenças estatísticas, segundo a análise realizada pelo Teste de Mann-Whitney U (Tabelas 3 e 4).

**Tabela 3.** Comparação da frequência de mutação de microdeleção entre o caso e o controle para cada cromossomo.

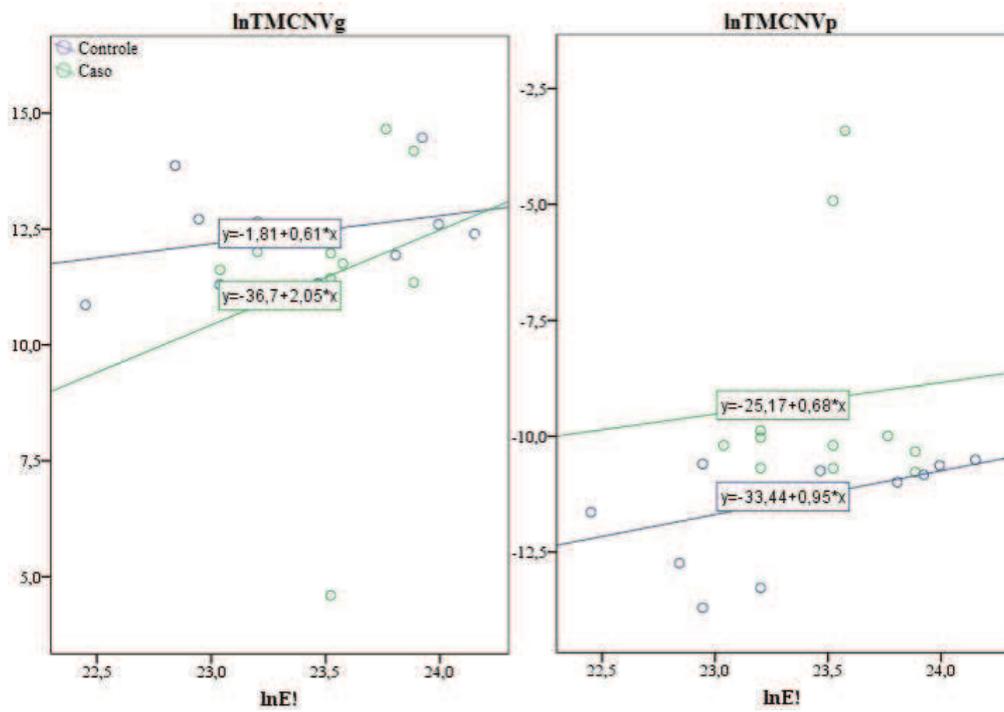
Cromossomo	Controle		Caso		P*
	Média	DP	Média	DP	
1	6,4E-07	9,4E-07	5,6E-07	4,1E-07	0,24
2	7,5E-07	1,0E-06	7,6E-07	6,3E-07	0,23
3	5,9E-07	4,6E-07	4,9E-07	2,8E-07	0,68
4	9,3E-07	9,6E-07	8,1E-07	7,5E-07	0,81
5	9,1E-07	6,4E-07	6,0E-07	4,7E-07	0,04
6	5,5E-07	4,5E-07	6,8E-07	7,3E-07	0,59
7	5,1E-07	9,0E-07	5,6E-07	7,5E-07	0,15
8	6,2E-07	3,1E-07	6,7E-07	4,8E-07	0,80
9	5,2E-07	3,9E-07	5,5E-07	3,0E-07	0,68
10	4,9E-07	3,9E-07	5,9E-07	4,1E-07	0,35
11	4,6E-07	5,5E-07	5,2E-07	2,9E-07	0,14
12	3,6E-07	3,4E-07	4,8E-07	3,9E-07	0,10
13	5,8E-07	5,1E-07	3,8E-07	2,6E-07	0,35
14	3,1E-06	5,9E-06	1,8E-06	5,6E-06	0,64
15	5,1E-07	4,6E-07	5,0E-07	3,5E-07	0,87
16	3,3E-07	3,4E-07	7,0E-07	8,3E-07	0,14
17	6,3E-07	4,6E-07	6,3E-07	4,3E-07	0,85
18	4,1E-07	3,5E-07	9,3E-07	3,9E-07	<0,001
19	5,4E-07	5,2E-07	4,8E-07	3,8E-07	0,92
20	7,1E-07	6,0E-07	6,8E-07	5,6E-07	0,91
21	3,9E-07	6,1E-08	5,0E-07	4,3E-07	0,80
22	5,1E-07	5,0E-07	6,4E-07	5,4E-07	0,54

**Tabela 4.** Comparação da frequência de mutação de microduplicação entre o caso e o controle para cada cromossomo.

Cromossomo	Controle		Caso		<i>P</i>
	Média	DP	Média	DP	
1	0,0E+00	0,0E+00	2,6E-07	0,0E+00	na
3	3,4E-07	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	na
4	1,8E-06	0,0E+00	8,6E-08	0,0E+00	0,98
5	4,7E-06	1,2E-06	9,5E-07	0,0E+00	0,66
6	7,3E-06	0,0E+00	7,3E-06	0,0E+00	0,99
7	9,5E-07	0,0E+00	6,9E-07	5,6E-07	0,58
8	6,7E-06	6,0E-06	4,0E-06	6,8E-06	0,22
9	2,4E-06	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	na
10	0,0E+00	0,0E+00	3,4E-06	1,7E-06	na
11	0,0E+00	0,0E+00	1,8E-06	6,1E-08	na
12	6,9E-07	7,3E-07	8,6E-08	0,0E+00	0,66
16	1,3E-06	9,7E-07	2,2E-06	2,4E-06	0,99
17	1,8E-06	1,2E-06	2,1E-06	1,7E-06	0,99
19	7,3E-07	3,0E-07	2,4E-06	1,3E-07	0,21
21	2,8E-06	0,0E+00	1,6E-06	0,0E+00	0,99
22	1,3E-07	6,1E-08	8,3E-07	9,3E-07	0,21

na=não se aplica

Foi realizado o teste de correlação de Sperman entre a média da idade paterna na concepção e a taxa média das mutações germinativas das CNVs na geração F1 do grupo exposto e controle (Figura 14). O coeficiente da correlação para o grupo controle na microdeleção  $r = 0,23$ ;  $p < 0,001$  e na microduplicação foi de  $r = 0,22$ ;  $p = 0,28$ . O coeficiente da correlação para o grupo caso na microduplicação foi de  $r = 0,009$ ;  $p = 0,56$ .



**Figura 14.** Correlação de Spearman entre a média da idade paterna na concepção e a taxa média das mutações germinativas das CNVs na geração F1 de controles e casos expostos a Ri de césio-137.

## 8. DISCUSSÃO

Alterações genômicas como as CNVs têm revelado um papel importante na diversidade populacional, na etiologia de doenças humanas e na variabilidade genômica que é observada na população. As CNVs recorrentes e não recorrentes são causas importantes e frequentes de doenças genéticas, genômicas e de desenvolvimento. Com mais de 25.000 CNVs polimórficos, fica claro que existe uma correlação entre a variação genética e as mudanças estruturais. Um componente importante das CNVs pode ter impactos deletérios no genoma e nos fenótipos. A frequência com que as CNVs surgem sugere uma alta taxa de mutação de novo, que podem ser transmitidas ao longo das gerações (GIRIRAJAN, et al., 2011; DAUBER, et al., 2011; ARLT, et al., 2012).

Itsara (2009) avaliou a presença de grandes CNVs ( $\geq 500$  Kb) e identificou grandes variantes em aproximadamente 2.500 indivíduos, correspondendo a cerca de 10% dos indivíduos com CNVs  $\geq 500$  Kb, em até 2% da população foi registrado CNVs  $\geq 1$  Mb. O presente estudo corrobora os achados descritos por Itsara (2009), pois foi encontrado cerca de 2% de grandes CNV na população goiana amostrada. No entanto, há uma escassez de dados sobre o papel biológico e a frequência de pequenas CNVs na população e suas aplicações como biomarcadores de exposição. Este é um estudo pioneiro com análise de pequenas deleções e duplicações para estimar a taxa de mutação *de novo* germinativa em uma população humana exposta ocupacionalmente à radiação ionizante de césio-137.

O uso de novas tecnologias genômicas tem proporcionado um grande potencial para a determinação de mutações germinativas em humanos e alguns animais como os camundongos. Tais estudos permitem investigar exposições potenciais a agentes mutagênicos, com consequente indução de mutações somáticas e germinativas. Em relação à exposição RI, as novas tecnologias tem possibilitando a avaliação dos efeitos biológicos estocásticos da exposição à radiação sobre a indução de mutação nos genomas expostos direta ou indiretamente à energia radioativa (ADEWOYE, et al., 2015).

O genoma de uma pessoa é resultado do acúmulo de um número de mutações de diversos tipos. Sendo assim, a exposição à radiação ionizante pode ser colocada em perspectiva para avaliar os riscos genéticos, para melhor compreensão da população. Quando as células germinativas são expostas à radiação, o risco de desordens hereditárias pode aumentar. Os efeitos genéticos resultantes da exposição à radiação têm sido confirmados em várias espécies, sendo assim, é improvável que o genoma humano seja uma exceção (ASAKAWA, et al., 2013). O nosso estudo corrobora com este dado, pois no estudo

observamos um aumento de CNVs novas nas proles de indivíduos que foram expostos ocupacionalmente a radiação ionizante quando comparado com o grupo controle.

Algumas pesquisas avaliaram os efeitos genéticos em populações que foram expostas diretamente a RI, alguns estudos *in vitro* relataram que a taxa de mutação em células germinativas permaneceram elevadas durante um período de tempo após a exposição inicial, uma característica comum relacionada com a instabilidade genômica (DUBROVA, et al., 2005; BARBER & DUBROVA, 2006).

A taxa de mutação permitiu discriminar os dois grupos, entre os escores associados ao grupo exposto e o controle, onde o número de meioses, idade materna e o número de marcadores nas CNVs foram os preditores que mais contribuíram para as médias das taxas, apresentando uma diferença estatística tanto para microdeleção quanto para microduplicação.

A compreensão de que a maioria das mutações germinativas celulares induzidas por radiação são deleções, abrangendo mais de um gene na sua grande maioria, e que surgem como resultado do reparo ou de erro no reparo do DNA induzidas por DSBs e SSBs. Neste aspecto fornece-se um cenário para concentrar os esforços de estimar os riscos genéticos devido a exposição à RI em seres humanos (SANKARANARAYANAN, et al., 2013). No presente estudo comparando o caso com o controle foi possível observar que as microdeleções foram mais frequentes do que as microduplicações, tendo um aumento de 1,15x mais microduplicações e 1,6x mais microdeleções no grupo exposto a RI do que no grupo controle.

Estudos feitos em loci específicos de células germinativas de camundongos, as deleções encontradas englobaram um variação de tamanhos, de alguns pares de bases e algumas megabases, sendo mais frequentes observadas na situações de exposição a dose de radiação elevadas. No entanto, existem questionamentos sobre o papel da indução das pequenas deleções decorrente da exposição a RI (WOLFF, 1967; SEARLE, 1974; RINCHIK, et al., 1990; RUSSELL, et al., 1990; SANKARANARAYANAN, 1991; THACKER, 1992; CATTANACH, et al., 1993; CATTANACH, et al., 1996; SANKARANARAYANAN, 1999).

Um estudo de Furitsu e colaboradores (2005) analisou se a exposição à radiação teria efeito nas células germinativas humanas, podendo assim provocar um aumento na frequência de mutações em microssatélites nos filhos dos indivíduos envolvidos nas operações de limpeza após o acidente em Chernobyl, e não encontraram nenhum aumento nas frequências. Esse estudo não corrobora com os nossos achados, onde encontramos um aumento na frequência de mutações de novo em filhos de militares expostos ocupacionalmente à radiação ionizante de césio-137.

Em um estudo com andorinhas que nidificaram perto de Chernobyl foi relatado um aumento significativo de mutações transgeracionais. Foram analisados dois loci microssatélites e a taxa de mutação combinada dos dois loci foi significativamente maior (3,6X) do que para as aves das áreas de controle. O mesmo estudo também analisou trigo e os resultados demonstraram um aumento de mutações microssatélites transgeracionais. Os pesquisadores analisaram 13 loci microssatélites em 186 plantas de trigo cultivadas a partir de sementes coletadas nas áreas expostas e usaram 150 plantas como controle. Nesse estudo houve um aumento de 6x na taxa de mutação ao longo de uma única geração, embora o estudo mostrasse um padrão extremamente complexo em vez de simples repetições (FURITSU, et al., 2005).

A última década foi de grande importância, pois, geraram grandes avanços no conhecimento na área da genômica e estudos sobre a interação da RI com o DNA, permitindo assim um melhor entendimento sobre os mecanismos que envolvem a replicação e os erros do reparo das DSBs e SSBs, que podem supostamente estar envolvido nas alterações estruturais do genoma. Com isso, foi possível entender o paradigma nas pesquisas de mutação, onde, mutações nos genes surgem como consequências de erros na replicação ou erros de reparo no DNA, incluindo as mudanças cromossômicas estruturais (TALEEI; NIKJOO, 2013; TALEEI, et al., 2013).

Com o presente estudo foi possível validar o uso de uma metodologia de alta resolução para descrever uma assinatura de exposição mutagênica por RI. Legitimando assim, o uso de CNVs como biomarcador útil para avaliar mutação germinativa de militares expostos ocupacionalmente a RI.

Estudos de Sankaranarayanan e colaboradores (2013) observaram deleções de diferentes tamanhos que foram induzidos por radiação que surgiram como resultado das DSBs por sistemas de reparo, e avaliaram os mecanismos que podem determinar para gerá-los em células germinativas de camundongos para estimativa de risco genético. Conforme a hipótese atual, a indução das deleções de tamanhos diferentes pode estar associada com a organização da cromatina nos cromossomos e na arquitetura nuclear. No entanto, essas pesquisas sugerem uma abordagem computacional para testar a hipótese, examinando os dados empíricos sobre deleções induzidas por radiação nas células germinativas.

Hu e colaboradores (2016) analisaram 119 crianças com baixa estatura idiopática e encontraram CNVs com tamanhos variando 2 Kb a 9 Mb. Esses autores demonstraram a aplicabilidade e eficiência da técnica de CMA para a detecção de pequenas CNVs. Essa

confirmação foi validada na presente pesquisa, em que se identificou pequenas CNVs pela técnica de CMA em indivíduos ocupacionalmente expostos à RI de Césio-137.

Arlt e colaboradores (2014) usaram a metodologia de microarranjos e detectaram CNVs com tamanhos que variaram de 2,7 Kb a 34,2 Mb em fibroblastos expostos à RI. Os autores relataram que radiação ionizante na faixa de 1,5-3,0 Gy induziu significativamente mutações *de novo* em células cultivadas de fibroblasto humano e não houve diferença na distribuição do tamanho dessas variações. Neste estudo, a frequência de CNVs *de novo* aumentou com doses mais altas de radiação e as duplicações foram mais frequentes. Esses dados não corroboram com os do presente estudo, pois as deleções foram mais frequentes do que duplicações. Por outro lado, os resultados do presente estudo estão em conformidade com relato de ADEWOYE e colaboradores (2015), que analisaram os efeitos da indução de mutação por RI em linhagem germinativa de camundongos e encontraram nos descendentes, um aumento significativo de 8x na frequência de CNVs *de novo* pela exposição parental.

A variação genética surge através das mutações, com isso é importante determinar a taxa para as diferentes classes de mutação para compreender melhor a genética das doenças e compreender melhor a evolução humana. Com o avanço da tecnologia tem sido permitido avaliar os dados empíricos das taxas de mutações no genoma. Estudos tem demonstrado que 76% das mutações de novo surgem na linhagem germinativa parental e fornecem evidências claras para um aumento de mutações com a idade paterna. Ainda que a maioria das análises tenham sido focadas nas variantes de nucleotídeos único (SNVs), estudos já começaram a fornecer algumas informações de mutação para outras classes de variação, dentre elas as CNVs (CAMPBELL; EICHLER, 2013).

Foi verificado em um estudo de microssatélites com a geração F1 de indivíduos que foram expostos ocupacionalmente a radiação ionizante do césio-137 que 91% das mutações encontradas eram de origem paterna, já que apenas os pais trabalharam nas ações de socorro, segurança e reconstrução das vítimas do acidente com o césio-137. O grupo de militares que trabalhou era, na época, exclusivamente formado por homens (FLORES, 2008).

A hipótese de que a maioria das mutações ocorre em linhagem germinativa paterna, ocorre devido à diferença do maior número e a natureza contínua de divisões celulares na espermatogênese. Ovócitos surgem em um número limitado de 22 a 33 divisões celulares, enquanto os espermatozoides aumentam de forma contínua a cada 15 a 16 dias como resultados da manutenção mitótica do conjunto de espermatogônias (CROW, 2000).

Estudos verificaram que a taxa de mutação em um locus por geração para CNVs foi de  $2,5 \times 10^{-6}$ , mas não relatam quais eram os tamanhos dessas CNVs (TURNER, et al., 2008; CAMPBELL; EICHLER, 2013). Já um estudo de ITSARA e colaboradores (2010) relatou que CNVs maiores que 100 Kb teve uma taxa de mutação de  $1,2 \times 10^{-2}$  por geração em aproximadamente 400 trios, sendo compostos pelos pais e filhos. No nosso estudo verificamos uma taxa de mutação em locus por geração para CNV<sub>p</sub> foi de  $3,9 \times 10^{-5}$ , e para CNV<sub>g</sub> foi de  $6,8 \times 10^{-6}$ . Com tamanhos das CNVs  $\geq 500\text{Kb}$ .

Estudos confirmam que o aumento da idade paterna correlaciona com um aumento no número de CNVs *de novo*. Alguns dados estimaram uma ou duas mutações por ano de vida dos pais, e outros sugerem que esse incremento é exponencial de aproximadamente 3% ao ano (FLATSCHER-BADER, et al., 2011; KONG, et al., 2012; MICHAELSON, et al., 2012; JACOBINE, et al., 2013). CNVs *de novo* podem ser herdadas ou acumula-se por gerações. Um estudo sugere um viés paterno, como um efeito da idade para a formação de CNVs *de novo* em 108 pacientes com deficiência intelectual (HEHIR-KAW, et al., 2011).

Os dados do presente estudo mostraram uma relação positiva entre o número de meioses paternas à concepção e a taxa de mutação *de novo*. O número de meioses foi mostrado em função da idade do pai. Os homens geralmente contribuem com mutações de ponto e pequenas deleções e duplicações. Na medida em que aumenta a idade paterna também aumenta a frequência de mutação, e essa correlação foi observada somente no grupo controle, que se refere ao acúmulo de mutações espontâneas.

Em contraste existem pesquisas de um estudo populacional da Holanda, onde não apresentaram evidências entre o aumento da idade paterna e alterações genômicas como microdeleções ou microduplicações na prole. Neste estudo os autores indicaram que o aumento da idade paterna e as CNVs podem ser de fatores de risco independentes. Os resultados dessa pesquisa estão em contraste com outros estudos (JACOBINE, et al., 2013). Entretanto isso não exclui a possibilidade de que a idade paterna pode ter efeito na formação das CNVs, um exemplo, mecanismos moleculares específicos que podem resultar na variação genômica (LUPSKI; STANKIEWICZ, 2005).

O dado da distribuição das frequências da taxa de mutação em CNVs novas foi de 1,5x maior para a prole de indivíduos expostos a RI do que em relação ao encontrado nos controles que não tinham sido expostos a RI. Sendo assim, a indução de CNVs pode resultar em estresse e erros da replicação, tendo como resultado um atraso no ciclo celular com susceptibilidade à formação desses rearranjos, definindo como uma classe de mutação.

Nos estudos de Flores (2008) foram encontradas uma taxa de mutação germinativa de 0,02 nos descendentes de pais expostos ocupacionalmente a RI de césio-137, utilizando marcadores STR. Nesse trabalho ficou evidente que a radiação aumentou a frequência de mutações. Esses dados foram semelhantes aos resultados de da CRUZ e colaboradores (2008) onde ambos os genitores foram expostos acidentalmente à RI, segundo o autor as taxas de mutação nos loci microssatélites estavam relacionadas com a exposição a radiação. Esses dados corroboram com estudos de Costa (2011), onde foi observado um aumento de 0,003 na taxa de mutação germinativa de indivíduos expostos acidentalmente ao césio-137.

As diferenças entre a análise de marcadores STRs e o presente estudo são que as avaliações para microssatélites são mais específicas para alguns locais do genoma, pois são utilizados em geral 15 marcadores. Por outro lado, a análise da frequência de mutações germinativas em CNVs identificadas pelo uso das técnicas que envolvem microarranjos que possuem uma ampla cobertura do genoma, aumentam a chance de se observar regiões modificadas pela exposição à radiação ionizante.

Portanto, este estudo tem grande importância, pois nos permite avaliar as mutações genéticas, possibilitando o monitoramento genético e retrospectivo dos militares expostos à radiação ionizante. Os dados e informações deste estudo contribuem ainda para ampliar o conhecimento sobre danos genômicos induzidos por RI e fornecem subsídios para novas pesquisas e estudos a respeito dos efeitos mutagênicos provocados pela radiação.

## 9. CONCLUSÃO

O presente estudo investigou a indução de mutação germinativa na prole de trabalhadores ocupacionalmente expostos à radiação ionizante de césio-137 durante o acidente radiológico de Goiânia, usando a taxa de mutação em CNVs como o biomarcadores de exposição. Os resultados previamente discutidos permitem concluir que:

- Foi possível estabelecer e validar o uso de CNVs de novo como biomarcadores de exposição à RI, sensíveis o bastante para discriminar a taxa de mutação nova de origem germinativa nos filhos nascidos de progenitores expostos;
- A frequência de CNVs *de novo* apresentou-se 1,5x aumentada nos filhos dos trabalhadores expostos, quando comparada com a prole dos controles da mesma região;
- O aumento da frequência de CNVs novas na geração F1 pôde ser quantificado e este achado foi útil para discriminar casos de controles;
- A  $TM_{CNVp}$  teve maior contribuição para elucidar o efeito estocástico da exposição parental à RI. Este achado está em conformidade como esperado para a exposição do sistema celular á RI, pois deleções são mais frequentemente observadas nestas condições;
- O presente estudo foi pioneiro na aplicação de pequenas CNVs ( $\leq 500$  Kb) como biomarcadores de exposição, sendo possível devido a monitoramento genético da população goiana exposta ao Césio-137. Além de validar o uso deste marcador, o estudo também foi pioneiro na investigação de mutação germinativa em humanos expostos à RI através do CMA.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

1. ADEWOYE, A.B.; LINDSAY, S.J.; DUBROVA, Y.E.; HURLES, M.E. The genome-wide effects of ionizing radiation on mutation induction in the mammalian germline. *Nature Communications*, 6(6684):1-8, 2015.
2. AGUILERA, A.; GÓMEZ-GONZÁLEZ, B. Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nature Reviews Genetics*, 9(3):204-217, 2008.
3. ALKAN, C.; COE, B.; EICHLER, E. Genome structural variation discovery and genotyping. *Nat Rev Genet*, 12:363-376, 2011.
4. ARLT, M. F.; RAJENDRAN, S.; BIRKELAND, S. R.; WILSON, T. E.; GLOVER, T. W. De novo CNV formation in mouse embryonic stem cells occurs in the absence of Xrcc4-dependent nonhomologous end joining. *PLoS Genet*, 8(9), 2012 e.
5. ARLT, M. F.; WILSON, T.E.; GLOVER, T. W. Replication stress and mechanisms of CNV formation. *Current opinion in genetics & development*, 22(3):204-210, 2012.
6. ARLT, M.F.; RAJENDRAM, S.; BIRKELAND, S.R.; WILSON, T.E.; GLOVER, T.W. Copy number variants are produced in response to low-dose ionizing radiation in cultured cells. *Environ Mol Mutagen*, 55(2):103-13, 2014.
7. BANDAZHEVSKY, Y. I. Chronic Cs-137 incorporation in children's organs. *Swiss Med. Wkly*, 133(35-36):488-490, 2003.
8. BARBER, R.C.; DUBROVA, Y.E. The offspring of irradiated parents, are they stable? *Mutation Research*, 598:50-60, 2006.
9. BIRAL, A. R. Radiações ionizantes para médicos, físicos e leigos.1.ed., Florianópolis: Insular, p. 232, 2002.
10. BRASIL. Manual de Desastres – Desastres Humanos de natureza tecnológica – v.2, Iparte I. Ministério da Integração Nacional, Secretaria Nacional de Defesa Civil. – Brasília: Ministerios da Integração Nacional, 452 p. 2003.
11. CAMPBELL, C. D.; EICHLER, E.E. Properties and rates of germline mutations in humans. *Trends in Genetics*,29(10):575-584, 2013.
12. CASTELLANI, C. A.; MELKA, M. G.; WISHART, A. E.; LOCKE, M.E.; AWAMLEH, Z.; O'REILLY, R.L.; SINGH, S.M. Biological relevance of CNV calling methods using familial relatedness including monozygotic twins. *BMC Bioinformatics*, 15(10):3275-3286, 2014.
13. CATTANACH,B.M.;BURTENSCHAW,M.D.;RASBERRY, C.;EVANS, E.P. Large deletions and other gross forms of chromosome imbalance compatible with viability and fertility in the mouse. *Nat. Genet.*, 3:56-61, 1993.
14. CATTANACH,B.M.;EVANS, E.P.; BURTENSCHAW,M.D.;RASBERRY, C. Incidence and distribution of radiation-induced large deletions in the mouse, in: U. Hagen, H. Harder, C. Jung, C. Streffer (Eds.), *Proceedings of the 10th International Congress of Radiation Research*, Radiation Research, p. 531- 534,1996.
15. CHRISTIAN, S.L.; BRUNE, C.W.; SUDI, J.; KUMAR, R.A.; LIU, S.; KARAMOHAMED, S.; BADNER, J.A.; MATSUI, S.; CONROY, J.; MCQUAID, D.; GERGEL, J.; HATCHWELL, E.; GILLIAM, T.C.; GERSHON, E.S.; NOWAK, N.J.; DOBYNS, W.B.; COOK, E.H. JR. Novel submicroscopic chromosomal abnormalities detected in autism spectrum disorder. *Biol. Psychiatry*, 63: 1111–1117, 2008.
16. CHUNG, B.H.; TAO, V.Q.; TSO, W.W. Copy number variation and autism: new insights and clinical implications. *J Formos Med. Assoc.*, 113(7):400-8, 2014.
17. COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. O que é Césio? *Química nova*, 11(2):169-178, 1988.
18. CONNOLLY, J. J.; GLESSNER, J.T.; ALMOGUERA, B.; CROSSLIN, D.R.; JARVIK,

- G.P.; SLEIMAN, P.M.; HAKONARSON, H. Copy number variation analysis in the context of electronic medical records and large-scale genomics consortium efforts. *Frontiers in genetics*,5(51):1-8,2014.
19. CONRAD, D. F.; ANDREWS, T.D.; CARTER, N.P.; HURLES, M.E.; PRITCHARD, J.K. A high-resolution survey of deletion polymorphism in the human genome. *Nature genetics*,38(1):75-81, 2006.
  20. CONRAD, D.F.; PINTO, D.; REDON, R.; FEUK, L.; GOKCUMEN, O.; ZHANG, Y.; AERTS, J.; ANDREWS, T.D.; BARNES, C.; CAMPBELL, P.; FITZGERALD, T.; HU, M.; IHM, C.H.; KRISTIANSOON, K.; MACARTHUR, D.G.; MACDONALD, J.R.; ONYIAH, I.; PANG, A.W.C.; ROBSON, S.; STIRRUPS, K.; VALSESIA, A.; WALTER, K.; WEI, J.; TYLER-SMITH, C.; CARTER, N.P.; LEE, C.; SCHERER, S.W.; HURLES, M.E. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature*, 464:704–712, 2010.
  21. COOK E. H, Jr.; SCHERER, S. W. Copy-number variations associated with neuropsychiatric conditions. *Nature*, 455(7215):919-923, 2008.
  22. COOK, E.H. JR.; SCHERER, S.W. Copy-number variations associated with neuropsychiatric conditions. *Nature*, 455:919–923, 2008.
  23. COOPER, G. M.; NICKERSON, D. A.; EICHLER, E. E. Mutational and selective effects on copy-number variants in the human genome. *Nature genetics*, 39(7):22-29, 2007.
  24. COSTA, E.O.; DE MELO E SILVA, D.; DE MELO, A.V.; GODOY, F.R.; NUNES, H.F.; PEDROSA, E.R.; FLORES, B.C.; RODOVALHO, R.G.; DA SILVA, C.C.; DA CRUZ, A.D. The effect of low-dose exposure on germline microsatellite mutation rates in humans accidentally exposed to caesium-137 in Goiânia. *Mutagenesis*, 26(4):651-655, 2011.
  25. COSTA, E.O.A.C. Estudo Genético Retrospectivo de Mutações Germinativas em *LOCI* STR de Indivíduos Potencialmente Expostos à Radiação Ionizante. 12/06/2010. 53P. Dissertação de Mestrado – Universidade Católica de Goiás. Goiânia 12/6/2010, Mestrado em Genética, 2010.
  26. COULTER, M. E.; MILLER, D. T.; HARRIS, D. J.; HAWLEY, P.; PICKER, J.; ROBERTS, A. E.; SOBEIH, M. M.; IRONS, M. Chromosomal microarray testing influences medical management. *Genet. Med.*,13(9):770-776, 2011.
  27. CROW, J. F. The origins, patterns and implications of human spontaneous mutation. *Nat. Rev. Genet.* 1(1):40-47, 2000.
  28. CRUMP, K.S.; DUPORT, P.; JIANG, H.; SHILNIKOVA, N.S.; KREWSKI, D.; ZIENLINSKI, J.M.A. Meta-Analysis of Evidence for Hormesis in Animal Radiation Carcinogenesis, Including a Discussion of Potential Pitfalls in Statistical Analyses to Detect Hormesis. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 15(3):210-31, 2012.
  29. CRUVINEL, J.A.A.; FRANCESCANTONIO, P. L. C.; ARAÚJO, F.I.; ABREU, A.L.M.R.; MESQUITA, F.V.; ALBUQUERQUE, E.S.; SILVA, C.C.; DA CRUZ, A.D.; CRUVINEL, W.M. Avaliação de Autoanticorpos em células HEp-2 nos indivíduos expostos a o <sup>137</sup>Cs no acidente radioativo de Goiânia. *Estudos (Goiânia- online)*, 41(3):603-613, 2014.
  30. DA CRUZ, A.D. Monitoring the Genetic Health of Humans Accidentally Exposed to Ionizing Radiation of Cesium-137 in Goiânia (Brazil). 17/03/2007. 146p. Tese de Doutorado – University of Victoria. Victoria 17/03/2007.
  31. DA CRUZ, A.D.; CURRY, J.; CURADO, M.P.; GLICKMAN, B.W. Monitoring *hprt* Mutant Frequency Over Time in T-Lymphocytes of People Accidentally Exposed to High Doses of Ionizing Radiation. *En-vironmental and Molecular Mutagenesis*, 27(3):165-175, 1996.

32. DA CRUZ, A.D.; MCARTHUR, A.G.; SILVA, C.C.; CURADO, M.P.; GLICKMAN, B.W. Human micronucleus counts are correlated with age, smoking, and cesium-137 dose in the Goiânia (Brazil) radiological accident. *Mutation Research*, 313(1):57-68, 1994.
33. DA CRUZ, A.D.; SILVA, D.M.; DA SILVA, C.C.; NELSON, R.J.; RIBEIRO, L.M.; PEDROSA, E.R.; JAIME, J.C.; CURADO, M.P. Microsatellite mutations in the offspring of irradiated parents nineteen years after the Cesium-137 accident. *Mutation Research* 652(2):175-179, 2008.
34. DA CRUZ, A.D.; VOLPE, J.P.; SADDI, V.; CURRY, J.; CURADO, M.P.; GLICKMAN, B.W. Radiation risk estimation in human population: Lessons from the radiological accident in Brazil. *Mutation Research*, 373(2):207-214, 1997.
35. DA SILVA, C. C.; DA CRUZ, A. D. Meia-vida das aberrações cromossômicas instáveis em Linfócitos T, expostos acidentalmente à radiação ionizante. *Estudos*, 29(3):717-725, 2002.
36. DA SILVA, C.C. Avaliação Citogenética de Indivíduos Expostos Acidentalmente à Radiação Ionizante de Césio-137 em Goiânia (Brasil). 30/08/2000. 108p. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Goiás. Goiânia 30/08/2000, Instituto de Ciências Biológicas, 2000.
37. DUBROVA, Y. E. Germline mutation induction at mouse and human tandem repeat DNA loci. *Adv. Exp. Med. Biol.* 518:115-29, 2003.
38. DUBROVA, Y.E & PLUMB, M.A. Ionizing radiation and mutation induction at mouse minisatellite loci. The story of the two generation. *Mutation Research*, 499(2):143-150, 2002.
39. DUBROVA, Y.E. Monitoring of radiation – induced germline mutation in humans. *Swiss Medical Weekly*, 133:474 – 478, 2003.
40. DUBROVA, Y.E. Radiation-induced mutation at tandem repeat DNA loci in the mouse germline: spectra and doubling doses. *Radiation Research*, 163(2):200-207, 2005.
41. DUBROVA, Y.E.; PLOSHCHANSKAYA, O.G.; KOZIONOVA, O.S.; AKLEVEV, A.V. Minisatellite germline mutation rate in the Techa River population. *Mutation Research*, 602(1-2):74-82, 2006.
42. DUBROVA, Y.E.; PLUMB, M.; BROWN, J.; JEFFEYS, A.J. Radiation-induced germline instability at minisatellite loci. *International Journal of radiation biology*, 74(6):689-696, 1998.
43. EGAN, C.M.; SRIDHAR, S.; WIGLER, M.; HALL, I.M. Recurrent DNA copy number variation in the laboratory mouse. *Nat Genet* 39: 1384–1389, 2007.
44. FEUK, L.; CARSON, A. R.; SCHERER, S. W. Structural variation in the human genome. *Nature Reviews Genetics*, 7(2):85-97, 2006.
45. FLAKUS, F.N. Radiation in perspective: Improving comprehension of risk. *IAEA Bulletin-Quarterly Journal of the International Atomic Energy Agency*, 37(2):7-11, 1995.
46. FLORES, B.C. Monitoramento Genético Retrospectivo de população ocupacionalmente exposta à radiação ionizante utilizando marcadores moleculares. 27/06/2008. 110p. Dissertação de Mestrado – Universidade Católica de Goiás. Goiânia 27/06/2008, Mestrado em Genética, 2008.
47. FRIEDMAN, J.; ADAM, S.; ARBOUR, L.; ARMSTRONG, L.; BAROSS, A.; BIRCH, P.; BOERKOEL, C.; CHAN, S.; CHAI, D.; DELANEY, A.D.; FLIBOTTE, S.; GIBSON, W.T.; LANGLOIS, S.; LEMYRE, E.; LI, H.I.; MACLEOD, P.; MATHERS, J.; MICHAUD, J.L.; MCGILLIVRAY, B.C.; PATEL, M.S.; QIAN, H.; ROULEAU, G.A.; VAN ALLEN, M.I.; YONG, S.L.; ZAHIR, F.R.; EYDOUX, P.; MARRA, M.A. Detection of pathogenic copy number variants in children with idiopathic intellectual disability using 500 K SNP array genomic hybridization. *BMC Genomics*, 10(526):1-20,

- 2009.
48. FURITSU, K.; RYO, H.; YELISEEVA, K.G.; THUY, T.T.; KAWABATA, H.; KRUPNOVA, E.V.; TRUSOVA, V.D.; RZHEUTSKY, V.A.; NAKAJIMA, H.; KARTEL, N.; NOMURA, T. Microsatellite mutations show no increases in the children of the Chernobyl liquidators. *Mutation Research*, 581:69–82, 2005.
  49. GIJSBERS, A.C.; LEW, J.Y.; BOSCH, C.A.; SCHUURS-HOEIJMAKERS, J.H.; VAN HAERENGEN, A.; DEN HOLLANDER, N.S.; KANT, S.G.; BIJLSMA, E.K.; BREUNING, M.H.; BAKKER, E.; RUIVENKAMP, C.A. A new diagnostic workflow for patients with mental retardation and/or multiple congenital abnormalities: test arrays first. *Eur. J. Hum. Genet.*, 17(11):1394-402, 2009.
  50. GIRIRAJAN S.; CAMPBELL, C. D.; EICHLER, E. E. Human copy number variation and complex genetic disease. *Annu Rev. Genet.*, 45:203-26, 2011.
  51. GREEN, D.M.; LANGE, J.M.; PEABODY, E.M.; GRIFORIEVA, N.N.; PETERSON, S.M.; KALAPURAKAL, J.A.; BRESLOW, N.E. Pregnancy outcome after treatment for Wilms tumor: a report from the national Wilms tumor long-term follow-up study. *J Clin. Oncol.*, 28:2824-30, 2010.
  52. GRIFFIN, C.S.; THACKER, J. The role of homologous recombination repair in the formation of chromosome aberrations. *Cytogenet Genome Res*, 104(1-4):21-27, 2004.
  53. GU, W.; ZHANG, F.; LUPSKI, J.R. Mechanisms for human genomic rearrangements. *Patho. Genetics*, 1(1):1-17, 2008.
  54. HABER, J.E. Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends in Genetic.*, 16(6):259-264, 2000.
  55. HALL, E.J.; GIACCIA, A.J. *Radiobiology for the Radiologist*, 6<sup>th</sup> ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, p 546, 2006.
  56. HAN, W.; YU, K. N. Ionizing Radiation, DNA Double Strand Break and Mutation Advances in Genetics Research, 4:1-13, 2010.
  57. HASTINGS, P.J.; LUPSKI, J.R.; ROSENBERG, S.M.; IRA, G. Mechanisms of change in gene copy number. *Nat Rev Genet*, 10(8): 551–564, 2009.
  58. HU, G.; FAN, Y.; WANG, L.; YAO, R.; HUANG, X.; SHEN, Y.; YU, Y.; GU, X. Copy number variations in 119 Chinese children with idiopathic short stature identified by the custom genome-wide microarray, *Molecular Cytogenetics*, 9:16, 2016.
  59. IAFRATE, A. J.; FEUK, L.; RIVERA, M.N.; LISTEWNIAK, M.L.; DONAHOE, P.K.; QI, Y.; SCHERER, S.W.; LEE, C. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nature genetics*, 36(9):949-951, 2004.
  60. ILIAKIS, G.; WANG, H.; PERRAULT, A.R.; BOECKER, W.; ROSIDI, B.; WINDHOFER, F.; WU, W.; GUAN, J.; TERZOUDI, G.; PANTELIS, G. Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. *Cytogenet Genome Res.*, 104(14-20), 2004.
  61. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA). *The Radiological Accident in Goiânia*. IAEA: Vienna, 157 p. 1988.
  62. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA). *Cytogenetic Dosimetry: Applications In Preparedness For And Response To Radiation Emergencies*. IAEA-Vienna, 257 p. 2011.
  63. ITSARA, A.; WU, H.; SMITH, J.D.; NICKERSON, D.A.; ROMIEU, I.; LONDON, S.J.; EICHLER, E.E. De novo rates and selection of large copy number variation. *Genome Res*. 20(11):1469-8, 2010.
  64. JEFFREYS, A.J.; BOIS, P.; BUARD, J.; COLLICK, A.; DUBROVA, Y.; HOLLIES, C. R.; MAY, C. C.; MURRAY, J.; NEIL, D. L.; NEUMANN, R.; STEAD, J. D.; TAMAKI, K.; YARDLEY, J. Spontaneous and induced minisatellite instability in the human

- genome, *Electrophoresis*, 93(5):383-90, 1997.
65. JEFFREYS, A.J.; BOIS, P.; BUARD, J.; COLLICK, A.; DUBROVA, Y.; HOLLIES, C. R.; MAY, C. C.; MURRAY, J.; NEIL, D. L.; NEUMANN, R.; STEAD, J. D.; TAMAKI, K.; YARDLEY, J. Spontaneous and induced minisatellite instability, *Electrophoresis*, 18(9):1501-11, 1997.
  66. KIROV, G.; GROZEVA, D.; NORTON, N.; IVANOV, D.; MANTRIPRAGADA, K.K.; HOLMANS, P.; CRADDOCK, N.; OWEN, M.J.; O'DONOVAN, M.C. Support for the involvement of large copy number variants in the pathogenesis of schizophrenia. *Hum. Mol. Genet.*, 18:1497-1503, 2009.
  67. KODAIRA, M.; SATOH, C.; HIYAMA, K.; TOYAMA, K. 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.
  68. KONG, S. W.; SHIMIZU-MOTOHASHI, Y.; CAMPBELL, M. G.; LEE, I. H.; COLLINS, C. D.; BREWSTER, S. J.; HOLM, I. A.; RAPPAPORT, L.; KOHANE, I. S.; KUNKEL, L. M. Peripheral blood gene expression signature differentiates children with autism from unaffected siblings. *Neurogenetics*, 14(2):143–152, 2013.
  69. KOOLEN, D.A.; PFUNDT, R.; DE LEEUW, N.; HEHIR-KWA, J.Y.; NILLESEN, W.M.; NEEFS, I.; SCHELTINGA, I.; SISTERMANS, E.; SMEETS, D.; BRUNNER, H.G.; VAN KESSEL, A.G.; VELTMAN, J.A.; DE VRIES, B.B. Genomic microarrays in mental retardation: a practical workflow for diagnostic applications. *Hum Mutat.*, 30(3):283-92, 2009.
  70. KOSCHEYEV, V.S. Psychological status of Chernobyl nuclear power plant operators after the nuclear disaster. *Journal of Traumatic Stress*, 6: 68-561, 1993.
  71. KRISTON, T.B.; GEORGIEV, A.B.; PISSIS, P.; GEORGAKILAS, A.G. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research*, 711:193-201, 2011.
  72. KURAHASHI, H.; SHAIKH, T.H.; ZACKAI, E.H.; CELLE, L.; DRISCOLL, D.A.; BUDARF, M.L.; EMANUEL, B.S. Tightly Clustered 11q23 and 22q11 Breakpoints Permit PCR-Based Detection of the Recurrent Constitutional t(11;22). *Hum. Genet.*, 67(3): 763–768, 2000.
  73. LEE, C.; IAFRATE, A. J.; BROTHMAN, A. R. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nat Genet.*, 39(7):48-54, 2007.
  74. LEE, C.; SCHERER, S.W. The clinical context of copy number variation in the human genome. *Expert reviews in molecular medicine*, 12(8), 2010.
  75. LEE, J. A.; CARVALHO, C. M. B.; LUPSKI, J. R. A DNA Replication Mechanism for Generating Nonrecurrent Rearrangements Associated with Genomic Disorders. *Cell.*, 131(7):1235–1247, 2007.
  76. LEITÃO, A. C.; GOMES, R. A. *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, 152, 1994.
  77. LI, Y. C.; KOROL, A. B.; BEILES, A.; NEVO, E. Microsatellite: genomic distribution putative functions and mutational mechanism: a review. *Molecular Ecology*, 11(12):2453-65, 2002.
  78. LINDBLOM, A.; ROBINSON, P. N. Bioinformatics for Human Genetics: Promises and Challenges. *Human Mutation*, 32(5):495-500, 2011.
  79. LU, X. Y.; PHUNG, M. T.; SHAW, C. A.; PHAM, K.; NEIL, S. E.; PATEL, A.; SAHOO, T.; BACINO, C. A.; STANKIEWICZ, P.; KANG, S. H.; LALANI, S.; CHINAULT, A. C.; LUPSKI, J. R.; CHEUNG, S. W.; BEAUDET, A. L. Genomic imbalances in neonates with birth defects: high detection rates by using chromosomal microarray analysis. *Pediatrics*, 122(6):1310-1318, 2008.

80. LUO, Y.; HERMETZ, K.E.; JACKSON, J.M.; MULLE, J.G.; DODD, A.; TSUCHIYA, K.D.; BALLIF, B.C.; SHAFFER, L.G.; CODY, J.D.; LEDBETTER, D.H.; MARTIN, C.L.; RUDD, M.K. Diverse mutational mechanisms cause pathogenic subtelomeric rearrangements. *Hum. Mol. Genet.*, 20: 3769–3778, 2011.
81. LUPSKI, J.R. Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet*, 14(10):471-422, 1998.
82. LUPSKI, J.R. Genomic rearrangements and sporadic disease. *Nat Genet*, 39:43–47, 2007.
83. LUPSKI, J.R.; STANKIEWICZ, P. Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS Genet*, 1(6):627-633, 2005.
84. MARSHALL, C.R.; NOOR, A.; VINCENT, J.B.; LIONEL, A.C.; FEUK, L.; SKAUG, J.; SHAGO, M.; MOESSNER, R.; PINTO, D.; REN, Y.; THIRUVAHINDRAPDURAM, B.; FIEBIG, A.; SCHREIBER, S.; FRIEDMAN, J.; KETELAARS, C.E.; VOS, Y.J.; FICICIOGLU, C.; KIRKPATRICK, S.; NICOLSON, R.; SLOMAN, L.; SUMMERS, A.; GIBBONS, C.A.; TEEBI, A.; CHITAYAT, D.; WEKSBERG, R.; THOMPSON, A.; VARDY, C.; CROSBIE, V.; LUSCOMBE, S.; BAATJES, R.; ZWAIGENBAUM, L.; ROBERTS, W.; FERNANDEZ, B.; SZATMARI, P.; SCHERER, S.W. Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *Am J. Hum. Genet.*, 82: 477–488, 2008.
85. MCCARROLL, S.A.; KURUVILLA, F.G.; KORN, J.M.; CAWLEY, S.; NEMESH, J.; WYSOKER, A.; SHAPERO, M.H.; BAKKER, P.I.W.; MALLER, J.; KIRVY, A.; ELLIOTT, A.L.; PARKIN, M.; HUBBELL, E.; WEBSTER, T.; MEI, R.; HANDSAKER, R.; LINCOLN, S.; NIZZARI, M.; BLUME, J.; JONES, K.; RAVA, R.; DALY, M.J.; GABRIEL, S.B.; ALTSHULER, D. Integrated detection and population-genetic analysis of SNPs and copy number variation. *Nature genetics*, 40(10):1166-1174, 2008.
86. MCMULLAN, D.J.; BONIN, M.; HEHIR-KWA, J.Y.; DE VRIES, B.B.; DUFKE, A.; RATTENBERRY, E.; STEEHOUWER, M.; MORUZ, L.; PFUNDT, R.; DE LEEUW, N.; RIESS, A.; ALTUG-TEBER, O.; ENDERS, H.; SINGER, S.; GRASSHOFF, U.; WALTER, M.; WALKER, J.M.; LAMB, C.V.; DAVISON, E.V.; BRUETON, L.; RIESS, O.; VELTMAN, J.A. Molecular karyotyping of patients with unexplained mental retardation by SNP arrays: a multicenter study. *Hum. Mutat.*, 30(7):1082-1092, 2009.
87. MERIKANGAS, A.K.; CORVIN, A.P.; GALLAGHER, L. Copy-number variants in neuro developmental disorders: promises and challenges. *Trends Genet.*, 25(12):536-44, 2009.
88. MILLER, D.T.; ADAM, M.P.; ARADHYA, S.; BIESECKER, L.G.; BROTHMAN, A.R.; CARTER, N.P.; CHURCH, D.M.; CROLLA, J.A.; EICHLER, E.E.; EPSTEIN, C.J.; FAUCETT, W.A.; FEUK, L.; FRIEDMAN, J.M.; HAMOSH, A.; JACKSON, L.; KAMINSKY, E.B.; KOK, K.; KRANTZ, I.D.; KUHN, R.M.; LEE, C.; OSTELL, J.M.; ROSENBERG, C.; SCHERER, S.W.; SPINNER, N.B.; STAVROPOULOS, D.J.; TEPPERBERG, J.H.; THORLAND, E.C.; VERMEESCH, J.R.; WAGGONER, D.J.; WATSON, M.S.; MARTIN, C.L.; LEDBETTER, D.H. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J. Hum. Genet.*, 86(5):749-64, 2010.
89. MILLS, R.E.; WALTER, K.; STEWART, C.; HANDSAKER, R.E.; CHEN, K.; ALKAN, C.; ABYZOV, A.; YOON, S.C.; YE, K.; CHEETHAM, R.K.; CHINWALLA, A.; CONRAD, D.F.; FU, Y.; GRUBERT, F.; HAJIRASOULIHA, I.; HORMOZDIARI, F.; IAKOUCHEVA, L.M.; IQBAL, Z.; KANG, S.; KIDD, J.M.; KONKEL,

- M.K.; KORN, J.; KHURANA, E.; KURAL, D.; LAM, H.Y.; LENG, J.; LI, R.; LI, Y.; LIN, C.Y.; LUO, R.; MU, X.J.; NEMESH, J.; PECKHAM, H.E.; RAUSCH, T.; SCALLY, A.; SHI, X.; STROMBERG, M.P.; STÜTZ, A.M.; URBAN, A.E.; WALKER, J.A.; WU, J.; ZHANG, Y.; ZHANG, Z.D.; BATZER, M.A.; DING, L.; MARTH, G.T.; MCVEAN, G.; SEBAT, J.; SNYDER, M.; WANG, J.; YE, K.; EICHLER, E.E.; GERSTEIN, M.B.; HURLES, M.E.; LEE, C.; MCCARROLL, S.A.; KORBEL, J.O. Mapping copy number variation by population-scale genome sequencing. *Nature*, 470: 59–65, 2011.
90. MIRANDA, F.J.; O acidente radioativo em Goiânia: “O tempo cura todos os males?” *Arquivos Brasileiros de Psicologia*, 57, 2005.
  91. MOENS, P.B. The double-stranded DNA helix in recombination at meiosis. *Genome*, 46(6):936-937, 2003.
  92. MOSSE, I. B. Genetic effects of ionizing radiation – some questions with no answers. *Journal Environmental Radioactivity*, 112:70-75, 2012.
  93. MOUSTACCHI, E. DNA damage and repair: consequences on dose-responses. *Mutation Res.*, 464(1):35-40, 2000.
  94. NAKAMURA, N. Genetic effects of radiation in atomic-bomb survivors and their children: Past, present and future. *J.Radiat. Res.*, 47:B67-73, 2006.
  95. NIKFOROV, Y.; NIKFOROV, M.; FAGIN, J.A. Prevalence of minisatellite and microsatellite instability in radiation-induced post-Chernobyl pediatric thyroid carcinomas. *Oncogene*, 17:, 1998.
  96. NISHIYAMA, T.; TAKAHASHI, K.; TANGO, T.; PINTO, D.; SCHERER, S.W.; TAKAMI, S.; KISHINO, H. A scan statistic to extract causal gene cluster from case-control genome-wide rare CNV data. *BMC Bioinformatics*, 205(12), 2011.
  97. OKUNO, E. Efeitos biológicos das radiações ionizantes. *Acidente radiológico de Goiânia. Estudos Avançados*, 27(77), 2013.
  98. OKUNO, E. *Radiação: Efeitos, Riscos e Benefícios*. Editora Herba LTDA, 96, 1998.
  99. OLDRIDGE, D. A.; BANERJEE, S.; SETLUR, S. R.; SBONER, A.; DEMICHELIS, F. Optimizing copy number variation analysis using genome-wide short sequence oligonucleotide arrays. *Nucleic Acids Res*, 38(10):3275-86, 2010.
  100. PERNOT E.; HALL, J.; BAATOUT, S.; BENOTMANE, M.M.; BLANCHARDON, E.; BOUFLER, S.; EL SAGHIRE, H.; GOMOLKA, M.; GUERTLER, A.; HARMS-RINGDAHL, M.; JEGGO, P.; KREUZER, M.; LAURIER, D.; LINDHOLM, C.; MKACHER, R.; QUINTENS, R.; ROTHKAMM, K.; SABATIER, L.; TAPIO, S.; DE VATHAIRE, F.; CARDIS, E. Ionizing radiation biomarkers for potential use in epidemiological studies. *Mutation Research*, 751(2): 258-286, 2012.
  101. PETKAU, A. Role of superoxide dismutase in modification of radiation injury. *Br. J. Cancer*, 8:87-95, 1987.
  102. PINO, E. S.; GIOVEDI, C. Radiação ionizante e suas aplicações na indústria. *Revista Unilus Ensino e Pesquisa*, 2(2), 2005.
  103. PINTO, D.; MARSHALL, C.; FEUK, L.; SCHERER, S.W. Copy-number variation in control population cohorts. *Human molecular genetics*, 16(2):168-173, 2007.
  104. PINTO, I.P. A importância dos resultados do CMA no aconselhamento genético das famílias com probandos apresentando deficiência intelectual. 10/02/2015. 64 p. Dissertação de Mestrado – Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Goiânia 10/02//2015, Mestrado em Genética, 2015.
  105. PRESTON, D.L.; RON, E.; TOKUOKA, S.; FUNAMOTO, S.; NISHI, N.; SODA, M.; MABUCHI, K.; KODAMA, K. Solid cancer incidence in atomic bomb survivors: 1958-1998. *Radiat. Res.*, 168: 1-64, 2007.
  106. RAMALHO, A.; NASCIMENTO, A. C. H.; NATARAJAN, A. T. Dose assessments by

- cytogenetic analysis in the Goiânia (Brazil) radiation accident. *Radiat Protect Dosimetry*,25(2): 97-100, 1988.
107. REDON, R.; ISHIKAWA, S.; FITCH, K.R.; FEUK, L.; PERRY, G.H.; ANDREWS, T.D.; FIEGLER, H.; SHAPERO, M. H.; CARSON, A. R.; CHEN, W.; CHO, E.K.; DALLAIRE, S.; FREEMAN, J.L.; GONZÁLEZ, J.R.; GRATACÒS, M.; HUANG, J.; KALAITZOPOULOS, D.; KOMURA, D.; MACDONALD, J.R.; MARSHALL, C.R.; MEI, R.; MONTGOMERY, L.; NISHIMURA, K.; OKAMUJRA, K.; SHEN, F.; SOMERVILLE, M.J.; TCHINDA, J.; VALSESIA, A.; WOODWARK, C.; YANG, F.; ZHANG, J.; ZERJAL, T.; ZHANG, J.; ARMENGOL, L.; CONRAD, D.; ESTIVILL, X.; TYLER-SHITH, C.; CARTER, N.P.; ABURATANI, H.; LEE, C.; JONES, K.W.; SCHERER, S.W.; HURLES, M.E. Global variation in copy number in the human genome. *Nature*, 444: 444-454, 2006.
  108. RIBEIRO, L.R.; MARQUES, E.K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. Ulbra, 2003.
  109. RINCHIK, E.M.; RUSSELL, L.B. Germ-line deletion mutations in the mouse: tools for intensive functional and physical mapping of the mammalian genome, in: K.E. Davies, K. Tilghman (Eds.), *Genome Analysis, Genetic and Physical Mapping*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2:121-158, 1990.
  110. RUSSELL, L. B.; RUSSELL, W. L. Factors affecting the nature of induced mutations. *Biology of Mammalian Germ Cell Mutagenesis*, p. 271-289, 1990.
  111. SALVADORI, D.M.F. *Mutagenese Ambiental*. Ed.; ULBRA, p. 355, 2003.
  112. SANKARANARAYANAN, K. Ionizing radiation and genetic risks. II. Nature of radiation-induced mutations in experimental mammalian in vivo systems, *Mutat. Res.*, 258(1):51-73, 1991.
  113. SANKARANARAYANAN, K. Ionizing radiation and genetic risks. X. The potential disease phenotypes of radiation-induced genetic damage in humans: perspectives from human molecular biology and radiation genetics, *Mutat. Res.*, 429(1):45-83, 1999.
  114. SANKARANARAYANAN, K.; TALEEI, R.; RAHMANIAN, S.; NIKJOO, H. Ionizing radiation and genetic risks. XVII. Formation mechanisms underlying naturally occurring DNA deletions in the human genome and their potential relevance for bridging the gap between induced DNA double-strand and deletions in irradiated germ cells. *Mutations Research*, 753(2):114-130, 2013.
  115. SANKARANARAYANAN, K.; TALEEI, R.; RAHMANIAN, S.; NKJOO, H. Ionizing radiation and genetic risks. XVII. Formation mechanisms underlying naturally occurring DNA deletions in the human genome and their potential relevance for bridging the gap between induced DNA double-strand and deletions in irradiated germ cells. *Mutations Research*, v. 753, n. 2, p. 114-130, Jul, 2013.
  116. SANKARANARAYANAN, K.; WASSOM, J.S. Ionizing radiation and genetic risks XIV. Potential research directions in the post-genome era based on knowledge of repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in mammalian somatic cells and the origin of deletions associated with human genomic disorders. *Mutat. Res.*, 578(1-2):333-370, 2005.
  117. SCOTT, B.R. Evaluating Residual Risks for Lethality from Deterministic Effects After Application of Medical Countermeasures Against Damage from Inhaled Radioactivity Dispersal Device Released Gamma-Emitting Radionuclides. *Radiation Protection Management*, 22(3):07-26, 2005.
  118. SEARLE, A. G. Mutation induction in mice. *Adv. Radiat. Biol.*, 4:131-207, 1974.
  119. SEBAT, J.; LAKSHMI, B.; MALHOTRA, D.; TROGE, J.; LESE-MARTIN, C.; WALSH, T.; YAMROM, B.; YOON, S.; KRASNITZ, A.; KENDALL, J.; LEOTTA, A.; PAI, D.; ZHANG, R.; LEE, Y.H.; HICKS, J.; SPENCE, S.J.; LEE, A.T.; PUURA,

- K.; LEHTIMÄKI, T.; LEDBETTER, D.; GREGERSEN, P.K.; BREGMAN, J.; SUTCLIFFE, J.S.; JOBANPUTRA, V.; CHUNG, W.; WARBURTON, D.; KING, M.C.; SKUSE, D.; GESCHWIND, D.H.; GILLIAM, T.C.; YE, K.; WIGLER, M. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science*, 316: 445–449, 2007.
120. SEBAT, J.; LAKSHMI, B.; TROGE, J.; ALEXANDER, J.; YOUNG, J.; LAKSHMI, B.; TROGE, J.; ALEXANDER, J.; YOUNG, J.; LUNDIN, P.; MÅNER, S.; MASSA, H.; WALKER, M.; CHI, M.; NAVIN, N.; LUCITO, R.; HEALY, J.; HICKS, J.; YE, K.; REINER, A.; GILLIAM, T.C.; TRASK, B.; PATTERSON, N.; ZETTERBERG, A.; WIGLER, M. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science*, 305: 525–528, 2004.
121. SEGAL, S. L. *Genética e Câncer de Mama*. HPCA, 21, 2001.
122. SHAFER, L.G.; LUPSKI, J.R. Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annu Rev. Genet.*, 34:297-329, 2000.
123. SHARMA, K. K. K.; TYAGI, R.; PURKAYASTHA, S.; BERNHARD, W. One-Electron Oxidation of DNA by Ionizing Radiation: Competition between Base-to-Base Hole-Transfer and Hole-Trapping. *J. Phys. Chem.*, 114(22):7672-7680, 2010.
124. SHARP, A.J.; LOCKE, D.P.; MCGRATH, S.D.; CHENG, Z.; BAILEY, J.A.; VALLENTE, R.U.; PERTZ, L.M.; CLARK, R.A.; SCHWARTZ, S.; SEGRAVES, R.; OSEROFF, V.V.; ALBERTSON, D.G.; PINKEL, D.; EICHLER, E.E. Segmental duplications and copy-number variation in the human genome. *American Journal of Human Genetics*, 77: 78–88, 2005.
125. SHAW, C.J.; LUPSKI, J.R. Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. *Hum Mol Genet*, 13(1):57-64, 2004.
126. SHEN, Y.; DIES, K. A.; HOLM, I. A.; BRIDGEMOHAN, C.; SOBEIH, M.M.; CARONNA, E.B.; MILLER, K.J.; FRAZIER, J.A.; SILVERSTEIN, I.; PICKER, J.; WEISSMAN, L.; RAFFALLI, P.; JESTE, S.; DEMMER, L.A.; PETERS, H.K.; BREWSTER, S.J.; KOWALCZYK, S.J.; ROSEN-SHEIDLEY, B.; MCGOWAN, C.; DUDA, A.W. 3RD.; LINCOLN, S.A.; LOWE, K.R.; SCHONWALD, A.; ROBBINS, M.; HISAMA, F.; WOLFF, R.; BECKER, R.; NASIR, R.; URION, D.K.; MILUNSKY, J.M.; RAPPAPORT, L.; GUSELLA, J.F.; WALSH, C.A.; WU, B.L.; MILLER, D.T. Clinical genetic testing for patients with autism spectrum disorders. *Pediatrics*, 125(4):727-735, 2010.
127. SHIMIZU, Y.; KODAMA, K.; NISHI, N.; KASAGI, F.; SUYAMA, A.; SODA, M.; Radiation exposure and circulatory disease risk: Hiroshima and Nagasaki atomic bomb survivor data, 1950-2003. *Br Med J*, 340:b5349. Doi:10.1136/bmj.b5349, 2010.
128. SHINAWI, M.; CHEUNG, S.W. The array CGH and its clinical applications. *Drug Discov Today*, 13(17-18):760-70, 2008.
129. SILVERSIDES, C. K.; SILVERSIDES, C.K.; LIONEL, A.C.; COSTAIN, G.; MERICO, D.; MIGITA, O.; LIU, B.; YUEN, T.; RICKABY, J.; THIRUVAHINDRAPURAM, B.; MARSHALL, C.R.; SCHERER, S.W.; BASSETT, A.S. Rare copy number variations in adults with tetralogy of Fallot implicate novel risk gene pathways. *PLoSGenet*, 8(8):1-14, 2012.
130. SPITZ, D.R.; AZZAM, E.I.; LI, J.J.; GIUS, D. Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: a unifying concept in stress response biology. *Cancer Metastasis Rev.*, 23:311-322, 2004.
131. STANKIEWICZ, P.; BEAUDET, A.L. Use of array CGH in the evaluation of dysmorphology, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation. *Curr Opin Genet Dev*, 17: 182–192, 2007.
132. STANKIEWICZ, P.; LUPSKI, J.R. Genome architecture, rearrangements and genomic

- disorders. *Trends in genetics*, 18(2):74-82, 2002.
133. STANKIEWICZ, P.; LUPSKI, J.R. Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annu. Rev. Med.*, 61:437-55, 2010.
  134. SUTHERLAND, B. M.; BENNETT, P.V.; SIDORKINA, O.; LAVAL, J. Clustered DNA damages induced in isolated DNA and in human cells by low doses of ionizing radiation. *PNAS*, 97(1):103-108, 2000.
  135. SUZUKI, M.; AUTSAVAPROMPOM, N.; USAMI, N.; FUNAVAMA, T.; PLANTE, I.; YOKOTA, I.; SUZUKI, M.; IKEDA, H.; HATTORI, Y.; KOBAYASHI, K.; KOBAYASHI, Y.; MURAKAMI, T. Radiation-quality Dependent Cellular Response in Mutation Induction in Normal Cells. *J. Radiat. Res.*, 50(5):395-399, 2009.
  136. TALEEI, R.; NIKJOO, H. The non-homologous end-joining (NHEJ) pathway for the repair of DNA double-strand breaks. I. A mathematical model. *Radiat. Res.*, 179(5):530-539, 2013.
  137. TAM, G.W.; REDON, R.; CARTER, N.P.; GRANT, S.G. The role of DNA copy number variation in schizophrenia. *Biol. Psychiatry*, 66: 1005–1012, 2009.
  138. TAMMINGA, J.; KOVALCHUK, O. Role of DNA damage and epigenetic DNA methylation changes in radiation-induced genomic instability and bystander effects in germline in vivo. *Current Mol. Pharmacol*, 4:115-125, 2011.
  139. THACKER, J. Radiation-induced mutation in mammalian cells. *Adv. Radiat. Biol.*, 16:77-124, 1992.
  140. TOYOKUNI, H.; MARUO, A.; SUZUKI, K.; WATANABE, M. The Contribution of Radiation-Induced Large Deletion of the Genome to Chromosomal Instability. *Radiation Research*, 171(2):198-203, 2009.
  141. TURNER, D.J.; MIRETTI, M.; RAJAN, D.; FIEGLER, H.; CARTER, N.P.; BLAYNEY, M.L.; BECK, S.; HURLES, M.E. Germline rates of de novo meiotic deletions and duplications causing several genomic disorders. *Nat. Genet.*, 40(1):90-95, 2008.
  142. TURNER, D.J.; MIRETTI, M.; RAJAN, D.; FIEGLER, H.; CARTER, N.P.; BLAYNEY, M.L.; BECK, S.; HURLES, M.E. Germline rates of de novo meiotic deletions and duplications causing several genomic disorders. *Nat Genet*, 40(1):90–95, 2008.
  143. VERDIN, H.; D'HAENE, B.; BEYSEN, D.; NOVIKOVA, Y.; MENTEN, B.; SANTE, T.; LAPUNZINA, P.; NEVADO, J.; CARVALHO, C.M.B.; LUPSKI, J.R.; BAERE, E. Microhomology-mediated mechanisms underlie non-recurrent disease-causing microdeletions of the FOXL2 gene or its regulatory domain. *PLoS genetics*, 9(3):1-12, 2013.
  144. VIEIRA, S. A. Césio-137, um drama recontado. *Estudos avançados*, 27(77):217-233, 2013.
  145. WALTSON, J. D.; MYERSW, R. M., CAUDY, A. A.; WITKOWSK, J. A. *Recombination DNA: Genes and Genomes- A short Course. Third Edition*, 2007.
  146. WASCHECK, C.C. (Org.). *A História do Acidente Radioativo de Goiânia. 2007.* Disponível em: [http://www.sgc.goias.gov.br/upload/links/arq\\_254\\_historiadooacident.pdf](http://www.sgc.goias.gov.br/upload/links/arq_254_historiadooacident.pdf). Acessado em 16/02/2016. Secretária de Estado e Saúde/ Superintendência Leide Das Neves Ferreira.
  147. WESTMAN, J. A. *Genética Médica*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2006.
  148. WINTHER, J.F.; BOICE, Jr. J.D.; FREDERIKSEN, K.; BAUTZ, A.; MULVIHILL, J.J.; STOVALL, M.; OLSEN, J.H. Radiotherapy for childhood cancer and risk for congenital malformation in offspring: a population-based cohort study. *Clin Genet.*, 75:56-6, 2009.
  149. WOLFF, S. Radiation genetics. *Annu. Rev. Genet.*, 1:221–24, 1967.
  150. WONG, K. K.; LEEUW, R.J.; DOSANJH, N.S.; KIMM, L.R.; CHENG, Z.; HORSMAN, D.E.; MACAULAY, H.C.; NG, R.T.; BROWN, C.J.; EICHLER, E.E.; LAM, W.L. Comprehensive analysis of common copy-number variations in the human genome.

- American journal of human genetics, 80(1):91-104, 2007.
151. WU, J.; MORIMYO, M.; HONGO, E.; HIGASHI, T.; OKAMOTO, M.; KAWANO, A.; OHMACHI, Y. Radiation-induced germline mutations detected by a direct comparison of parents and first-generation offspring DNA sequences containing SNPs. *Mutation Research*, 596(1-2):1-11, 2006.
  152. XAVIER, A.N; MORO, J.T; HEILBRON, P.F. Princípios básicos de segurança e proteção radiológica. Terceira Edição. Rio Grande do Sul, p 245 2006.
  153. XU, Y.; PENG, B.; FU, Y.; AMOS, C.I. Genome-wide algorithm for detecting CNV associations with disease. *BMC Bioinformatics*, 12(331):1-10, 2011.
  154. ZARREI, M.; MACDONALD, J.R.; MERICO, D.; SCHERER, S.W.A. copy number variation map of the human genome. *Nature Reviews Genetics*, 16(3):172-183, 2015.
  155. ZHANG, F.; GU, W.; HURLES, M.E.; LUPSKI, J.R. Copy number variation in human health, disease, and evolution. *Annu Rev. Genomics Hum Genet*, 10:451-481, 2009.

## 11. ANEXOS

### ANEXO I



**GOVERNO DO ESTADO DE GOIÁS**  
**Gabinete Civil da Governadoria**  
**Superintendência de Legislação.**

LEI Nº 14.226, DE 8 DE JULHO DE 2002.

- [Vide Lei nº 16.507, de 24-03-2009.](#)
- [Vide Lei nº 18.080, de 16-07-2013.](#)

Reajusta os valores das pensões especiais que especifica, dispõe sobre a concessão de pensões especiais às pessoas irradiadas ou contaminadas que trabalharam na descontaminação da área acidentada com o Césio 137, na vigilância do Depósito Provisório em Abadia de Goiás e no atendimento de saúde às vítimas diretas do acidente e dá outras providências.

A ASSEMBLÉIA LEGISLATIVA DO ESTADO DE GOIÁS decreta e eu sanciono a seguinte lei:

Art. 1º. As pensões especiais concedidas pela Lei n. 10.977, de 03 de outubro de 1989, alterada pela Lei n. 13.346, de 24 de setembro de 1998, passam a ser devidas nos seguintes valores:

I - R\$ 1.448,00 (mil, quatrocentos e quarenta e oito reais) ~~R\$ 1.356,00 (mil e trezentos e cinquenta e seis reais) R\$ 1.244,00 (mil e duzentos e quarenta e quatro reais) R\$ 800,00 (oitocentos reais)~~, para os radiolesionados pelo contato direto com a substância radioativa Césio 137 e para os que receberam irradiação superior a 100 RAD, relacionados no Anexo I desta Lei;

- Valor reajustado pela Lei nº	18.497,	de	09-06-2014,	art.	1º.
- Vide Lei nº	18.080,	de	16-07-2013.		

- Vide Lei nº 17.604, de 27-4-2012.

II - R\$ 724,00 (setecentos e vinte e quatro reais) ~~R\$ 678,00 (seiscentos e setenta e oito reais) R\$ 622,00 (seiscentos e vinte e dois reais) R\$ 465,00 (quatrocentos e sessenta e cinco reais) R\$ 400,00 (quatrocentos reais)~~, para os demais beneficiários.

- Valor reajustado pela Lei nº	18.497,	de	09-06-2014,	art.	1º.
- Vide Lei nº	18.080,	de	16-07-2013.		

- Vide Leis nºs 17.604, de 27-4-2012 e 16.507, de 24-03-2009.

Art. 2º. Fica concedida, a partir da vigência desta lei, pensão especial vitalícia, no valor mensal de R\$ 400,00 (quatrocentos reais), para até cento e vinte pessoas a serem definidas pela Agência Goiana de Administração e Negócios Públicos - AGANP, com intervenção obrigatória da Secretaria da Saúde, através da Superintendência Leide das Neves Ferreira - SULEIDE, dentre aquelas relacionadas no Anexo II desta Lei, após cadastramento e avaliação minuciosa.

- Vide Decreto Administrativo de 27-02-2015, processo nº 201300005005725, D.O. de 04-03-2015, pág. 5.
- Vide Decreto Administrativo de 27-02-2015, processo nº 201400005004342, D.O. de 04-03-2015, pág. 5.
- Vide Decreto Administrativo de 27-02-2015, processo nº 201300005014328, D.O. de 04-03-2015, pág. 5.
- Vide Decreto Administrativo de 07 de outubro de 2014, D.O. de 09-10-2014.

- Vide Decreto Administrativo de 08 de maio de 2013, D.O. de 08-05-2013, pág. 3.
- Vide Decreto Administrativo de 07 de abril de 2009, D.O. de 16-04-2009.
- Vide Decreto Administrativo de 25 de abril de 2008, D.O. de 30-04-2008.
- Vide Decreto Administrativo de 23 de setembro de 2003, D.O. de 26-09-2003, pág. 2.
- Vide Decreto Administrativo de 03 de dezembro de 2002, D.O. de 06-12-2002, pág. 3.

§ 1º. A pensão a que se refere o caput é devida aos servidores públicos e aos agentes requisitados da administração indireta, irradiados ou contaminados no trabalho da descontaminação da área acidentada com a substância radioativa Césio 137, ocorrida no ano de 1.987, na vigilância do Depósito Provisório em Abadia de Goiás e no atendimento de saúde prestado às vítimas diretas do acidente radiológico, especialmente aqueles relacionados no Anexo II, dos seguintes órgãos:

- I - Consórcio Rodoviário Intermunicipal S.A.-CRISA, em liquidação;
- II - Polícia Militar do Estado de Goiás;
- III - Corpo de Bombeiros Militar;
- IV - Companhia de Urbanização de Goiânia - COMURG.

§ 2º. Respeitado o limite previsto no caput deste artigo, também farão jus à pensão mencionada:

I - os descendentes, até a Segunda geração, de pessoas irradiadas e/ou contaminadas no desempenho da atividade laboral, nascidos após o acidente radiológico, desde que portadores de moléstia considerada grave ou crônica;

II - Os descendentes até a segunda geração, nascidos após o acidente de 1987, das vítimas falecidas e ainda não reconhecidas pelo Estado de Goiás como irradiadas ou contaminadas, portadores de moléstia grave ou crônica, desde que comprovem, através de regular procedimento administrativo junto à AGANP, com intervenção obrigatória da SULEIDE, o efetivo trabalho do ascendente na descontaminação da área acidentada com o Césio 137, na vigilância do Depósito Provisório em Abadia de Goiás e no atendimento de saúde prestado às vítimas diretas.

Art. 3º. Para a definição dos beneficiários de que trata o art. 2º, serão observados os seguintes critérios, em ordem sucessiva:

I - servidores e agentes requisitados junto à administração indireta, portadores de moléstia:

- a) grave;
- b) crônica;

- Vide Decreto Administrativo de 07 de abril de 2009, D.O. de 16-04-2009.
- Vide Decreto Administrativo de 25 de abril de 2008, D.O. de 30-04-2008.

II - para os demais servidores e agentes requisitados junto à administração, que não manifestaram doença grave ou crônica, no tempo médio de latência de quinze anos após o acidente (Nota Técnica n. 15, de 15 de dezembro de 2001, elaborada pelo Ministério da Saúde/FUNASA):

- a) mais idoso;
- b) maior número de dependentes;
- c) maior tempo de serviço estadual;
- d) maior tempo de serviço público.

Art. 4º. Fica garantida a concessão da pensão especial prevista no art. 2º aos elencados no Anexo II desta Lei, não incluídos dentre o número de beneficiários ali definido, desde que apresentem, a qualquer tempo, manifestação de moléstia diagnosticada como grave ou crônica, comprovada através de procedimento administrativo junto à AGANP, com acompanhamento da SULEIDE.

- Vide Decreto Administrativo de 07 de abril de 2009, D.O. de 16-04-2009.  
- Vide Decreto Administrativo de 25 de abril de 2008, D.O. de 30-04-2008.

Art. 5º. A Secretaria da Saúde, por meio da SULEIDE, deverá prestar assistência médica integral aos radioacidentados, até que a União, através do Ministério da Saúde, assumo o seu custeio integral.

- Vide Lei nº 14.488, de 24-07-2003, art. 3º.

Parágrafo único. Caberá à Procuradoria-Geral do Estado a adoção das medidas administrativas e judiciais visando ao cumprimento do disposto neste artigo, desonerando o erário estadual do financiamento respectivo, além de buscar a implementação, pela União, de estrutura adequada ao atendimento, compreendendo:

I - implantação de centro de estudos epidemiológicos sobre os efeitos tardios da exposição à radiação ionizante pelo Césio 137 nas vítimas diretas, bem como na população de Goiânia;

II - criação ou adequação de hospital de referência para o atendimento dos radioacidentados, dotado de equipamentos de última geração e equipe de saúde de treinamento específico na área de radiação ionizante;

III - implementação de um laboratório de citogenética e biologia molecular para realizar estudos na população de Goiânia e pessoas já conhecidas do acidente radiológico;

IV - criação de registro de patologias decorrentes do acidente com o Césio 137 em vítimas diretas e na população em geral, que deverá ser vinculado ao Centro Nacional de Epidemiologia do Ministério da Saúde (CENEP).

Art. 6º. As pessoas que se considerarem enquadradas na situação descrita no art. 2º desta Lei e não tenham seus nomes relacionados no Anexo II poderão requerer a concessão de pensão especial, em procedimento administrativo próprio junto à AGANP, utilizando-se de todos os meios de prova em direito admitidos.

Parágrafo único. Para concessão dessa pensão deverão ser observados os mesmos critérios estabelecidos no art. 3º e respeitado o limite do art. 2º.

- Vide Decreto Administrativo de 07 de abril de 2009, D.O. de 16-04-2009.  
- Vide Decreto Administrativo de 25 de abril de 2008, D.O. de 30-04-2008.

Art. 7º. O direito para as 120 (cento e vinte) pessoas mencionadas no art. 2º pleitear os benefícios desta lei prescreve no prazo de um ano, a contar da data de sua publicação.

Art. 8º As pensões especiais a serem concedidas e aquelas já deferidas pela Lei nº 10.977/89 são inacumuláveis e deverão ser pagas em contracheque individual, sendo revistas, anualmente, na data-base prevista em lei para a revisão geral da remuneração do funcionalismo estadual, mediante decreto do Governador do Estado, de acordo com a variação inflacionária verificada nos 12 (doze) meses imediatamente anteriores àquela data, tendo por base o indicador econômico INPC.

- Redação dada pela Lei nº 18.497, de 09-06-2014, art. 3º.

~~Art. 8º As pensões especiais a serem concedidas e aquelas já deferidas pela Lei n. 10.977/89 são inacumuláveis e deverão ser pagas em contracheque individual, sendo revistas na mesma proporção e na mesma data sempre que se modificar a remuneração dos servidores públicos estaduais.~~

Art. 9º. As pensões de que trata esta lei têm caráter personalíssimo, não sendo transmissíveis ao cônjuge sobrevivente ou aos herdeiros em caso de morte do beneficiário.

Art. 10. Fica estipulado o prazo máximo de noventa dias para que o Estado de Goiás, por meio do órgão competente, expeça as escrituras definitivas dos imóveis doados aos radioacidentados, com pendência documental.

Art. 11. Os recursos necessários ao atendimento do disposto nesta Lei advirão do Tesouro Estadual, Unidade Orçamentária - Fundo Especial de Saúde, à conta da dotação n. 2850.10.122.0000.7001.21, Encargos com inativos e pensionistas.

Art. 12. Esta lei entra em vigor na data de sua publicação.

PALÁCIO DO GOVERNO DO ESTADO DE GOIÁS, em Goiânia, 8 de julho de 2002, 114º da República.

MARCONI FERREIRA PERILLO JÚNIOR  
Walter José Rodrigues  
Fernando Passos Cupertino de Barros  
Wanderley Pimenta Borges

(D.O. de 19-7-2002)

## ANEXO II

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), do Projeto de Pesquisa sob o título **Indução de CNVs na geração F1 de indivíduos expostos ocupacionalmente e acidentalmente à radiação ionizante do Césio-137 avaliada pelo CMA (ChromosomalMicroarray)**. Meu nome é Aparecido Divino da Cruz, sou o pesquisador responsável, doutor em Biologia Molecular. Após receber os esclarecimentos e as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, este documento deverá ser assinado em duas vias e em todas as páginas, sendo a primeira via de guarda e confidencialidade do Pesquisador responsável e a segunda via ficará sob sua responsabilidade para quaisquer fins. Em caso de recusa, você não será penalizado (a) de forma alguma. Em caso de dúvida **sobre a pesquisa**, você poderá entrar em contato com o pesquisador responsável **Aparecido Divino da Cruz**, nos telefones: (62) 3946-1385/ (62) 3946-1443, ou através do e-mail [acruz@pucgoias.edu.br](mailto:acruz@pucgoias.edu.br). Em caso de dúvida **sobre a ética aplicada a pesquisa**, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, telefone: (62) 3946-1512, localizado na Avenida Universitária, N° 1069, Setor Universitário, Goiânia Goiás.

I. Este projeto terá uma duração de 4 anos, com o objetivo de avaliar e monitorar a saúde genética dos indivíduos expostos ao Césio-137, e será feito uma análise das alterações genéticas em diversos genes usando uma técnica de última geração, denominada de Análise Cromossômica por Microarranjo. Não será feito a inclusão dos participantes como grupo controle, pois isto não se aplica ao projeto.

II. A sua participação na pesquisa inclui: a) responder um questionário com perguntas relacionadas ao momento do acidente com o Césio-137 e pós acidente; b) doação de 10 mL de amostra de sangue.

III. A coleta de sangue será realizada no Núcleo de Pesquisas Replicon da PUC-Goiás por profissionais habilitados para essa função.

IV. O sangue coletado será armazenado no laboratório Replicon da PUC-Goiás por um período de 10 anos, na forma de biorepositório (nos termos da Resolução CNS 441/11) para eventuais necessidades de re-testes das amostras quando necessários. Ficarão sob a

responsabilidade do pesquisador Aparecido Divino da Cruz e este material poderá ser retirado a qualquer momento pelo participante do estudo. Caso haja a possibilidade do participante ser incluído em pesquisas futuras, o mesmo deverá assinar um novo TCLE.

V. O descarte do material ocorrerá segundo as normas e regulamento institucional.

VI. Os riscos decorrentes da sua participação na pesquisa são mínimos, próprios de qualquer coleta de sangue, que são, dor no local e possível aparecimento de manchas roxas (hematomas). Caso ocorra qualquer intercorrência devido a coleta de sangue (crise nervosa, com dificuldade respiratória, aumento da pressão arterial, sudorese intensa), o participante será encaminhado imediatamente ao serviço de assistência à saúde gratuita e integral para dano direto ou indireto, imediato ou tardio em decorrência da sua participação na pesquisa.

VII. Os benefícios referentes à coleta de sangue serão os resultados obtidos após a realização da técnica Análise Cromossômicos por Microarranjo que trará informações importantes na identificação de alterações genéticas após a contaminação com o Césio - 137).

VIII. O senhor (a) tem a opção de tomar conhecimento ou não dos resultados genéticos. Se for identificada alguma alteração genética, caso você queira, poderá ser encaminhado ao aconselhamento genético, que é um procedimento de assistência gratuita oferecida pela equipe do projeto.

IX. A participação no estudo não acarretará custos para você e também não haverá nenhuma remuneração financeira. Os gastos necessários para sua participação na pesquisa serão assumidos pelos pesquisadores. Fica também garantida indenização em casos de danos comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial (justiça comum).

X. 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.

XI. 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.

XII. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas a sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Todos os dados que permitam a identificação pessoal serão mantidos em sigilo profissional e científico. Sendo-lhe garantido que todos os resultados obtidos serão utilizados somente para estudos científicos e não irão prejudicar qualquer tratamento que o participante esteja sendo submetido (a).

XIII. Este termo será assinado em duas vias, sendo que uma ficará sob responsabilidade do pesquisador e a outra via será entregue ao participante da pesquisa.

Eu \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, abaixo assinado, discuti com o **Dr. Aparecido Divino da Cruz** sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de assistência integral e gratuita por danos diretos e indiretos, imediatos ou tardios quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

Goiânia, \_\_\_\_, de \_\_\_\_\_, de 201\_\_.

\_\_\_\_\_/ \_\_/\_\_\_\_

Assinatura do participante Data

\_\_\_\_\_/ \_\_/\_\_\_\_

Assinatura do responsável pelo estudo Data

### ANEXO III

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA MENORES DE 18 ANOS

Seu filho (a) está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), do Projeto de Pesquisa sob o título **Indução de CNVs na geração F1 de indivíduos expostos ocupacionalmente e acidentalmente à radiação ionizante do Césio-137 avaliada pelo CMA (*ChromosomalMicroarray*)**. Meu nome é Aparecido Divino da Cruz, sou o pesquisador responsável, doutor em Biologia Molecular. Após receber os esclarecimentos e as informações a seguir, no caso de aceitar que seu filho(a) possa fazer parte do estudo, este documento deverá ser assinado em duas vias e em todas as páginas, sendo a primeira via de guarda e confidencialidade do Pesquisador responsável e a segunda via ficará sob sua responsabilidade para quaisquer fins. Em caso de recusa, o (a) menor não será penalizado (a) de forma alguma. Em caso de dúvida **sobre a pesquisa**, você poderá entrar em contato com o pesquisador responsável **Aparecido Divino da Cruz**, nos telefones: (62) 3946-1385/ (62) 3946-1443, ou através do e-mail **acruz@pucgoias.edu.br**. Em caso de dúvida **sobre a ética aplicada a pesquisa**, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, telefone: (62) 3946-1512, localizado na Avenida Universitária, N° 1069, Setor Universitário, Goiânia Goiás.

I. Este projeto terá uma duração de 4 anos, com o objetivo de avaliar e monitorar a saúde genética dos indivíduos expostos ao Césio-137, e será feito uma análise das alterações genéticas em diversos genes usando uma técnica de última geração, denominada de Análise Cromossômica por Microarranjo. Não será feito a inclusão dos participantes como grupo controle, pois isto não se aplica ao projeto.

II. A participação do seu filho(a) na pesquisa inclui: a) responder um questionário com perguntas relacionadas ao momento do acidente com o Césio-137 e pós acidente; b) doação de 10 mL de amostra de sangue.

III. A coleta de sangue será realizada no Núcleo de Pesquisas Replicon da PUC-Goiás por profissionais habilitados para essa função.

IV. O sangue coletado será armazenado no laboratório Replicon da PUC-Goiás por um período de 10 anos, na forma de biorepositório (nos termos da Resolução CNS 441/11) para eventuais

necessidades de re-testes das amostras quando necessários. Ficarão sob a responsabilidade do pesquisador Aparecido Divino da Cruz e este material poderá ser retirado a qualquer momento pelo participante do estudo. Caso haja a possibilidade do participante ser incluído em pesquisas futuras, o mesmo deverá assinar um novo TCLE.

V. O descarte do material ocorrerá segundo as normas e regulamento institucional.

VI. Os riscos decorrentes da participação do seu filho(a) na pesquisa são mínimos, próprios de qualquer coleta de sangue, que são, dor no local e possível aparecimento de manchas roxas (hematomas). Caso ocorra qualquer intercorrência devido a coleta de sangue (crise nervosa, com dificuldade respiratória, aumento da pressão arterial, sudorese intensa), o (a) menor será encaminhado imediatamente ao serviço de assistência à saúde gratuita e integral para dano direto ou indireto, imediato ou tardio em decorrência da participação na pesquisa.

VII. Os benefícios referentes à coleta de sangue serão os resultados obtidos após a realização da técnica Análise Cromossômicos por Microarranjo que trará informações importantes na identificação de alterações genéticas após a contaminação com o Césio - 137) nos seus descendentes.

VIII. O senhor (a) tem a opção de tomar conhecimento ou não dos resultados genéticos do seu filho (a). Se for identificada alguma alteração genética, caso você queira, poderá ser encaminhado ao aconselhamento genético, que é um procedimento de assistência gratuita oferecida pela equipe do projeto.

IX. A participação no estudo não acarretará custos para o seu filho (a) e também não haverá nenhuma remuneração financeira. Os gastos necessários para a participação na pesquisa serão assumidos pelos pesquisadores. Fica também garantida indenização em casos de danos comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial (justiça comum).

X. Seu filho (a) será esclarecido (a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Seu filho (a) é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento.

XI. Se depois de consentir com a participação da criança no estudo, o Sr. (a) tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem nenhum prejuízo a sua pessoa ou à criança.

XII. A participação de seu filho(a) 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.

XIII. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas a identidade de seu filho(a) não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Todos os dados que permitam a identificação pessoal serão mantidos em sigilo profissional e científico. Sendo-lhe garantido que todos os resultados obtidos serão utilizados somente para estudos científicos e não irão prejudicar qualquer tratamento que o participante esteja sendo submetido (a).

XIV. Este termo será assinado em duas vias, sendo que uma ficará sob responsabilidade do pesquisador e a outra via será entregue ao responsável do menor.

Eu \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, abaixo assinado, discuti com o **Dr. Aparecido Divino da Cruz** sobre a minha decisão em participar nesse estudo e/ou meus descendentes (filhos). Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação e/ou dos meus descendentes (filhos) é isenta de despesas e que tenho garantia de assistência integral e gratuita por danos diretos e indiretos, imediatos ou tardios quando necessário. Concordo voluntariamente que meu filho (a) participe deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

Goiânia, \_\_\_\_, de \_\_\_\_\_, de 201 \_\_\_\_.

\_\_\_\_\_/ \_\_/\_\_\_\_

Assinatura do Responsável Legal Data

\_\_\_\_\_/ \_\_/\_\_\_\_

Assinatura do responsável pelo estudo Data

## ANEXO IV

### TERMO DE CONSENTIMENTO DOS INDIVÍDUOS EXAMINADOS “Monitoramento genético retrospectivo de população potencialmente exposta à radiação ionizante utilizando marcadores STR”

#### I. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. Nome: \_\_\_\_\_  
Documento de Identidade \_\_\_\_\_ Org. Exp. \_\_\_\_\_ Data de  
nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Endereço:  
\_\_\_\_\_  
Bairro:  
\_\_\_\_\_  
Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_ CEP:  
\_\_\_\_\_  
Telefone: ( ) \_\_\_\_\_

2. Responsável legal \_\_\_\_\_ Natureza  
(grau de parentesco, tutor, curador, etc) \_\_\_\_\_ Documento de identidade  
\_\_\_\_\_  
Sexo: M ( ) F ( ) Endereço:  
\_\_\_\_\_  
Bairro:  
\_\_\_\_\_  
Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_ CEP:  
\_\_\_\_\_  
Telefone: ( ) \_\_\_\_\_

#### II. DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. Título do protocolo de pesquisa: Monitoramento genético retrospectivo de população potencialmente exposta à radiação ionizante utilizando marcadores STR.

2. Pesquisador responsável: Aparecido D. da Cruz, Superintendência Leide das Neves Ferreira. Fone: (062) 3946 1086; e-mail: [acruz@ucg.br](mailto:acruz@ucg.br)

3. Avaliação do risco da pesquisa: Os procedimentos da pesquisa oferecem risco mínimo de ocorrência de algum dano imediato ou tardio para o paciente (apenas hematomas locais após a coleta);

4. Duração da pesquisa: dezembro de 2006 a dezembro de 2007.

#### III. REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPERESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA

Nós conduzimos um estudo para encontrar provas de contaminação com o Césio 137. Para isso solicitamos aos membros do Corpo de Bombeiros que se julgarem de alguma forma afetados com o acidente do Césio 137 em 1987, que contribuam.

A sua participação na pesquisa inclui: a) responder a perguntas de um questionário; b) doação de amostras de sangue da veia do braço (10 ml).

#### IV. ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

Todas as informações prestadas em questionário e durante a entrevista serão de **caráter confidencial** e as informações colhidas serão utilizadas somente para fins científicos descritos no protocolo desta pesquisa, **sem qualquer identificação pessoal.**

Qualquer provável benefício do estudo para o bem-estar da população depende da exatidão de suas respostas. Portanto, se o Senhor não entender alguma das questões, por favor, solicite todos os esclarecimentos que julgar necessário sobre os procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa ou qualquer dúvida.

Os resultados dos estudos esclarecerão apenas se existe ou não **possibilidade** de contaminação com o Césio - 137, sendo necessários outros estudos para a confirmação. O sangue que sobrar da coleta será guardado para que outros exames e estudos sejam feitos no futuro.

O Senhor tem a liberdade de não participar do estudo, saber ou não dos resultados dos exames, e retirar seu consentimento a qualquer momento deixando de participar do estudo, sem que isto traga qualquer prejuízo à continuidade de sua assistência.

---

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa em Goiânia, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

**ANEXO V**

**QUESTIONÁRIO PARA SELEÇÃO DOS MILITARES QUE PARTICIPARAM DAS AÇÕES DE DEFESA CIVIL DURANTE O ACIDENTE DO CÉSIO – 137 EM GOIÂNIA, 1987**

**“Monitoramento genético retrospectivo de população potencialmente exposta à radiação ionizante utilizando marcadores STR”**

**Atenção: Este questionário é um instrumento de pesquisa e esclarecimento, e será utilizado somente para esta finalidade.**

Nome \_\_\_\_\_

Idade \_\_\_\_\_ Data da entrevista \_\_\_\_\_

Posto de Graduação \_\_\_\_\_

RG \_\_\_\_\_

Contato () \_\_\_\_\_ () \_\_\_\_\_ OBM \_\_\_\_\_

1.	Participou das ações de socorro durante o acidente radiológico?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
2.	Aproximou-se da fonte de radiação ou dos rejeitos radioativos?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
3.	Foi registrado o índice de radiação recebido?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
4.	Recebeu atenção médico-hospitalar especializada?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
5.	Teve filhos biológicos após o acidente?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
6.	Seu(s) filho(s) apresentou (apresentaram) distúrbio(s) de saúde?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
7.	Fuma ou fumou alguma vez na vida?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
8.	Bebe ou utilizou bebida alcoólica alguma vez na vida?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não

9.	Usou algum medicamento por período prolongado?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
10.	Teve algum tipo de câncer?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
11.	Possuía alguma doença antes do acidente radiológico?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
12.	Teve filhos biológicos antes do acidente?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não

**13. Caso a resposta para a questão 1 tenha sido “Sim” responda:**

Por quanto tempo? \_\_\_\_\_

Qual era a função? \_\_\_\_\_

**14. Caso a resposta para a questão 2 tenha sido “Sim” responda:**

Como se aproximou? \_\_\_\_\_

**15. Caso a resposta para a questão 3 tenha sido “Sim” responda:**

Você possui estes registros?  Sim  Não

Se não possui, sabe onde estão?  Sim  Não Onde? \_\_\_\_\_

**16. Caso a resposta para a questão 4 tenha sido “Sim” responda:**

Onde foi atendido? \_\_\_\_\_

Foi internado?  Sim  Não Quanto tempo? \_\_\_\_\_

Possui seus registros? \_\_\_\_\_

**17. Caso a resposta para a questão 5 tenha sido “Sim” responda:**

Quantos filhos?  Um  Dois  Três  \_\_\_\_\_

Com quantas mulheres? ( ) Um ( ) Dois ( ) Três ( ) \_\_\_\_\_

A(s) mãe(s) é(são) viva(s)? ( ) Sim ( ) Não

**18. Caso a resposta para a questão 6 tenha sido “Sim” responda:**

Qual distúrbio(s)? \_\_\_\_\_

**19. Caso a resposta para a questão 7 tenha sido “Sim” responda:**

Você ainda fuma? ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo? \_\_\_\_\_

A(s) mãe(s) do(s) filho(s) que teve depois do acidente fuma(m)?

Mãe 1: ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo? \_\_\_\_\_

Mãe 2: ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo? \_\_\_\_\_

Fumaram? Mãe 1: ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo? \_\_\_\_\_

Mãe 2: ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo? \_\_\_\_\_

O seu(s) filho(s) nascido(s) após o acidente fuma(m)?

Filho 1: ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo? \_\_\_\_\_

Filho 2: ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo? \_\_\_\_\_

Filho 3: ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo? \_\_\_\_\_

Filho 4: ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo? \_\_\_\_\_

Fumaram? Filho 1: ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo? \_\_\_\_\_

Filho 2: ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo? \_\_\_\_\_

Filho 3: ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo? \_\_\_\_\_

Filho 4: ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo? \_\_\_\_\_

**20. Caso a resposta para a questão 8 tenha sido “Sim” responda:**

Você ainda utiliza? ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo? \_\_\_\_\_

A(s) mãe(s) do(s) filho(s) que teve depois do acidente utiliza(m)?

Mãe 1: ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo? \_\_\_\_\_

Mãe 2: ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo? \_\_\_\_\_

Já utilizaram? Mãe 1: ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo? \_\_\_\_\_

Mãe 2: ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo? \_\_\_\_\_

O seu(s) filho(s) nascido(s) após o acidente utiliza (m)?

Filho 1: ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo? \_\_\_\_\_

Filho 2: ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo? \_\_\_\_\_

Filho 3: ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo? \_\_\_\_\_

Filho 4: ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo? \_\_\_\_\_

Já utilizaram? Filho 1: ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo?

Filho 2: ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo? \_\_\_\_\_

Filho 3: ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo? \_\_\_\_\_

Filho 4: ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo? \_\_\_\_\_

**21. Caso a resposta para a questão 9 tenha sido “Sim” responda:**

Você ainda usa? ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo? \_\_\_\_\_

A(s) mãe(s) do(s) filho(s) que teve depois do acidente usa(m)?

Mãe 1: ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo? \_\_\_\_\_

Mãe 2: ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo? \_\_\_\_\_

Já usaram? Mãe 1: ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo? \_\_\_\_\_

Mãe 2: ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo? \_\_\_\_\_

O seu(s) filho(s) nascido(s) após o acidente usa (m)?

Filho 1: ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo? \_\_\_\_\_

Filho 2: ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo? \_\_\_\_\_

Filho 3: ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo? \_\_\_\_\_

Filho 4: ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo? \_\_\_\_\_

Já usaram? Filho 1: ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo? \_\_\_\_\_

Filho 2: ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo? \_\_\_\_\_

Filho 3: ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo? \_\_\_\_\_

Filho 4: ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo? \_\_\_\_\_

**22. Caso a resposta para a questão 10 tenha sido “Sim” responda:**

Você ainda tem? ( ) Sim ( ) Não Qual? \_\_\_\_\_

A(s) mãe(s) do(s) filho(s) que teve depois do acidente tem(têm)?

Mãe 1: ( ) Sim ( ) Não Qual? \_\_\_\_\_

Mãe 2: ( ) Sim ( ) Não Qual? \_\_\_\_\_

Já tiveram? Mãe 1: ( ) Sim ( ) Não Qual? \_\_\_\_\_

Mãe 2: ( ) Sim ( ) Não Qual? \_\_\_\_\_

O seu(s) filho(s) nascido(s) após o acidente tem (têm)?

Filho 1: ( ) Sim ( ) Não Qual? \_\_\_\_\_

Filho 2:  Sim  Não Qual? \_\_\_\_\_

Filho 3:  Sim  Não Qual? \_\_\_\_\_

Filho 4:  Sim  Não Qual? \_\_\_\_\_

Já tiveram? Filho 1:  Sim  Não Qual? \_\_\_\_\_

Filho 2:  Sim  Não Qual? \_\_\_\_\_

Filho 3:  Sim  Não Qual? \_\_\_\_\_

Filho 4:  Sim  Não Qual? \_\_\_\_\_

**23. Caso a resposta para a questão 11 tenha sido “Sim” responda:**

Qual? \_\_\_\_\_

Por quanto tempo? \_\_\_\_\_

**24. Quantos anos de serviço têm ou teve no Corpo de Bombeiros? \_\_\_\_\_**

**25. Em quais áreas e por quanto tempo trabalhou? (Caso tenha executado serviço de Polícia, especificar nos campos vagos abaixo)**

Combate a incêndio \_\_\_\_\_

Salvamento \_\_\_\_\_

Mergulho \_\_\_\_\_

Resgate \_\_\_\_\_

Defesa Civil \_\_\_\_\_

Administração \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**26. Como classifica o seu envolvimento com o Acidente do Césio 137?**

Pequeno  Médio  Grande  Muito Grande

Por que? \_\_\_\_\_

**27. Como avalia a atenção e o serviço de saúde e monitoramento dado ao pessoal de segurança pública e defesa civil durante as ações no desastre e depois que elas encerraram?**

\_\_\_\_\_

**28. Caso a resposta para a questão 5 tenha sido “Sim” responda:**

Quantos filhos?  Um  Dois  Três  \_\_\_\_\_

Com quantas mulheres?  Um  Dois  Três  \_\_\_\_\_

A(s) mãe(s) é(são) viva(s)?  Sim  Não

## ANEXO VI

### RESOLUÇÃO CNS Nº 441, DE 12 DE MAIO DE 2011.

O Plenário do Conselho Nacional de Saúde, em sua Ducentésima Vigésima Primeira Reunião Ordinária, realizada nos dias 11 e 12 de maio de 2011, no uso de suas competências regimentais e atribuições conferidas pela Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, pela Lei nº 8.142, de 28 de dezembro de 1990, e pelo Decreto nº 5.839, de 11 de julho de 2006, e.

Considerando a necessidade de atualizar a complementação da regulamentação da Resolução CNS nº 196/96 no que diz respeito ao armazenamento e à utilização de material biológico humano com finalidade de pesquisa;

Considerando a importância da utilização de material biológico humano para o desenvolvimento das ciências da saúde;

Considerando os subsídios advindos do Sistema EP/CONEP e a experiência acumulada na análise dos projetos de pesquisas que envolvem material biológico humano;

Considerando a necessidade de ser observada a proteção dos Direitos Humanos, das liberdades fundamentais e do respeito à dignidade humana na coleta, depósito, armazenamento, utilização e descarte de material biológico humano, resolve:

Art. 1º Aprovar as seguintes diretrizes para análise ética de projetos de pesquisas que envolvam armazenamento de material biológico humano ou uso de material armazenado em pesquisas anteriores:

1. Para os efeitos desta Resolução, considera-se:

I - Biobanco: coleção organizada de material biológico humano e informações associadas, coletado e armazenado para fins de pesquisa, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade e gerenciamento institucional, sem fins comerciais;

II - Biorrepositório: coleção de material biológico humano, coletado e armazenado ao longo da execução de um projeto de pesquisa específico, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade institucional e sob gerenciamento do pesquisador, sem fins comerciais;

III - Material Biológico Humano: espécimes, amostras e alíquotas de material original e seus componentes fracionados;

IV - Projeto de Pesquisa: documento em que é descrita a pesquisa em seus aspectos fundamentais, incluindo informações relativas ao sujeito da pesquisa, detalhamento a respeito dos métodos que serão utilizados para a coleta e tratamento das amostras biológicas, qualificação dos pesquisadores e instâncias responsáveis;

V - Protocolo de Desenvolvimento: documento no qual são definidos a constituição de um Biobanco, seus responsáveis e seus aspectos fundamentais, como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) a ser utilizado; as informações relativas ao sujeito e às amostras; e as etapas de coleta, processamento, armazenamento, distribuição e descarte de material biológico humano; e

VI - Sujeito da pesquisa: aquele que, de forma esclarecida, livre e autônoma, consente em participar de pesquisas, atuais ou potenciais, associadas ao armazenamento de material biológico humano em Biorrepositório ou Biobanco.

2. Sempre que houver previsão de armazenamento de material biológico humano, no País ou no exterior, visando à possibilidade de utilização em investigações futuras, além do cumprimento dos requisitos da Resolução CNS no 196/96 e complementares, devem ser apresentados:

I - justificativa quanto à necessidade e oportunidade para utilização futura;

II - consentimento do sujeito da pesquisa, autorizando a coleta, o depósito, o armazenamento e a utilização do material biológico humano;

III - declaração de que toda nova pesquisa a ser realizada com o material armazenado será submetida para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) institucional e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP); e

IV - regulamento aprovado pela instituição depositária destinado à constituição e ao funcionamento do banco de material biológico humano.

3. No caso de Biobanco:

I - o Regulamento corresponde ao seu Protocolo de Desenvolvimento, devendo ser primeiramente analisado pelo CEP institucional ou por CEP indicado pela CONEP e, quando aprovado, ser necessariamente avaliado e receber parecer final da CONEP;

II - o Protocolo de Desenvolvimento é necessário para o credenciamento do Biobanco, devendo ser apresentado no momento de sua proposição e avaliado de acordo com os prazos de tramitação estabelecidos no Sistema CEP/CONEP; e

III - o Biobanco deve conter um sistema seguro de identificação, que garanta o sigilo, o respeito à confidencialidade e à recuperação dos dados dos sujeitos da pesquisa, para

fornecimento de informações do interesse destes ou para a obtenção de consentimento específico para utilização em nova pesquisa;

IV - quando houver alteração da titularidade da responsabilidade pelo Biobanco, tal fato deve ser prontamente comunicado ao Sistema CEP/CONEP; e

V - os Biobancos estão sujeitos à inspeção sanitária pelos órgãos competentes.

4. No caso de Biorrepositório, as condições associadas ao armazenamento de material biológico humano devem estar explicitadas no Projeto de Pesquisa respectivo, devendo seu Regulamento ser apreciado pelo CEP institucional ou por CEP indicado pela CONEP e, quando for o caso, pela CONEP, segundo atribuições definidas na Resolução CNS no 196/96 e complementares.

5. O consentimento livre e esclarecido referente à coleta, depósito, armazenamento e utilização de material biológico humano em Biobanco é formalizado através de TCLE, por meio do qual o sujeito da pesquisa deve se manifestar expressamente quanto às seguintes alternativas, excludentes entre si:

I - necessidade de novo consentimento a cada pesquisa; e

II - dispensa de novo consentimento a cada pesquisa.

a) O TCLE deve conter referência aos tipos de informação que poderão ser obtidos nas pesquisas futuras, a partir da utilização do material biológico humano armazenado, para fins de conhecimento e decisão autônoma do sujeito.

b) O TCLE deve conter a garantia expressa da possibilidade de acesso pelo sujeito da pesquisa, inclusive a(s) forma(s) de contato para tal, ao conhecimento dos resultados obtidos com a utilização do seu material biológico e às orientações quanto as suas implicações, incluindo aconselhamento genético quando aplicável, a qualquer tempo.

c) O TCLE pode conter manifestação expressa da vontade do sujeito da pesquisa quanto à cessão dos direitos sobre o material armazenado aos sucessores ou outros por ele indicado, em caso de óbito ou condição incapacitante.

d) O TCLE deve informar ao sujeito que os dados fornecidos, coletados e obtidos a partir de pesquisas poderão ser utilizados nas pesquisas futuras.

e) O TCLE pode conter referência à autorização de descarte do material armazenado e às situações nas quais o mesmo é possível.

6. O consentimento livre e esclarecido referente à coleta, depósito, armazenamento, utilização e descarte de material biológico humano em Biorrepositório é formalizado por meio de TCLE específico para cada pesquisa, conforme preconizado nas

resoluções do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

7. A transferência do material biológico humano armazenado entre Biobancos ou Biorrepositórios, da própria ou de outra instituição, deve ser comunicada ao sujeito da pesquisa, sempre que possível ou, na impossibilidade, deve ser apresentada justificativa ao Sistema CEP/CONEP.

8. O sujeito da pesquisa deve ser informado sobre a perda ou destruição de suas amostras biológicas, bem como sobre o encerramento do Biobanco ou do Biorrepositório, quando for o caso.

9. O material biológico humano armazenado em Biobanco ou Biorrepositório é do sujeito da pesquisa, permanecendo sua guarda sob a responsabilidade institucional.

I - O gerenciamento do material biológico humano armazenado em Biobanco cabe à instituição e no caso de Biorrepositório ao pesquisador responsável.

10. O sujeito da pesquisa, ou seu representante legal, a qualquer tempo e sem quaisquer ônus ou prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado em Biobanco ou Biorrepositório, valendo a desistência a partir da data de formalização desta.

I - A retirada do consentimento será formalizada por manifestação, por escrito e assinada, pelo sujeito da pesquisa ou seu representante legal, cabendo-lhe a devolução das amostras existentes.

11. O prazo de armazenamento de material biológico humano em Biobanco é indeterminado, sendo a manutenção de seu credenciamento subordinada ao atendimento das normas vigentes.

I - A cada cinco anos, contados a partir da sua constituição, ou a qualquer tempo, por solicitação da CONEP, a instituição responsável pelo Biobanco deve apresentar relatório de atividades do período ao Sistema CEP/CONEP, constando, obrigatoriamente, o número de sujeitos incluídos no período e a relação de pesquisas que utilizaram amostras armazenadas.

II - O descarte do material biológico humano armazenado em Biobanco pode ocorrer:

- a) pela manifesta vontade do sujeito da pesquisa;
- b) devido à inadequação da amostra por critérios de qualidade;
- c) por iniciativa da instituição; e
- d) pela dissolução do Biobanco.

III - Nas hipóteses previstas nas alíneas “c” e “d”, são obrigatórias:

- a) a oferta formal do material armazenado a, no mínimo, duas instituições de pesquisa que possuam Biobanco e a apresentação comprovada da recusa; e
- b) a submissão da decisão institucional e da destinação do material biológico ao CEP, que as encaminhará para avaliação da CONEP.

12. O prazo de armazenamento de material biológico humano em Biorrepositório deve estar de acordo com o cronograma da pesquisa correspondente e pode ser autorizado por até dez anos.

I - Renovações da autorização de armazenamento são permitidas mediante solicitação do pesquisador responsável, ao CEP, acompanhada de justificativa e relatório das atividades de pesquisa desenvolvidas com o material durante o período.

II - Ao final do período de realização da pesquisa, o material biológico humano armazenado em Biorrepositório pode:

- a) permanecer armazenado, se em conformidade com as normas pertinentes do CNS;
- b) ser transferido formalmente para outro Biorrepositório ou Biobanco, mediante aprovação dos CEP e das instituições envolvidas; e
- c) ser descartado, conforme normas vigentes de órgãos técnicos competentes, e de acordo com o TCLE, respeitando-se a confidencialidade e a autonomia do sujeito da pesquisa.

13. No caso de pesquisa envolvendo mais de uma instituição deve haver acordo firmado entre as instituições participantes, contemplando formas de operacionalização, compartilhamento e utilização do material biológico humano armazenado em Biobanco ou Biorrepositório, inclusive a possibilidade de dissolução futura da parceria e a consequente partilha e destinação dos dados e materiais armazenados, conforme previsto no TCLE.

I - É necessário explicitar o tipo e a quantidade dos materiais compartilhados, informando sua destinação após a utilização.

14. No caso de constituição ou participação em banco de material biológico humano no exterior, devem ser obedecidas as normas nacionais e internacionais para remessa de material e ser apresentado o regulamento da instituição destinatária para análise do Sistema CEP/CONEP quanto ao atendimento dos requisitos desta Resolução.

I - O pesquisador e instituição brasileiros devem ter direito ao acesso e à utilização, em pesquisas futuras, do material biológico humano armazenado no exterior, não necessariamente das amostras por ele depositadas pelo pesquisador, garantida, no

mínimo, a proporcionalidade da participação.

II - O direito de acesso e utilização compreende as amostras, informações associadas e resultados incorporados ao banco, obtidos em pesquisas aprovadas pelo Sistema CEP/CONEP.

III - os direitos relativos ao material biológico humano armazenado no exterior não podem ser considerados exclusivos de Estado ou instituição.

IV - A utilização de amostras de brasileiros armazenadas no exterior somente poderá se realizar se observado o art. 5º desta Resolução e com a participação de pesquisador e/ou instituição brasileiros.

V - A instituição destinatária no exterior deve comprometer-se a respeitar a legislação brasileira, em especial a vedação do patenteamento e da utilização comercial de material biológico humano.

15. Sobre a utilização de amostras de material biológico humano armazenado:

I - as amostras armazenadas podem ser utilizadas em novas pesquisas aprovadas pelo CEP e, quando for o caso, pela CONEP;

II - os projetos de pesquisas que pretendam utilizar amostras armazenadas devem incluir:

a) justificativa para utilização do material;

b) cópia do TCLE empregado quando da coleta do material, contendo autorização de armazenamento e possível utilização futura em pesquisa, se o armazenamento ocorreu a partir da homologação da Resolução CNS no 196/96; e

c) TCLE específico para nova pesquisa ou a solicitação de sua dispensa, conforme disposto no art. 5º desta Resolução.

III - quando fundamentada a impossibilidade de obtenção do consentimento específico para a nova pesquisa, mediante opção do sujeito em ser consultado a cada pesquisa, cabe ao CEP autorizar, ou não, a utilização do material biológico humano armazenado em Biobanco ou Biorrepositório.

16. A legislação brasileira veda o patenteamento e a utilização comercial de material biológico humano armazenado em Biobancos e Biorrepositórios.

17. Os Biobancos constituídos a partir da homologação desta Resolução deverão adequar-se à mesma e os constituídos anteriormente terão o prazo de um ano para sua regularização, contado a partir da data de homologação.

I - a regularização prevista no art. 17 será objeto de análise e aprovação pelo Sistema

CEP/CONEP.

18. Fica revogada a Resolução CNS no 347, de 13 de janeiro de 2005, publicada no Diário Oficial da União no 47, de 10 de março de 2005.

ALEXANDRE ROCHA SANTOS PADILHA

Presidente do Conselho Nacional de Saúde

Homologo a Resolução CNS no 441, de 12 de maio de 2011, nos termos do Decreto  
no 5.839,  
de 11 de julho de 2006.

ALEXANDRE ROCHA SANTOS PADILHA

Ministro de Estado da Saúde

## ANEXO VII

### CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE

#### RESOLUÇÃO Nº 340, DE 8 DE JULHO DE 2004.

O Plenário do Conselho Nacional de Saúde, em sua Centésima Quadragésima Quarta Reunião Ordinária, realizada nos dias 7 e 8 de julho de 2004, no uso de suas competências regimentais e atribuições conferidas pela Lei no 8.080, de 19 de setembro de 1990, e pela Lei no 8.142, de 28 de dezembro de 1990, e

Considerando o recente avanço técnico-científico e suas aplicações na pesquisa em genética humana, exigindo posicionamento de instituições, pesquisadores e Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) em todo o País, demandando, portanto, regulamentação complementar à Resolução CNS No 196/96 (Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos), atribuição da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), conforme item VIII.4 daquela Resolução;

Considerando os subsídios advindos do sistema CEPs – CONEP e a experiência acumulada na análise dos projetos de pesquisa dessa área até o momento; e

Considerando a necessidade de serem observados os riscos potenciais à saúde e a proteção dos direitos humanos, das liberdades fundamentais e do respeito à dignidade humana na coleta, processamento, uso e armazenamento de dados e materiais genéticos humanos,

#### R E S O L V E:

Aprovar as seguintes Diretrizes para Análise Ética e Tramitação dos Projetos de Pesquisa da Área Temática Especial de Genética Humana:

#### I - Preâmbulo:

A presente Resolução incorpora todas as disposições contidas na Resolução CNS No 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos, da qual esta é parte complementar da área temática específica, e incorpora também, no que couber, as

disposições constantes das Resoluções CNS Nos 251/97, 292/99, 303/2000 e 304/2000.

## II - Termos e Definições:

II.1 - A pesquisa em genética humana é a que envolve a produção de dados genéticos ou proteômicos de seres humanos, podendo apresentar várias formas:

a) pesquisa de mecanismos genéticos básicos: estudos sobre localização, estrutura, função e expressão de genes humanos e da organização cromossômica;

b) pesquisa em genética clínica: pesquisa que consiste no estudo descritivo de sujeitos individualmente e/ou em suas famílias, visando elucidar determinadas condições de provável etiologia genética, podendo envolver análise de informações clínicas e testes de material genético;

c) pesquisa em genética de populações: estudos da variabilidade genética normal ou patológica em grupos de indivíduos e da relação entre esses grupos e uma condição particular;

d) pesquisas moleculares humanas: pesquisa que envolve testes moleculares associados ou não a doenças; estudos genéticos ou epigenéticos dos ácidos nucleicos (DNA e RNA) ou de proteínas visando a novos tratamentos ou à prevenção de desordens genéticas, de outras patologias ou à identificação de variabilidade molecular;

e) pesquisa em terapia gênica e celular: introdução de moléculas de DNA ou RNA recombinante em células somáticas humanas *in vivo* (terapia gênica *in vivo*) ou células somáticas humanas *in vitro* e posterior transferência dessas células para o organismo (terapia gênica *ex vivo*) e pesquisas com células-tronco humanas com modificações genéticas; e

f) pesquisa em genética do comportamento: estudo com o objetivo de estabelecer possíveis relações entre características genéticas e comportamento humano.

II.2 - Todo procedimento relacionado à genética humana, cuja aceitação não esteja ainda consagrada na literatura científica, será considerado pesquisa e, portanto,

deverá obedecer às diretrizes desta Resolução. Incluemse procedimentos de genética em reprodução assistida, não regulados pelo Conselho Federal de Medicina.

### III - Aspectos Éticos:

A finalidade precípua das pesquisas em genética deve estar relacionada ao acúmulo do conhecimento científico que permita aliviar o sofrimento e melhorar a saúde dos indivíduos e da humanidade.

III.1 - A pesquisa genética produz uma categoria especial de dados por conter informação médica, científica e pessoal e deve por isso ser avaliado o impacto do seu conhecimento sobre o indivíduo, a família e a totalidade do grupo a que o indivíduo pertença.

III.2 - Devem ser previstos mecanismos de proteção dos dados visando evitar a estigmatização e a discriminação de indivíduos, famílias ou grupos.

III.3 - As pesquisas envolvendo testes preditivos deverão ser precedidas, antes da coleta do material, de esclarecimentos sobre o significado e o possível uso dos resultados previstos.

III.4 - Aos sujeitos de pesquisa deve ser oferecida a opção de escolher entre serem informados ou não sobre resultados de seus exames.

III.5 - Os projetos de pesquisa deverão ser acompanhados de proposta de aconselhamento genético, quando for o caso.

III.6 - Aos sujeitos de pesquisa cabe autorizar ou não o armazenamento de dados e materiais coletados no âmbito da pesquisa, após informação dos procedimentos definidos na Resolução sobre armazenamento de materiais biológicos.

III.7 - Todo indivíduo pode ter acesso a seus dados genéticos, assim como tem o direito de retirá-los de bancos onde se encontrem armazenados, a qualquer momento.

III.8 - Para que dados genéticos individuais sejam irreversivelmente dissociados de qualquer indivíduo identificável, deve ser apresentada justificativa para tal procedimento para avaliação pelo CEP e pela CONEP.

III.9 - Nos casos de aprovação de desassociação de dados genéticos pelo CEP e pela CONEP, deve haver esclarecimento ao sujeito de pesquisa sobre as vantagens e desvantagens da dissociação e Termo de Consentimento específico para esse fim.

III.10 - Deve ser observado o item V.7 da Resolução CNS No 196/96, inclusive no que se refere a eventual registro de patentes.

III.11 - Os dados genéticos resultantes de pesquisa associados a um indivíduo identificável não poderão ser divulgados nem ficar acessíveis a terceiros, notadamente a empregadores, empresas seguradoras e instituições de ensino, e também não devem ser fornecidos para cruzamento com outros dados armazenados para propósitos judiciais ou outros fins, exceto quando for obtido o consentimento do sujeito da pesquisa.

III.12 - Dados genéticos humanos coletados em pesquisa com determinada finalidade só poderão ser utilizados para outros fins se for obtido o consentimento prévio do indivíduo doador ou seu representante legal e mediante a elaboração de novo protocolo de pesquisa, com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa e, se for o caso, da CONEP. Nos casos em que não for possível a obtenção do TCLE, deve ser apresentada justificativa para apreciação pelo CEP.

III.13 - Quando houver fluxo de dados genéticos humanos entre instituições deve ser estabelecido acordo entre elas de modo a favorecer a cooperação e o acesso equitativo aos dados.

III.14 - Dados genéticos humanos não devem ser armazenados por pessoa física, requerendo a participação de instituição idônea responsável, que garanta proteção adequada.

III.15 - Os benefícios do uso de dados genéticos humanos coletados no âmbito da pesquisa, incluindo os estudos de genética de populações, devem ser compartilhados entre a comunidade envolvida, internacional ou nacional, em seu conjunto.

III.16 - As pesquisas com intervenção para modificação do genoma humano só poderão ser realizadas em células somáticas.

IV - Protocolo de Pesquisa:

IV.1 - As pesquisas da área de genética humana devem ser submetidas à apreciação do CEP e, quando for o caso, da CONEP como protocolos completos, de acordo com o capítulo VI da Resolução CNS No 196/96, não sendo aceitos como emenda, adendo ou subestudo de protocolo de outra área, devendo ainda incluir:

a) justificativa da pesquisa;

b) como os genes/segmentos do DNA ou do RNA ou produtos gênicos em estudo se relacionam com eventual condição do sujeito da pesquisa;

c) explicitação clara dos exames e testes que serão realizados e indicação dos genes/segmentos do DNA ou do RNA ou de produtos gênicos que serão estudados;

d) justificativa para a escolha e tamanho da amostra, particularmente quando se tratar de população ou grupo vulnerável e de culturas diferenciadas (grupos indígenas, por exemplo);

e) formas de recrutamento dos sujeitos da pesquisa e de controles, quando for o caso;

f) análise criteriosa dos riscos e benefícios atuais e potenciais para o indivíduo, o grupo e gerações futuras, quando couber;

g) informações quanto ao uso, armazenamento ou outros destinos do material biológico;

h) medidas e cuidados para assegurar a privacidade e evitar qualquer tipo ou situação de estigmatização e discriminação do sujeito da pesquisa, da família e do grupo;

i) explicitação de acordo preexistente quanto à propriedade das informações geradas e quanto à propriedade industrial, quando couber;

j) descrição do plano de aconselhamento genético e acompanhamento clínico, quando indicado, incluindo nomes e contatos dos profissionais responsáveis, tipo de abordagens de acordo com situações esperadas, conseqüências para os sujeitos e condutas previstas. Os profissionais responsáveis pelo aconselhamento genético e acompanhamento clínico deverão ter a formação profissional e as habilitações exigidas pelos conselhos profissionais e sociedades de especialidade;

l) justificativa de envio do material biológico e/ou dados obtidos para outras instituições, nacionais ou no exterior, com indicação clara do tipo de material e/ou dados, bem como a relação dos exames e testes a serem realizados. Esclarecer as razões pelas quais os exames ou testes não podem ser realizados no Brasil, quando for o caso; e

m) em projetos cooperativos internacionais, descrição das oportunidades de transferência de tecnologia.

V - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE):

V.1 - O TCLE deve ser elaborado de acordo com o disposto no capítulo IV da Resolução CNS No 196/96, com enfoque especial nos seguintes itens:

a) explicitação clara dos exames e testes que serão realizados, indicação dos genes/segmentos do DNA ou do RNA ou produtos gênicos que serão estudados e sua relação com eventual condição do sujeito da pesquisa;

b) garantia de sigilo, privacidade e, quando for o caso, anonimato;

c) plano de aconselhamento genético e acompanhamento clínico, com a indicação dos responsáveis, sem custos para os sujeitos da pesquisa;

d) tipo e grau de acesso aos resultados por parte do sujeito, com opção de tomar ou não conhecimento dessas informações;

e) no caso de armazenamento do material, a informação deve constar do TCLE, explicitando a possibilidade de ser usado em novo projeto de pesquisa. É indispensável que conste também que o sujeito será contatado para conceder ou não autorização para uso do material em futuros projetos e que quando não for possível, o fato será justificado perante o CEP. Explicitar também que o material somente será utilizado mediante aprovação do novo projeto pelo CEP e pela CONEP (quando for o caso);

f) informação quanto a medidas de proteção de dados individuais, resultados de exames e testes, bem como do prontuário, que somente serão acessíveis aos pesquisadores envolvidos e que não será permitido o acesso a terceiros (seguradoras, empregadores, supervisores hierárquicos etc.);

g) informação quanto a medidas de proteção contra qualquer tipo de discriminação e/ou estigmatização, individual ou coletiva; e

h) em investigações familiares deverá ser obtido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de cada indivíduo estudado.

#### VI - Operacionalização:

VI.1 - Cabe ao CEP, conforme o disposto no capítulo VII da Resolução CNS No 196/96, a análise dos projetos de pesquisa, assumindo co-responsabilidade no que diz respeito aos aspectos éticos.

VI.2 - Cabe ao CEP devolver de imediato ao pesquisador o protocolo que não contiver todas as informações relevantes (capítulo VI – Resolução CNS N° 196/96, assim como as referidas nos capítulos III e IV da presente Resolução).

VI.3 - Cabe à CONEP a aprovação final das pesquisas em genética humana que incluam:

a) envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético;

b) armazenamento de material biológico ou dados genéticos humanos no exterior e no País, quando de forma conveniada com instituições estrangeiras ou em instituições comerciais;

c) alterações da estrutura genética de células humanas para utilização *in vivo*;

d) pesquisas na área da genética da reprodução humana (reprogenética);

e) pesquisas em genética do comportamento; e

f) pesquisas em que esteja prevista a dissociação irreversível dos dados dos sujeitos de pesquisa.

VI.4 - Nos casos previstos no item VI.3 acima, o CEP deverá examinar o protocolo, elaborar o parecer consubstanciado e enviar ambos à CONEP com a documentação completa conforme a Resolução CNS No 196/96, itens VII.13.a e b e

VIII.4.c.1. O pesquisador deve ser informado que deverá aguardar o parecer da CONEP para início da execução do projeto.

VI.5 - Fica delegada ao CEP a aprovação final dos projetos de genética humana que não se enquadrem no item VI.3 acima. Nesses casos, o CEP deve enviar à CONEP a folha de rosto e o parecer consubstanciado final, seja de aprovação ou não aprovação.

VI.6 - A remessa de material para o exterior deve obedecer às disposições normativas e legais do País.

HUMBERTO COSTA

Presidente do Conselho Nacional de Saúde

Homologo a Resolução CNS No 340, de 8 de julho de 2004, nos termos do Decreto de Delegação de Competência de 12 de novembro de 1991.

HUMBERTO COSTA

Ministro de Estado da Saúde

## ANEXO VIII

### CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE

#### RESOLUÇÃO Nº 347, DE 13 DE JANEIRO DE 2005

O Plenário do Conselho Nacional de Saúde em sua Centésima Quinquagésima Reunião Ordinária, realizada nos dias 11, 12 e 13 de janeiro de 2005, no uso de suas competências regimentais e atribuições conferidas pela Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, e pela Lei nº 8.142, de 28 de dezembro de 1990, e considerando a necessidade de regulamentar o armazenamento e utilização de material biológico humano no âmbito de projetos de pesquisa

#### RESOLVE:

Aprovar as seguintes diretrizes para análise ética de projetos de pesquisa que envolva armazenamento de materiais ou uso de materiais armazenados em pesquisas anteriores:

1. Quando, em projetos de pesquisa, estiver previsto o armazenamento de materiais biológicos humanos para investigações futuras, além dos pontos previstos na Resolução CNS nº 196/96, devem ser apresentados:

1.1. Justificativa quanto a necessidade e oportunidade para usos futuros;

1.2. Consentimento dos sujeitos da pesquisa doadores do material biológico, autorizando a guarda do material;

1.3. Declaração de que toda nova pesquisa a ser feita com o material será submetida para aprovação do CEP da instituição e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa-CONEP;

1.4. Norma ou regulamento elaborado pela instituição depositária para armazenamento de materiais biológicos humanos.

2. O material biológico será armazenado sob a responsabilidade de instituição depositária, a qual deverá ter norma ou regulamento aprovado pelo CEP dessa instituição, que deverá incluir:

2.1. Definição dos responsáveis pela guarda e pela autorização de uso do material;

2.2. Mecanismos que garantam sigilo e respeito à confidencialidade (codificação);

2.3. Mecanismos que assegurem a possibilidade de contato com os doadores para fornecimento de informação de seu interesse (por exemplo, resultados de exames para acompanhamento clínico ou aconselhamento genético) ou para a obtenção de consentimento específico para uso em novo projeto de pesquisa;

3. O armazenamento poderá ser autorizado pelo período de 5 anos, quando houver aprovação do projeto pelo CEP e, quando for o caso, pela CONEP, podendo haver renovação mediante solicitação da instituição depositária, acompanhada de justificativa e relatório das atividades de pesquisa desenvolvidas com o material.

4. No caso de pesquisa envolvendo mais de uma instituição, deve haver acordo entre as instituições participantes, contemplando formas de operacionalização e de utilização do material armazenado.

5. No caso de armazenamento e/ou formação do banco de material biológico no Exterior, deve ser obedecida à legislação vigente para remessa de material para o Exterior e ser apresentado o regulamento para análise do CEP quanto ao atendimento dos requisitos do item II.

5.1. O pesquisador e instituição brasileiros deverão ser considerados como cotistas do banco, com direito de acesso ao mesmo para futuras pesquisas. Dessa forma, o material armazenado não poderá ser considerado como propriedade exclusiva de país ou instituição depositária.

#### 6. Sobre o uso de amostras armazenadas:

6.1. Amostras armazenadas podem ser usadas em novas pesquisas aprovadas pelo CEP e, quando for o caso, pela CONEP;

6.2. Os protocolos de pesquisa que pretendam utilizar material armazenado devem incluir:

a) Justificativa do uso do material;

b) Descrição da sistemática de coleta e armazenamento, com definição de data de início ou período;

c) Cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE obtido quando da pesquisa em que foi colhido o material, incluindo autorização de armazenamento e possível uso futuro, se o armazenamento ocorreu a partir de pesquisa aprovada depois da Resolução CNS nº 196/96; e

d) TCLE específico para nova pesquisa: em caso de impossibilidade da obtenção do consentimento específico para nova pesquisa (doador falecido, tentativas anteriores de contato sem sucesso ou outros) devem ser apresentadas as justificativas como parte do protocolo para apreciação do CEP, que dispensará ou não o consentimento individual.

6.3. No caso de material biológico para cujo armazenamento se dispõe de normas da ANVISA, as mesmas devem também ser observadas.

**HUMBERTO COSTA**

Presidente do Conselho Nacional de Saúde

Homologo a Resolução CNS Nº 347, de 13 de janeiro de 2005, nos termos do Decreto de Delegação de Competência de 12 de novembro de 1991.

**HUMBERTO COSTA**

Ministro de Estado da Saúde