

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM GENÉTICA
Dissertação de Mestrado

**MONITORAMENTO GENÉTICO RETROSPECTIVO DE
POPULAÇÃO OCUPACIONALMENTE EXPOSTA À RADIAÇÃO
IONIZANTE UTILIZANDO MARCADORES STR**

BRÁULIO CANÇADO FLORES

ORIENTADOR: Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz, Ph.D.

CO-ORIENTADORA: Profª. Drª. Daniela de Melo e Silva

Goiânia - Go

2008

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

**MONITORAMENTO GENÉTICO RETROSPECTIVO DE
POPULAÇÃO OCUPACIONALMENTE EXPOSTA À RADIAÇÃO
IONIZANTE UTILIZANDO MARCADORES STR**

BRÁULIO CANÇADO FLORES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Genética.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz, Ph.D.

CO-ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Daniela de Melo e Silva

Goiânia - Go

2008

Ficha Catalográfica

F634m Flores. Bráulio Cançado.
Monitoramento genético retrospectivo de população ocupacionalmente exposta à radiação ionizante utilizando marcadores STR / Bráulio Cançado Flores. – 2008.
108 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Católica de Goiás, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Mestrado em Genética, 2008.
“Orientador: Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz. Ph.D.”
“C-orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela de Melo e Silva”.

1. Radiação ionizante. 2. Microssatélites. 3. *Liquidators*.
4. Césio 137. 5. STR (Repetições Curtas em Tandem). 6. Genética. Título.

CDU: 572.224(043.3)

**BANCA EXAMINADORA DA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Aluno(a): Bráulio Cançado Flores

Orientador: Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz, Ph.D.

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela de Melo e Silva

Membros Externos:

Titular: Professor Dr. Barry W. Glickman

Suplente: Professor Dr. Wagner Gouvêa dos Santos

Membros Internos:

Titular: Professora Dra. Maria Paula Curado

Suplente: Professor Dr. Breno de Faria e Vasconcellos

Curso de Mestrado em Genética

Universidade Católica de Goiás

Data: 27/06/2008

Dedico este trabalho...

***Aos meus pais queridos e à
minha irmã pelo apoio e
incentivo que me propulsionam
todos os dias da minha vida e
me revitalizam ante todas as
dificuldades.***

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz, “Peixoto”, por acreditar que um bombeiro poderia transformar-se em geneticista, por ter se envolvido com a Defesa Civil, por ter sonhado muitos dos meus sonhos, consolado muitos dos meus sofrimentos e regozijado muito de minhas conquistas. Agradeço pela compreensão, pela amizade, pela cumplicidade, pela lealdade, pela competência e principalmente pela paciência em toda esta inusitada experiência de formação.

Ao Cel QOCBM Uilson Alcântara Manzan, por ter depositado confiança no oficial “maluco” que resolveu ser cientista e creditado a assinatura do Corpo de Bombeiros a essa investigação científica.

À Profª Drª. Daniela de Melo e Silva, por ter sido o anjo que a providência divina colocou em meu caminho para guiar-me pelas veredas da desconhecida investigação genética. Agradeço por ter iluminado minha busca e se disposto a enfrentar o desafio do aluno militar e sistemático que deveria se polir em cientista. Muito obrigado pelo companheirismo, pela disponibilidade e principalmente pelo seu maravilhoso exemplo.

Aos Coronéis Claiton Divino de Souza Coelho, Paulo Rocha Arantes e aos Tenentes Coronéis Ismael José de Siqueira, Edmar de Sousa Lima e Adenir José Ferreira de Jesus por terem acreditado que podíamos envolver a Defesa Civil com a Genética e que essa união seria salutar e edificante.

À Profª Angela Adamski da Silva Reis, M.Sc, por ter me aberto as portas de um mundo jamais sonhado e desejado por mim, por ter se configurado em mestre e amiga de muitas horas e, finalmente, por ter me apresentado a uma família que me satisfiz muito em escolher e da qual para sempre quero ser membro.

Aos colegas e amigos Maj QOC Sérgio Ribeiro Lopes, Cap QOC Pedro Carlos Borges de Lira e 1º Ten QOC Hélio Loyola Gonzaga Júnior pelo

incentivo e pelo conhecimento que compuseram minha formação de bombeiro e de defesa civil.

Às “minhas meninas”, Emília Oliveira Alves Costa, Luciana Abrahão Ramos e Marília Gomes Ismar, pela amizade, pelo envolvimento, pelo comprometimento, pela luz, pela vida e pela alegria que lhes são características e compuseram ícones essenciais que movimentaram o coração e o cérebro deste trabalho.

Aos Colegas do Replicon, em especial, Fabiano Ribeiro Borges, Eduardo Rocha Pedrosa, Julles Cristiane Rodrigues da Silva, Luciana Pinheiro Vaz e Raimundo da Silva Lima Júnior pelo auxílio na coleta das amostras e nos conhecimentos cotidianos tão importantes na formação de um novo membro do Núcleo.

Aos Oficiais e Praças do Corpo de Bombeiros Militar do Estado de Goiás que confiaram e apoiaram minha nova empreitada numa área, em princípio, estranha à nossa atividade.

Aos funcionários da Superintendência Leide das Neves Ferreira que aceitaram, se acostumaram e receberam muito bem mais um integrante da “família” SuLeide.

Aos professores dos Programas de Mestrado e Pós-graduação em Genética da Universidade Católica de Goiás, por auxiliar com seus conhecimentos e disponibilidade e pelo incentivo, constantemente presentes.

Aos amigos e colegas de mestrado, em especial, Priscilla Rosa Silva de Almeida e Ricardo Goulart Rodovalho, pela paciência, cumplicidade, amparo e incentivo tão importantes para que eu perseverasse na labuta diuturna em busca da conclusão desta obra.

Aos voluntários que participaram da pesquisa, muitas vezes superando seus traumas e preconceitos em prol do desenvolvimento científico e social.

Aos Funcionários da Universidade pela competência e carinho que dignificam nosso trabalho e o tornam mais prazeroso.

“Que você substitua a facilidade pelo esforço; que sempre encontre alegria ao escalar novas montanhas; que jamais descanse da sua busca pelo conhecimento; que deseje ser hoje um pouco mais do que foi ontem e um pouco menos do que será amanhã. Tudo isso fará de você um ser humano completo e lhe trará a verdadeira felicidade”.

Rabino Benjamin Blech – “Benção a um amigo”

Sumário

	Página
Figuras, Tabelas e anexos	9
Siglas, Símbolos e Abreviaturas	10
Resumo	11
Abstract	12
1. Introdução	13
1.1 O Atendimento à Ocorrência	14
1.2 Classificação do Desastre	16
2. Conhecimento Atual	18
2.1 Mutações	18
2.2 Repetições em Tandem	21
2.3 Radiação Ionizante	23
2.4 Os Trabalhadores do Acidente, ou <i>Liquidators</i>	25
3. Metodologia	27
3.1 Grupo Amostral	27
3.2 Extração e Quantificação das Amostras de DNA	29
3.3 Reações de PCR	29
3.4 Genotipagem dos Marcadores	30
3.5 Análise dos Dados Moleculares	31
3.6 Definição de Mutações Germinativas	34
3.7 Taxa de Mutação, Qui-quadrado e <i>Doublig Dose</i>	34
4. Resultados	36
5. Discussão	41
6. Conclusão	47
7. Referências Bibliográficas	49
8. Anexos	54

Figuras, Tabelas e Anexos

		Página
Figura 1	Exemplo de como se dispôs no software a representação dos tamanhos dos fragmentos para a análise de cada marcador. Neste caso, observamos os alelos paternos (6,9), os maternos (6,7) e os filiais (6,9), indicando a coincidência entre a geração parental e a filial.	32
Figura 2	Exemplo de como se dispôs no software a representação dos tamanhos dos fragmentos para a análise de cada marcador. Neste caso, observamos os alelos paternos (11,14), os maternos (12,13) e os filiais (10,13), indicando uma mutação de origem paterna (11→10).	33
Tabela 1	Tipos de mutação gênica e seus mecanismos de ocorrência	20
Tabela 2	Características dos 16 marcadores STR utilizados para genotipagem dos indivíduos ocupacionalmente expostos à radiação ionizante de césio-137 em Goiânia	30
Tabela 3	Dados gerais dos eventos mutacionais de cada <i>locus</i> STR no grupo ocupacionalmente exposto à radiação ionizante de césio-137 em Goiânia	38
Tabela 4	Características do grupo ocupacionalmente exposto à radiação ionizante de césio-137 em Goiânia	38
Tabela 5	Dados gerais dos eventos mutacionais de cada <i>locus</i> STR no grupo controle	39
Tabela 6	Características do grupo controle, de acordo com o <i>locus</i> mutado e a taxa de mutação/ <i>locus</i>	39
Anexo 1	Questionário aplicado aos potencialmente expostos	54
Anexo 2	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	62
Anexo 3	Resolução 340 CNS/MS	65
Anexo 4	Resolução 347 CNS/MS	76
Anexo 5	Protocolo de coleta de sangue	80
Anexo 6	Protocolo de Extração de DNA	82
Anexo 7	Protocolo de PCR e Eletroforese	85
Anexo 8	Artigo Submetido à Publicação	87
Anexo 9	Comprovantes de Recebimento da Revista Científica	108

Siglas, Símbolos e Abreviaturas

APAE	Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CODAR	Codificação Brasileira de Desastres, Ameaças e Riscos
DNA	Acido Desoxirribonucléico
EUA	Estados Unidos da América
IGR	Instituto Goiano de Radioterapia
LaGene	Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular
MI	Ministério da Integração Nacional
MD	Manual de Desastres – Desastres Humanos
MS	Ministério da Saúde
PNDC	Política Nacional de Defesa Civil
STR	Do Inglês, <i>Short Tandem Repeats</i> (Repetições Curtas em Tandem)
SULEIDE	Superintendência Leide das Neves Ferreira

RESUMO

O acidente radiológico mais grave do ocidente aconteceu em setembro de 1987, quando um aparelho de radioterapia contendo 50.9 TBq de Cs¹³⁷Cl foi removida das ruínas de uma clínica de radioterapia e em seguida, violada. Este acontecimento criou a oportunidade de que se investigasse os efeitos genéticos da radiação ionizante. Foi investigada a variabilidade genética em 12 *loci* microssatélites em 11 famílias de *liquidators*, que trabalharam nas ações de defesa civil. Como grupo controle, utilizamos famílias sem potencial de exposição à radiação ionizante, perfazendo 900 indivíduos analisados, da mesma área do Estado de Goiás. Quando comparamos os grupos exposto e controle, encontramos um incremento no número de novos alelos nos perfis dos *liquidators* expostos. A taxa de mutação encontrada foi maior nas famílias dos expostos do que no grupo controle. Estes resultados, associados a anteriores, indicaram que a análise dos perfis alélicos dos *liquidators* pode indicar a exposição à radiação ionizante, além de uma elevada taxa de mutações de microssatélites poder ser atribuída a esta exposição

Palavras – chave: Radiação Ionizante, Microssatélites, *Liquidators*, Césio – 137, STR, Goiânia.

ABSTRACT

The most serious radiological accident occurred in the western hemisphere and it happened in September of 1987, when a radiotherapy unit containing 50.9 TBq of Cs¹³⁷Cl was removed from an abandoned radiotherapy clinic in the State of Goias, Brazil and it was subsequently disassembled. This event provides an opportunity to assess the genetic effects of ionizing radiation. We investigated the genetic variation of 12 microsatellite *loci* in 11 families of exposed liquidators, who worked at the civil defense procedures. As a control group, non-exposed families, comprised of 900 individuals, from the same area of Goias state were analyzed. When we compared the exposed and control groups, we found an increase in the number of new alleles in the offspring of the exposed liquidators. The mutation rate was found to be higher in the exposed families compared to the control group. These results, associated with previous studies, indicated that exposure to ionizing radiation can be detected in offspring of exposed liquidators and also suggest that the elevated microsatellite mutation rate can be attributed to radioactive exposure.

Keywords: Ionizing Radiation, Microsatellite, Liquidators, Cesium – 137, STR, Goiania.

1. INTRODUÇÃO

O uso freqüente de fontes de radiação na medicina, na indústria e nas usinas nucleares cria possibilidades de acidentes radioativos. Por outro lado, a contribuição político-social e econômica do uso deste recurso de energia é imensurável. Conseqüentemente o uso dos recursos radioativos, assim como os acidentes decorrentes desta fonte de energia, tem recebido grande atenção por parte da população. Entretanto, os cuidados básicos de radioproteção, prevenção e controle de exposição às radiações, só há pouco tempo, passaram a ser valorizados no território nacional, motivados, em parte, pelo acidente radiológico ocorrido em Goiânia no ano de 1987 (da Silva, 2000).

Os acidentes radioativos podem envolver desde indivíduos isolados até comunidades inteiras. O efeito agudo da exposição humana à radiação ionizante pode não ser a morte celular, mas uma alteração permanente no DNA e, assim, a célula passa a sobreviver com erros incorporados ao seu genoma. Neste contexto, os efeitos genéticos da exposição podem perdurar por várias gerações (da Cruz, 1997). Além dos conseqüentes efeitos físicos na população exposta, a exposição individual à radiação resulta em agravos emocionais, promovendo um incremento da ocorrência de doenças psicológicas e elevação do nível de estresse dos indivíduos envolvidos no evento (Miranda *et al*, 2005, Koscheyev *et al*, 1993).

Os efeitos biológicos da exposição aguda à radiação incluem queimaduras e danos à pele. Já os efeitos da exposição crônica incluem danos ao DNA, que podem resultar em doenças genéticas como o câncer (Brenner *et al*, 2003, Montelone, 1998, da Cruz *et al*, 1997). As radiações ionizantes são

exemplos de agentes físicos mutagênicos que podem levar também ao comprometimento dos mecanismos de reparo celular (Eot-Houllier, 2005) e ao desenvolvimento de diversos tipos de câncer que variam de acordo com a intensidade, local e tempo de exposição e tipo de radionuclídeo (Ward, 2002, Goldman, 1982).

A assistência às populações vitimadas por desastres compreende as atividades logísticas, assistenciais e de promoção à saúde. As necessidades de pronta resposta exigem um planejamento circunstanciado. Adicionalmente, é de fundamental importância elaborar um programa minucioso que envolve preparação dos órgãos locais de defesa civil. Nas situações de desastres que envolvem agentes potencialmente genotóxicos é relevante conhecer os efeitos genéticos e os riscos populacionais deste tipo de acidente, sobretudo para que sejam propostas ferramentas e protocolos utilizados em planejamento de contingência, que correspondem a táticas elaboradas a partir de uma hipótese de desastre para reduzir o risco relativo das populações (BRASIL, 2008).

1.1 O ATENDIMENTO À OCORRÊNCIA

Em setembro de 1987, ocorreu no Brasil, na cidade de Goiânia, capital do Estado de Goiás, a maior ocorrência envolvendo produtos radioativos do país. O acidente foi causado pela ruptura de uma cápsula de césio – 137, por pessoas leigas, que desconheciam a natureza do objeto e os riscos associados à exposição humana a elementos radioativos. Após as medidas emergenciais de controle e contenção do acidente e identificação dos indivíduos rádio - acidentados, foram consideradas expostas à radiação 249 pessoas, além de

toda população da cidade ter sido afetada pelo desastre. Dos expostos, 14 indivíduos tiveram contaminação interna comprovada e exibiam danos graves à saúde e, portanto, foram encaminhados à unidade especializada de tratamento no Rio de Janeiro (BRASIL, 2004).

Além do envolvimento da população de uma forma geral, os trabalhadores de defesa civil¹ foram acionados para iniciar os trabalhos de atendimento ao desastre que, em princípio, tratava-se de possível “vazamento de gás tóxico”. Naturalmente, a preocupação principal dos trabalhadores enviados aos locais do acidente foi com o que respiravam, e não com potencial exposição de corpo inteiro à radiação ionizante, situação que só seria identificada cerca de 13 dias depois da remoção do cabeçote de blindagem das antigas premissas do Instituto Goiano de Radioterapia – IGR (Cavalcante *apud* GOIÁS, 2002).

Mesmo depois de identificada a natureza do acidente, que envolvia radiação ionizante e o risco de exposição ocupacional, os membros do Corpo de Bombeiros e da Polícia Militar permaneceram no local cumprindo suas atividades laborais. Durante a jornada de trabalho, executavam atividades de lavagem de asfalto e remoção de rejeitos, cuidavam da segurança dos locais atingidos e isolados pela equipe da Comissão Nacional e Energia Nuclear, que também foi envolvida no atendimento emergencial e nos cuidados iniciais com a saúde da população e dos ambientes (GOIÁS, 2002).

¹No presente contexto, defesa civil deve ser compreendida como o conjunto de ações preventivas, de socorro, assistenciais e reconstrutivas destinadas a evitar ou minimizar desastres, preservar a moral da população e restabelecer a normalidade social (BRASIL, 2008).

1.2 CLASSIFICAÇÃO DO ACIDENTE

A Codificação Brasileira de Desastres, Ameaças e Riscos (CODAR) definiu o acidente ocorrido como sendo integrante da categoria de desastres humanos de natureza tecnológica. A categoria inclui acidentes que ocorreram em consequência indesejável do desenvolvimento econômico, tecnológico e industrial, que podem ser reduzidos em função do incremento de medidas preventivas relacionadas, principalmente, com a segurança industrial. Os desastres desta natureza também estão ligados ao incremento das trocas comerciais, do tráfego de cargas perigosas e com o surto de crescimento demográfico das cidades sem um desenvolvimento compatível e adequado da estrutura de serviços essenciais (BRASIL, 2004).

Desastres humanos, de natureza tecnológica e relacionados com produtos perigosos são mais comuns durante o transporte destes produtos, nas plantas e distritos industriais, em instalações de mineração e campos de petróleo e em parques e depósitos em consequência, muitas vezes, do uso ou armazenamento irresponsável dos produtos. Ainda que sejam mais freqüentes nos países desenvolvidos, a ocorrência dos desastres tecnológicos costuma provocar maiores danos nos países em desenvolvimento, em função da maior vulnerabilidade tecnológica, econômica e sócio-cultural, uma vez que, na medida em que a sociedade melhora o seu senso de percepção de risco, desenvolve um padrão de exigência mais acentuado e o governo é induzido a priorizar seus deveres com relação à segurança global da população (BRASIL, 2004).

A capacidade que a sociedade tem de assimilar e os recursos que tem para reagir a desastres com produtos perigosos devem ser observados e levados em consideração numa tentativa de reduzir a vulnerabilidade social aos desastres com produtos radioativos. Assim, os órgãos envolvidos com atividades locais de defesa civil promoveriam a segurança contra este tipo de desastre, além de conduzir auditorias periódicas para se determinar a viabilidade dos procedimentos e garantir a confiabilidade à população sobre qualquer empreendimento que ofereça riscos ao cotidiano das pessoas e comunidades envolvidas (Castro, 2005).

Mais especificamente, o acidente com o cloreto de cério-137, ocorrido em 1987 em Goiânia, 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, 2008). Durante um acidente que envolva risco de exposição ocupacional à radiação os trabalhadores da segurança pública podem receber altas doses de radiação, principalmente quando não se conhece a natureza do material (Scott, 2005). No episódio goiano, o Governo do Estado de Goiás entendeu, na Lei 14.226/2002, que o pessoal envolvido em defesa civil durante o acidente deveria ser assistido.

2. CONHECIMENTO ATUAL

2.1 MUTAÇÕES

Ao longo da vida do ser humano o ácido desoxirribonucléico (DNA) pode, espontaneamente, sofrer mutações, causadas por erros durante a replicação na divisão celular (Ribeiro e Marques, 2003). As mutações ocorrem devido a uma alteração gênica ou cromossômica que pode acarretar mudança fenotípica trazendo consigo aspectos favoráveis ou desfavoráveis em função do ambiente em que foram introduzidas (Westman, 2006).

O estudo de mutações pode levar a compreensão de diversos processos biológicos e permitem ainda a compreensão destas alterações no material herdável das espécies como sendo a principal componente da variabilidade genética configurando um combustível da evolução (Lewin, 2001). Nos organismos multicelulares as mutações são divididas em somáticas e germinativas. As somáticas são as que ocorrem em células do corpo humano e podem afetar seu portador, entretanto não serão transmitidas à prole, característica fundamental na diferenciação das mutações germinativas, que necessariamente são caracteres transmitidos à geração filial e que nem sempre apresenta sinais nos portadores (Segal *et al*, 2001).

Mutações cromossômicas envolvem alteração na morfofisiologia dos cromossomos. Podem afetar desde uma determinada região até um cromossomo inteiro e traduzem-se em alterações estruturais, englobando as translocações, deleções e inversões, ou numéricas, como é o caso das euploidias e aneuploidias (Watson *et al*, 2007). Até hoje, constituem a principal

ferramenta de investigação genética de biodosimetria em monitoramentos retrospectivos de acidentes que envolvem radiação ionizante (da Silva, 2000)

Mutações gênicas, como as descritas na tabela I, são alterações nas seqüências de nucleotídeos do DNA e ocorrem devido à mudança de uma ou mais bases nitrogenadas. Na espécie humana, são fundamentalmente importantes por dois motivos: primeiro, são responsáveis pelas desordens herdáveis e outras doenças como o câncer, que envolve alterações nos genes e, segundo, são fontes de variações fenotípicas relacionadas à seleção natural e à evolução (Watson *et al*, 2007).

Tabela 1 – Tipos de mutação gênica e seus mecanismos de ocorrência.

Tipo de Mutação	Categoria da Mutação	Mecanismo
Estrutural	Substituição	Uma base é trocada por outra
	Inserção	Uma ou mais bases são inseridas além da seqüência original
	Deleção	Uma ou mais bases são removidas da seqüência original
Funcional	<i>Non-sense</i>	No ponto da mutação, o códon é substituído por um códon de parada
	<i>Sense</i>	A substituição de bases não acarreta em mudança do aminoácido
	<i>Missense</i>	A substituição de bases acarreta em mudança do aminoácido

Fonte: Watson *et al*, 2007

Segundo suas origens, as mutações podem ser espontâneas, sendo a freqüência na qual elas ocorrem característica para cada organismo, ou ainda induzidas, ocasionadas pela exposição do genoma aos agentes mutagênicos. A mutagenicidade de um agente químico, físico ou biológico pode ser avaliada de acordo com o aumento da freqüência de mutações induzidas em relação à freqüência de mutações em nível basal (Westman, 2006).

Exemplos típicos de exposições mutagênicas são aquelas em que o indivíduo é submetido a agentes químicos, luz ultravioleta ou radiação ionizante. Esta exposição pode levar erros no DNA que ativarão os mecanismos de reparo celular e poderão conduzir a célula à correção destas alterações, à sobrevivência com erros incorporados ou à apoptose (Griffiths *et al.*, 2001).

A análise de alterações no material genético, em especial a quantificação da frequência de aberrações cromossômicas, micronúcleos, é particularmente útil quando existem dificuldades na interpretação retrospectiva de dados relativos à exposição individual, quando o indivíduo não possui um histórico dosimétrico ou mesmo nas suspeitas de exposição acidental à radiação (da Silva, 2000).

As informações de biomonitoramento podem indicar a possibilidade ou suspeita da exposição a agentes genotóxicos podendo até, com o uso de técnicas apropriadas, estimarem a magnitude do evento. A dosimetria biológica usando marcadores é uma importante ferramenta na proteção radiológica, bem como na indicação de exposição à radiação (da Cruz *et al.*, 1995).

2.2 REPETIÇÕES EM *TANDEM*²

O Genoma humano é dividido dois grandes grupos. O primeiro é o grupo dos genes e seqüências relacionadas, que ocupam aproximadamente a quarta parte de todo o genoma e compreendem DNA codificante e DNA não codificante. O DNA codificante são as seqüências que são traduzidas em proteínas e itens constitutivos e metabólicos, já os não codificantes são os íntrons, pseudogenes e seqüências não traduzidas. O segundo grupo é constituído pelo DNA extragênico, que corresponde a todo o restante do genoma e está distribuído em seqüências de cópia única, moderada e altamente repetitiva. Entre as sequencias de aparições moderadas e altamente repetitivas estão os elementos genéticos de transposição, ou *transposons*, o DNA espaçador, os minissatélites e os microssatélites, também chamados STR, do inglês *short tandem repeats*, ou repetições curtas em tandem (Snustad e Simmons, 2008)

As repetições em tandem são cópias aleatórias de seqüências de DNA, altamente variáveis, distribuídas ao acaso em todo genoma. Correspondem a várias seqüências com tamanhos diferentes e que se repetem em blocos (Ellegren, 2000b).

Embora existam muitas seqüências em tandem constituintes de genes, a maior parte não se caracteriza como codificante. As repetições em tandem são excelentes marcadores genômicos pelo conhecimento dos já mapeados e por suas inúmeras aparições (Nakamura *et al*, 1987). Os minissatélites e

² Repetições em *tandem* são seqüências altamente variáveis de nucleotídeos encontradas na maior parte dos eucariotos. Em humanos, a variabilidade destes fragmentos pode determinar o vínculo genético, além de possuir outras utilizações particulares na medicina forense e legal (Nikiforov *et al.*, 1998).

microssatélites (STR) são repetições menores que permitem, inclusive, diferenciar pessoas (Watson *et al*, 2007) num mecanismo de avaliação que aproxima o número de repetições de um determinado cerne de pais e filhos possibilitando o estabelecimento de vínculo genético. Mutações nessas regiões acontecem principalmente por *slippage* da polimerase, um mecanismo no qual é inserido ou diminuído o número de repetições, que registra novos valores nos filhos, muito próximos dos alelos paternos (Ellegren, 2000a). Recentemente, a frequência de mutações germinativas em STR tem sido usada para determinar a exposição de indivíduos à radiação ionizante (da Cruz *et al*, 2008, Dubrova, 2003b), visto que as regiões de repetições em tandem têm alta sensibilidade para sofrer mutações causadas pela exposição à radiação (Jeffreys *et al*, 2005, Jeffreys, 1997).

Num primeiro momento, a análise de *loci* STR foi realizada em ratos para determinar a associação entre exposição à radiação e taxas de mutação, já num estágio posterior e como método consolidado, atualmente serve para, inclusive, se estabelecer o risco genético da exposição à radiação, seja ela aguda, crônica ou ocupacional. A observação de alelos de STR pode ser uma estratégia eficiente de monitoramento de mutações radio-induzidas na linhagem germinativa dos indivíduos expostos (Dubrova, 2003a).

Em termos práticos, a instabilidade de microssatélites foi observada em casos de tumores de tireóide ocorridos na linhagem germinativa de pessoas que trabalharam durante o acidente com a usina nuclear em Chernobyl em 1986 (Nikiforov *et al*, 1998).

Os dados obtidos com avaliação de repetições de DNA em tandem mostraram-se muito úteis no monitoramento genético de mutações rádio

induzidas em humanos. Em populações da extinta União Soviética, foram encontradas taxas particulares de mutações nas famílias dos expostos (Furitsu *et al*, 2005, Dubrova, 2003b), mais tarde, foram utilizados com o mesmo êxito em famílias expostas à radiação ionizante do céscio-137 em Goiânia, no Brasil (da Cruz *et al*, 2008).

2.3 RADIAÇÃO IONIZANTE

As radiações ionizantes são exemplos de agentes físicos mutagênicos que podem levar ao comprometimento dos mecanismos de reparo celular (Eot-Houllier, 2005) e ao desenvolvimento de diversos tipos de câncer, incluindo os tumores de tireóide, pulmão, mama e os tumores hematopoiéticos (Ward, 2002, Goldman, 1982).

Os efeitos biológicos da exposição à radiação ionizante não dependem do isótopo radioativo ao qual foi exposto o indivíduo, mas da dose absorvida pelos tecidos, a quantidade recebida e a distribuição espacial da energia transferida (Svensson, 1988). São conhecidos dois tipos de efeitos principais da exposição à radiação: Os efeitos determinísticos, associados à morte celular, como as queimaduras por radiação e os efeitos estocásticos, associados à modificação celular, dentre elas o câncer e outras desordens genéticas (Flakus, 1995).

A exposição à radiação ionizante pode induzir a diferentes formas de instabilidade genômica, sendo estas mutações consideradas um potencial marcador para distinguir os efeitos tardios da exposição à radiação (Nikiforov *et al*, 1998). Num período embrionário, a exposição a agentes mutagênicos

podem levar a uma apresentação tardia de danos a saúde do indivíduo. Particularmente, as mutações em células germinativas podem manifestar-se apresentando doenças, deficiências e inclusive a morte (Aizawa *et al*, 2007).

O DNA, a exemplo de algumas moléculas, pode existir em pequenas quantidades nas células, às vezes até como cópia única, e sua integridade depende da manutenção dos processos metabólicos, da possibilidade de divisão celular e da preservação da informação genética. Já moléculas como a água, aparecem em quantidades bastante elevadas, representando até 70% da massa celular (da Silva, 2000).

A Radiação Ionizante pode transferir sua energia diretamente para o DNA, de forma a modificar sua estrutura, o que caracteriza o efeito direto da radiação sobre o DNA. Em outros casos, a energia da Radiação é transmitida a moléculas intermediárias da célula, na maioria das vezes, para moléculas de água, causando um fenômeno de rádio-hidrólise³. Nesse caso, o dano à molécula de DNA corresponde ao efeito indireto das radiações ionizantes (Leitão *et al.*, 1994).

A radiação gama de césio-137 é um exemplo de radiação ionizante freqüentemente usada em aparelhos de radiodiagnóstico. A maioria dos desastres e acidentes provocados por equipamentos de radiologia relaciona-se com erros humanos e com o descumprimento de normas de segurança nacionais e internacionais estabelecidas por instituições reguladoras do uso da radiação (BRASIL, 2004).

³ O fenômeno de rádio-hidrólise, neste contexto, ocorre quando a liberação da energia da radiação quebra as moléculas de água presentes na célula, que forma produtos H⁺ e OH⁻ altamente reativos que se ligam deliberadamente à molécula de DNA provocando alterações na sua estrutura (da Silva, 2000).

2.4 OS TRABALHADORES DO ACIDENTE, OS *LIQUIDATORS*

O desastre na Usina Nuclear de Chernobyl, ocorrido em 1986, foi acompanhado de uma disseminação grande de radioisótopos na atmosfera da região. Em consequência, regiões da Ucrânia, Bielorrússia e da Federação Russa foram exponencialmente contaminadas. As pessoas que moravam, freqüentavam e trabalhavam nestas regiões foram as mais atingidas. Estudos que compararam geneticamente as pessoas expostas a outras aparentemente não irradiadas encontraram diferença significativa de alelos mutantes induzidos pela exposição individual à radiação ionizante (Livshits *et al*, 2001). Nikiforov e colaboradores (1998) descreveram a elevação na taxa de mutações de DNA satélite da linhagem germinativa, observada nos filhos das pessoas que vivam nas áreas próximas à Usina Nuclear e dos próprios trabalhadores que ajudaram nas ações pós-desastre.

Os trabalhadores envolvidos no controle e contenção do acidente de Chernobyl, chamados *liquidators*⁴, apresentaram uma maior incidência de alterações no DNA. No período que se seguiu ao acidente na Ucrânia, várias pessoas foram expostas a diferentes doses de radiação (Fischbein *et al*, 1997). De acordo com a gravidade da exposição individual, as pessoas foram divididas em quatro grandes grupos e, um deles, contemplou os *liquidators* que, incluía os trabalhadores que, de fato, auxiliaram na limpeza do local do desastre e empenharam-se no restabelecimento dos serviços do local. Estes trabalhadores tiveram uma exposição particular à radiação dado que

⁴ *Liquidators* foi o nome dado aos trabalhadores empregados nas ações de defesa civil, segurança, limpeza, obras e infra-estrutura durante e após o acidente radioativo que envolveu a explosão de um reator na Usina Nuclear de Chernobyl (Weinberg *et al*, 2001, Livshits *et al*, 2001).

trabalharam no isolamento, na confecção do “sarcófago” de concreto para o reator danificado e na limpeza da área da usina, basicamente (Ivanov *et al*, 2004, Cristofaro *et al*, 2005).

Em Goiânia, em 1987, de modo semelhante à Chernobyl, um grupo de trabalhadores de defesa civil atuou na assistência à população, na descontaminação dos locais sinistrados e na escolta e guarda de rejeitos do acidente radioativo com o céσιο-137. Os trabalhadores goianos foram reconhecidos como ocupacionalmente expostos à radiação ionizante. O grupo foi constituído, entre outros profissionais, de bombeiros e policiais militares que atuaram nas diversas atividades durante e após a deflagração do acidente (GOIÁS, 2002).

3. METODOLOGIA

3.1 GRUPO AMOSTRAL

Foram elaborados questionários (Anexo 1) e procedimentos de investigação com o objetivo de avaliar retrospectivamente a exposição potencial dos trabalhadores de defesa civil à radiação ionizante de césio-137 durante o acidente radiológico de Goiânia. Os questionários incluíam os termos de consentimento livre e informado que foram assinados por todos os participantes do estudo (Anexo 2).

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.

Para o presente estudo, foram levantados os nomes dos 187 policiais militares e 17 bombeiros militares que constam da Lei Estadual 14.226/2002⁵ e dos 208 policiais e 158 bombeiros militares constantes de sindicâncias de suas respectivas corporações que visam apurar os envolvidos nas ações de defesa civil durante o acidente radiológico. Destes 570 militares, foram contatados 98

⁵ A Lei Estadual n. 14.226 de 08 de julho de 2002, publicada no Diário Oficial do Estado n. 18.952 de 19 de julho de 2002, requisita 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.

que se fizeram presentes na primeira reunião da Associação dos Militares Vítimas do Acidente do Césio – 137, ocorrida em maio de 2007.

Dos contatados, fizeram adesão voluntária ao estudo 22 militares, que tiveram filhos nascidos após o acidente. Dos participantes voluntários, 11 formaram o grupo amostral final analisado neste estudo, uma vez que não foi possível, devido a problemas nas amostras, analisar todos os casos. Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), 10 mL de sangue periférico dos militares, de suas esposas e de pelo menos um de seus filhos biológicos foram coletados por venipunção em tubos heparinizados. O material biológico foi fracionado em hemácias, plasma e creme leucocitário, armazenado entre -20°C e -86°C. O creme leucocitário foi usado, subseqüentemente, para a extração e o isolamento do DNA genômico. Os estudos foram conduzidos nos termos das Resoluções 340/2004 – CNS/MS e 347/2005 – CNS/MS (Anexos 3 e 4).

O grupo controle foi constituído de 900 casos de estudos de vínculo genético, para os quais foram analisadas 12 *loci* STR por indivíduo, perfazendo um total de 21.600 alelos pesquisados (900 indivíduos x 12 *loci* x 2 alelos por *locus* em indivíduos diplóides). Todos os controles foram avaliados entre os anos de 1998 a 2005. Os estudos de vínculo genético entre as famílias do grupo controle foram realizados nos laboratórios da Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE), de Anápolis/GO, no Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular (LaGene) da Secretaria da Saúde do Estado de Goiás, em Goiânia, e no *Genetics Center* Ltda, totalizando 800, 45 e 55 casos, respectivamente. Dos participantes foram coletados, por venipunção, 5mL de sangue heparinizado por indivíduo.

3.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE DNA

O DNA genômico foi purificado a partir de 350 μL de creme leucocitário utilizando-se um *kit* comercial de extração de DNA (*Easy® DNA Purification Kit*, Invitrogen, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de DNA existente em cada amostra foi quantificada por análise comparativa em géis de agarose a 1%, corados com brometo de etídio a 10ng/ μL e comparada com o marcador de peso molecular *Low DNA Mass®* (Invitrogen, EUA).

3.3 REAÇÕES DE PCR

As reações de amplificação foram realizadas para um volume final de 12,5 μL de solução contendo 100 ng de DNA, tampão da enzima livre de magnésio 10x, 10 ng de solução contendo 16 oligonucleotídeos fluorescentes marcados com os fluoróforos FAN, HEX e NED (Tabela 2) e 0,5 U de Taq DNA polimerase. O termociclador DNA IQ 5® (Biorad, EUA) foi utilizado nas reações de amplificação, sendo programado para realizar as seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial de 11 minutos a 95°C e posteriormente de 2 minutos a 96°C; 10 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C e 1 minuto e 30 segundos a 70°C cada; seguidos de 22 ciclos de 1 minuto a 90°C, 1 minuto a 60°C e 1 minuto e 30 segundos a 70°C e finalmente, extensão final de 30 minutos a 60°C .

Tabela 2 – Características dos 16 marcadores STR utilizados para genotipagem dos indivíduos ocupacionalmente expostos à radiação ionizante de céσιο-137 em Goiânia.

Locus STR	Localização Cromossômica	Seqüência repetitiva (5'→3')
Penta E	15q	AAAGA
D18S51	18q21.3	AGAA (21)
D21S11	21q11 - 21q21	TCTA Complexo (21)
TH01	11p15.5	AATG (21)
D3S1358	3p	TCTA Complexo
FGA	4q28	TTTC Complexo (21)
TPOX	2p23 - 2pter	AATG
D8S1179	8q	TCTA Complexo (21)
vWA	12p12 - pter	TCTA Complexo (21)
Amelogenin2	Xp22.1 - 22.3 e Y	Não se Aplica
Penta D	21q	AAAGA
CSF1PO	5q33.3 - 34	AGAT
D16S539	16q24 - qter	GATA
D7S820	7q11.21 - 22	GATA
D13S317	13q22 - q31	TATC
D5S818	5q23.3 - 32	AGAT

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

3.4 GENOTIPAGEM DOS MARCADORES

Para a leitura dos produtos de PCR foi utilizado o seqüenciador automático de DNA MEGABACE 1000® (Amersham Pharmacia Biotech, EUA). Para tanto, 2 µL de cada produto de PCR foi diluído em 8 µL de uma solução contendo 7,75 µL de solução de Tween 20 a 0,1% e 0,25 µL de ET-ROX® GE HealthCare. Esse último reagente corresponde a um padrão de peso molecular usado para alinhar as diferentes corridas nos diversos capilares. Após esse procedimento, as amostras diluídas foram desnaturadas mediante aquecimento a 95°C durante 5 minutos, sendo logo em seguida colocadas em gelo, para a manutenção da desnaturação das fitas duplas de DNA. Os parâmetros de

corrida do seqüenciador utilizados para injetar os fragmentos de PCR foram os 3kV / 80 segundos e 9kV / 75 minutos.

3.5 ANÁLISE DOS DADOS MOLECULARES

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

Inicialmente, foi selecionado o procedimento para a genotipagem (*Binning_AdvMicrosat_PeakPostProcessor*), que torna o software aplicável ao protocolo utilizado. Em seguida, um filtro para a definição do padrão foi importado, visando estabelecer um referencial de leitura por peso molecular (*PowerPlex16bio_ET550.peakfilter.xml*), ou seja, definir o que o programa entenderia ser os tamanhos referência para a leitura das concentrações colocadas como amostra. Para realizar as análises das amostras, os picos dos fragmentos do marcador ET-ROX® GE HealthCare (*ET-550 Size Standard*) foram selecionados e utilizados como parâmetros para cada leitura.

Em seguida, as amostras foram exibidas com o auxílio de eletroferogramas, e os alelos amplificados ficaram dispostos em formas de picos.

Os perfis alélicos dos fragmentos analisados, contendo seus respectivos pesos moleculares, foram representados em forma de picos, que uma vez alinhados, eram comparados em cada família e, uma vez estabelecidos o

índice de paternidade de, no mínimo 99,99%, foi investigada a presença de possíveis mutações germinativas.

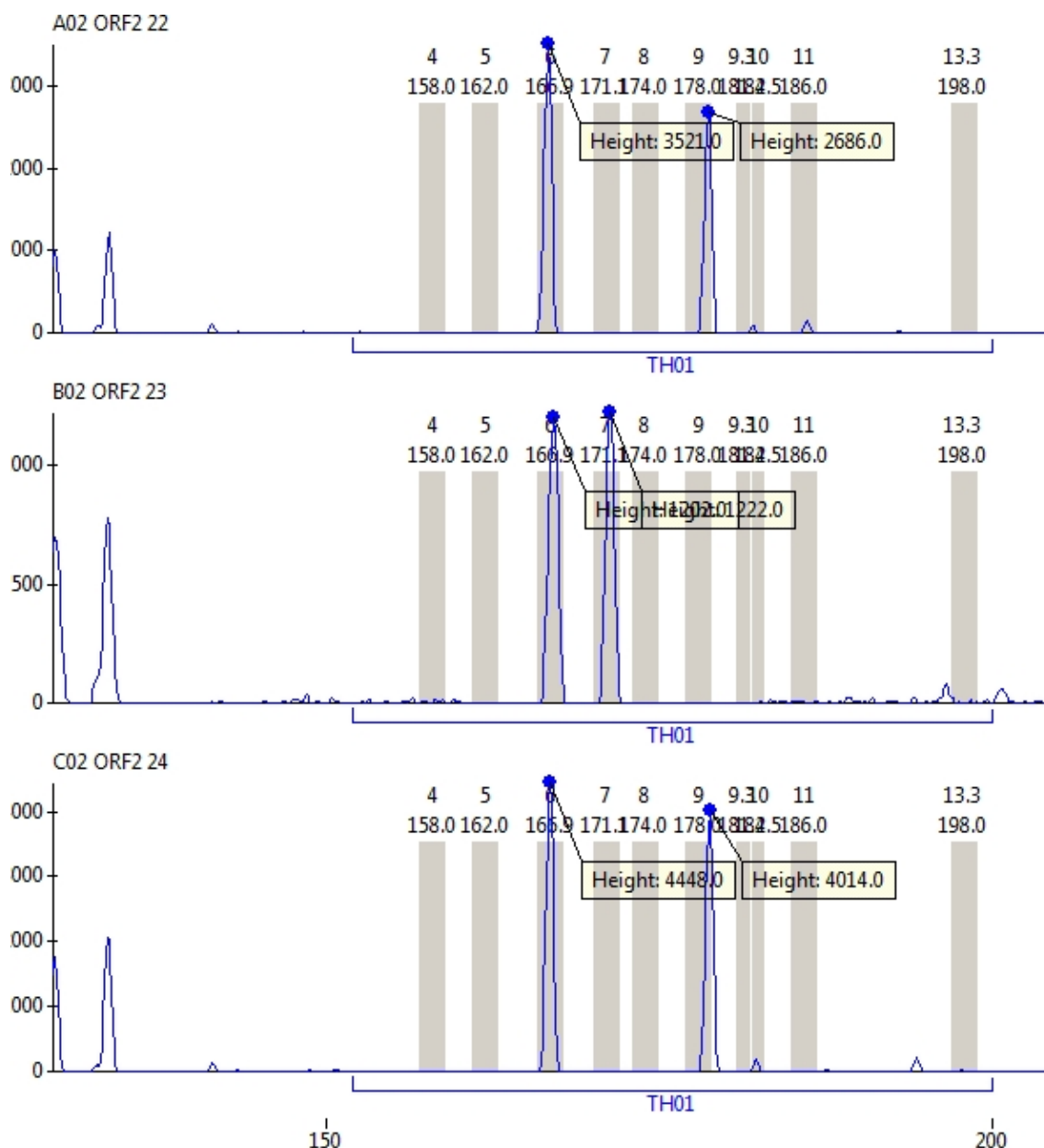


Figura 1 – Exemplo de como se dispôs no software a representação dos tamanhos dos fragmentos para a análise de cada marcador. Neste caso, observamos os alelos paternos (6,9), os maternos (6,7) e os filiais (6,9), indicando a coincidência entre a geração parental e a filial.

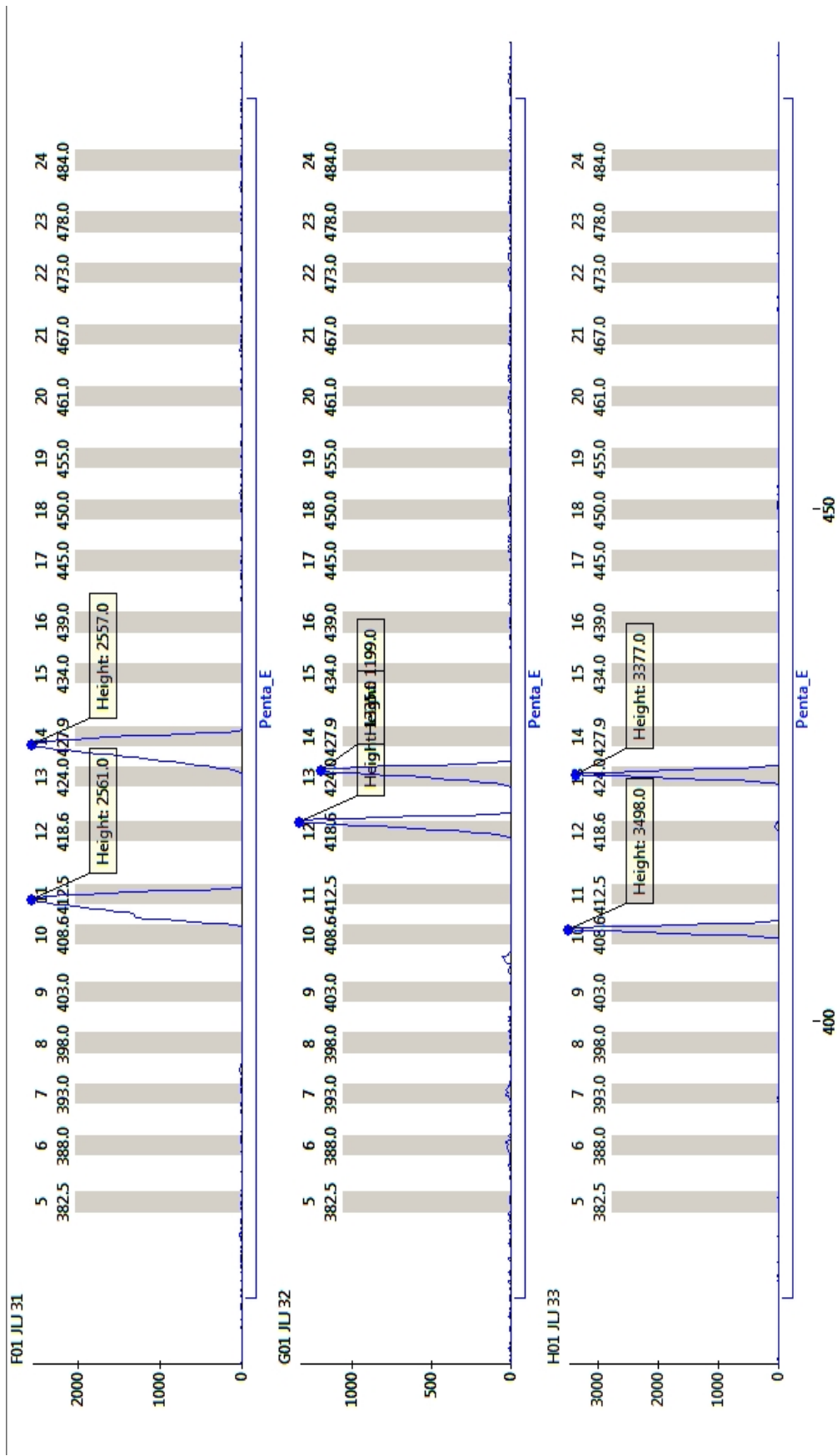


Figura 2 – Exemplo de como se dispôs no software a representação dos tamanhos dos fragmentos para a análise de cada marcador. Neste caso, observamos os alelos paternos (11,14), os maternos (12,13) e os filiais (10,13), indicando uma mutação de origem paterna (11→10).

3.6 DEFINIÇÃO DE MUTAÇÕES GERMINATIVAS

Para analisar possíveis mutações germinativas e inferir se a exposição ocupacional ao céσιο-137 ocasionou mudanças nos tamanhos dos cernes de repetição dos *loci* de microssatélite, famílias compostas por pai-mãe e filho tiveram seus perfis alélicos comparados. Uma variante em uma criança que não era observada em ambos os pais biológicos foi considerada como uma mutação germinativa *de novo*. Como sugerido por Dubrova *et al.* 2006, o alelo considerado como o do progenitor, foi o que apresentou o tamanho, em pares de base, mais próximo ao do alelo mutante.

3.7 TAXA DE MUTAÇÃO, QUI-QUADRADO E *DOUBLING DOSE*

Para confrontar os dados das mutações encontradas no grupo exposto, foi preciso calcular a taxa de mutação nos *loci* específicos. A taxa de mutação foi obtida com a razão entre o número de mutações encontradas na geração seguinte e o número total de alelos analisados na geração parental, pois o quantitativo de mutações nos filhos dos expostos refere-se àquele número que não coincidiu com o ponto de partida, ou seja, o genoma parental.

Para se avaliar o risco potencial da exposição ao céσιο-137, a dose dupla foi avaliada. Esta dose é definida como a quantidade de radiação necessária para se produzir um número significativo de mutações, como as que ocorrem em uma geração, resultado de mutações espontâneas. Esta dose pode ser calculada pela razão entre as taxas de mutações espontâneas e

induzidas em um set de *loci* gênicos definido, a partir de uma quantidade estimada de radiação (Sankaranarayanan e Chakraborty, 2000).

Testes do qui-quadrado (BioEstat 3.0) foram realizados visando avaliar possíveis diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$), entre os grupos exposto e controle tomando-se como esperado o grupo controle e como observado o grupo exposto, relacionadas ao número de mutações germinativas, idade dos progenitores, tamanho do cerne de repetição e taxas de mutação.

4. RESULTADOS

Foram obtidos resultados de 07 bombeiros e 04 policiais, todos participantes de reuniões da Associação dos Militares Vítimas do Acidente com o césio-137. A média de idade dos pais, quando o acidente ocorreu era de 26 anos e a média de idade das mães era de 21 anos. Como grupo controle, foram utilizados 300 trios, ou seja, 900 indivíduos que residiam no Estado de Goiás e que realizaram exames de vínculo genético, visando estabelecer a taxa de mutações germinativas em 12 *loci* STR.

No grupo exposto, dos 16 marcadores STR utilizados, 12 (75%) foram informativos, ou seja, apresentaram leituras confiáveis ao eletroferograma (Tabela 3). As reações de genotipagem dos 16 marcadores foram realizadas em duplicata e foram considerados apenas os resultados dos casos que demonstraram reprodutibilidade e clareza nos perfis alélicos, após a visualização do marcador utilizado como padrão em todas as leituras (ET-ROX). Desta forma, foram genotipados 528 alelos e a grande maioria das mutações observadas nos microsatélites representou perda do cerne de repetição (Tabela 4 e Figura 2). As Tabelas 3 e 4 destacam as características dos grupos exposto, quanto aos números de mutações paternas e/ou maternas e quanto às taxas de mutação germinativa por marcador, respectivamente. As Tabelas 5 e 6 demonstram os dados do grupo controle.

Tabela 3 – Dados gerais dos eventos mutacionais de cada *locus* STR no grupo ocupacionalmente exposto à radiação ionizante de céσιο–137 em Goiânia.

<i>Locus</i> STR	Número de mutações paternas	Número de mutações maternas	Número de mutações paternas e/ou maternas
D18S51	-	-	-
Penta E	1	-	-
TH01	1	-	-
CSF1PO	1	1	-
D13S317	1	-	-
D5S818	1	-	-
D8S1179	-	-	2
Amelogenin	-	-	-
D3S1358	-	-	-
FGA	2	-	-
TPOX	1	-	-
vWA	-	-	-
Total	8	1	2

Tabela 4 – Características do grupo ocupacionalmente exposto à radiação ionizante de céσιο–137 em Goiânia.

Caso	Alelos maternos	Alelos do filho	Alelos paternos	<i>Locus</i> mutado	Taxa de mutação
F1.033	12,13	10,13	11,14	Penta E	0,023
F1.080	7,9	7,8	9,11	TH01	0,023
F3.073	11,13	10,11	12,12	CSF1PO	0,045
F1.036	13,14	11,12	11,12		
F1.080	12,12	11,12	12,13	D13S317	0,023
F1.080	10,12	10,13	12,14	D5S818	0,023
F1.024	13,14	12,13	13,14	D8S1179	0,045
F2.025	13,14	12,14	13,14		
F1.025	20,23	23,23	20,24	FGA	0,045
F1.033	21.2,21.2	21.2,25	23,26		
F2.037	8,12	12,13	11,12	TPOx	0,023

Tabela 5 – Dados gerais dos eventos mutacionais de cada *locus* STR no grupo controle.

<i>Locus</i> STR	Número de mutações paternas	Número de mutações maternas	Número de mutações maternas e/ou paternas	Número de crianças analisadas/alelos analisados
D7S820	2	-	-	
D13S317	1	1	1	
D16S539	2	-	-	
CSF1PO	-	-	-	
TPOx	-	-	-	
Th01	-	-	-	300/3600
F13A01	-	-	-	
FESPS	-	-	-	
Vwa	2	-	-	
LPL	-	-	1	
F13B	-	-	-	
HPRTB	-	-	-	
Total	7	1	2	

Tabela 6 – Características do grupo controle, de acordo com o *locus* mutado e a taxa de mutação/*locus*

Caso	Alelos maternos	Alelos da criança	Alelos paternos	<i>Locus</i> mutado	Taxa de mutação
A74	11,13	12,13	11,11		
A143	11,12	10,12	9,12	D16S539	0,0002
A103	8,12	8,11	10,12		
A112	8,10	10,11	12,12	D7S820	0,0001
A91	11,14	9,13	9,11		
A161	11,11	9,10	9,10	D13S317	0,0002
A488	9,14	8,13	8,12		
A117	17,18	15,18	16,17		
A773	14,16	11,14	15,16	vWA	0,00007
A655	9,10	10,11	10,10	LPL	0,00007

O grupo exposto continha 39 indivíduos, perfazendo um total de 1248 alelos analisados. Destes alelos, 936 (75%) foram informativos, apresentando clareza e reprodutibilidade. Foram encontradas 11 mutações germinativas e uma

taxa de mutações de 0,02 (Tabela 4). Os *loci* CSF1PO, D8S1179 e FGA apresentaram 2 mutações cada (Tabela 3). Com exceção da amelogenina, vWA e D18S51 que não apresentaram mutações, os demais marcadores apresentaram apenas 1 evento mutacional (Tabela 3). Das onze mutações observadas, 8 (73%) eram de origem paterna, 2 (18%) de origem paterna ou materna e apenas 1 (9%) foi de origem materna. Em apenas 1 das 8 mutações de origem paterna, houve ganho no cerne de repetição, referente ao marcador FGA. As demais mutações representaram perda no cerne de repetição, inclusive a mutação de origem materna. A idade média das mães e dos pais deste por ocasião do acidente foi de 21 e 26 anos e a média de idade na ocasião da concepção dos filhos foi de 27 e 31 anos, respectivamente.

No grupo controle, 900 indivíduos foram analisados, perfazendo um total de 21.600 alelos. Foram encontradas 10 mutações germinativas e uma taxa de mutações de 0,0007 (Tabela 6). O *locus* D13S317 foi o marcador com o maior número de mutações apresentando 3 eventos mutacionais (Tabela 5). Nos marcadores D16S539 e D7S820 foram verificadas 2 mutações, enquanto que nos marcadores vWA e LPL foram detectadas apenas 1 mutação (Tabela 5). Neste grupo, 7 mutações eram de origem paterna, 1 de origem materna e 2 mutações poderiam ter origem tanto da materna quanto paterna. Todos os resultados dos exames de vínculo genético dos grupos exposto e controle apresentaram um índice de paternidade de 99,99%. A idade média das mães e dos pais deste grupo foi de 24 e 31 anos, respectivamente.

O teste do qui-quadrado demonstrou que tanto as idades paternas, quanto as idades maternas, no grupo exposto e controle, não tiveram efeito na frequência de mutações germinativas da prole ($p=0,16$ e $p =0,17$,

respectivamente). O efeito do cerne de repetição, na taxa de mutações germinativas, em ambos os grupos, também foi investigado. Contudo, nenhuma evidência do tamanho do cerne de repetição dos marcadores STR nas taxas de mutação foi observada ($p=0,24$).

A maioria dos eventos mutacionais, em ambos os grupos exposto e controle, envolveu a perda de apenas uma unidade de repetição. Apenas no grupo controle houve 1 caso em que a criança perdeu 4 nucleotídeos. Dessa forma, a incidência de mutações, envolvendo ganho ou perda de unidades de repetição foi indistinguível em ambos os grupos (10 perdas versus 1 ganho no grupo exposto; contra 7 perdas, 1 ganho e em 2 casos pode ter ocorrido perda ou ganho; $\chi^2= 3.6$, g.l.=10 $P= 0,96$). Assim, pode-se concluir que houve diferenças estatisticamente significativas, quanto à taxa de mutações germinativas, em *loci* STR, entre os grupos estudados.

5. DISCUSSÃO

Vários estudos têm detectado e observado os efeitos potenciais da radiação ionizante no material genético (DNA) de filhos de sobreviventes de acidentes radioativos (da Cruz *et al.* 2008; Dubrova *et al.*, 2006; Furitsu *et al.*, 2005; Kodaira *et al.*, 2004; Slebos *et al.*, 2004; Kiuru *et al.*, 2004; Weinberg *et al.*, 2001). Alguns destes estudos utilizaram marcadores microssatélites e minissatélites visando detectar alterações nos gametas paternos e maternos que pudessem ser transmitidos para a prole (da Cruz *et al.*, 2008; Dubrova *et al.*, 2006).

Marcadores STR são altamente polimórficos e apresentam taxas de mutação maiores do que seqüências codificantes, uma característica que os torna eficientes no rastreamento de efeitos genéticos, induzidos por agentes mutagênicos (da Cruz *et al.*, 2008; Dubrova *et al.*, 2006). Sabe-se que a exposição à radiação aumenta a freqüência de mutações em estudos experimentais, mas os efeitos da radiação na indução de mutações germinativas em humanos ainda permanece indefinida (da Cruz *et al.*, 2008; Dubrova *et al.*, 2006; Furitsu *et al.*, 2005; Kodaira *et al.*, 2004).

Neste estudo foram encontradas 11 mutações na prole da geração parental exposta ocupacionalmente ao césio-137, há aproximadamente vinte anos, durante o acidente radiológico de Goiânia – GO. O grupo exposto foi composto por 39 indivíduos e o grupo controle por 900 indivíduos. De acordo com os resultados obtidos, há evidência de que a radiação aumentou a freqüência de mutações nos *loci* STR em 29 vezes (taxa de mutação nos

expostos/taxa de mutação nos controles, 0,02 / 0,0007), na prole dos indivíduos expostos.

Os resultados obtidos neste estudo são bastante semelhantes aos resultados de da Cruz *et al.*, 2008. Naquele estudo, foram detectadas 10 mutações na geração parental, da qual ambos os genitores haviam sido expostos acidentalmente à radiação ionizante de céσιο-137.

Quanto às mutações encontradas no presente estudo, foi verificado que 91% eram de origem paterna, uma vez que somente os pais trabalharam nas ações de socorro, segurança e reconstrução das vítimas do acidente do céσιο-137. Embora outros estudos tenham relatado uma distribuição eqüitativa destes valores entre pais e mães (da Cruz *et al.*, 2008), o grupo dos bombeiros e policiais era, na época, exclusivamente de homens que, declararam em suas entrevistas, que suas esposas não estiveram nos locais onde se guardavam os rejeitos radioativos.

Ainda de acordo com da Cruz *et al.* 2008, como relatado anteriormente, o aumento das taxas de mutações nos *loci* microssatélites, da geração parental, exposta ao céσιο-137, estaria relacionado a exposição à radiação. Naquele estudo, foram detectadas taxas de mutação em torno de 0,02, com a utilização de 12 *loci* microssatélites, neste estudo as taxas de mutação também apresentam este valor. Estes resultados estão dentro do esperado, uma vez que os oficiais envolvidos no socorro das vítimas também foram expostos ao céσιο-137, mas não há registros das doses absorvidas por este grupo.

As análises deste estudo foram realizadas com 16 marcadores, todavia, foram selecionados os 12 marcadores STR mais específicos e de maior

reprodutibilidade, cujos resultados foram confiáveis, e apresentaram o mesmo número de regiões analisadas em estudos anteriores.

Dado o tamanho do grupo exposto no estudo, foram obtidas taxas de mutação consideravelmente altas, quando os resultados são comparados com o grupo controle. E, considerando o número de trabalhadores de defesa civil envolvidos no desastre, a amostra mostra-se de tamanho significativo, pois representa cerca de 2% da quantidade total de indivíduos empregados pela Defesa Civil para trabalhar na ocorrência.

Na aplicação dos questionários foi verificado que os bombeiros e policiais militares do Estado de Goiás foram empregados em diversos serviços durante o atendimento à ocorrência. Os bombeiros foram empregados, prioritariamente, na lavagem das ruas e avenidas onde havia focos de material radioativo e nos lotes com rejeitos, além da remoção de vítimas e atenção às populações das circunvizinhanças dos focos que, expostas ou não à radiação, requeressem atendimento pré-hospitalar ou remoção para algum centro especializado de saúde. Os policiais militares foram, principalmente, incumbidos da segurança dos locais sinistrados bem como dos materiais e rejeitos que lá estavam, da segurança dos comboios que transportavam vítimas e rejeitos e, por fim, de assegurar os depósitos provisórios e definitivos dos rejeitos radioativos, além, é claro, de conter revoltas pontuais de uma população assustada e enfurecida pelo ocorrido.

Tanto bombeiros quanto policiais declararam que nem todo pessoal que trabalhava nas zonas irradiadas, principalmente eles, dispunha de equipamentos e vestimentas especiais para desempenhar suas funções e que, muitas foram as vezes em que suas fardas chegavam às suas casas sujas de

rejeitos e eram misturadas com outras roupas usadas por seus familiares, todas lavadas por suas mães e esposas. Eles relataram também, não terem sido assistidos do ponto de vista de saúde e que não foram submetidos a nenhum tipo de dosimetria durante o acidente, para que constasse em seus registros a exposição a doses de radiação.

Não foi possível precisar o número real de bombeiros e policiais militares potencialmente expostos à radiação ionizante durante o acidente radioativo do césio-137 em Goiânia em 1987, pois na época, o Corpo de Bombeiros Militar do Estado de Goiás era apenas uma fração da Polícia Militar do Estado. Além disso, ocorria um Curso de Formação de Soldados da Polícia Militar e, como era habitual, sem prévio aviso, quando havia necessidade emergencial de emprego nas ruas, os alunos eram empenhados no serviço, no intuito de buscar uma melhor resposta à ocorrência e oferecer uma atuação mais eficaz, uma vez que estes alunos já tinham um determinado nível de formação que os permitiria atuar, assistidos por seus tutores policiais, complementando a força tarefa. Como ocorreu isso com o acidente, sabe-se que, além dos policiais militares e bombeiros envolvidos, os alunos da turma de 1987 foram empregados, não se pode especificar, ao certo, quem, quando, onde e por quanto tempo.

Embora membros de instituições militares, normalmente fechadas ideologicamente, os policiais e bombeiros que foram voluntários para participar da pesquisa demonstraram, além das dores e marcas psicológicas do acidente com o césio-137, uma iniciativa inédita de envolvimento individual e corporativo com a pesquisa científica. Demonstraram envolvimento com a causa e interesse no sentido de investigar as razões para que lições fossem

aprendidas e ferramentas desenvolvidas para a proteção e segurança global da população, como é previsto na Política Nacional de Defesa Civil, cujo apelo pela pesquisa científica visa, entre outras razões, o esclarecimento operacional e o planejamento de contingência.

Figuram nas leis que aprovaram as pensões para o pessoal que trabalhou no ocorrido 17 bombeiros e 187 policiais militares. Além de, aproximadamente, mais 200 policiais e 150 bombeiros em sindicâncias e procedimentos administrativos das respectivas corporações solicitando reconhecimento moral, hierárquico, meritório e pecuniário.

Já sob um escopo psicológico, os bombeiros e policiais militares, que participaram das ações emergenciais durante o acidente, relataram que se sentem demasiadamente coagidos quando se trata do assunto por três razões fundamentais: primeiramente, o medo de perder a pensão conseguida a duras custas sociais e burocráticas em ações intermináveis movidas contra o Estado. Em segundo lugar, o desconforto dos familiares que se sentem expostos e têm verdadeiro pavor do preconceito que será imposto a eles e seus familiares se forem rotulados como “vítimas” do acidente radioativo, numa sociedade que discrimina, quase que abertamente, esta população. E finalmente, o sentimento de descrença na saúde, na eficiência e na agilidade das instituições públicas que deveriam ampará-los.

Sob a ótica do planejamento de contingência em Defesa Civil, os dados e o conjunto da pesquisa exibiram um elevado grau de confiabilidade para a adoção de ferramentas a serem utilizadas em eventos que envolvam agentes genotóxicos. Os órgãos de defesa civil devem, a partir de sistemáticas como

essa, incluir a preocupação com o rastreamento e a dosimetria em quaisquer desastres com qualquer produto perigoso.

Os mecanismos de acionamento, alerta e alarme que são, rotineiramente, inicializados em face de qualquer risco, ameaça ou desastre devem incluir as responsabilidades de biodosimetria e desenvolver, num sentido amplo, a preocupação com todas as vítimas e também com os envolvidos nas ações pontuais desenvolvidas pelo Sistema de Defesa Civil.

No caso de um desastre de acionamento relativamente tardio, como foi o caso do céscio-137, deve haver uma preocupação com a informação ampla da população sobre os riscos para que o preconceito seja diminuído e a disseminação de boatos e pânico contida. Deve haver uma acessibilidade maior e uma motivação agregada a comoção social para que quaisquer pessoas, que tiverem a mais irrisória chance de contaminação, procurem os órgãos de defesa civil, e não se afastem deles no medo do diagnóstico, preconceito ou tratamento.

Finalmente, os resultados deste estudo demonstraram que os *loci* STR são marcadores potentes para o monitoramento retrospectivo da freqüência de mutações germinativas, na prole de indivíduos expostos a agentes mutagênicos. Estes marcadores demonstraram a capacidade de se detectar mutações induzidas, mesmo em amostras populacionais relativamente pequenas.

6. CONCLUSÃO

Pelas análises realizadas em alguns bombeiros e policiais militares, envolvidos nas ações de segurança e socorro, durante o acidente do césio-137, em 1987, na cidade de Goiânia – GO, foi concluído, com a aplicação de questionários, entrevistas e pelos resultados das taxas de mutações germinativas em *loci* STR de 11 famílias, que:

- Existiu uma ingenuidade operacional na época, no que tange ao emprego destes homens, dado que, segundo eles, pouquíssima informação lhes era passada acerca dos riscos e que não existia um planejamento, previamente elaborado pela Defesa Civil, para atuação neste tipo de catástrofe;
- A exposição ocupacional dos bombeiros e policiais militares à radiação ionizante do césio-137 susceptibilizou a ocorrência de mutações no DNA, que inclusive foram comprovadas dado que, 20 anos mais tarde, na realização da coleta de dados e material biológico para este estudo, foi possível encontrar, em valores relativamente consideráveis, mutações remanescentes desta exposição, numa área do DNA já conhecida por sua eficiência em servir de marcador biológico para exposição à radiação;
- A taxa de mutações germinativas em *loci* STR foi de 0,02;
- A *doubling dose* calculada para este grupo foi de 0,03 por gene por Gy.
- Outros estudos deverão ser realizados com mais indivíduos deste e de outros grupos, no intuito de se utilizar marcadores STR para

determinar a exposição à radiação ionizante, dando continuidade aos estudos de biomonitoramento da população potencialmente e acidentalmente exposta ao céσιο-137.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIZAWA, Kouichi *et al.* (2007): Responses of Embryonic Germ Cells of the Radiation-Sensitive Medaka Mutant to γ -irradiation. *Journal of Radiation Research*, vol 48.
- BARBER, Ruth *et al.* (2002): Elevated mutation rates in the germ line of first and second generation offspring of irradiated male mice. *Proceedings of the national academy of sciences of United States of America*, Vol 99, n°10, p. 6877 – 6882.
- BRASIL, Ministério da Integração Nacional, Secretaria Nacional de Defesa Civil (2004): Manual de Desastres – Desastres Humanos, I Parte: De Natureza Tecnológica. Brasília.
- BRASIL, Ministério da Integração Nacional. Secretaria Nacional de Defesa Civil (2008): Política Nacional de Defesa Civil. Brasília.
- BRENNER, David J. *et al.* (2003): Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: Assessing what we really know. *Proceedings of the national academy of sciences of United States of America*, vol. 100(24), p. 13761 – 13766.
- CASTRO, Antônio Luiz Coimbra de (2005): Manual de Planejamento em Defesa Civil. Brasil. Ministério da Integração Nacional. Secretaria Nacional de Defesa Civil. Volume I. Brasília.
- CRISTOFARO, J. Di *et al.* (2005): ret/PTC1 and ret/PTC3 in thyroid tumors from Chernobyl liquidators: comparison with sporadic tumors from Ukrainian and French patients. *Endocrine-Related Câncer*, vol 12.
- da CRUZ, Aparecido Divino *et al.* (2008): Microsatellite mutations in the offspring of irradiated parents nineteen years after the Cesium-137 accident. *Mutation Research*. In Press.
- da CRUZ, Aparecido Divino, *et al.* (1995): Biological dosimetry of radiation exposure using cytogenetic and molecular endpoints. Centre for environmental health at the university of Victoria.
- da CRUZ, Aparecido Divino (1997): Monitoring the Genetic Health of Humans Accidentally Exposed to Ionizing Radiation of Cesium-137 in Goiania (Brazil). Tese (Doutorado) – Department of Biology, University of Victoria.
- da SILVA, Cláudio Carlos (2000): Avaliação Citogenética de Indivíduos Expostos Acidentalmente à Radiação Ionizante de Césio-137 em Goiânia (Brasil). Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

- DUBROVA, Yuri E e PLUMB M. A (2002): Ionizing radiation and mutation induction at mouse minisatellite loci. The story of the two generations. *Mutation Research*, vol. 499(2), p. 143-150.
- DUBROVA, Yuri E *et al.* (2006): Minisatellite germline mutation rate in the Techa River population. *Mutation Research*, 602 p. 74 – 82.
- DUBROVA, Yuri E *et al.* (1998): Radiation-induced germline instability at minisatellite loci. *International Journal of Radiation Biology*, vol 74(6), p. 689 – 696.
- DUBROVA, Yuri E (2003a): Germline mutation induction at mouse and human tandem repeat DNA loci. *Adv. Exp. Med. Biol.* vol 518.
- DUBROVA, Yuri E (2003b): Monitoring of radiation-induced germline mutation in humans. *Swiss Medical Weekly*, vol 133.
- DUBROVA, Yuri E (2005): Radiation-induced mutation at tandem repeat DNA loci in the mouse germline: spectra and doubling doses. *Radiation Research*, vol 163.
- ELLEGREN, Hans (2000a): Heterogeneous mutation processes in human microsatellite DNA sequences. *Nature Genetics*.
- ELLEGREN, Hans (2000b): Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends in Genetics*, vol 16.
- EOT-HOULLIER, Grégory *et al.* (2005): Processing of a complex multiply damage DNA site by human cell extracts and purified repair proteins. *Nucleic Acids Research*, vol 33, n. 1 p. 260 – 271.
- FISCHBEIN, A. L. F *et al.* (1997): Ultramorphological Sperm Characteristics in the Risk Assessment of Health Effects after Radiation Exposure among Salvage Workers in Chernobyl. *Environmental Health Perspectives*, Vol 105.
- FLAKUS, F. N. (1995): Radiation in perspective: Improving comprehension of risks. IAEA Bulletin - Quarterly Journal of the International Atomic Energy Agency **37**(2):7-11.
- FURITSU, Katsumi *et al.* (2005): Microsatellite mutation shows no increases in the children of the Chernobyl liquidators. *Mutation Research*, vol 581.
- GOIÁS, Corpo de Bombeiros Militar (2002): Extrato do livro da parte diária do dia 29/09/1987 do oficial de dia redigida pelo 2º Ten Elison Nunes Cavalcante. (Documentação) Goiânia.
- GOIÁS, Diário Oficial do Estado (2002): Lei 14.226 de 06 de julho de 2002. (Documentação) Goiânia.

- GOLDMAN, Marvin (1982): Ionizing radiation and its risks. *The western journal of medicine*.
- GRIFFITHS, Anthony J. F. *et al.* (2001): Introdução à genética. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- IVANOV, Victor *et al.* (2004): Radiation and Epidemiological Analysis for Solid Cancer Incidence Among Nuclear Workers Who Participated in Recovery Operations Following the Accident at The Chernobyl NPP. *Journal of Radiation Research*, Vol 45.
- JEFFREYS, Alec J. *et al.* (2005): Spontaneous and induced minisatellite instability. *Electrophoresis*, vol 18.
- JEFFREYS, Alec J. (1997): Spontaneous and induced minisatellite instability in the human genome. *Clinical Science*, vol 93.
- KIURU, A. Auvinen *et al.* (2003): Hereditary minisatellite mutations among the offspring of Estonian Chernobyl cleanup workers. *Radiat. Res*, vol 159.
- KODAIRA, M. *et al.* (2004): No evidence of radiation effect on mutation rates at hypervariable minisatellite loci in the germ cells of atomic bomb survivors. *Radiat. Res*, vol 162.
- KOSCHEYEV, Victor S. (1993): Psychological status of Chernobyl nuclear power plant operators after the nuclear disaster. *Journal of Traumatic Stress*. Vol. 6 p 561-68.
- LEITÃO, A.C. e GOMES, R. A. (1994): 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.
- LEWIN, Benjamin (2001): Gene VII. In. *Genes são DNA*. p. 03- 34. ArtMed. São Paulo – SP.
- LIVSHITS, L. A. *et al.* (2001): Children of Chernobyl Cleanup Workers do not Show Elevated Rates of Mutations in Minisatellite Alleles. *Radiation Research*, vol 155.
- MIKHALEVICH, L.S *et al.* (2000): Radiation effects in lymphocytes of children living in a Chernobyl contaminated region of Belarus. *Int. J. Radiat. Biol*, vol 76.
- MIRANDA, Fábio Jesus *et al.* (2005): O acidente radioativo em Goiânia: “O tempo cura todos os males? ”. *Arquivos Brasileiros de Psicologia*, vol 57.
- MONTELONE, Beth A (1998): Mutation, Mutagens, and DNA Repair Outline. BIOL400, *Human Genetics*.
- NAKAMURA, Y *et al.* (1987): Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science*, vol 235.

- NIKIFOROV, Yuri E *et al.* (1998): Prevalence of minisatellite and microsatellite instability in radiation-induced post-Chernobyl pediatric thyroid carcinomas. *Oncogene*, Vol 17.
- PINTO, Luis Felipe Ribeiro e FELZENSZWALB, Israel (2003): Genética do câncer humano. Ulbra. Canoas – RS.
- RIBEIRO, Lucia Regina e MARQUES, Edmundo Kanan (2003): A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. Ulbra. Canoas – RS.
- SATOH, C. *et al.* (1996): Genetic analysis of children of atomic bomb survivors. *Environ. Health Perspect.* vol 104.
- SANKARANARAYANAN, S. e CHAKRABORTY, R. (2000): Ionizing radiation and genetic risks XI. The doubling dose estimates from the mid-1950s to present and the conceptual change to the use of human data on spontaneous mutation rates and mouse data on induced mutation rates for doubling dose calculations. *Mutation Research*, vol 453.
- SCOTT, Bobby R. (2005): 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 n°3, p 07 – 26.
- SEGAL, Sandra L (2001): Genética e Câncer de Mama. Revista HCPA, Vol 21.
- SLEBOS, Robert. *et al.* (2004): Mini- and microsatellite mutations in children from Chernobyl accident cleanup workers. *Mutation Research*, Vol 559.
- SNUSTAD, D. Peter e SIMMONS, Michael J. (2008): Fundamentos da Genética. Quarta Edição. *Guanabara Koogan*, Rio de Janeiro.
- SVENSSON, H. (1988): Different kinds and properties of ionizing radiation. In: "Somatic and Genetic Effects of Ionizing Radiation.". Proceedings of the XVth Berzelius Symposium, pp. 9-11.
- WARD, Laura Sterian (2002): Entendendo o processo molecular da tumorigênese. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo*. Vol 46 n. 4 p. 351 – 360.
- WATSON, James D. *et al.* (2007): Recombinant DNA. Genes and Genomes – A short Course. Third Edition. W. H. Freeman and Company, New York.
- WEINBERG, H. Sh *et al.* (2001): Very High Mutation Rate in Offspring of Chernobyl Accident Liquidators. *Proc. Biol. Sci.* vol 268.

WESTMAN, Judith A. (2006): *Genética Médica*. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro – RJ.

XU, X *et al.* (2000): The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length. *Nat. Genet.* Vol 24.

8. ANEXOS

ANEXO 1

**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/Graduação: _____ RG _____

Contato () _____ () _____ OBM _____

01.	Participou das ações de socorro durante o acidente radiológico?	() Sim	() Não
02.	Aproximou-se da fonte de radiação ou dos rejeitos radioativos?	() Sim	() Não
03.	Foi registrado o índice de radiação recebido?	() Sim	() Não

04.	Recebeu atenção médico-hospitalar especializada?	() Sim	() Não
05.	Teve filhos biológicos após o acidente?	() Sim	() Não
06.	Seu(s) filho(s) apresentou (apresentaram) distúrbio(s) de saúde?	() Sim	() Não
07.	Fuma ou fumou alguma vez na vida?	() Sim	() Não
08.	Bebe ou utilizou bebida alcoólica alguma vez na vida?	() Sim	() Não
09.	Usou algum medicamento por período prolongado?	() Sim	() Não
10.	Teve algum tipo de câncer?	() Sim	() Não
11.	Possuía alguma doença antes do acidente radiológico?	() Sim	() Não
12.	Teve filhos biológicos antes do acidente?	() Sim	() 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 tem 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? _____

ANEXO 2**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
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 REPERESANTANTE 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. Os 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 3

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 nucléicos (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. Incluem-se 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 eqüitativo 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 Nº 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 4

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

ANEXO 5

PROTOCOLO DE COLETA DE SANGUE

Separar os seguintes materiais:

1. Seringas de 10 mL;
2. Heparina (para evitar a coagulação do sangue no interior da seringa);
3. Garrote;
4. Descartex (recipiente adequado para fazer descarte de materiais cortantes);
5. Material para assepsia;
6. Tubos Falcon® de 15 mL (para armazenamento).

Procedimento:

1. “Heparinizar” a seringa;
2. Colocar agulha esterilizada;
3. Fazer assepsia do braço do paciente;
4. “Garrotear” o braço do paciente;
5. Punçar a veia e coletar;
6. Retirar o garrote;
7. Retirar a agulha do braço do paciente;
8. Retirar a agulha da seringa;
9. Colocar a agulha utilizada no recipiente adequado;
10. Desprezar a amostra no Tubo Falcon®;
11. Homogeneizar a amostra;

12. Descartar a seringa em recipiente adequado;

13. Identificar a amostra.

Processamento da amostra:

1. Colocar, balanceadamente, as amostras na centrífuga;
2. Centrifugar, por 20 minutos, a 3000 rpm (rotações por minuto), ou maior rotação disponível;
3. Retirar as amostras da centrífuga;
4. Identificar os tubos de 2 mL que vão armazenar a amostra;
5. Retirar o “anel leucocitário” e transferi-lo para o tubo de 2 mL identificado;
6. Congelar a amostra a, no máximo, - 20°C ou proceder à extração de DNA.

ANEXO 6

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA

O Kit Easy – DNA permite que se isole fácil e rapidamente um DNA Genômico de alto peso molecular e variedade de tipos e tamanhos de amostras. O procedimento permite que se isole o DNA Genômico de muitas amostras de sangue em menos de 30 minutos. O DNA isolado é pronto para análise por PCR ou RFLP.

Antes de começar:

1. Separe tubos de 2 mL para microcentrífuga;
2. Equilibre o “Banho – Maria” em 65°C.

Isolamento do DNA:

1. Pipetar 350 μ L de sangue em cada tubo. As amostras de sangue devem ser misturadas para formar uma solução homogênea;
2. Adicionar 500 μ L da solução “A” no tubo. Misturar por inversão;
3. Incubar a 65°C por 6 minutos;
4. Remover a amostra do “Banho – Maria” e homogeneizar por inversão;
5. Adicionar 900 μ L de Clorofórmio e agitar (Vortex). Certificar – se de que a amostra está completamente misturada. A amostra está completa quando corre livremente e as hemoglobinas parecem pequenos flocos de chocolate;

6. Adicionar 200 μ L da solução “B” e agitar (Vortex) até que a amostra fique uniformemente viscosa;
7. Centrifugar à velocidade máxima utilizando uma microcentrífuga por 10 minutos em temperatura ambiente;
8. Pipetar o limpo, fase aquosa, para um novo tubo de microcentrífuga 1,5 mL.

Precipitação do DNA genômico:

1. Adicionar 1 mL de Etanol 100% à temperatura ambiente e misturar por inversão até a formação do precipitado. O precipitado é visto, normalmente, após 30 a 60 segundos. Se o precipitado não for visto, deixar os tubos incubarem a temperatura ambiente por 10 minutos;
2. Centrifugar à velocidade máxima em uma microcentrífuga, à temperatura ambiente, por 5 minutos;
3. Decantar o sobrenadante e adicionar 1 mL de Etanol a 70% à temperatura ambiente;
4. Centrifugar à velocidade máxima numa microcentrífuga por 1 minuto à temperatura ambiente;
5. Decantar o sobrenadante. Centrifugar à velocidade máxima numa microcentrífuga por 1 minuto à temperatura ambiente;
6. Remover o Etanol residual com uma pipeta e inverter os tubos para que sequem;
7. Adicionar 100 – 150 μ L de água “ultra – pura” (*autoclaved nuclease – free water*) em cada tubo;
8. Incubar a 65°C por 5 minutos;

9. Fazer gel de Agarose a 1,5% e submeter à eletroforese;
10. Eletroforese deverá ser a 100 V e por 30 minutos;
11. Corar gel com Brometo de Etídio por 5 minutos para verificar a presença e integridade do DNA (atenção: se houver uma banda destacada, é sinal da integridade da amostra, caso seja um arraste, pode significar que o DNA está degradado.

ANEXO 7

PROTOCOLO DE PCR E ELETROFORESE

Preparo da Solução para PCR (por amostra):

1. Adicionar 8,35 μL de Água ultra – pura;
2. Adicionar 1,25 μL de *Tp Gold*;
3. Adicionar 1,25 μL de *Primer*;
4. Adicionar 0,4 μL de Taq-DNA Polimerase;
5. Adicionar 1,25 μL da amostra a ser amplificada.

Variação da temperatura no Termociclador:

1. 1º Ciclo:
 - a. Elevar e manter a 95°C por 11 minutos;
 - b. Elevar e manter a 96°C por 2 minutos;
2. 2º Ciclo (repetir 10 vezes consecutivas):
 - a. Abaixar (no início) ou elevar (nas outras vezes) e manter a 94°C por 1 minuto;
 - b. Abaixar e manter a 60°C por 1 minuto;
 - c. Elevar e manter a 70°C por 1 minuto e 30 segundos;
3. 3º Ciclo (repetir 22 vezes consecutivas):
 - a. Elevar e manter a 90°C por 1 minuto;
 - b. Abaixar e manter a 60°C por 1 minuto;
 - c. Elevar e manter a 70°C por 1 minuto e 30 segundos;

4. 4º Ciclo
 - a. Abaixar a 60°C por 30 minutos;
 - b. Finalizar e permanecer a 4°C.

ELETROFORESE

1. Preparar o MEGABACE 1000® para receber as amostras, executando os procedimentos de limpeza dos capilares e configuração para genotipagem;
2. Levar as amostras ao Termociclador e aquecê-las a 95°C por 5 minutos para desnaturar o DNA, então colocá-las no gelo para aguardarem a eletroforese;
3. Introduzi-las no MEGABACE 1000® com os seguintes parâmetros de injeção:
 - a. 3 KV por 80 segundos e;
 - b. 9 KV por 75 minutos.
4. Em seguida, coletar os dados armazenados no computador, e analisá-los com o software *Fragment Profiler*.

ANEXO 8

ARTIGO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO

Research paper

Microsatellite mutations in children from Cesium-137 accident liquidators

Bráulio Cançado Flores^{1,2,3}, Daniela de Melo e Silva*^{2,3}, Emília Oliveira Alves Costa^{2,3}, Luciana Abrahão Ramos³, Marília Gomes Ismar³, Aparecido Divino da Cruz^{2,3}

¹ Corpo de Bombeiros Militar do Estado de Goiás/Diretoria de Defesa Civil (DIDEC). Av. Anhanguera, n. 7364, Setor Aeroviário, CEP 74435-800, Goiânia, Goiás, Brazil

² Secretaria Estadual de Saúde de Goiás/Superintendência Leide das Neves Ferreira/Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular (LaGene). Rua 16-A n. 792, Setor Aeroporto, Cep 74075-150, Goiânia, Goiás, Brazil

³ Universidade Católica de Goiás/Departamento de Biologia/Núcleo de Pesquisas Replicon, Rua 235 n. 40, Setor Universitário, Cep 74605-010, Goiânia, Goiás, Brazil.

*Correspondence should be addressed to D.M.S (e-mail: danielamelo@ucg.br; Telephone number: 556239461086; Fax number: 556239461385)

Abstract

We performed a study on few Brazilian liquidators, verifying whether increase in the frequencies of germline mutations at microsatellite loci could be found in their progeny. These liquidators were involved, during September of 1987, in clean-up operations, in the most serious radiological accident occurred in the western hemisphere, when a radiotherapy unit containing 50.9 TBq of Cs¹³⁷Cl was removed from an abandoned clinic and it was subsequently disassembled. This accident exposed hundreds of people to non-natural environmental radiation. To evaluate the effects of low radiation doses, we compared the microsatellite mutation rates of 11 families of liquidators and 300 controls. A total of 12 microsatellite loci (11 autosomal and one X-linked) were used. DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes and the microsatellite loci were amplified by the polymerase chain reaction with fluorescence-labelled primers. Mutations were detected as variations in the length of the loci. At the autosomal loci, the mutation rates (expressed as number of mutations among the total number of loci for the individuals included) are 2×10^{-2} (11/528, exposed group) and 6.9×10^{-4} (10/14400, control group). This difference is significant and showed an increase of approximately 29 times in the mutation rates of the exposed group. These results indicated the possibility that the liquidators of the Cesium-137 accident might have been unexpectedly exposed to some radioactive contaminants in the environment, once the spontaneous mutation rates, in several non-exposed Brazilian individuals, differ to those in the group of liquidators. Unfortunately, the mean radiation doses, possibly absorbed to the liquidators, were not evaluated, but our results are consistent with an effect of radiation on microsatellite mutations.

Keywords: Cesium-137; liquidators, mutation rate; microsatellite mutations.

1. INTRODUCTION

A single accidental event such as the removal of a highly radioactive $^{137}\text{Cesium}$ source (50.9 TBq or 1.375 Ci) [1,2], from an abandoned radiotherapy clinic in Goiânia, Brazil, on September 13, 1987, can exposed hundred of people to substantial doses of ionizing radiation. Upon the discovery of the accident, over 120,000 people were screened and the civil defense worked hardly in the contaminated area and tried to help the accidentally exposed people [2].

According to some estimates, the absorbed doses of the individuals accidentally exposed was estimated and ranged from near 0 up to 7 Gy. Emergency actions were taken to clean and control further exposure and contamination, generating a total of 3,500 m³ of waste. The civil defense agents comprised of firemen and police officers, also known as liquidators, thought, in a first moment that it was a gas escapement and they didn't protect themselves against radiation. Latter, they were employed at security and cleanness of the irradiated areas, being exposed frequently, without protection, to residual radiation [3]. Such accident had major medical, social-economical and physiological impacts in the community, leaving the government to grapple with political fallout. For a major review on the accident and genetic long-term studies of the exposed population refer to [1], [2] and [4].

Previous follow-up study of the Goiânia population accidentally exposed to Cs-137 using offspring investigation provided us the opportunity to view the genetic traces of radiation exposure in a human population [4]. Previously, cytogenetic and molecular endpoints were used to understand the genetic effects of this kind of exposure [5 – 7]. The potential induction of somatic microsatellite instability by ionizing radiation was also investigated in the Goiânia population and the results indicated that mismatch repair deficiency could be compatible with cell development [1, 4]. Our group also investigated the genetic effects of STR mutations in the offspring of irradiated fathers,

nineteen years after the Cesium-137 accident, and it was found that the absorbed doses elevated the germline mutations 0.03 times [4].

Trying to continue such genetic investigations, in this study, we used 16 STR markers, and we selected 12 STR markers which exhibited the most accurate results. Such molecular markers are largely used in paternity tests and they are used to infer if radiation exposure could cause an increase in the frequency of microsatellite mutation in the offspring of liquidators occupationally exposed to ionizing radiation. The allelic sequences in parents and their offspring possibilities the estimation of the inheritance of a mutation event. A mutation event is typically recognized as a shift in allelic mobility assessed by electrophoretic separation of differently sized alleles [9].

Hereafter we reported the results of a case-control study carried out in 11 families for which the father was occupationally exposed to Cesium-137 ionizing radiation. We obtained the mutation frequency in STR *loci* of exposed and control groups and we also tested whether ionizing radiation could cause paternal genetic mutations that are transmitted to the offspring in the liquidators group.

2- MATERIAL AND METHODS

2.1. Samples analyses

A total of 11 families comprised of 39 individuals were studied, including the parental generation and their offspring. The parental generation included 7 firemen and 4 policemen occupationally exposed to ionizing radiation. The exposed group contained 16 children, including 7 girls and 9 boys, mostly conceived after the Goiânia accident and born between 1987 and 2005 (Table 1). The control group comprised of 300 paternity cases, 900 individuals, whose genetic link was performed during the years of 2000 to 2004. All DNA tests had a probability of paternity of at least 99.99%. All participants contributed voluntarily with 10 mL of peripheral blood collected in vacutubes containing sodium heparin.

2.2. DNA isolation and PCR

We isolated the genomic DNA from blood samples using Easy DNA Genomic Kit (Invitrogen, USA) and stored at -20° C until analysis. The PowerPlex® 16 System was used to co-amplify twelve loci, including: CSF1PO, D8S1179, FGA, Amelogenin, vWA, D18S51, Penta E, TH01, D13S317, D5S818, D3S1358 and TPOX. The ability to perform STR analysis from a single amplification resulted in increased efficiency and sample conservation, as well as a reduction in sample handling and the potential laboratory error associated with it. All PCR product separations were performed by capillary electrophoresis using MegaBACE 1000 Automatic Genotyping (GE HealthCare®). The capillary runs were analyzed using the software Fragment Profiler v. 1.0 (Amersham Biosciences®), which performs automatic sizing and allele calling. All electropherograms were manually reviewed prior to analyses.

2.3. Spectrum of microsatellite mutation

Father-mother and children sets were compared to analyze a mutational germline event and to infer whether Cesium-137 radiation exposure led to mutations in germ cells that resulted in changes in the length of microsatellite repetitive DNA sequences. It was considered to be a *de novo* germ-cell mutation each variant in a child that is not observed in either biological parent. The progenitor allele was assumed to be the paternal allele closest in size to the mutant allele as in previous studies [10]. Chi-square tests were performed using the BioEstat® version 3.0, in order to evaluate a significant difference ($p < 0.05$) between controls and exposed patients, related to the number of germline mutation and mutation rates.

3. RESULTS

When the radioaccident happened, the mean age of the exposed fathers was 26 years old and the mean age of the mothers was 21 years old. Data from 300 usual cases (900 individuals) living in the State of Goias, undergoing paternity/maternity DNA testing to establish the frequency of germline mutations in the 12 STR loci, were used as controls.

We estimated the doubling dose (DD) to evaluate the potential human hazard of Cesium-137 exposure. This is defined as the amount of radiation required to produce as many mutations as those that occur in a generation as a result of spontaneous mutations. It is calculated as a ratio of the average rates of spontaneous and induced mutations in a set of defined gene loci [11].

The rate of spontaneous mutations represents the mean of the STR mutation rates in the control group (6.9×10^{-4}). For our exposed liquidators group, the ratio of induced mutations in the 12 *loci* was 2×10^{-2} .

The target population could not be divided in ethnic groups as the level of admixture is very high in Brazil. So, germline mutations in STR *loci* of the exposed groups were evaluated for the origin of the mutations (maternal or paternal origin), age and sex of the F1 individual, and length of the allele core.

A total of 1248 alleles were genotyped by PCR and 936 were analyzed in the exposed group. The vast majority of microsatellite mutations represented gains of entire repeat units, a hallmark of replication slippage [8-13]. So, the probabilities of addition and deletion are identical and constant across the alleles, assuming the classical stepwise mutation model for microsatellites [14]. Tables 02 and 04 summarize the data for the exposed and Tables 03 and 05 summarize the data for the controls.

According to our results, the first generation of the exposed liquidators group showed 2 mutations in the *loci* CSF1PO, D8S1179 and FGA, presenting a mutation rate of 0.045 each one. Except Amelogenin, vWA and D18S51, the other markers showed only one mutation and the frequency of microsatellite mutation in their offspring was 0.023 each one.

We also analyzed 900 individuals in the control group, totalizing 21,600 alleles. We found 10 germline mutational events and a total mutation rate of 0.00069. D13S317 presented the highest mutational rate with 3 events, D16S539 and D7S820 showed 2 mutations, vWA and LPL showed only one. In the control group 60% of the mutations were paternally derived, 30% were derived from the mother and 10% could be from either parent. Mutation distribution between parents has previously been discussed by other authors [8,9] who argue that the identification of *de novo* mutations in hypermutable markers by pedigree analysis suggested a male: female mutation rate of 2:1. All controls included in the current study had a cumulative paternity index of 99.99%. The mean age of mothers and fathers in the control group it was 24 and 31 years old, respectively.

Chi-square tests showed that neither mother's age nor father's age both in control or exposed groups had no effect in germline mutation frequency ($p= 0.16$ and $p= 0.17$, respectively). A possible effect of the core sequence in germline mutation frequency in both groups was also investigated. However, no evidence of parental allele size on mutation frequency of their offspring was observed ($p =0.24$)

In the current study, unfortunately we had no data about the individual absorbed doses of the liquidators. Such doses were not evaluated when the liquidators worked at the emergency actions of Cesium-137 accident.

Most mutation events involved the gain or loss of only one repeat unit and in the control group there was only one case that the child STR core lost 4 nucleotides. However, the incidence of such mutations, involving gain or loss of repeat units, was not distinct in both groups (1 gain, 9 losses and in 1 case it could be gain or loss in exposed; against 1 gain, 7 losses and in 2 cases it could be gain or loss in control; $\chi^2= 8$, d.f.=2 , $P=0.01$). So, we therefore conclude that there is not a difference in the spectrum of paternal microsatellite mutations between these groups.

4. DISCUSSION

We found 11 mutations in the paternal generation of the exposed liquidators group comprised of 39 individuals and only 10 mutations in 900 people of the control group. According to our results, there was an evidence of radiation effect on mutation rate at hypervariable microsatellite *loci* in the germ cells of radiation exposed survivors. Our findings contrast with other groups, in which no effect of radiation on micro- and minisatellites mutations were found [15, 17, 18, 21], but agree with others [4, 20, 25, 27].

Human microsatellites mutate much more frequently than coding sequences, a characteristic that make them attractive to population screening for genetic effects of mutagenic agents and several studies have detected and observed the potential genetic effects of radiation at the DNA level in the children of people who were exposed [15-27], but the genetic effects of radiation in humans remain largely undefined [15-17].

In this study, all the mutations were of paternal origin, once just the fathers worked at civil defense activities, when the radiological accident happened. Mutations rate did not increase with paternal age, since in the control group, the parents presented mean ages higher than the exposed group.

The minisatellite mutation rates in the germline of irradiated fathers from the Techa River population was significantly elevated and it could be attributed to the influence of ionizing radiation, once the control and exposed groups were matched by ethnicity, parental age, occupation and smoking habitats [27]. Unfortunately, we did not match our group according to the factors cited above, but our and previous results with Goiania's exposed population demonstrated that the increased in the frequency of microsatellite mutations in the offspring can be explained mostly by ionizing radiation.

Despite the very discrete size of our exposed group, we found an increase in the number of new alleles in the offspring of exposed individuals, when compared with the control group. Even occupational absorbed doses of radiation could induce multiple changes in germline DNA, as the parental generation was contaminated directly by Cesium-137. Our results demonstrate that microsatellite *loci*, as minisatellites [25], provide powerful systems for the efficient retrospective monitoring of germline mutation in humans and are capable of detecting induced mutations in small population samples, being an easy, efficient and rapid assay to verify germline mutation.

Following a study initiated at 2006 [4] , our group intention was to compare and to find out if, even with the occupational liquidators exposure, during the actions of civil defense, microsatellites could give results similar to the Chernobyl liquidators [18], in contradiction to another studies carried out in the exposed population of Ucraina [15]. We found an evidence for an increased mutation rate in microsatellites, indicating that mutation rate could be increased by radiation exposure.

Although we found an influence of paternal radiation exposure on microsatellite germline mutations, further investigations might be carried out to improve our results.

5. Acknowledgments

The authors wish to thank Genetic Master's Teaching Staff for their assistance in the last two years, and our university colleagues who help us in the collection of the blood samples and DNA analysis. This work was supported by several grants, including Corpo de Bombeiros Militar do Estado de Goiás, Secretaria Estadual da Saúde de Goiás and Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa PROPE)/Universidade Católica de Goiás.

5. REFERENCES

- [1] A.D. da Cruz. Monitoring the Genetic Health of Humans Accidentally Exposed to Ionizing Radiation of Cesium-137 in Goiânia (Brazil), *Ph.D Thesis* (1997) pp. 175.
- [2] International Atomic Energy Agency – IAEA. The radiological accident in Goiania, Vienna, IAEA (1988).
- [3] Corpo de Bombeiros Militar do Estado de Goiás. Fire Department – Officers Registers, 2º Ten Elison Nunes Cavalcante - Document (1987).
- [4] A. D. da Cruz, D. M. e Silva, C. C. da Silva, R. J. Nelson, L. M. Ribeiro, E. R. Pedrosa, J. C. Jayme, M. P. Curado. Microsatellite mutations in the offspring of irradiated parents nineteen years after the Cesium-137 accident, *Mutat. Res.* 652 (2008) 175-179.
- [5] A.D. da Cruz; A.G. McArthur, C.C Silva, M.P. Curado, B.W.Glickman. Humans micronucleus counts are correlated age, smoking and cesium-137 dose in the Goiânia (Brazil) radiological accident, *Mutat. Res.* 313 (1994) 57-68.
- [6] A.D. da Cruz, J. Curry, M.P. Curado, B.W. Glickman. Monitoring *hprt* mutant frequency over time in T-lymphocytes of people accidentally exposed to high doses of ionizing radiation, *Environ. Mol. Mutagen.* **27** (1996) 165-175.
- [7] A.D. da Cruz, B.W. Glickman. Nature of mutation in the human *hprt* gene following in vivo exposure to ionizing radiation of cesium-137, *Environ. Mol. Mutagen.* 30 (1997) 385-395.
- [8] H. Ellegren. Human mutation-blame (mostly) men, *Nature Genet.* 31 (2002) 9-10.
- [9] Bennett, P. Microsatellites, *J Clin Pathol: Mol Pathol.* 53 (2000) 177-183.

- [10] Y.E. Dubrova, O.G.Ploshchanskaya, O.S.Kozionva, A.V. Akleyev. Minisatellite germline mutation rate in the Techa River population, *Mutat. Res.* 602 (2006) 74-82.
- [11] S. Sankaranarayanan, R. Chakraborty, Ionizing radiation and genetic risks XI. The doubling dose estimates from the mid-1950s to present and the conceptual change to the use of human data on spontaneous mutation rates and mouse data on induced mutation rates for doubling dose calculations, *Mutat. Res.* 453 (2000) 107-127.
- [12] M. Klintschar, E.M. Dauber, U. Ricci, N. Cerri, U.D. Immel, M. Kleiber, W.R. Mayr, Haplotype studies support slippage as the mechanism of germline mutations in short tandem repeats, *Electrophoresis* 25 (2005) 3344-3348.
- [13] Y-C, Li , A.B. Korol, T. Fahima, A. Beiles, E. Nevo. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review, *Mol. Ecol.* 11 (2002) 2453-2465.
- [14] A.M. Valdes, M. Slatkin, N.B. Freimer. Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited, *Genetics* 133 (1993) 737-749.
- [15] K. Furitsu, H. Ryo, K.G.Yeliseeva, T.T.Thuy le, H. Kawabata, E.V.Krupnova, V.D.Trusova, V.A.Rzheutsky, H. Nakajima, N. Kartel, T. Nomura, K. Furitsu. Microsatellite mutation shows no increases in the children of the Chernobyl liquidators, *Mutat. Res.* 581 (2005) 69-82.
- [16] X. Xu, M. Peng, Z. Fang, X. Xu. The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length, *Nat. Genet.* 24 (2000) 396-399.
- [17] M. Kodaira, S. Izumi, N. Takahashi, N.Nakamura. No evidence of radiation effect on mutation rates at hypervariable minisatellite loci in the germ cells of atomic bomb survivors, *Radiat. Res.* 162 (2004) 350-356.

- [18] R.J. Slebos, R.E. Little, D.M. Umbach, Y. Antipkin, T.D. Zadaorozhnaja, N.A. Mendel, C.A. Sommer, K. Conway, E. Parrish, S. Gulino, J.A. Taylor. Mini- and microsatellite mutations in children from Chernobyl accident cleanup workers, *Mutat. Res.* 559 (1-2) (2004) 143-151.
- [19] A. Kiuru, A. Auvinen, M. Luokkamaki, K. Makkonen, T. Veidebaum, M. Tekkel, M. Rahu, T. Hakulinen, K. Servomaa, T. Rytomaa and R. Mustonen, Hereditary minisatellite mutations among the offspring of Estonian Chernobyl cleanup workers, *Radiat. Res.* 159 (2003) 651-655.
- [20] H. Sh. Weinberg, A. B. Korol, V. M. Kirzhner, A. Avivi, T. Fahima, Eviatar Nevo, S. Shapiro, G. Rennert, O. Piatak, E. I. Stepanova, E. Skvarkaja. Very High Mutation Rate in Offspring of Chernobyl Accident Liquidators, *Proc. Biol. Sci.* 268 (2001) 1001-1005.
- [21] L.A. Livshits, S.G. Malyarchuk, S.A. Kravchenko, G.H. Matsuka, E.M. Lukyanova, Y.G. Antipkin, L.P. Arabskaya, E. Petit, F. Giraudeau, P. Gourmelon, G. Vergnaud and B. Le Guen. Children of chernobyl cleanup workers do not show elevated rates of mutations in minisatellite alleles, *Radiat. Res.* 155 (2001) 74-80.
- [22] L.S. Mikhalevich, F.A. de Zwart, G.A. Perepetskaya, N.V. Chebotareva, E.A. Mikhalevich, A.D. Tate. Radiation effects in lymphocytes of children living in a Chernobyl contaminated region of Belarus, *Int. J. Radiat. Biol.* 76 (2000) 1377-1385.
- [23] Y.E. Dubrova, M. Plumb, J. Brown, A.J. Jeffreys. Radiation-induced germline instability at minisatellite loci, *Int. J. Radiat. Biol.* 74 (6) (1998) 689-96.
- [24] C. Satoh, N. Takahashi, J. Asakawa, M. Kodaira, R. Kuick, S.M. Hanash and J.V. Neel. Genetic analysis of children of atomic bomb survivors, *Environ. Health Perspect.*, 104 (3) (1996) 511-519.

- [25] Y.E. Dubrova. Radiation-induced mutation at tandem repeat DNA loci in the mouse germline: spectra and doubling doses, *Radiat. Res.* 163 (2) (2005) 200-207.
- [26] Y.E. Dubrova. Germline mutation induction at mouse and human tandem repeat DNA loci, *Adv. Exp. Med. Biol.* 518 (2003) 115-29.
- [27] Y.E. Dubrova, O.G.Ploshchanskaya, O.S.Kozionva, A.V. Akleyev. Minisatellite germline mutation rate in the Techa River population, *Mutat. Res.* 602 (2006) 74-82.

Table 1.
Birth years of the children of the exposed group

Children	Birth year	Presence of STR mutations
1	1987	+
2	1989	+
3	1988	-
4	1995	+
5	1989	+
6	1991	+
7	1998	-
8	1987	-
9	1990	-
10	1995	-
11	1998	-
12	1991	+
13	1991	+
14	1999	-
15	1992	-
16	2005	-

Table 2. Whole set of mutational data for each STR locus in the exposed group

Microsatellite locus	Number of paternal mutations	Number of maternal mutations	Number of paternal or maternal mutations (undetermined type of mutation)	Number of children and number of alleles analyzed
D18S51	-	-	-	
Penta E	1	-	-	
TH01	1	-	-	
CSF1PO	1	1	-	
D13S317	1	-	-	
D5S818	1	-	-	
D8S1179	-	-	2	16 children (192 alleles)
Amelogenin	-	-	-	
D3S1358	-	-	-	
FGA	2	-	-	
TPOX	1	-	-	
Vwa	-	-	-	
Total	8	1	2	

Table 3. Whole set of mutational data for each STR locus in the control group

Microsatellite locus	Number of paternal mutations	Number of maternal mutations	Number of paternal or maternal mutations (undetermined type of mutation)	Number of children/ analyzed	Number of alleles
D7S820	2	-	-		
D13S317	1	1	1		
D16S539	2	-	-		
CSF1PO	-	-	-		
TPOx	-	-	-		
TH01	-	-	-		
F13A01	-	-	-		
FESPS	-	-	-	300 children/	
vWA	2	-	-	3600 alleles	
LPL	-	-	1		
F13B	-	-	-		
HPRTB	-	-	-		
Total	7	1	2		

Table 4.
 Characteristics of the group exposed to CsCl-13

Case	Mother alleles	Child alleles	Father alleles	Mutated Locus	Mutation rate
04	12,13	10,13	11,14	Penta E	0,023
13	7,9	7,8	9,11	TH01	0,023
12	11,13	10,11	12,12	CSF1PO	0,045
05	13,14	11,12	11,12		
13	12,12	11,12	12,13	D13S317	0,023
13	10,12	10,13	12,14	D5S818	0,023
01	13,14	12,13	13,14	D8S1179	0,045
02	13,14	12,14	13,14		
01	20,23	23,23	20,24	FGA	0,045
04	21.2,21.2	21.2,25	23,26		
06	8,12	12,13	11,12	TPOx	0,023

Table 5.
 Characteristics of the control group, according to mutated locus and mutation rate/locus

Case	Mother alleles	Child alleles	Alleged father	Mutated Locus	Mutation rate
A74	11,13	12,13	11,11		
A143	11,12	10,12	9,12	D16S539	0.0017
A103	8,12	8,11	10,12		
A112	8,10	10,11	12,12	D7S820	0.0017
A91	11,14	9,13	9,11		
A161	11,11	9,10	9,10	D13S317	0.0025
A488	9,14	8,13	8,12		
A117	17,18	15,18	16,17		
A773	14,16	11,14	15,16	vWA	0.0017
A655	9,10	10,11	10,10	LPL	0.0008

ANEXO 9**COMPROVANTES DE RECEBIMENTO DA REVISTA CIENTÍFICA**

From: "Mutation Research" <mutgentox@elsevier.com>

To: <daniela@persogo.com.br>

Sent: Monday, June 23, 2008 10:01 AM

Subject: Submission Confirmation

Dear Daniela,

Your submission entitled "Microsatellite mutations in children from Cesium-137 accident liquidators" has been received by Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/mutgen/>.

Your username is: Danielamelo

Your password is: *****

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

From: "Mutation Research" <mutgentox@elsevier.com>

To: <daniela@persogo.com.br>

Sent: Monday, June 23, 2008 10:33 AM

Subject: A manuscript number has been assigned: MUTGEN-D-08-00191

Ms. Ref. No.: MUTGEN-D-08-00191

Title: Microsatellite mutations in children from Cesium-137 accident liquidators
Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

Dear Daniela,

Your submission entitled "Microsatellite mutations in children from Cesium-137 accident liquidators" has been assigned the following manuscript number: MUTGEN-D-08-00191.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/mutgen/>.

Your username is: Danielamelo

Your password is: *****

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Brigitte Neilson

Journal Manager

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis