



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR
LABORATÓRIO DE PESQUISAS REPLICON

EVIDÊNCIA DO AUMENTO DE DESVIOS MENDELIANOS MEDIANTE ANÁLISE
TRANSGERACIONAL DE MUTAÇÕES GERMINATIVAS EM POPULAÇÃO EXPOSTA
À RADIAÇÃO IONIZANTE DE CÉSIO-137

Goiânia – GO

©2022



UFG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Lorraynne Guimarães Oliveira

3. Título do trabalho

EVIDÊNCIA DO AUMENTO DE DESVIOS MENDELIANOS MEDIANTE ANÁLISE
TRANSGERACIONAL DE MUTAÇÕES GERMINATIVAS EM POPULAÇÃO EXPOSTA À
RADIAÇÃO IONIZANTE DE CÉSIO-137

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;

- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Aparecido Divino da Cruz, Usuário Externo**, em 03/10/2022, às 10:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **LORRAYNE GUIMARÃES OLIVEIRA, Discente**, em 03/10/2022, às 20:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3234812** e o código CRC **790B1806**.

Referência: Processo nº 23070.038341/2022-43

SEI nº 3234812

LORRAYNNE GUIMARÃES OLIVEIRA

EVIDÊNCIA DO AUMENTO DE DESVIOS MENDELIANOS MEDIANTE ANÁLISE
TRANSGERACIONAL DE MUTAÇÕES GERMINATIVAS EM POPULAÇÃO EXPOSTA
À RADIAÇÃO IONIZANTE DE CÉSIO-137

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e
Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás (UFG)
como requisito para obtenção do título de Doutora em Genética e
Biologia Molecular.

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular

Linha de pesquisa: Genômica funcional, estrutural e proteômica

Orientador: Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz

Co-Orientadora: Dra. Emília Oliveira Alves Costa

Goiânia – GO

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Oliveira, Lorryne Guimarães
EVIDÊNCIA DO AUMENTO DE DESVIOS MENDELIANOS
MEDIANTE ANÁLISE TRANSGERACIONAL DE MUTAÇÕES
GERMINATIVAS EM POPULAÇÃO EXPOSTA À RADIAÇÃO IONIZANTE
DE CÉSIO-137 [manuscrito] / Lorryne Guimarães Oliveira. - 2022.
CXII, 112 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz; co-orientadora
Dra. Emília Oliveira Alves Costa.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Genética e
Biologia Molecular, Goiânia, 2022.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, mapas, fotografias, abreviaturas, símbolos, gráfico,
tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Bioinformática. 2. SNVs. 3. Genotipagem. 4. Desvio
Mendeliano. I. da Cruz, Aparecido Divino, orient. II. Título.

CDU 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata Nº 40 da sessão de Defesa de Tese de **Lorrynne Guimarães Oliveira** que confere o título de Doutora em **GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR**, na área de concentração em **GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR**.

Aos **doze dias do mês de agosto de dois mil e vinte e dois**, a partir das **13h30**, por videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada “**CARACTERIZAÇÃO DO ESPECTRO E TAXA DE MUTAÇÕES GERMINATIVAS NA GERAÇÃO F1 DE INDIVÍDUOS EXPOSTOS ACIDENTALMENTE À RADIAÇÃO IONIZANTE DE CÉSIO-137**”. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, Professor Doutor **Aparecido Divino da Cruz (PUC-GO)** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor Doutor **Claudio Carlos da Silva (PUC-GO)**, membro titular externo; Professor Doutor **Hugo Pereira Leite Filho (UEG)**, membro titular externo; Professora Doutora **Daniela de Melo e Silva (UFG)**, membro titular interno; Professora Doutora **Renata de Oliveira Dias (UFG)**, membro titular interno. Durante a arguição os membros da banca fizeram sugestão de alteração do título. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese tendo sido a candidata aprovada pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Professor Doutor **Aparecido Divino da Cruz**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos **doze dias do mês de agosto de dois mil e vinte e dois**.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

Evidência do aumento de desvios mendelianos mediante análise transgeracional de mutações germinativas em população exposta à radiação ionizante de Césio-137



Documento assinado eletronicamente por **Aparecido Divino da Cruz, Usuário Externo**, em 12/08/2022, às 17:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renata De Oliveira Dias, Professora do Magistério Superior**, em 12/08/2022, às 17:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniela De Melo E Silva, Professor do Magistério Superior**, em 12/08/2022, às 17:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **HUGO PEREIRA LEITE FILHO, Usuário Externo**, em 12/08/2022, às 17:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por **Cláudio Carlos da Silva, Usuário Externo**, em 15/08/2022,



às 18:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3111695** e o código CRC **C2C5CFD8**.

Referência: Processo nº 23070.038341/2022-43

SEI nº 3111695

Dedico esta tese de doutorado aos meus pais, Luiz de Souza Oliveira e Vicentina Barbosa Guimarães, e ao meu irmão Paulo Henrique de Souza Oliveira, pois a vocês devo tudo e sem sua ajuda não teria chegado tão longe.

Agradecimentos

Primeiramente, a Deus por ter me dado saúde e forças para percorrer esse caminho, e por ter colocado pessoas iluminadas no meu trajeto.

A pandemia do coronavírus (COVID-19) tornou esses últimos anos extremamente difíceis e sem a ajuda de diversas pessoas este estudo não seria concluído. Sou grata por todas as horas e horas de reuniões *online*, por toda a dedicação, esforços e amor de todos.

Aos meus pais, Luiz de Souza Oliveira e Vicentina Barbosa Guimarães, que não mediram esforços para que eu conquiste os meus sonhos e sempre se doam de alma e coração em meus planos e projetos. À minha avó Jandira Barbosa dos Santos e ao meu irmão Paulo Henrique de Souza Oliveira, que me apoiam incondicionalmente. Aos meus tios e primos que mesmo distante fisicamente me deram todo incentivo e apoio possível. Amo todos vocês.

Ao meu orientador Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz por toda paciência, tempo, entusiasmo e, principalmente, amor dedicado a mim. Eu não sei se tenho palavras para poder descrever o quanto o senhor é importante na minha vida e o quanto me inspira tanto na vida profissional quanto como ser humano. Sou grata por todos esses anos de parceria e amizade. À minha coorientadora Prof^a. Dr^a. Emília de Oliveira Alves Costa por sempre estar disponível, por sempre responder às minhas dúvidas com tanto carinho e sempre acreditar no meu potencial.

A todos do Núcleo de Pesquisas Replicon e Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular (LaGene) por esses oito anos de companheirismo. Com vocês aprendi muito e dei muitas risadas, sou grata por ter conhecido cada um de vocês, estudantes, funcionários e professores. Gostaria de agradecer principalmente àqueles que contribuíram diretamente neste estudo, Elza Maria Gonçalves Santos Uchoa, Prof^a. Dr^a. Fernanda Ribeiro Godoy, Isaque de Sousa Aquino, Juliana Ferreira da Silva, Nayara Lopes de Souza e Samara Socorro Silva Pereira. Por toda disponibilidade de me acompanhar nas coletas nas casas dos participantes desse estudo e por toda dedicação em todas as etapas dessa pesquisa.

A todos os professores e colegas discentes do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular pela contribuição na minha formação, por terem feito as aulas e apresentações um momento de aprendizado mais leve e divertido.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), à FAPEG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás), e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo e por todo o auxílio financeiro.

Ao Centro de Assistência aos Radioacidentados (C.A.R.A.) por todo o auxílio e suporte para contato com os participantes desse estudo.

À Prof^a. Dr^a. Renata de Oliveira Dias e ao Prof. Dr. Hugo Pereira Leito Filho que me ajudaram nas análises e sempre estavam disponíveis, sempre encontravam um tempo para tirar minhas dúvidas com muita paciência e carinho. Ao Prof. Dr. Claudio Carlos da Silva e à Prof^a. Dr^a. Daniela de Melo e Silva por todos os ensinamentos, contribuições ao estudo, apoio e incentivo. Vocês sempre acreditaram em mim e me deram oportunidades incríveis para o meu aperfeiçoamento profissional e pessoal. Estou muito feliz de ter todos vocês integrando o meu comitê de avaliação e poderem dar mais ideias e contribuições para este estudo.

A todos aqueles que foram afetados de alguma forma pelo acidente com a cápsula de Césio-137 na cidade de Goiânia. A todos aqueles que aceitaram participar deste estudo, que me receberam em suas casas, me contaram suas histórias e compartilharam comigo algumas das suas angústias, revelando como o acidente ainda é presente em suas vidas. Quero que saibam que esse estudo e os outros monitoramentos feitos são para e por vocês, que todo o conhecimento gerado nesses estudos possam contribuir para melhor compreender os efeitos da radioatividade em suas vidas.

A todos os meus amigos que não foram citados, mas que também puderam contribuir de alguma forma, sejam me ouvindo em momentos de preocupação ou me recebendo em casa para um café para um momento de descontração.

Tabelas, Quadros e Figuras.....	xiii
Resumo.....	xvi
Abstract.....	xvii
1 INTRODUÇÃO.....	18
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
2.1 Radiação: definições, conceitos e efeitos.....	20
2.1.1 Mecanismos e impactos nos efeitos na saúde induzidas por radiação.....	22
2.2 O que são mutações e como a radiação ionizante podem forma-las.....	24
.....	
2.3 Indução de mutações em humanos pela radiação ionizante.....	28
2.4 O Acidente Radiológico de Goiânia.....	28
2.5 Estado da arte do monitoramento.....	31
2.6 Aplicações e vantagens do Sequenciamento de Nova Geração na mutagênese.....	35
2.7 Variante de Nucleotídeo Único (SNV)	37
3 OBJETIVOS.....	40
3.1 Objetivo Geral.....	40
3.2 Objetivos Específicos.....	40

4	MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1	Delineamento do estudo e grupo amostral.....	41
4.2	Obtenção e preparo das amostras.....	44
4.3	Extração e quantificação das amostras de DNA.....	44
4.4	Construção da Biblioteca GBS.....	44
4.5	Identificação das SNV.....	45
4.6	Estimativa dos Desvios Mendelianos.....	45
4.7	Análise estatística.....	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
6	CONCLUSÃO.....	61
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
8	ANEXO.....	71
ANEXO I	Questionário para o monitoramento dos indivíduos acidentalmente expostos ao césio-137.....	71
ANEXO II	Termo de consentimento livre e esclarecido.....	74
ANEXO III	Termo de assentimento. Grupo 1 (4 a 7 anos).....	77
ANEXO IV	Termo De Assentimento. Grupo 2 (8 a 10 anos).....	79
ANEXO V	Termo de assentimento. Grupo 3 (11 a 14 anos).....	81
ANEXO VI	Termo de assentimento. Grupo 4 (15 a 18 anos incompleto).....	83
ANEXO VII	Resolução CNS nº 441, de 12 de maio de 2011.....	84
ANEXO VIII	Protocolo de extração/purificação de DNA genômico de 50 – 300 µl de sangue total – ilustratm ge Healthcare:	91

ANEXO IX	Construção da biblioteca GBS para amostras de humanos otimizado a partir do protocolo sugerido por Elshire et al. (2011).....	93
ANEXO X	Dados descritivos dos grupos caso e controle para as gerações parental e F1 incluídos no estudo sobre a indução de mutação germinativa na prole de indivíduos expostos acidentalmente a altas e baixas doses de radiação ionizante de césio-137	100
ANEXO XI	Artigo “Como a genética contribuiu para compreender os efeitos biológicos da exposição humana à radiação ionizante de césio-137?” publicado na revista Genética na Escola.....	102

Tabelas

Tabela 1. Dados gerais dos grupos caso e controle para as gerações parental e F1 incluídos no estudo da sobre a indução de mutação germinativa na prole de indivíduos expostos acidentalmente de radiação ionizante de ¹³⁷ Cs.....	47
Tabela 2. Dados descritivos dos desvios mendelianos dos grupos caso e controle para as gerações parentais no estudo sobre a indução de mutação germinativa na prole de indivíduos expostos acidentalmente a doses baixas e alta de radiação ionizante de ¹³⁷ Cs.....	48
Tabela 3. Resumo dos dados descritivos dos grupos caso e controle para as seis classes de substituição de bases no genoma de crianças concebidas após exposição dos pais a baixas doses de radiação ionizante e seus controles.....	53
Tabela 4. Estimativa do Risco Relativo e do <i>Odds Ratio</i> de uma SNV ocorrer na prole de um indivíduo exposto acidentalmente a doses baixas e alta de radiação ionizante de ¹³⁷ Cs comparado ao grupo caso.....	56

Quadros

Quadro 1. Disposição do grupo caso e controle incluídos no estudo sobre a indução de mutação germinativa na prole de indivíduos expostos acidentalmente a altas e baixas doses de radiação ionizante de ¹³⁷ Cs.....	41
---	----

Figura

Figura 1. Esquemática do processo de ionização no qual a radiação possui energia suficiente para ejetar um elétron de um átomo ou de uma molécula, ao qual ele está ligado por força elétrica. Fonte: Adaptado de SARTORI, 2008.....	20
Figura 2. Representação esquemática dos efeitos diretos e indiretos da radiação no DNA. Na ação direta a radiação danifica o DNA sem intermediários e na ação indireta a radiação interage com a molécula de água produzindo radiólises da água e assim	

danificando o DNA. Esses danos podem ser SSBs ou DSBs, entre outros. Fonte: Adaptado de SARTORI, 2008..... 21

Figura 3. As mutações de ponto podem ser por substituição, onde há mudanças de bases ou pequenos indels que são inserções ou deleções de bases. Essas alterações causam mudanças na matriz de leitura a partir da mutação, podendo resultar em um produto gênico diferente do produto inicial. Fonte: Adaptado de EL-SHARKASY e BADR, 2018..... 25

Figura 4. Esquema demonstrando diversos tipos de mutações de substituição e suas consequências. Silenciosas: Há uma alteração no códon, porém o aminoácido codificado é o mesmo, não modificando a proteína produzida. Missense: Ocorre uma substituição no códon e o aminoácido codificado é alterado de arginina para treonina causando mudanças na proteína gerada. Nonsense: Há uma alteração de um códon codificador de tirosina para um códon de termino de tradução podendo produzir uma proteína incompleta. Adaptado de EL-SHARKASY e BADR, 2018..... 26

Figura 5. Mapa da cidade de Goiânia com indicação da área mais afetada pelo desastre radioativo. Os locais que estão sinalizados com um círculo vermelho, viviam as pessoas que foram afetadas diretamente pelo acidente. Fonte: Adaptado de DA SILVA, 2017..... 30

Figura 6. Cariótipo obtido no estudo de DA SILVA; DA CRUZ, 2002. A: Uma metáfase demonstrando um cromossomo dicêntrico (seta azul) e acêntrico (círculo azul). B: Uma metáfase que passou pela técnica de FISH expondo uma translocação..... 32

Figura 7. Linha do tempo do monitoramento da saúde genética da população exposta ao ¹³⁷Cs, indicando os estudos produzidos no período de 1994 a 2021 pelo Núcleo de Pesquisa Replicon da PUC Goiás..... 24

Figura 8. Principais etapas da Genotipagem por Sequenciamento (GBS). Adaptado de Motta, 2016..... 37

Figura 9. Representação esquemática de uma Variante de Nucleotídeo Único. A imagem mostra uma substituição do tipo CG→AT. Adaptado de NESTA; TAFUR; BECK, (2021)	38
Figura 10. Fluxograma da organização metodológica realizada no presente estudo.....	43
Figura 11. Gráficos apresentando a distribuição normal do grupo controle nos eventos mutacionais. A: Mutações do tipo A>C e T>G. B: Mutações do tipo A>G e T>C. C: Mutações do tipo A>T e T>A. D: Mutações do tipo C>A e G>T. E: Mutações do tipo C>G e G>C. F: Mutações do tipo C>T e G>A.....	50
Figura 12. Gráficos apresentando a distribuição não normal do grupo caso nos eventos mutacionais. A: Mutações do tipo A>C e T>G. B: Mutações do tipo A>G e T>C. C: Mutações do tipo A>T e T>A. D: Mutações do tipo C>A e G>T. E: Mutações do tipo C>G e G>C. F: Mutações do tipo C>T e G>A.....	51
Figura 13. Figura 13. Correlação de Pearson entre quatro variáveis, total de desvios mendelianos, dose, sexo e idade do progenitor. A: Grupo Controle. B: Grupo Caso.....	52
Figura 14. Análise da influência da dose de controles e casos expostos a doses muito baixas de radiação ionizante de ¹³⁷ Cs em Goiânia (Brasil). Teste de Regressão Linear....	53
Figura 15. Média das taxas de Desvios Mendelianos da progênie de controles e casos expostos à radiação ionizante de ¹³⁷ Cs em Goiânia (Brasil) comparando doses e idade dos progenitores. Em verde os expostos e em azul os controles.....	54
Figura 16. Indica a proporção de mutações do tipo transição e transversão nos grupos controle e casos da população de Goiânia exposta acidentalmente a baixas doses de radiação ionizante.....	58

Resumo

Em 13 de setembro de 1987 ocorreu em Goiânia, Goiás (Brasil) o maior acidente radiológico em área urbana, tendo como consequência a exposição humana, animal, vegetal e ambiental pelo Césio-137. Os efeitos mutagênicos sobre a linhagem germinativa de pessoas expostas à radiação ionizante são particularmente preocupantes, pois o risco de distúrbios hereditários pode ser aumentado. As Variantes de Nucleotídeo Único são a forma mais comum de variação genética humana e ocorrem em maior abundância em região não codificadora e nos últimos anos diversas tecnologias estão sendo desenvolvidas para identificar essas variantes. Uma destas tecnologias é o Sequenciamento de Nova Geração que oferecem maiores quantidades de dados, tempos de sequenciamento mais curtos e custos reduzidos. O objetivo deste trabalho é estabelecer espectro e frequência de substituições de base *de novo* de origem germinativa a partir de dados de sequenciamento de nova geração do trio, correspondendo a uma criança da geração F1 e seus pais biológicos, expostos acidentalmente à altas e baixas doses de RI de césio-137, contribuindo com o conhecimento sobre os efeitos biológicos de exposição à radiação ionizante. Considerando caso e controle foram incluídos os resultados de 38 progenitores, e uma prole de 14 filhos (as) nascidos do grupo exposto e 5 filhos da população não exposta. Os indivíduos expostos tiveram ~39% de incremento de média global de DMs comparado ao controle. As mães expostas tiveram ~44% de incremento de média global de DMs comparado ao controle. A mutação do tipo A:T>C:G foi a que demonstrou um maior aumento estatisticamente significativo de acontecer na prole dos indivíduos expostos. As frequências de substituição de transições foram mais altas do que as transversões nos filhos de casos e controles, porém a diferença não é estatisticamente significativa. Em conclusão, com a metodologia e os biomarcadores usados foi possível identificar a origem de mutação dos progenitores, como também o tipo de substituição e informar qual a variante que sofreu a mutação, foi possível ainda detectar a frequência da mutação de linhagem germinativa em DM o que possibilitou estudar retrospectivamente esta população exposta à RI.

Palavras Chaves: Bioinformática; SNVs; Genotipagem; Desvio Mendeliano

Abstract

On September 13th, 1987, the largest radiological accident in urban areas occurred in Goiânia, Goiás (Brazil), resulting in human, animal, plant and environmental exposure by Cesium-137. The mutagenic effects on the germline of people exposed to ionizing radiation are of particular concern, as the risk of inherited disorders can be increased. Single Nucleotide Variants are the most common form of human genetic variation and occur in greater abundance in a non-coding region and in recent years, several technologies have been developed to identify these variants. One of these technologies is Next-Generation Sequencing, which offers greater amounts of data, shorter sequencing times and reduced costs. The objective of this work is to establish the spectrum and frequency / rate of base *de novo* substitutions of germ origin from the trio's new generation sequencing data, corresponding to an F1 generation child and his biological parents, accidentally exposed to high and low doses of IR of cesium-137, contributing to knowledge about the biological effects of exposure to ionizing radiation. Considering case and control, the results of 38 parents, and an offspring of 14 children born from the exposed group and 5 children from the unexposed population were included. Exposed individuals had ~39% increase in global mean DMs compared to controls. Exposed mothers had ~44% increase in global mean DMs compared to controls. The A:T>C:G mutation was the one that showed the greatest statistically significant increase in occurrence in the offspring of exposed individuals. Transition replacement rates were higher than transversions in the offspring of cases and controls, but the difference is not statistically significant. In conclusion, with the methodology and biomarkers used, it was possible to identify the origin of mutation in the parents, as well as the type of substitution and to inform which variant was mutated, it was also possible to detect the frequency of the germline mutation in DM which made it possible to retrospectively study this population exposed to IR.

Keywords: Bioinformatics; SNVs; Genotyping; Mendelian Deviation

1. Introdução

Um grave acidente radiológico em área urbana ocorreu em Goiânia, Goiás (Brasil) em 1987. Um total de 249 pessoas foram expostas de forma considerável à radiação ionizante (RI) de Césio-137 (^{137}Cs), culminando em quatro óbitos devido às altas doses absorvidas que variaram até 7 Gray (Gy) (NATARAJAN et al., 1998; ROMM et al., 2011). O ^{137}Cs é um metal alcalino e seu período de decaimento radioativo é de 30,2 anos. A radiação ionizante emitida por ^{137}Cs é comumente usada para fins médicos em teleterapia (LESTAEVEL et al., 2010; VIEIRA, 2013). A exposição a doses elevadas de ^{137}Cs é caracterizada pela indução da síndrome de mielossupressão observada após irradiação com radiação ionizante aguda (LESTAEVEL et al., 2010).

Nos últimos anos, evidências crescentes sugerem que mesmo doses baixas de radiação podem ter efeitos profundos nas funções celulares. A dose mínima que oferece evidência direta de aumento de risco oncológico foi gradualmente reduzida para cerca de 0,05 a 0,1Gy em humanos e modelos animais. Além disso, existem evidências emergentes de que o limiar para outros efeitos estocásticos tardios pode ser menor do que o originalmente observado. É sabido que altas doses de RI, também têm fortes efeitos mutagênicos, genotóxicos e citotóxicos. Os tecidos são extremamente vulneráveis a esses danos que, por exemplo, podem causar acúmulo progressivo de danos no DNA (ALESSIO et al 2015; KITAHARA et al., 2015).

A célula germinativa, como portadora de informação genética é essencial para a aptidão reprodutiva humana e o desenvolvimento da prole. A saúde das células germinativas é refletida não apenas na morfologia, estrutura e função fisiológica, mas também na integridade e estabilidade do genoma que elas carregam, o que é indispensável para a transmissão de informação genética entre as gerações. De fato, durante toda a vida das células germinativas, uma diversidade de variações genômicas surgirá e, em alguns casos, pode afetar possivelmente a estabilidade do genoma (MA et al., 2017).

Na última década, os padrões de mudança de exposição individual e os avanços tecnológicos têm apoiado uma nova era de estudos epidemiológicos de radiação em larga escala de populações ambiental e ocupacionalmente expostas. Uma destas tecnologias é o Sequenciamento de Nova Geração (em inglês, *Next-Generation Sequencing* - NGS), que auxiliou a ampliação das pesquisas nesta área (KITAHARA et al., 2015). Sequenciar as mutações no genoma revela sua distribuição espacial, normalmente mostrando que elas agrupam em *hotspot* com frequência de mutação 3 a 10 vezes mais alta que em outras regiões

genômicas. O sequenciamento também revela os tipos de mutações e as suas proporções relativas (BRASH, 2015).

A identificação de variantes de sequências no genoma continua sendo um passo desafiador, porém crítico, na análise de dados de NGS. Enormes conjuntos de dados brutos são produzidos pelo sequenciamento, junto com milhares de variantes. Isso leva a um grande problema que deixa os pesquisadores inseguros sobre onde começar. Portanto, é necessário explorar uma estratégia de classificação eficaz e eficiente para os dados de sequenciamento, que pode garantir que as mutações detectadas realmente induzidas e, então, reduzir efetivamente o escopo das alterações nucleotídicas causadoras de um fenótipo mutante (DU et al., 2018).

O monitoramento genético da população acidentalmente exposta ao ^{137}Cs em Goiânia-Goiás tem sido realizado desde 1987. Em 1994, da Cruz et al. utilizou o teste de micronúcleo para investigar as consequências genéticas dos radioacidentados, desde então foram usadas diversas tecnologias e biomarcadores para continuar o acompanhamento dessa população. Os resultados desses estudos mostraram a necessidade de se ampliar e validar novos marcadores genéticos que também possam ser úteis para o monitoramento genético à longo prazo da população exposta acidentalmente ao ^{137}Cs .

Melhorias nas tecnologias de análise genômica têm proporcionado a chance de investigar, com alto nível de precisão, diversos tipos de variantes genéticas, possibilitando uma estimativa real do risco genético da população exposta. O presente estudo propõe a investigação da frequência de substituições de bases em consequência da exposição à radiação ionizante em populações humanas para determinar a frequência de mutações germinativas induzidas pela exposição parental usando a tecnologia de NGS.

2. Referencial teórico

2.1 Radiação: definições, conceitos e efeitos.

Todos os organismos vivos são expostos diariamente à radiação. Além das exposições médicas diagnósticas e terapêuticas, estamos expostos cronicamente à radiação de fundo de raios cósmicos, resíduos radioativos, decaimento de radônio, testes nucleares e acidentes (DESOUKY et al., 2015). A irradiação de células e tecidos gera uma série de processos que ocorrem em nanossegundos. O primeiro evento é a interação biofísica entre radiação e células. A colisão entre radiação e átomos de células viáveis resulta na ejeção dos elétrons e na ionização (Figura 1). O evento de ionização é o primeiro passo que induz danos nas células resultantes de moléculas instáveis e mau funcionamento celular e molecular (YAHYAPOUR et al., 2018).

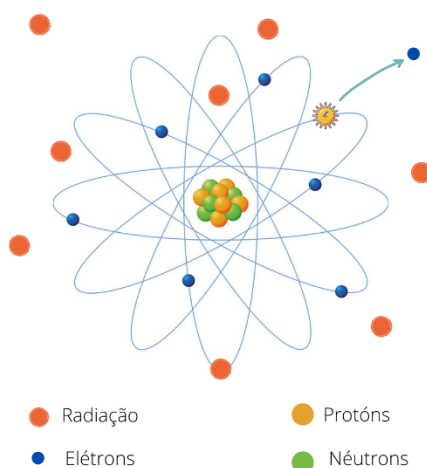


Figura 1. Esquemática do processo de ionização no qual a radiação possui energia suficiente para ejetar um elétron de um átomo ou de uma molécula, ao qual ele está ligado por força elétrica. Fonte: Adaptado de SARTORI, 2008

Os efeitos adversos da radiação ionizante são agrupados em duas categorias: efeitos determinísticos e efeitos estocásticos. Os efeitos determinísticos são proporcionais à dose, sendo que quanto maior a dose, mais severo é o efeito. Os efeitos estocásticos podem surgir sem que uma dose limite de radiação tenha sido ultrapassada, estando associados à uma probabilidade de ocorrência e manifestação destes efeitos, mesmo que a dose recebida seja baixa (DESOUKY et al., 2015).

A RI danifica diretamente o DNA e pode gerar lesões em bases únicas, quebra de fita simples (em inglês, *Single Strand Break – SSB*), quebras na dupla fita do DNA (em inglês,

Double Strand Break – DSB) (Figura 2), lesões agrupadas em vários locais próximas ligações cruzadas de DNA-DNA ou DNA-proteína, modificações na função celular e outras modificações químicas (BEHJATI et al.; 2016; MØLLER e MOUSSEAU, 2016; SAGE e SHIKAZONO, 2017).

Estes danos também podem ser por interação indireta das espécies reativas induzidas a partir de moléculas que circundam o DNA. Este último, comumente referido como efeito indireto, refere-se à interação da radiação com o ambiente molecular local em torno da molécula de DNA (por exemplo, água, sais, proteínas e moléculas de oxigênio). O efeito indireto surge principalmente da reação dos produtos de radiólise da água (radicais hidroxila, elétrons solvatados e átomos de hidrogênio) com o DNA (Figura 2) (ALIZADEH et al., 2015; KANAKOGLU et al., 2020).

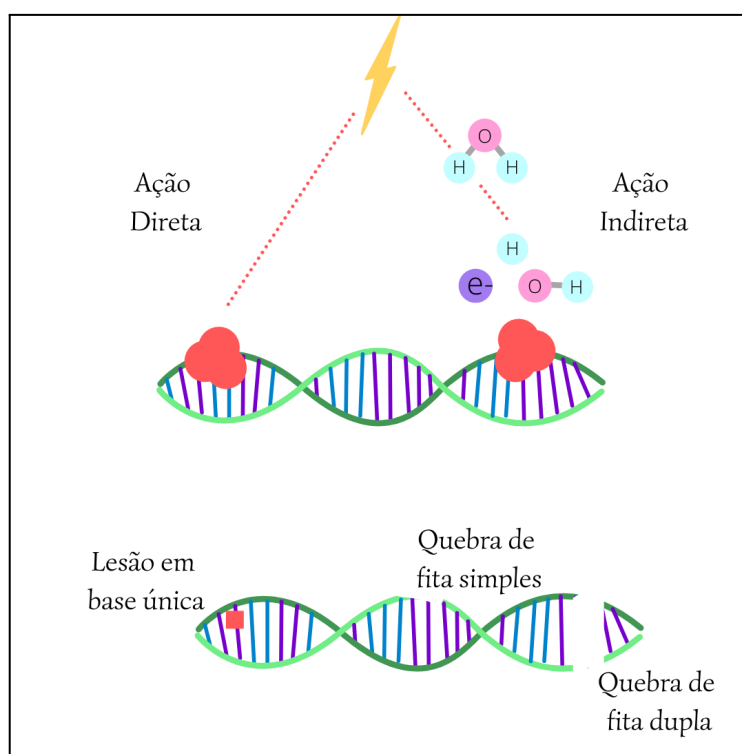


Figura 2. Representação esquemática dos efeitos diretos e indiretos da radiação no DNA. Na ação direta a radiação danifica o DNA sem intermediários e na ação indireta a radiação interage com a molécula de água produzindo radiólises da água e assim danificando o DNA. Esses danos podem ser SSBs ou DSBs, entre outros. Fonte: Adaptado de SARTORI, 2008

Danos maciços no DNA, observados após a exposição a doses clínicas de radiação ionizante, causam morte celular, seja por apoptose, catástrofe mitótica, necrose e autofagia. Entre esses, mecanismos de morte celular, necrose e apoptose estimulam as respostas do sistema imunológico através da secreção de alarmes de perigo (YAHYAPOUR et al., 2018).

2.1.1 Mecanismos e impactos nos efeitos na saúde induzidas por radiação

Muitos dos fenótipos associados aos efeitos da radiação foram associados ao câncer e ao processo carcinogênico, porém há uma série de efeitos não-cancerígenos, como distúrbios cardiovasculares, hipertensão, acidente vascular cerebral, opacidades no cristalino do olho, bem como efeitos no sistema nervoso central. Os estudos destes mecanismos e seus impactos estão evoluindo e com intensas investigações (MORGAN E SOWA, 2013; RÖDEL et al., 2015; HALL et al, 2017).

De acordo com Foray e colaboradores (2016) as respostas de RI dependem de alguns aspectos principais como (1) eventos adversos nos tecidos (efeitos não cancerígenos atribuíveis à morte celular, principalmente reações cutâneas), epilação, eritema e dermatite semelhantes a queimaduras de terceiro grau. Observações posteriores identificaram queimaduras em outros órgãos e tecidos irradiados, esse fenômeno é conhecido como radiosensibilidade; (2) câncer induzido por radiação que foram relatados pela primeira vez em 1902, essa propensão é denominada como radiosusceptibilidade; (3) efeitos não cancerígenos que são frequentemente considerados atribuíveis a outros mecanismos que não a morte celular, como cataratas e doenças circulatórias (por exemplo, efeitos cardio ou cerebro-vasculares) esse evento é denominado como radiodegeneração.

Os efeitos da radiação podem ser classificados como genômicos e não direcionados. Respostas celulares específicas observadas em reação à baixa dose foram descritas como Efeitos Não Direcionados (em inglês, *Non-targeted effects* - NTEs), Efeitos *bystander* induzidos por radiação (em inglês, *Radiation induced bystander effects* - RIBE), Instabilidade Genômica Induzida Por Radiação (em inglês, *Radiation Induced Genomic Instability* - RIGI) e efeitos abscopais. Todos esses fenômenos são considerados respostas à radiação que envolvem moléculas não direcionadas ou moléculas que não interagiram diretamente com a radiação. A propagação de efeitos prejudiciais de células irradiadas para células não irradiadas resultaria, presumivelmente, em relações de resposta supra lineares com a dose. Por outro lado, a expressão de respostas adaptativas que atenuam os efeitos prejudiciais iniciais induzidos pela radiação sugeriria uma relação de dose-resposta infra linear ou a existência de uma dose limiar abaixo da qual não haveria risco (DESOUKY et al., 2015; SZUMIEL, 2015; HORAI et al., 2018).

O maior paradigma clássico da biologia da radiação compreende o conceito de que a deposição de energia no núcleo e danos direcionados ao DNA são responsáveis pelas

consequências biológicas da exposição à radiação. Por outro lado, com base em descobertas mais recentes, existem evidências emergentes de NTEs no DNA. São ações que se manifestam em células não irradiadas que receberam um sinal comunicado de uma célula irradiada. Os NTEs incluem uma infinidade de respostas celulares geralmente associadas à exposição à radiação, além de várias outras respostas fenotípicas. As respostas ao estresse genotóxico em um sistema biológico são variáveis, e os NTEs não são observadas em todos os sistemas de modelos experimentais. O grau de resposta depende do tempo de análise, dose e taxa de radiação e qualidade da radiação (MORGAN E SOWA, 2013; RÖDEL et al., 2015).

Efeitos RIBE são observados em células não irradiadas que respondem aos sinais comunicados por uma célula irradiada. O RIBE induz e / ou modula respostas em uma célula não irradiada. Essas células *bystander* não irradiadas podem estar no mesmo ambiente físico que as células irradiadas usando exposições a micro-raios, ou cultivadas em meio transferido de culturas celulares que haviam sido irradiadas anteriormente. O RIBE foi observado em sistemas de cultura de células *in vitro* e em sistemas modelo *in vivo* (MORGAN E SOWA, 2013; DESOUKY et al., 2015).

A RIGI são efeitos que ocorrem na progênie de uma célula irradiada. Esta instabilidade pode ser vista mesmo após várias gerações que a célula parental foi irradiada. Embora a própria progênie não tenha sido diretamente afetada por radiação, ela é descendente clonal de uma célula irradiada (MORGAN E SOWA, 2013).

Os efeitos abscopais são geralmente associados a exposições clínicas à radiação ionizante em uma situação do tipo radioterapia. Como todo o corpo recebe radiação no momento do tratamento, algumas doses de radiação ficam ‘fora de campo’, ou seja, não está na região diretamente irradiada do paciente, porém estas dispersões devem ser consideradas efeitos de radiação de baixa dose (MORGAN E SOWA, 2013).

Uma característica comum desses efeitos é que eles se tornaram dominantes em baixas doses de irradiação e geralmente exibem relações não lineares de dose-resposta. Esses novos conceitos levam em consideração uma comunicação intercelular complexa e a interação de células irradiadas com o tecido circundante e o sistema imunológico (RÖDEL et al., 2015). Existem algumas sugestões de que o efeito não direcionado causa mudanças permanentes na estrutura do DNA que também podem ser transferidas para as gerações seguintes. A avaliação de marcos epigenéticos mostrou que a irradiação local resulta em hipometilação e também na

regulação positiva ou negativa na sistematização de alguns microRNAs (miRNAs) em tecidos não direcionados (YAHYAPOUR et al., 2018).

2.2 O que são mutações e como a radiação ionizante podem forma-las

O genoma é muito adaptável, sofre alterações no decorrer da sua própria síntese ou é alvo da ação de vários agentes físico-químicos oriundo do ambiente externo ou mesmo endógenos. Porém as células possuem diversos mecanismos para reparar essas lesões. Estas lesões podem prejudicar o processo de replicação e transcrição, podendo levar à morte celular ou até mesmo alterando a sequência do DNA, ou seja, ocasionando mutações (MATIOLI e FERNANDES, 2012).

Compreende-se como evento mutacional, qualquer alteração que ocorre na estrutura de DNA podendo ser reparada ou não e fixada. O conhecimento sobre como as mutações ocorrem e como sua frequência é afetada pela paisagem genômica é crucial para a compreensão do processo evolutivo e das doenças humanas. As mutações podem ser classificadas com base em seus efeitos na estrutura do DNA e no número de nucleotídeos que elas afetam (MAKOVA e HARDISON, 2015).

Nos mamíferos, algumas das mutações mais comuns são substituições de bases, pequenas inserções e deleções (*indels*), inserções de elementos transponíveis e duplicações segmentares (MAKOVA e HARDISON, 2015). São conhecidas como mutações de ponto as alterações em um único par de base do DNA ou de um pequeno número de pares de bases próximos, destacando-se as mutações *indels* e as de substituição de bases. Estas mutações são capazes de mudar a matriz de leitura (em inglês, *frameshift mutation*) isto é, um único nucleotídeo modificado altera toda sequência de códon desde a mutação, podendo resultar em um produto gênico diferente do original (Figura 3). (BRASH, 2015).

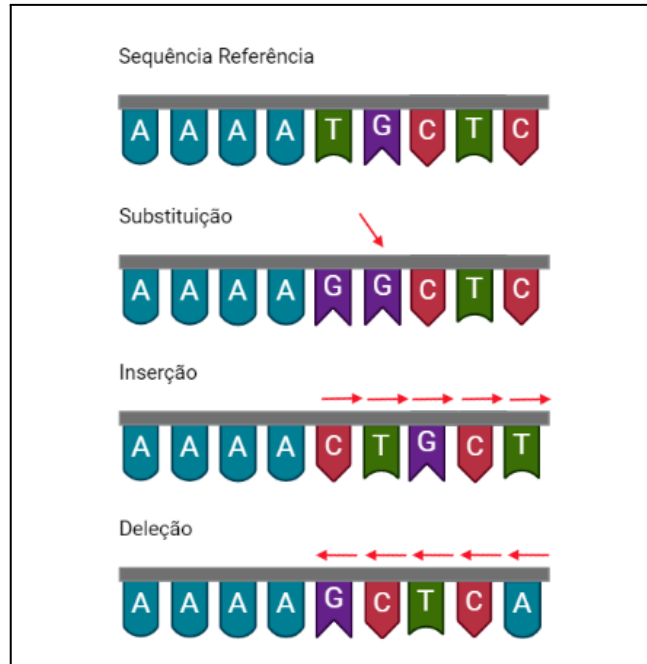


Figura 3. As mutações de ponto podem ser por substituição, onde há mudanças de bases ou pequenos *indels* que são inserções ou deleções de bases. Essas alterações causam mudanças na matriz de leitura a partir da mutação, podendo resultar em um produto gênico diferente do produto inicial. Fonte: Adaptado de EL-SHARKASY e BADR, 2018

Dois tipos diferentes de alterações podem ser distinguidos nas mutações de substituição de bases: (1) transversões, nas quais uma purina é substituída por uma pirimidina ou vice-versa, e (2) transições onde uma base é substituída por outra do mesmo grupamento químico, por exemplo uma purina é substituída por outra purina (BOORA et al., 2015). As consequências desses tipos de mutações podem ser três: (1) silenciosas: altera um códon para um que codifica o mesmo aminoácido e não causa mudanças na proteína produzida; (2) *missense*: altera um códon para um que codifica um aminoácido diferente e causa pequenas mudanças na proteína produzida e (3) *nonsense*: altera um códon codificador de aminoácido para um códon de término de tradução produzindo uma proteína incompleta (Figura 4) (EL-SHARKASY e BADR, 2018).

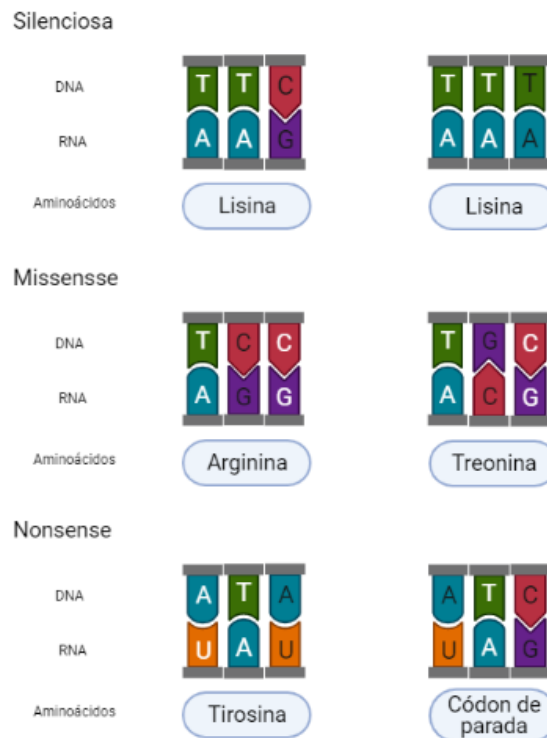


Figura 4. Esquema demonstrando diversos tipos de mutações de substituição e suas conseqüências. Silenciosas: Há uma alteração no códon, porém o aminoácido codificado é o mesmo, não modificando a proteína produzida. *Missense*: Ocorre uma substituição no códon e o aminoácido codificado é alterado de arginina para treonina causando mudanças na proteína gerada. *Nonsense*: Há uma alteração de um códon codificador de tirosina para um códon de término de tradução podendo produzir uma proteína incompleta. Adaptado de EL-SHARKASY e BADR, 2018.

Nos estudos de Rahbari e colaboradores (2016) com sequenciamento do genoma completo de trios familiares, a taxa média de mutação geracional para substituições de base única em humanos foi estimada em $\sim 1-1,5 \times 10^{-8}$. Quando essas mutações ocorrem na linhagem das células germinativas humanas (isto é, nas células-tronco espermatozóides e nos oócitos), estas alterações podem ser transmitidas para a prole. Mutações em células somáticas ficam limitadas à célula afetada e suas descendentes (MILHOLLAND et al., 2017).

Como os seres humanos são organismos multicelulares com um longo tempo de geração, as linhagens germinativas agem como porteiros para proteger a integridade das informações transmitidas através das gerações. Para isso, eles desenvolveram estratégias para reduzir as taxas de mutação que provavelmente envolvem mecanismos que impedem o surgimento de lesões, bem como um complexo mecanismo de reparo para corrigir erros em caso de dano. Embora os erros de replicação que ocorrem durante as divisões das células-tronco forneçam a explicação mais provável para a origem da maioria das mutações *de novo* (em inglês, *de novo mutations* – DNMs) serem derivadas de mutações paternas, a

descrição de um efeito da idade materna com assinaturas moleculares distintas implica que as mutações também surjam por mecanismos não replicativos (GORIELY, 2016).

A linhagem germinativa masculina é mais mutagênica, ou seja, cada ano adicional, em média, na idade do pai na concepção resulta em ~ 2 DNM adicionais na criança. Da mesma forma, o risco de doenças genéticas dominantes na criança amplia com o aumento da idade paterna. A causa mais provável do efeito da idade paterna é o número crescente de divisões celulares na linhagem germinativa masculina. Enquanto os ovócitos são produzidos no início da vida de uma mulher e têm um número fixo de divisões celulares, as células-tronco espermatogênicas sofrem replicação contínua do genoma ao longo da vida de um homem (RAHBARI et al., 2016).

Existem estimativas que todos nós carregamos até 100 DNMs, na escala de todo o genoma, isso se traduz em um risco de mutação tão baixo quanto $\sim 1 \times 10^{-8}$ em qualquer local genômico. Essa taxa é de várias ordens de magnitude inferior às observadas para mutações em tecidos somáticos, sugerindo que, em geral, os mecanismos de replicação e reparo de DNA funcionam de maneira eficiente nas células germinativas. No entanto, os efeitos da idade dos pais indicam que a precisão desses mecanismos diminui com a idade, embora em um ritmo diferente para homens e mulheres, e isso deve ser uma preocupação para o envelhecimento reprodutivo das populações (GORIELY, 2016; MILHOLLAND et al., 2017).

Estudos confirmaram que a radiação pode danificar genes e cromossomos (DA CRUZ et al., 1994; DA CRUZ et al., 1996; DA CRUZ et al., 1997; SILVA, 2000; MØLLER e MOUSSEAU, 2016). Pesquisas recentes demonstram que a exposição dos pais à radiação pode produzir um aumento na incidência de mutações no genoma nos filhos dos indivíduos expostos (SILVA, 2016; COSTA et al., 2018; LEITE FILHO et al., 2020). A maioria das mutações germinativas induzidas por radiação são deleções de DNA, muitas vezes abrangendo mais de um gene, e as deleções surgem como resultado do reparo ou falha no reparo de DSBs. Presume-se que as modificações das taxas de mutação não sejam restritas aos locais de replicação e reparo do DNA, mas também podem incluir fatores biológicos como número de divisões de células germinativas, tempo em diferentes estágios de células germinativas, padrões de modificação de DNA e outras características germinativas (DROST E LEE, 1995; SANKARANARAYANAN E NIKJOO, 2015).

2.3 Indução de mutações em humanos pela radiação ionizante

Supõe-se que o dano ao genoma humano por radiação de alta energia seja de cerca de dois terços de danos de efeitos diretos e um terço são indireto. Nos efeitos diretos e indiretos, a energia transmitida ao meio biológico ocorre principalmente via ionização, gerando grandes quantidades de espécies secundárias ao longo da faixa de radiação, por exemplo, íons, radicais e elétrons secundários (ALIZADEH et al., 2015).

Na metanálise feita por Møller e Mousseau (2015), que revisaram os efeitos da radiação de Chernobyl nas taxas de mutação em todos os táxons encontradas naquela área, foram notados que fatores como mecanismos de reparo do DNA, tamanho do genoma, ploidia e histórico de vida podem ter um impacto sobre como uma determinada espécie responde em termos de mutações a níveis elevados de radiação ionizante. Como os efeitos da radiação nos seres humanos são de particular interesse por razões de saúde pública, também foram analisadas as taxas de mutação nessa população e foi demonstrado uma suscetibilidade intermediária à radiação em comparação com outras espécies. Na conclusão deste estudo também foi apontado que não há evidências de uma diminuição nos efeitos da radiação de Chernobyl nas mutações ao longo do tempo.

Contudo, na literatura há uma infinidade de síndromes genéticas associadas a radiosensibilidade na população humana. Este é especialmente o caso da síndrome de ruptura de Nijmegen (mutações *NBS1*), distúrbio do tipo AT (mutações *MRE11*), anemia de Fanconi (mutações nos genes *FANC*), síndrome de Bloom (mutações no *BLM*), xeroderma pigmentoso (mutações nos genes *XP*), síndrome de Cockayne e mutações *LIG1*. Todas essas síndromes compartilham uma variedade de características clínicas e biológicas comuns, como instabilidade genômica, rendimentos anormais de aberrações cromossômicas, imunodeficiência e geralmente propensão ao câncer (FORAY et al., 2016). Os efeitos mutagênicos da RI na linhagem germinativa são particularmente preocupantes, pois levam ao acúmulo de mutações extras na prole de pais irradiados. (ADEWOYE et al. 2015).

2.4 O Acidente Radiológico de Goiânia

No caso do acidente radioativo com ^{137}Cs em Goiânia, como relata a sentença da ação civil pública, o Instituto Goiano de Radioterapia – IGR, possuía uma sede no setor central de Goiânia e dispunha de uma bomba de ^{137}Cs devidamente autorizado pela Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), a fim de utilizá-la na prestação de serviços radiológicos. No final de 1985 o IGR transferiu a sua sede para outro endereço, terminando por abandonar no

antigo prédio a unidade de teleterapia, contendo 19,26g de cloreto de ^{137}Cs . Em 04 de maio de 1987, iniciou-se a demolição da construção, culminando com a destruição quase total do prédio original, que o deixou sem telhado, portas ou janelas, a respeito da cápsula contendo ^{137}Cs não havia quaisquer avisos ou advertências (ROBERTS, 1987; INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 1988; ROZENTAL et al., 1989; DA CRUZ et al., 1994; DA CRUZ et al., 1996; DA CRUZ et al., 1997).

No dia 13 de setembro de 1987 dois sucateiros entraram nesses escombros e encontraram a unidade de teleterapia. Supondo que essa unidade poderia ter algum valor de sucata e sem saber o que era, removeram-na do local e a levaram a um ferro-velho para ser desmontada e comercializada como sucata. A cápsula contendo o ^{137}Cs foi rompida e a fonte radioativa foi liberada da blindagem que estava na forma de sal de cloreto de céσιο que é altamente solúvel e prontamente dispersível (ROBERTS, 1987; INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 1988; ROZENTAL et al., 1989; DA CRUZ et al., 1994; DA CRUZ et al., 1996; DA CRUZ et al., 1997).

O acidente radioativo foi agravado pelo fascínio despertados pela coloração azul reluzente da fonte de ^{137}Cs , amigos e parentes foram convidados a ver esse fenômeno, após alguns dias, diversas pessoas exibiam sintomas gastrointestinais resultantes da exposição à radiação. Mais tarde, uma das pessoas envolvida, pressupôs que esses sintomas eram em virtude do pó e levou a cápsula de ^{137}Cs a Vigilância Sanitária de Goiânia. Esta atitude despertou uma série de eventos que levaram o descobrimento do acidente (ROBERTS, 1987; INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 1988; ROZENTAL et al., 1989; DA CRUZ et al., 1994; DA CRUZ et al., 1996; DA CRUZ et al., 1997).

Em 30 de setembro foram tomadas as primeiras providências como identificar, monitorar, descontaminar e tratar a população envolvida, então iniciou-se uma triagem de pessoas no Estádio Olímpico Pedro Ludovico Teixeira. Os pacientes identificados com alguma contaminação eram encaminhados para o Hospital Geral de Goiânia e os com estado grave para o Hospital Naval Marcílio Dias, no Rio de Janeiro (INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 1988).

A contaminação sobreveio em 249 pessoas. Entre estes, 120 possuíam roupas e sapatos contaminados e 129 manifestaram contaminação externa e /ou interna a radiações ionizantes para doses tão altas quanto 7 Gy. Destas, 4 não resistiram e foram a óbito na fase aguda do acidente, entre essas, estava Leide das Neves, que se tornou a imagem do acidente radioativo

em Goiânia. Passados poucos dias após o acidente, algumas outras pessoas buscaram atendimento médico, entre estes, membros da Polícia Militar, do corpo de Bombeiros ou parentes próximos das vítimas. Naquele momento 112.800 pessoas foram monitoradas e atualmente o Sistema de Monitoramento de Radioacidentados (SISRAD) tem o registro de 1252 pacientes sendo acompanhados por grupo, sendo GI o grupo de pacientes que tiveram contato direto com o ^{137}Cs , GII são aqueles que tiveram contato indireto, GIII é o grupo dos profissionais que trabalharam no acidente (INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 1988; ROZENTAL et al., 1989; DA CRUZ et al., 1994; DA CRUZ et al., 1996; DA CRUZ et al., 1997; SISRAD).

Os cenários destes eventos ocorreram no centro de Goiânia. A figura 5 apresenta os principais pontos de contaminação, como o ferro-velho onde foi vendida a cápsula. Os outros pontos principais contaminados foram: Setor Aeroporto e Setor Norte Ferroviário, bairros da região central de Goiânia. A descontaminação exigiu a demolição desses locais e vários outros edifícios, e também, a remoção da camada superficial de grandes áreas. No total, foram gerados cerca de 3500 m³ de rejeitos radioativos (INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 1988)

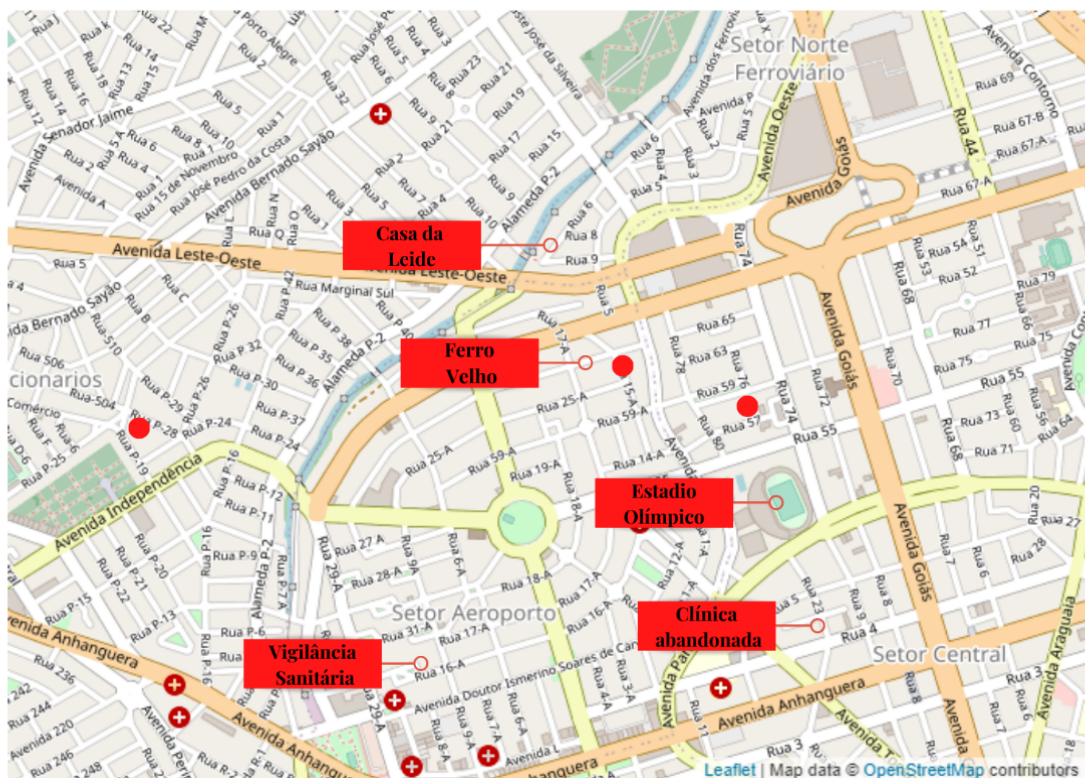


Figura 5. Mapa da cidade de Goiânia com indicação da área mais afetada pelo desastre radioativo. Os locais que estão sinalizados com um círculo vermelho, viviam as pessoas que foram afetadas diretamente pelo acidente. Fonte: Adaptado de DA SILVA, 2017.

Os rejeitos radioativos provenientes do acidente radiológico com o ^{137}Cs estão assentados em Abadia de Goiás em uma Unidade de Conservação Ambiental de 160 hectares. Os Depósitos Definitivos foram fundados em 1997 e também nessa época foi instalado um Programa de Monitoração Ambiental com o objetivo de assegurar a saúde humana e do meio ambiente (JAAKKO PÖYRY ENGENHARIA LTDA, 1994).

2.5 Estado da arte do monitoramento

Este estudo faz parte do monitoramento genético da população acidentalmente exposta ao ^{137}Cs em Goiânia-Goiás. Foram desenvolvidas diversas pesquisas usando numerosas tecnologias com a colaboração de inúmeros pesquisadores em diversos laboratórios brasileiros com parcerias de Universidades do Canadá, Japão, Holanda, Estados Unidos e Suécia. Vale ressaltar a importância do monitoramento genético à longo prazo da população exposta acidentalmente ao ^{137}Cs para ampliar e indicar marcadores genéticos que também podem ser analisados, o que justifica plenamente a realização do presente estudo.

A primeira pesquisa observando as consequências genéticas dos radioacidentados do ^{137}Cs foi de Da Cruz et al. (1994), neste estudo foram constatados aumentos relacionados com a dose nas frequências de micronúcleos. Em 1996 foi publicado um estudo usando o gene *hprt* como biomarcador, os resultados deste estudo demonstraram que a frequência de *hprt* mutante foi maior naqueles expostos a altas doses de radiação ionizante do que no grupo controle e que a frequência desse gene mutante nos indivíduos expostos diminuiu gradualmente ao longo do tempo, isto é resultado da renovação natural das células T periféricas e há evidências sugerindo que também há seleção negativa das células mutantes (DA CRUZ et al., 1996; DA CRUZ et al., 1997; DA CRUZ; GLICKMAN, 1997).

Os biomarcadores citogenéticos são considerados os mais sensíveis e confiáveis entre os indicadores biológicos usados para quantificar uma dose de radiação absorvida. Quebras mal reparadas podem induzir vários tipos de cromossomos anormais como cromossomos dicêntricos, e translocações resultantes de rearranjos cromossômicos quebrados (HERATE; SABATIER, 2020). Através dessa técnica da Silva (2000) identificou esses biomarcadores, seu número está relacionado com a dosagem, proporcionando uma relação dose-resposta confiável. Também foi constatada um aumento de 19x na frequência de aberrações instáveis em relação ao grupo controle.

Outra técnica da citogenética empregada foi a Hibridização Fluorescente *in situ* (em inglês, *Fluorescent in situ Hybridization* - FISH) que usa sondas fluorescentes para identificar

e quantificar aberrações cromossômicas estáveis. Esta metodologia foi empregada para fazer a quantificação de translocações e biodosimetria retrospectiva, embora utilizando lâminas armazenadas há 12 anos, a técnica se mostrou eficiente para a visualização de translocações, fragilidade cromossômica e quebras causadas pela exposição a RI (figura 6) (DA SILVA; DA CRUZ, 2002).

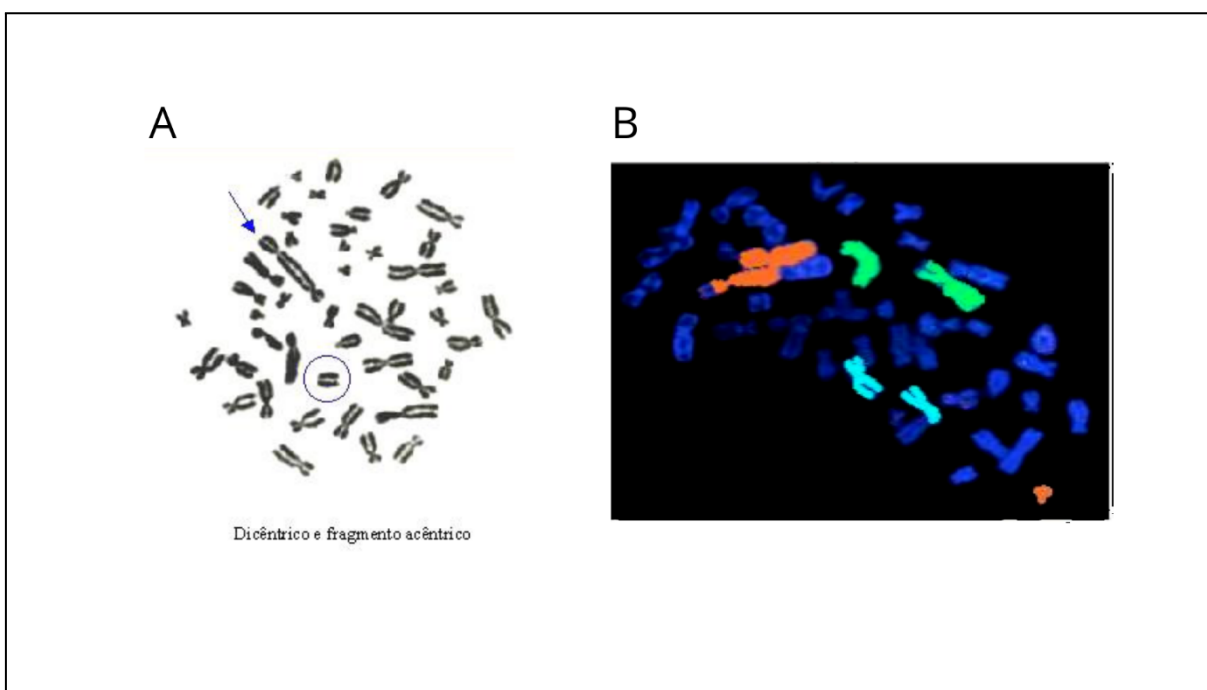


Figura 6. Cariótipo obtido no estudo de DA SILVA; DA CRUZ, 2002. A: Uma metáfase demonstrando um cromossomo dicêntrico (seta azul) e acêntrico (círculo azul). B: Uma metáfase que passou pela técnica de FISH expondo uma translocação.

A partir de 2008 e até o presente momento, estudos envolvendo o núcleo familiar dos indivíduos expostos começaram a ser desenvolvidos com o foco na investigação de possíveis mutações de origem germinativa e o primeiro biomarcador utilizado foi o microssátelite. Em 2008 foram produzidos três estudos utilizando esta tecnologia e um em 2011, todos trouxeram evidências que as radiações absorvidas podem induzir múltiplas mudanças no DNA da linha germinativa, já que a geração dos pais foi irradiada diretamente pelo ^{137}Cs (DA CRUZ et al., 2008; FLORES, 2008; ARRUDA et al., 2008; COSTA et al., 2011). A pesquisa de Nunes (2013) trouxe o método de PCR quantitativo em tempo real para a identificação de possíveis translocações que geralmente correspondem a ativação do oncogene *BCL2* correlacionado ao linfoma non-Hodgkin em radioexpostos e familiares e os resultados deste estudo não apontaram dados estatisticamente significantes para a frequência dessa translocação.

Nos últimos anos, o rápido desenvolvimento de tecnologias de microarranjos, como a Análise Cromossômica em Microarranjos (em inglês, *Chromosomal Microarray Analysis - CMA*), levou à possibilidade de investigar variantes estruturais de tamanho limitado tal como as Variantes de Número de Cópias (em inglês, *Copy Number Variants – CNV*) (SALPIETRO et al., 2018). Seguindo esta mesma proposta, Silva (2016) e Costa e colaboradores (2018) analisaram o efeito da exposição ocupacional e acidental, respectivamente, às doses baixas de RI sobre a formação de CNV na progênie da população exposta. Estes estudos apontaram um aumento de 1,5 vezes na frequência de mutações de CNV *de novo* na progênie nascida do grupo parental exposto, em relação ao grupo controle.

Com o objetivo de se entender melhor as consequências da exposição à radiação ionizante, Oliveira em 2018 investigou os mecanismos mutacionais das CNV com base nas características da sequência das junções do ponto de ruptura e sugeriu o mecanismo de MMBIR como contributivo para a formação desses rearranjos. Rodrigues (2019) também encontrou nos seus estudos um aumento das CNV *de novo* encontradas no cromossomo X da prole de indivíduos expostos acidentalmente a baixas doses de radiação ionizante de ^{137}Cs . O estudo de Leite Filho e colaboradores (2020) considerou a progênie de expostos acidentalmente e analisou os desvios mendelianos usando dados de polimorfismos de nucleotídeos únicos (em inglês, *Single Nucleotide Polymorphisms - SNP*) e verificou um aumento de mutações germinativas. Todos esses estudos citados acima podem ser acompanhados na Figura 7.

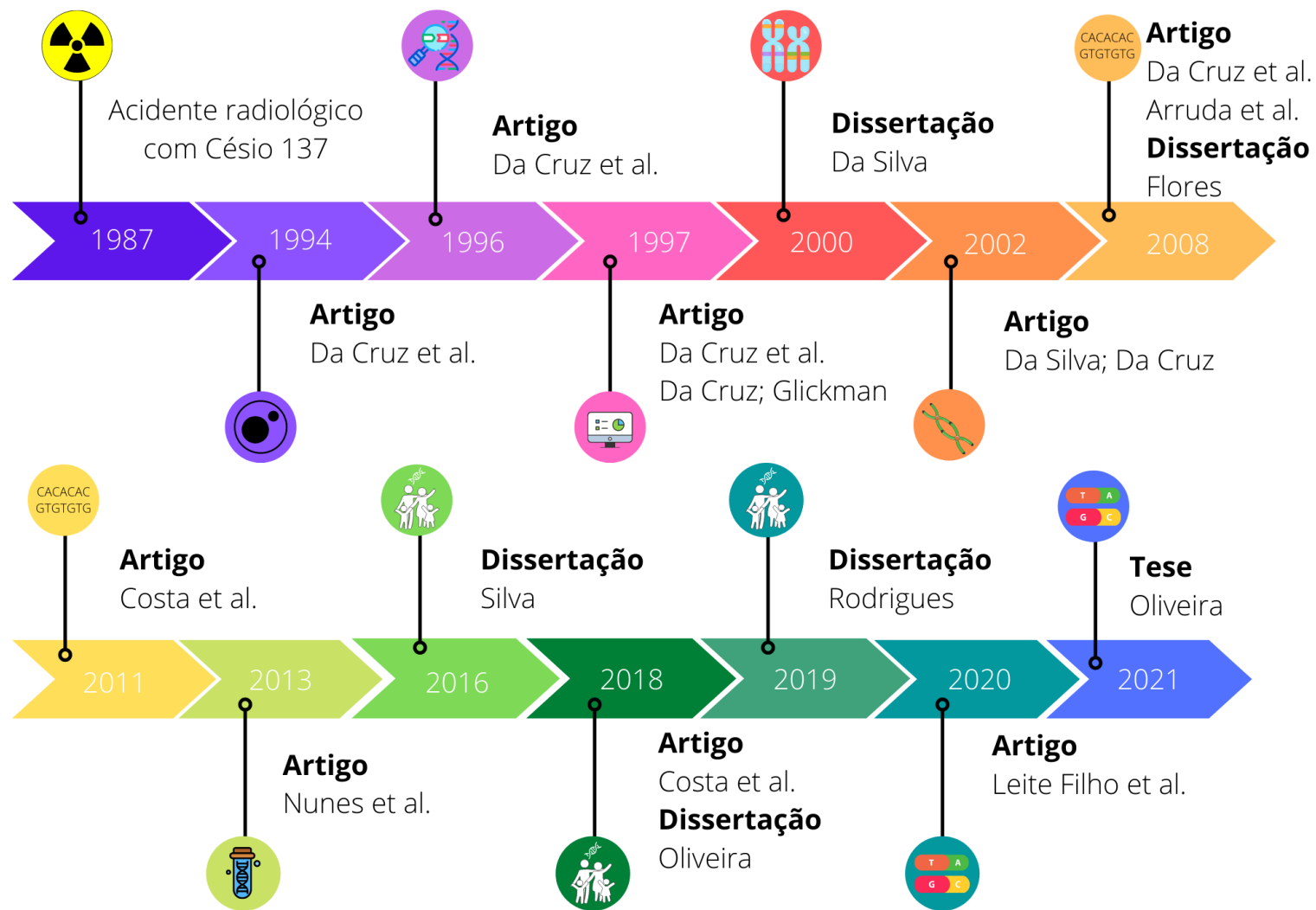


Figura 7. Linha do tempo do monitoramento da saúde genética da população exposta ao ^{137}Cs , indicando os estudos produzidos no período de 1994 a 2021 pelo Núcleo de Pesquisa Replicon da PUC Goiás.

2.6 Aplicações e vantagens do Sequenciamento de Nova Geração na mutagênese

Na década de 1970, Sanger e colaboradores desenvolveram um sequenciamento que exigia menos manuseio de produtos químicos tóxicos e radioisótopos, comumente referida como sequenciamento de Sanger. Como resultado, tornou-se o método de sequenciamento de DNA predominante durante 30 anos. Isso transformou a biologia, fornecendo as ferramentas para decifrar genes completos e, posteriormente, genomas inteiros. Uma demanda crescente por aumento da produtividade levou à automação do laboratório e à paralelização de processos, o que acabou resultando no estabelecimento de equipamentos de fábrica com centenas de instrumentos de sequenciamento. Devido a esses avanços, a técnica de Sanger finalmente permitiu a conclusão da primeira sequência do genoma humano em 2004 (VAN DIJK et al., 2014).

Isso estimulou o desenvolvimento e a comercialização de tecnologias de Sequenciamento de Nova Geração, em oposição ao método automatizado de Sanger, que é considerado uma tecnologia de primeira geração (VAN DIJK et al., 2014). As técnicas de NGS oferecem maiores quantidades de dados, tempos de sequenciamento mais curtos e custos reduzidos, embora mediante taxas de erro aumentadas e comprimentos de leitura mais curtos. Estas tecnologias facilitam claramente o acúmulo de grandes conjuntos de dados, porém o processamento posterior desses dados ainda é um gargalo importante. Não é de surpreender que os dados do NGS deem origem a vários desafios de bioinformática, incluindo armazenamento, transmissão, manipulação e análise (ESCALONA et al., 2016).

O advento das técnicas de NGS permitiu que os pesquisadores estudassem sistemas biológicos em um nível nunca antes possível. À medida que as tecnologias evoluíram, um número crescente de métodos de preparação de amostras e ferramentas de análise de dados gerou uma imensa diversidade de aplicações científicas. O NGS tornou-se, assim, uma tecnologia-chave na ciência básica e também está rapidamente se tornando uma ferramenta estabelecida na pesquisa translacional. A redução contínua de custos e o desenvolvimento de linhas de estudos padronizados provavelmente tornarão o NGS uma ferramenta padrão para aplicações mais rotineiras em um futuro próximo. O aumento significativo no rendimento da amostra é benéfico, e os métodos NGS podem ser capazes de resolver casos específicos que não seriam possíveis com o sequenciamento de Sanger (VAN DIJK et al., 2014).

Durante a última década, a tecnologia NGS revolucionou muito o campo da mutagênese, esta tecnologia representa uma grande revolução no sequenciamento do genoma,

oferecendo uma oportunidade para avaliar a mutagenicidade no nível do genoma. Ela fornece informações diretas sobre cada par de bases de DNA, altera as formas de detecção de mutações, desde a seleção de fenótipos de genes repórter até a comparação de genótipos de genomas inteiros. No NGS, as frequências de mutações são calculadas com base na proporção do número de mutações detectadas em relação ao número de pares de bases de DNA analisados, mas não os genes ou células mutantes. Portanto, menos células ou tecidos são necessários para detectar frequências de mutações usando NGS. Diferentes tipos de mutações podem ser detectados ao mesmo tempo usando a tecnologia (DU, PAN E CHEN, 2017).

As tecnologias NGS contam com uma interação complexa entre química, *hardware* e sensores ópticos. Além dessa complexidade, está o *software* que analisa os dados do sensor e prevê as bases individuais, isso é conhecido como “chamada de base”. A chamada de base converte os sinais em dados reais da sequência com índices de qualidade. As diferentes plataformas de sequenciamento geralmente assumem um modelo de erro explícito para atribuir uma medida de incerteza a cada chamada de base. As técnicas de NGS passaram por desenvolvimentos rápidos e recentes, possibilitando detectar alterações de nucleotídeo único no genoma e um grande número de alterações genômicas em um indivíduo (HORAI et al., 2018).

Na análise de Du e colaboradores (2018) foi verificado que a varredura de mutação em todo o genoma por sequenciamento pode fornecer um perfil molecular abrangente de mutações induzidas por agentes mutagênicos. Em detalhes, o fluxo de análise básica de todos os dados de sequenciamento do genoma contém cinco etapas: (1) mapeamento das leituras limpas obtidas da plataforma de sequenciamento *versus* o genoma de referência; (2) pós-processamento dos dados de alinhamento do NGS (armazenando alinhamentos de leitura contra sequências de referência, indexação, etc.); (3) chamada de mutação (como substituições de nucleotídeo único e *indels*); (4) Anotação de variante genética e predição de efeito; (5) Verificação dos dados no site *Gene Ontology* (GO) e *Kyoto Encyclopedia of Genes e Genomes* (KEGG).

Cada etapa representa um conjunto de desafios e ambiguidades específicas. Geralmente, várias características genômicas, como o número de variantes detectadas, a complexidade do genoma, o grau de heterozigosidade, a proporção de sequências repetitivas em todo o genoma, o nível de polimorfismo e divergência entre as populações podem contribuir para esses desafios. Diversos métodos de genotipagem habilitados para NGS podem reduzir a complexidade do genoma, como sequenciamento de RNA (RNA-seq),

genotipagem por sequenciamento (em inglês, *Genotyping-By-Sequencing* - GBS) e sequenciamento de enriquecimento alvo (em inglês, *Target-Enrichment Sequencing* TES), que descobrem variações genéticas de uma proporção representativa do genoma (TORKAMANEH et al., 2017; PENG et al., 2020).

O GBS é um método de redução de complexidade particularmente atraente que oferece um método simples, robusto, de baixo custo e alto rendimento para genotipagem em espécies modelo e não modelo. Este método aumenta substancialmente a quantidade de informações genômicas disponíveis com milhares de SNP sendo genotipados. Usando grandes conjuntos de dados SNP genômicos, esta técnica mostra uma melhora significativa na capacidade de resolver a estrutura da população em escala fina em comparação com marcadores microssatélites, além disso, aumenta também a precisão da inferência demográfica (TORKAMANEH et al., 2017). A figura 8 demonstra um resumo das etapas desse método.

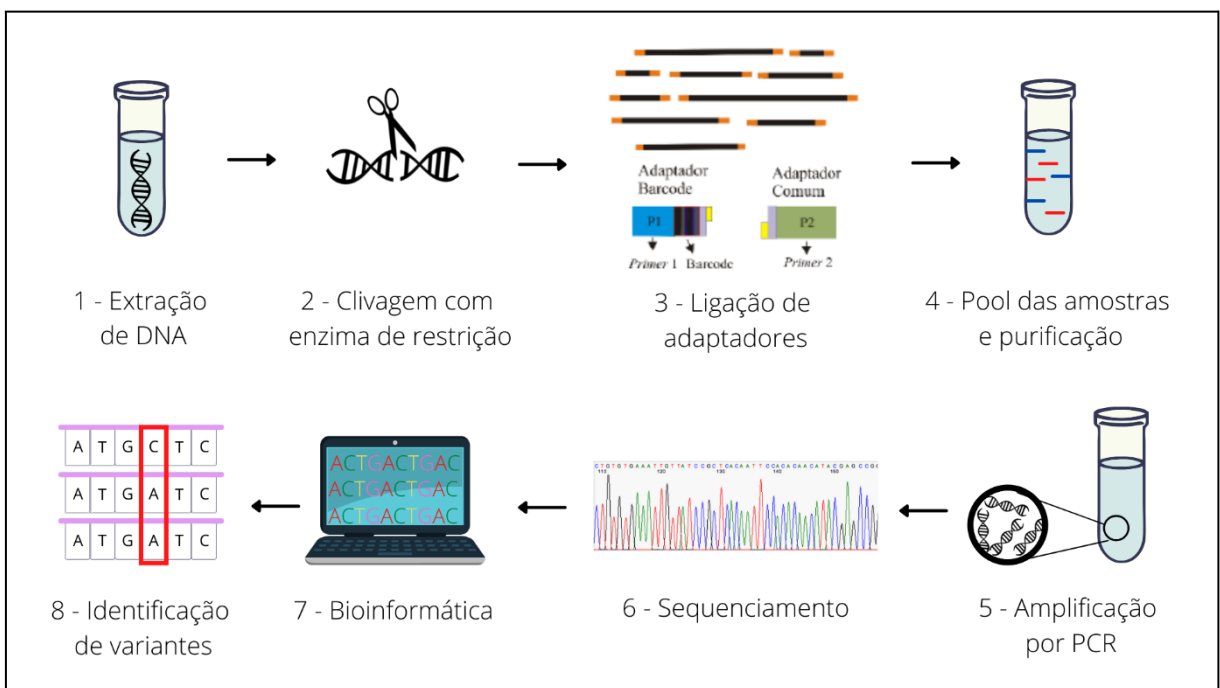


Figura 8. Principais etapas da Genotipagem por Sequenciamento (GBS). Adaptado de Motta, 2016.

2.7 Variante de Nucleotídeo Único (SNV)

Como já citado neste estudo, a mutação pode causar danos em várias dimensões do DNA, quando essa lesão atinge apenas um nucleotídeo, é conhecido como variante de nucleotídeo único (em inglês, *Single Nucleotide Variants* - SNV) e quando ocorre em mais de 1% da população é classificado como um Polimorfismo de Nucleotídeo Único (em inglês,

Single Nucleotide Polimorfism - SNP) (figura 9). As SNV são a forma mais comum de variação genética humana e ocorrem em maior abundância em região não codificadora, o que os tornam marcadores ideais para mapeamento genético (CAPRIOTTI et al., 2013; SPENCER, ZHANG E PFEIFER, 2015).

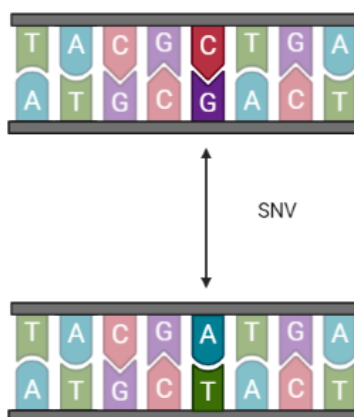


Figura 9. Representação esquemática de uma Variante de Nucleotídeo Único. A imagem mostra uma substituição do tipo CG→AT. Adaptado de NESTA; TAFUR; BECK, (2021)

Segundo Hall e colaboradores (2017), as SNV podem ser um adequado biomarcador de exposição à RI, dado que essa variante foi vista com uma frequência significativa em mutações na linhagem germinativa. Esse achado pode ser traduzido em uma assinatura específica da exposição à RI, apropriado para uso em estudos epidemiológicos moleculares e auxiliaria também em estudos com populações expostas à RI.

Estima-se que a taxa de mutação em DNM em humanos de SNV são aproximadamente 1×10^{-8} mutações por geração, dando origem a 45-60 DNM por genoma. A suscetibilidade a DNM varia em diversas ordens de magnitude ao longo do genoma e pode ser influenciada por fatores como conteúdo de nucleotídeos, tempo de replicação, distância dos pontos de recombinação, ocupação de nucleossomos, transcrição e 'abertura' da cromatina (GOLDMANN et al., 2016).

No estudo de Adewoye e colaboradores (2015) foi analisado os efeitos da RI na indução de mutações no genoma na linhagem germinativa de camundongos e foi visto que a taxa de indução de novos *indels* aumentou significativamente na prole de machos irradiados em comparação com os controles. Por outro lado, o número de SNV *de novo* na prole de pais expostos não é significativamente elevado em comparação com a prole de controle. Embora a

taxa basal de SNV *de novo* na linhagem germinativa de pais irradiados não exceda significativamente a dos controles, o espectro da mutação é marcadamente diferente. Também foi visto que a frequência de mutações agrupadas *de novo* (agrupamentos de 1 a 4 SNV ou agrupamentos de 1 a 2 SNV e *indels* dentro de alguns pares de bases), é significativamente elevada na prole de pais irradiados em comparação com os controles.

No mesmo estudo foi identificado que os locais danificados do DNA, com duas ou mais lesões dentro de uma ou duas voltas helicoidais do DNA são considerados uma assinatura da exposição à radiação. A julgar os resultados da indução de locais de danos de DNA agrupados em células de mamíferos irradiados, a exposição a 3 Gy de raios-X pode induzir até 1.000 locais de dano multiplicado na linhagem germinativa de camundongos machos irradiados. Dado que a eficiência de seu reparo está substancialmente comprometida e atrasada, os locais danificados agrupados induzidos por radiação podem levar a múltiplas substituições de nucleotídeos que ocorrem em curtos trechos de DNA (ADEWOYE et al. 2015).

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Estabelecer espectro e frequência de substituições de base *de novo* de origem germinativa a partir de dados de sequenciamento de nova geração do trio, correspondendo a uma criança da geração F1 e seus pais biológicos, expostos acidentalmente à RI de Césio-137, contribuindo com o conhecimento sobre os efeitos biológicos de exposição à radiação ionizante.

3.2 Objetivos específicos

- Estimar a frequência de substituições de base na prole;
- Estabelecer o espectro de substituições de bases e classificá-las;
- Avaliar o potencial das SNV e SNP como biomarcadores de exposição para discriminar a exposição parental a partir de F1;
- Relacionar os efeitos da radiação ionizante como biomarcadores que podem conduzir a existência de desvios mendelianos;
- Fortalecer estudos de mutagênese em Goiás, dando continuidade ao acompanhamento da saúde genética da população exposta e seus descendentes;
- Produzir um artigo para a difusão das informações do efeito da Radiação Ionizante.

4. Materiais e métodos

4.1 Delineamento do estudo e grupo amostral

O presente estudo foi desenvolvido no Núcleo de Pesquisas Replicon (NPR) da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, em parceria com o Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular da Secretaria de Saúde do Estado de Goiás (LaGene/Lacen/SES-GO) e Centro de Assistência aos Radioacidentados (C.A.RA). A EcoMol Consultoria e Projetos Ltda foi uma prestadora de serviço que realizou as etapas de sequenciamento. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) em Humanos da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-Goiás), sob o número de protocolo 95056418.2.0000.0037.

Foram incluídos no estudo 10 famílias diretamente expostas à radiação ionizante de ^{137}Cs . Os progenitores que não foram expostos à RI no grupo caso foram incluídos no grupo controle. O grupo caso incluiu um total de 30 indivíduos, sendo distribuídos em 10 mães, 6 pais e 14 filhos concebidos após o acidente. As doses absorvidas dos progenitores variam de 0,1 a 1,1 Gy. O estudo incluiu uma família na qual ambos os progenitores foram expostos à RI com dose absorvida elevadas de 1,0 e 1,1 Gy para mãe e pai, respectivamente. Três progenitores de média dose e 11 progenitores expostos a baixas doses. Um grupo de indivíduos não-expostos à radiação ionizante foi usado como controle. Esse grupo foi composto por 5 famílias residentes da cidade de Goiânia-Goiás, contendo 15 pessoas (5/5 mães/pais e 5 filhos). Um conjunto de 12 progenitores não expostos foram incluídos, totalizando 22 participantes no grupo controle (Quadro 1).

Alguns casais originais do grupo exposto tiveram mais de um filho e os pais foram replicados para podermos identificar a natureza das mutações dos filhos, pois cada nascimento é uma razão e um evento independente. Isto ocorreu para as famílias T8, T9, T10, T11, T12, T18 e T19. A figura 10 demonstra a organização metodológica deste estudo científico.

Quadro 1. Disposição do grupo caso e controle incluídos no estudo sobre a indução de mutação germinativa na prole de indivíduos expostos acidentalmente a altas e baixas doses de radiação ionizante de ^{137}Cs .

Família	Grupo	Progenitor	Dose (Gy)
T01	Controles	Mãe	0
T01	Controles	Pai	0
T02	Controles	Mãe	0
T02	Controles	Pai	0
T03	Controles	Mãe	0

T03	Controles	Pai	0
T04	Controles	Mãe	0
T04	Controles	Pai	0
T05	Controles	Mãe	0
T05	Controles	Pai	0
T08	Controles	Pai	0
T09	Controles	Pai	0
T10	Controles	Pai	0
T11	Controles	Pai	0
T12	Controles	Pai	0
T13	Controles	Mãe	0
T14	Controles	Pai	0
T15	Controles	Pai	0
T16	Controles	Pai	0
T17	Controles	Mãe	0
T18	Controles	Mãe	0
T19	Controles	Mãe	0
T06	Expostos	Pai	1,1
T06	Expostos	Mãe	1,0
T07	Expostos	Mãe	0,45
T07	Expostos	Pai	0,1
T08	Expostos	Mãe	0,3
T09	Expostos	Mãe	0,2
T10	Expostos	Mãe	0,2
T11	Expostos	Mãe	0,2
T12	Expostos	Mãe	0,2
T13	Expostos	Pai	0,2
T14	Expostos	Mãe	0,2
T15	Expostos	Mãe	0,2
T16	Expostos	Mãe	0,2
T17	Expostos	Pai	0,2
T18	Expostos	Pai	0,5
T19	Expostos	Pai	0,5

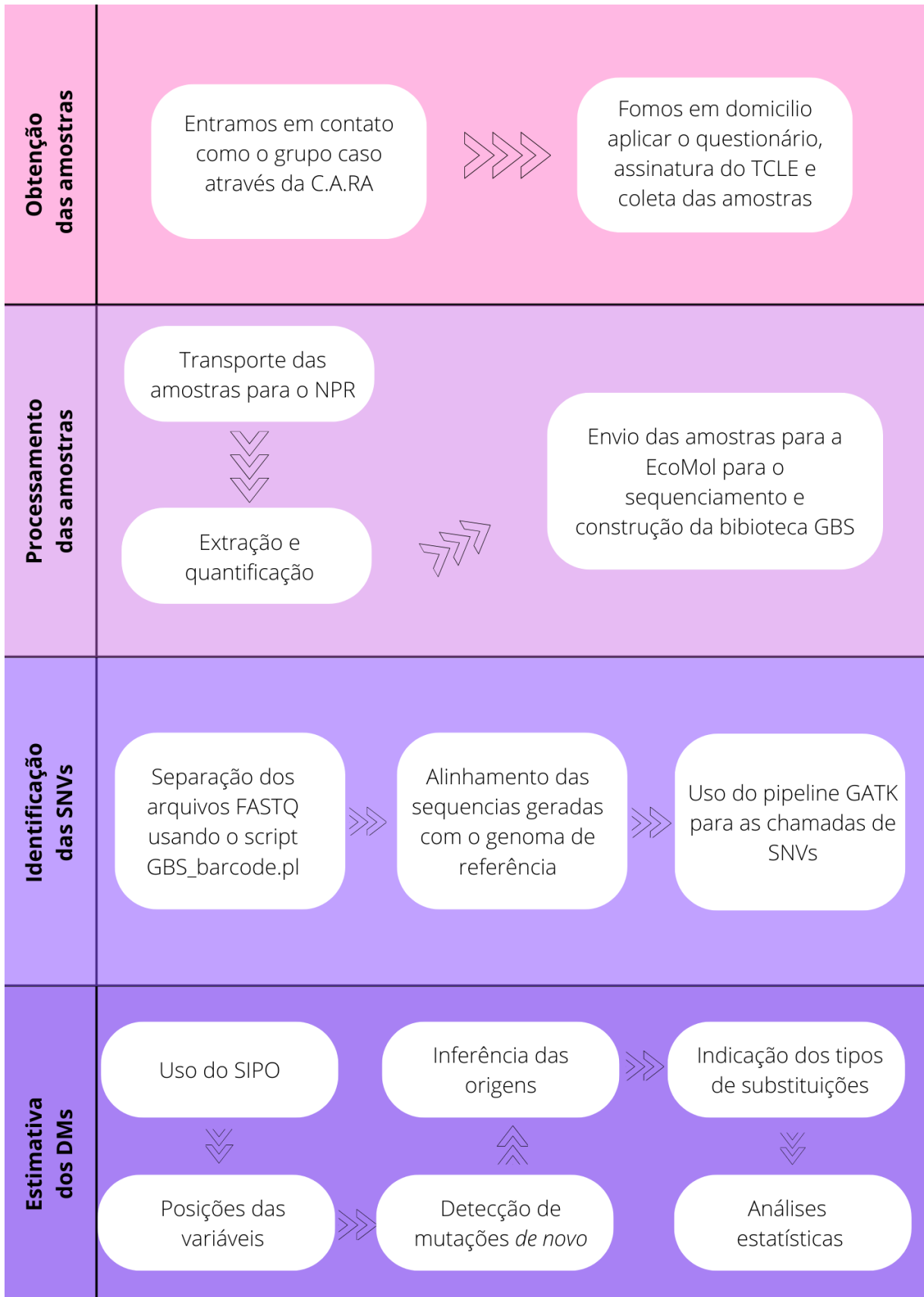


Figura 10. Fluxograma da organização metodológica realizada no presente estudo.

4.2 Obtenção e preparo das amostras

As amostras biológicas, aplicação do questionário (Anexo I) e os dados dos prontuários dos participantes do estudo foram obtidos pela parceria entre NPR, LaGene e C.A.R.A. A aplicação do questionário de monitoramento e a coleta das amostras biológicas foram feitas por pesquisadores integrantes do estudo, habilitados para tal procedimento. Esta coleta foi realizada ao longo do ano de 2019 nas residências dos participantes mediante contato telefônico e agendamento prévio para realizar estes procedimentos. Os participantes assinaram voluntariamente o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo II, III, IV, V e VI).

As amostras biológicas foram constituídas de sangue periférico, sendo coletados 10 mL por punção venosa. As amostras de sangue foram coletadas usando tubo de coleta à vácuo contendo EDTA. Após a coleta, o material biológico foi transportado refrigerado (4 a 8°C) ao NPR da PUC Goiás e LaGene/Lacen/SES-GO para seguimento do procedimento de extração e purificação do DNA genômico. Para cada amostra biológica, foram separadas alíquotas de sangue e armazenadas a -20°C. Todos os protocolos e condutas no presente estudo seguiram os termos da Resolução CNS Nº 441/11 (Anexo VII). Os controles doaram suas amostras voluntariamente no laboratório de genética do Núcleo de Pesquisas Replicon da PUC Goiás.

4.3 Extração e quantificação das amostras de DNA

Para a extração de DNA foi usado o kit de extração de DNA Illustra Blood GenomicPrep® Mini Kit (GE Healthcare, EUA) (Anexo VIII). A quantificação da concentração de DNA genômico foi realizada em um espectrofotômetro NanoVue® Plus (GE Healthcare, Life Sciences, Reino Unido). Os procedimentos foram executados de acordo com os protocolos sugeridos pelos fabricantes.

4.4 Construção da Biblioteca GBS

Após a extração de DNA, as amostras foram enviadas para a EcoMol Consultoria e Projetos Ltda para realização das etapas de sequenciamento, mediante contrato de serviço de terceiros a fim de otimizar o sequenciamento e o uso dos recursos do fomento destinado ao projeto.

Foi realizado a otimização da concentração da enzima e titulação dos adaptadores para construção de biblioteca GBS em humanos de acordo com a metodologia proposta por Elshire e colaboradores (2011), utilizando a enzima de restrição PSTI (Anexo IX).

Em seguida, foi realizado o sequenciamento de DNA em 2 *lanes flowcell* no equipamento HiSeq 2500 Illumina modo *high throughput* (150-200 milhões de *reads* por *lane*). Os resultados gerados a partir do sequenciamento (*reads*) foram entregues na forma de arquivo digital no formato FASTQ para cada biblioteca. O próximo passo foi a limpeza de dados e o preparo das planilhas contendo SNV com genoma referência e assessoria (Bioinformática).

4.5 Identificação das SNV

Esta etapa foi realizada com o auxílio e colaboração da Professora Dra. Renata de Oliveira Dias que integra o Departamento de Genética da Universidade Federal de Goiás. Os arquivos FastQ oriundos das duas rodadas de sequenciamento foram separados por amostra, utilizando o *script* GBS_barcode.pl (https://github.com/qisun2/GBS_barcode). Para cada arquivo individual, a qualidade do sequenciamento foi analisada utilizando o software FastQC (Andrews, 2010) e as sequências e regiões de baixa qualidade foram removidas usando o *software* Trimmomatic v.0.39 (LI, 2013; BOLGER et al., 2010).

As sequências filtradas pela etapa anterior foram alinhadas ao genoma humano de referência (*assembly* GRCh38.p13, NCBI Genome ID: GCF_000001405.39), usando o algoritmo BWA-MEM (Li, 2013). O pipeline GATK foi utilizado para a chamada de variantes (Van der Auwera e O'Connor, 2020), utilizando as ferramentas: a) HaplotypeCaller, para a chamada de variantes (com a opção: `--disable-read-filter NotDuplicateReadFilter`); b) CombineGVCFs, para a junção dos trios; c) GenotypeGVCFs, para a genotipagem combinada das amostras; d) SelectVariants, para a seleção dos SNP; e) VariantFiltration, para filtragem das variantes pelos seguintes filtros: $QD < 2.0$, $FS > 60.0$, $MQ < 40.0$, $MQRankSum < -12.5$ e $ReadPosRankSum < -8.0$; f) SelectVariants, para selecionar apenas os SNP que passaram nos filtros descritos na etapa anterior; e g) VariantsToTable, para converter os arquivos do formato vcf para tabular. Adicionalmente, foram mantidos apenas os SNP para os quais em todas as amostras do trio: a) um genótipo foi predito pelo pipeline GATK e b) houve pelo menos três leituras de sequenciamento alinhando nessa posição.

4.6. Estimativa dos Desvios Mendelianos

Para esta etapa foi aplicado algoritmo SIPO (do inglês, *Script Inference for Parental Origin*) desenvolvido pelo Professor Dr. Hugo Pereira Leito Filho da Universidade Estadual de Goiás. Alguns detalhes do SIPO não foram descritos, pois o sistema encontra-se em processo de patente.

Com esta estimativa foi possível extrair informações relevantes do trio (pai, mãe e filho(a)) e exibir os dados dos marcadores para um único cromossomo. Estes resultados foram transformados em informações que puderam ser analisadas e tratadas de forma que as variações observadas nas SNV pudessem ser corretamente identificadas. No presente estudo, os DM foram estimados apenas para os autossomos. Após a descoberta dos DM, os algoritmos foram desenvolvidos na linguagem de programação PERL.

Para a determinação da origem da mutação foi analisada as seguintes variáveis: (1) alelo da base paterna e materna e assim poder indicar e inferir a origem da mutação e o tipo de substituição; (2) a posição desta mutação para calcular a distância Euclidiana e (3) Cálculo do Valor de Confiança paterna e materna, o menor valor oferece um maior suporte para a determinação da origem da mutação.

4.7 Análise estatística

As análises foram realizadas no pacote estatístico SPSS® 21.0 (*IBM Corporation*), com nível de significância de 5% ($p < 0,05$) e o Excel® versão 16.63.1 (*Microsoft Corporation*). Também foi usado um *Plug in* do Excel chamado, que funciona como um complemento do programa.

O teste paramétrico de Student-t foi aplicado para comparar as médias de dois grupos (Caso e Controle). Este teste, integrado à Análise Univariada de Variância (ANOVA) foi usado para comparar as médias pelo tipo de SNV entre os grupos.

A regressão linear foi usada para analisar a relação entre preditores (idade dos pais à época da concepção da prole, sexo e dose absorvida) e o aumento do DM na prole.

O risco relativo mediu o risco de um evento mutacional ocorrer no grupo exposto versus o risco desse evento ocorrer no grupo controle e o *odds ratio* (OR), correspondendo a razão entre as chances de um evento em um grupo versus as chances do evento no outro grupo, foi empregado para medir a associação entre a exposição parental e a ocorrência de substituições de base na prole.

A correlação de Pearson foi usada para medir a relação entre quatro variáveis, total de desvios mendelianos, dose, sexo e idade no momento da concepção. O teste retorna um valor entre -1 e 1, onde 1 indica uma forte relação positiva, -1 indica uma forte relação negativa e zero indica ausência de correlação.

5. Resultados e discussão

Considerando os participantes dos grupos caso e controle, foram incluídos os resultados de 38 progenitores, e uma prole de 14 filhos (as) nascidos do grupo exposto e 5 filhos da população não exposta. As médias das idades dos progenitores à época da concepção foram 26,7 e 31,22 para os pais e 30,7 e 30,23 para as mães dos grupos caso e controle, respectivamente. As médias de idade da geração F1 foram de 18,8 e 11,4 para casos e controles, respectivamente. A Tabela 1 contém os dados gerais dos grupos participantes do presente estudo e anexo X os dados descritivos.

Tabela 1. Dados gerais dos grupos caso e controle para as gerações parental e F1 incluídos no estudo da sobre a indução de mutação germinativa na prole de indivíduos expostos acidentalmente de radiação ionizante de ¹³⁷Cs.

Geração		Variáveis	Casos	Controles
		N	16	22
		Intervalo etário (anos)	18 a 47	16 a 47
Parental	Média das idades à concepção	Paterna	26,7 (11,5)	31,2 (8,6)
		Materna	30,7 (5,4)	30,2 (8,5)
	(±DP)			
		Dose absorvida (Gy)	0,1 a 1,1	0
		N	14	5
F1	Intervalo etário (anos)		2 a 30	5 a 25
	Média das idades (±DP)		18,8 (9,0)	11,4 (7,8)
	Proporção entre os sexos (H/M)		7/7*	2/3**

H: Homens; M: Mulheres.

*Pelo menos um dos pais expostos à RI

**Nenhum dos pais expostos à RI

O presente estudo investigou os números de desvios mendelianos (DM) associados aos autossomos dos grupos amostrais. Portanto, no estudo foram investigados os cromossomos não sexuais, os cromossomos sexuais foram descartados da análise, pois o X apresenta muitos ruídos em seus dados de SNV e o Y por ter uma baixa cobertura de marcadores. A análise dos dados permitiu a identificação de 21.736 e 21.521 DM para os grupos casos e controles, respectivamente. Todos os DM observados para os grupos casos e controles do presente estudo foram incluídos nas análises estatísticas. Os menores números de DM encontrados foram 731 e 794, para os grupos caso e controle respectivamente. No entanto, os maiores números de DM foram 5.690 e 1.140, para os grupos casos e controles respectivamente.

A prole dos indivíduos expostos apresentou ~39% de incremento na média global de DM quando comparada ao controle. As crianças nascidas de mães expostas tiveram ~45% de incremento na média global de DM comparadas aos controles. Quando mães e pais foram expostos a baixas doses de RI, um incremento na média global de DM de sua prole não foi observado quando comparado aos controles. Entre os progenitores do grupo controle, as mães contribuíram mais (0,5%) DM com a prole. E entre os expostos, as mães também contribuíram mais com DM (22%), esse resultado demonstra um aumento quando comparado caso e controle (Tabela 2).

Tabela 2. Dados descritivos dos desvios mendelianos dos grupos caso e controle para as gerações parentais no estudo sobre a indução de mutação germinativa na prole de indivíduos expostos acidentalmente a doses baixas e alta de radiação ionizante de ¹³⁷Cs.

Média	Expostos	Controles	Incremento	Porcentagem
Média global DM todos	1358,5	978,2	1,39	39
Média global DM Maternos	1458,7	1009,4	1,45	45
Média global DM, Mães expostas a baixas doses	1014,6	-	0,70	
Média global DM Paternos	1191,5	956,6	1,25	25
Média global DM, Pais expostos a baixas doses	899,0	-	0,75	

A RI pode induzir mutações em células somáticas e germinativas de várias espécies estudadas. Em humanos, as células germinativas, do ponto de vista dos riscos genéticos decorrentes da exposição à RI, são bastante radiosensíveis. Assim, as espermatogônias e os oócitos imaturos são altamente sensíveis à irradiação, mesmo a doses tão baixas quanto 0,1Gy. As abordagens mais convencionais para detectar mutações de origem germinativa comparam fenótipos e/ou genótipos entre os progenitores e suas proles. Porém, quando a frequência de mutações na linhagem germinativa é muito baixa, torna-se necessário o uso de um grande número de descendentes para encontrar as mutações germinativas. O advento da tecnologia NGS trouxe um novo horizonte para este tipo de análise, pois apenas um genoma da progênie é suficiente para detectar milhares de mutações germinativas. Os dados de sequenciamento podem ilustrar não apenas a frequência de mutações com base em pares de bases sequenciadas, mas também tipos de mutação e localizações exatas das mutações (DU, PAN E CHEN, 2017).

No estudo de Goldmann e colaboradores (2016), foi usado um conjunto de dados de 7.216 DNM autossômicos de sequenciamento de genoma completo de 816 trios para investigar diferenças entre DNM derivados de mãe e pai e estudar os mecanismos mutacionais subjacentes. Nos seus resultados foi observado um enriquecimento de DNM maternos com motivos de mutagênese mediada por APOBEC, uma família de citidina-desaminases evolutivamente conservadas. Também constataram que o número de DNM na prole aumenta não apenas com a idade paterna, mas também com a idade materna.

Poucos estudos utilizaram tecnologias genômicas de alta cobertura de todo o genoma para explorar os efeitos transgeracionais da exposição à radiação ionizante usando estratégias de sequenciamento de nova geração. O desenho do presente estudo de 2 gerações não apenas fornece novos insights sobre os efeitos transgeracionais da exposição à radiação em geral, mas também informou questões relacionadas à exposição paterna versus materna, agregando novas evidências aos relatos recentes sobre do efeito da contribuição materna no número de mutações *de novo* na prole (WONG et al., 2016).

Historicamente, análises das frequências de substituições de bases permitem esboçar os espectros mutacionais em seis classes, sendo quatro classes de transversões (A:T>C:G, A:T>T:A, C:G>A:T e C:G>G:C) e duas classes de transições (A:T>G:C e C:G>T:A). A definição do espectro das mutações de ponto tem sido útil para destacar padrões de mutação típicos e para inferir potenciais mecanismos subjacentes à indução e fixação do dano no genoma. Esta abordagem foi empregada no presente estudo.

Para testar a distribuição normal do conjunto de dados, foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk sobre a variável número de desvios mendelianos no conjunto de dados em função das classes de substituição de bases, cujo valor de P foi de <0,0001 para o grupo caso, conseqüentemente os resíduos não seguiram uma distribuição normal. Os resíduos são heterocedásticos, ou seja, os dados são muito variáveis. Na figura 11 pode ser observado que o grupo controle apresentou distribuição normal para todos os eventos mutacionais, já o grupo caso (Figura 12) os dados desviaram da distribuição. A dispersão dos dados do grupo exposto representa a variância elevada nas frequências de substituições de bases na prole em resposta à exposição parental à RI.

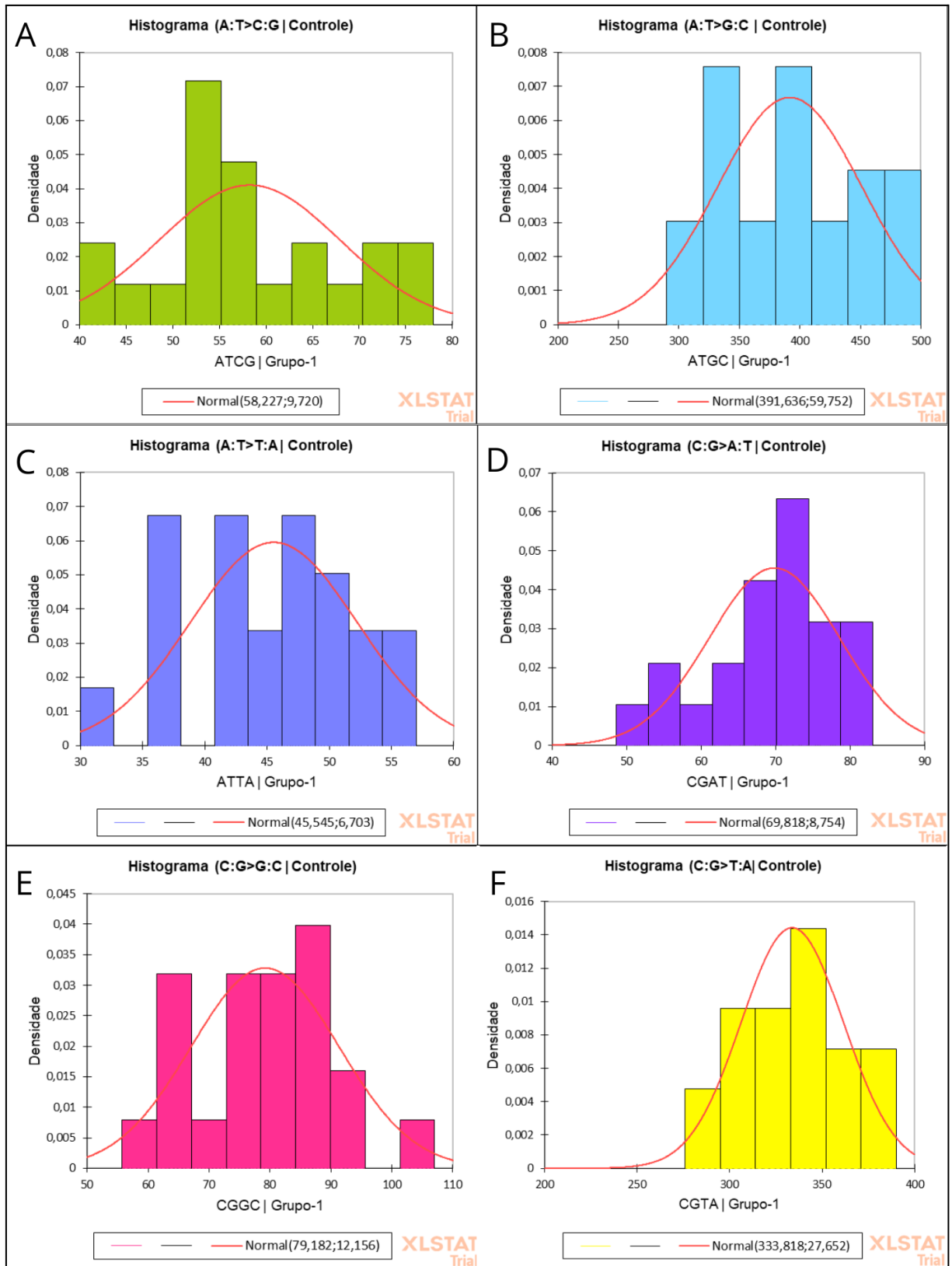


Figura 11. Gráficos apresentando a distribuição normal do grupo controle nos eventos mutacionais. A: Mutações do tipo A>C e T>G. B: Mutações do tipo A>G e T>C. C: Mutações do tipo A>T e T>A. D: Mutações do tipo C>A e G>T. E: Mutações do tipo C>G e G>C. F: Mutações do tipo C>T e G>A.

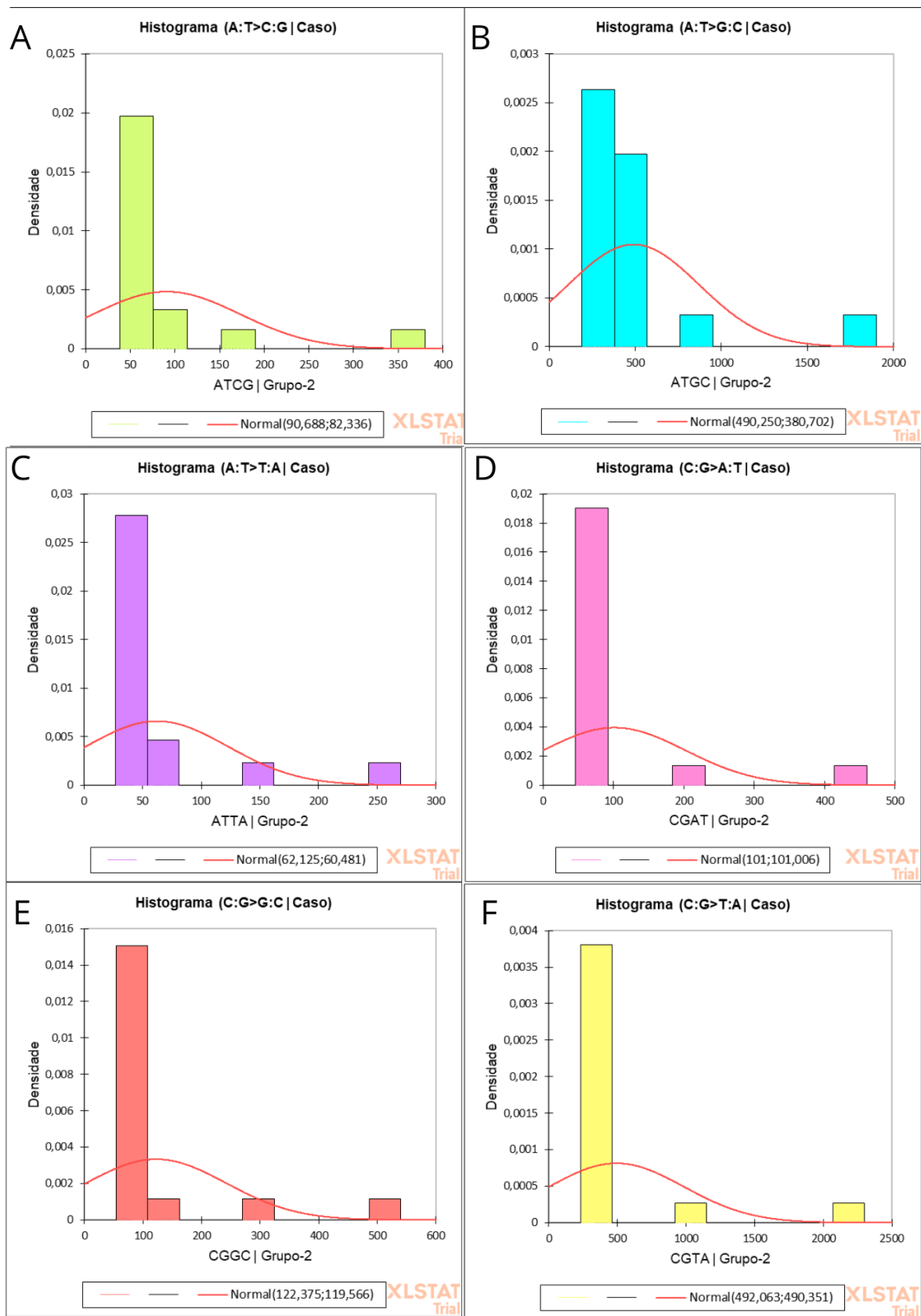


Figura 12. Gráficos apresentando a distribuição não normal do grupo caso nos eventos mutacionais. A: Mutações do tipo A>C e T>G. B: Mutações do tipo A>G e T>C. C: Mutações do tipo A>T e T>A. D: Mutações do tipo C>A e G>T. E: Mutações do tipo C>G e G>C. F: Mutações do tipo C>T e G>A.

No teste de correlação de Pearson foi analisado a relação de quatro variáveis: total de DM, dose, sexo e idade dos progenitores (Figura 13). O valor de p mais próximo ao 1 (vermelho) constata uma correlação muito forte, já o valor de p igual a 0 (preto) corresponde à não associação. Valores de 0,70 a 0,89 (laranja) indicam uma forte correlação. As variáveis Total de DM e dose demonstram uma correlação positiva no grupo caso. O resultado constata que quanto maior a dose absorvida pelo progenitor, maior o aumento no número de DM na prole.

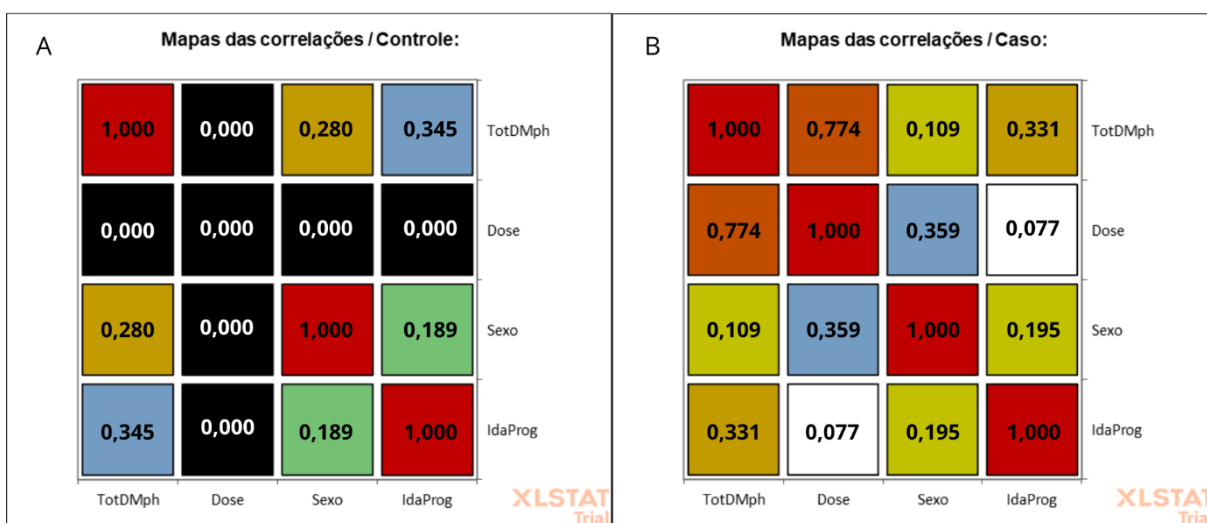


Figura 13. Correlação de Pearson entre quatro variáveis, total de desvios mendelianos, dose, sexo e idade do progenitor. A: Grupo Controle. B: Grupo Caso.

A grande maioria dos dados epidemiológicos sobre os efeitos das exposições à RI veio das coortes dos sobreviventes dos bombardeios de Hiroshima e Nagasaki e após o acidente de Chernobyl e, em menor grau, dos estudos sobre os efeitos das exposições ocupacionais prolongadas em diagnósticos médicos. Situações muito diferentes dos participantes desse estudo, caracterizadas por modos e tipos de exposição totalmente diferentes. Estudos anteriores com esse grupo de pessoas (DA CRUZ et al., 1994; DA CRUZ et al., 1996; DA CRUZ et al., 1997; SILVA, 2000; COSTA et al., 2017; LEITE FILHO et al., 2020) também encontraram uma correlação do aumento de mutação na população exposta a baixas doses, essas pesquisas foram feitas com diversos métodos e bioindicadores. É fácil entender a importância de estudos que pesquisem o efeito da RI nessas pequenas populações expostas à RI para contribuir com o conhecimento das consequências da exposição e avaliar o efeito transgeracional na frequência das mutações.

Os resultados da regressão linear para avaliar a influência da dose, da idade e sexo dos progenitores sobre o total dos DM na prole podem ser observados na Figura 14. A análise

identificou diferenças significativas entre os escores associados ao grupo caso e controle ($p < 0.001$; $r^2 = 0,548$). Por meio do modelo proposto nesta análise, ~55% da variação encontrada pôde ser explicada pela dose e pela idade dos progenitores.

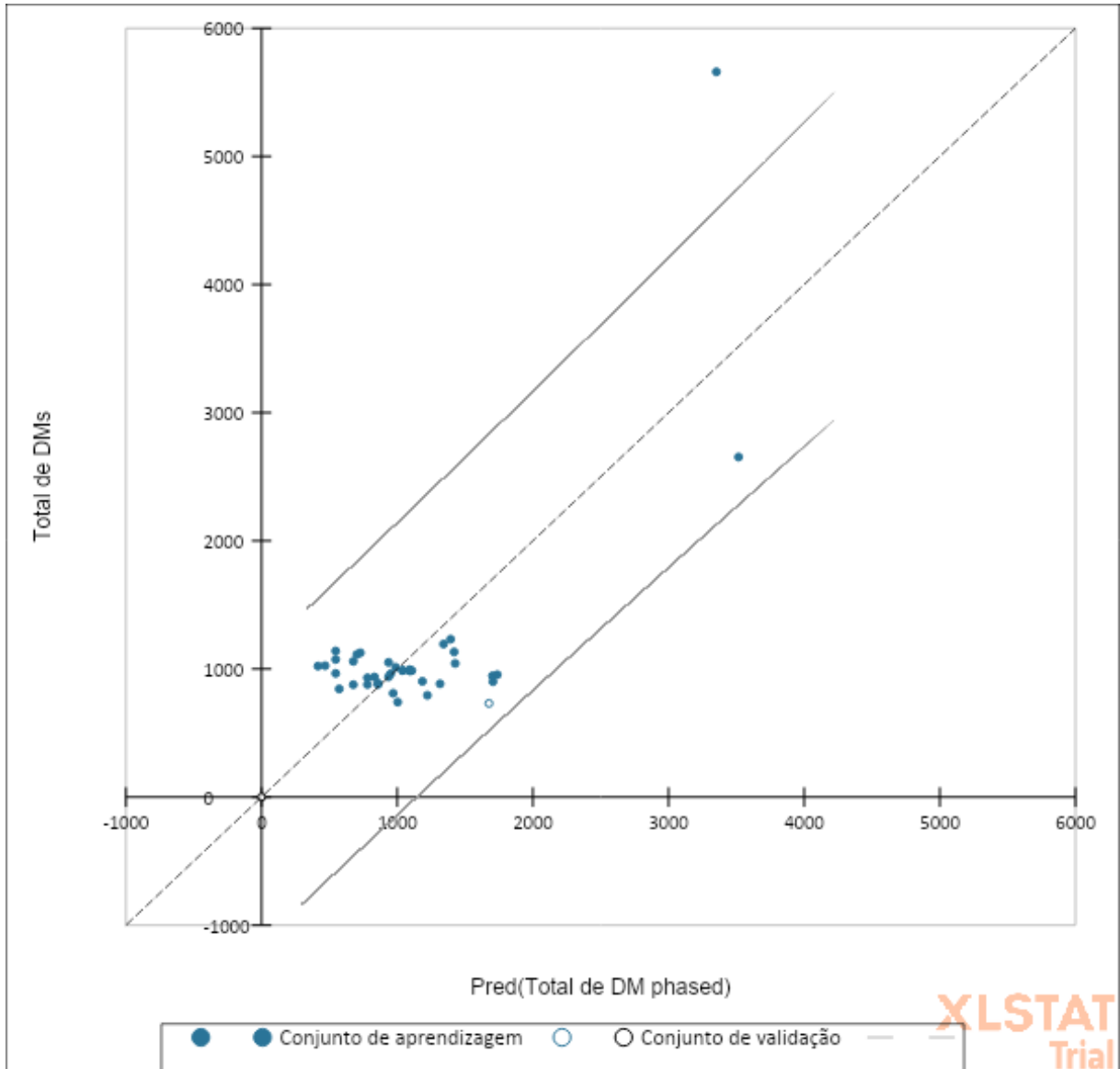


Figura 14. Análise da influência da dose de controles e casos expostos a doses muito baixas de radiação ionizante de ^{137}Cs em Goiânia (Brasil). Teste de Regressão Linear.

Em nosso estudo, a idade dos progenitores à concepção e a dose modularam positivamente a frequência de mutações *de novo* de SNV autossômicos. O modelo, ajustado para intercepto igual a zero, permitiu a predição do efeito segundo a equação:

Equação 1.

$$(\text{TotDMph} = 2.416,4 * \text{Dose}(\text{Gy}) + 26,0 * \text{Idade do Progenitor}(\text{anos}))$$

Pelo modelo, a cada 1Gy acrescentado na dose absorvida houve um aumento de 2.416,4 nos DM da prole. Também foi possível perceber um aumento de 26,0 DM a cada ano acrescentado na idade dos progenitores. Isso nos permite prever as consequências de longo prazo de uma mudança nos tempos de geração. A Figura 15 apresenta o gráfico que demonstra que os DM estão interligados com a dose e a idade à concepção.

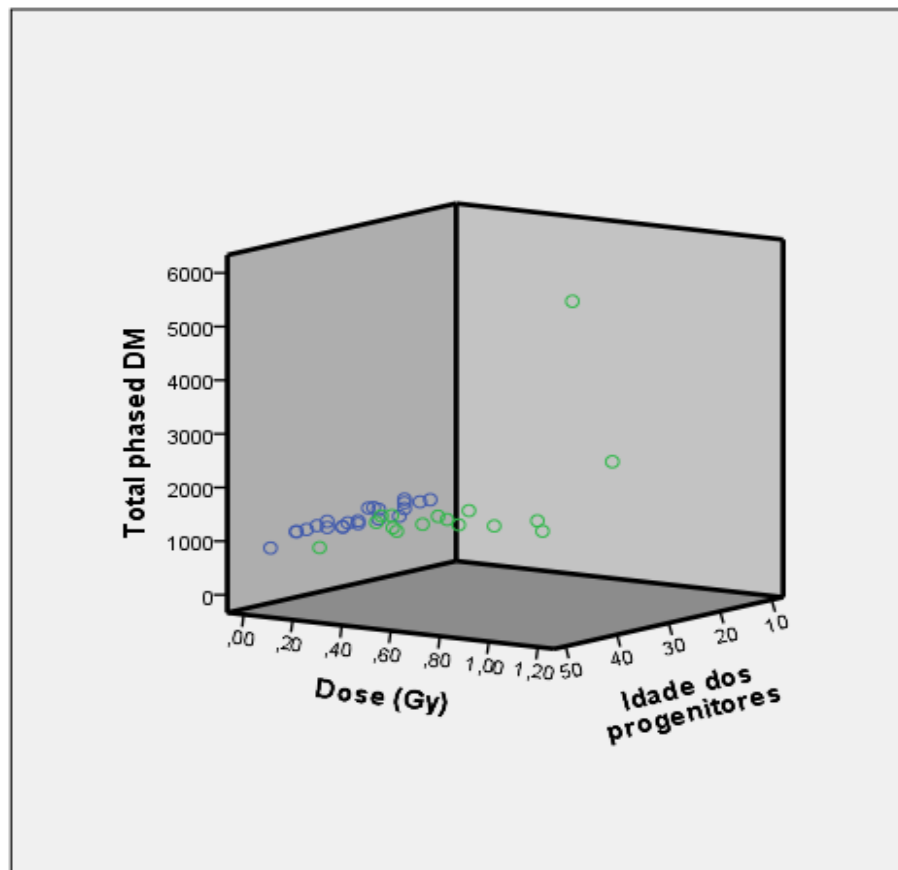


Figura 15. Média das frequências de Desvios Mendelianos da progênie de controles e casos expostos à radiação ionizante de ^{137}Cs em Goiânia (Brasil) comparando doses e idade dos progenitores. Em verde os expostos e em azul os controles.

A revisão de Narendran, Luzhna e Kovalchuk (2019) reuniu dados dos principais estudos humanos sobre os riscos à saúde decorrente da exposição à radiação. O agregado dos dados mostrou que o sexo pode influenciar potencialmente a resposta prolongada à exposição à radiação. Esses dados sugerem que a radiosensibilidade de longo prazo em mulheres é maior do que em homens que recebem uma dose comparável de radiação.

Estudos anteriores corroboram que o número de mutações *de novo* na linhagem germinativa de pessoas expostas a RI está correlacionado com a idade dos pais à concepção (DA CRUZ et al., 1997; COSTA et al., 2017; LEITE FILHO et al., 2020; GOLDMANN et al., 2021). Outro estudo que obteve resultados parecidos, foi o de Wong e colaboradores

(2016), no qual foi observado que a idade materna tem uma correlação pequena, mas significativa, com o número total de DNM na prole, após contabilizar a idade paterna. Há evidências, de que a frequência de mutação das mães aumenta a uma taxa acelerada com a idade, enquanto a frequência de mutação dos pais aumenta a uma taxa constante. A idade materna também se mostrou positivamente correlacionada com o número de DNM de determinada origem materna usando os dados de GBS da Illumina.

A Tabela 3 apresenta o resumo dos resultados do teste ANOVA para o conjunto de mutações *de novo* dividido em 6 classes do presente estudo. A transição AT>GC apresentou a maior variabilidade (34%) que foi explicada pela variável explicativa, ou seja, a dose.

Tabela 3. Resumo dos dados descritivos dos grupos caso e controle para as seis classes de substituição de bases no genoma de crianças concebidas após exposição dos pais a baixas doses de radiação ionizante e seus controles.

Mutação	Fonte	GL	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	R ²	F	Pr > F
A:T>C:G	Modelo	1	71458,333	71458,333	0,233	10,935	0,002
	Erro	36	235255,667	6534,880			
	Total						
	corrigido	37	306714,000				
<hr/>							
A:T>G:C	Modelo	1	3178519,048	3178519,048	0,343	18,785	0,000
	Erro	36	6091410,952	169205,860			
	Total						
	corrigido	37	9269930,000				
<hr/>							
A:T>T:A	Modelo	1	42885,762	42885,762	0,267	13,139	0,001
	Erro	36	117507,238	3264,090			
	Total						
	corrigido	37	160393,000				
<hr/>							
C:G>A:T	Modelo	1	101504,762	101504,762	0,242	11,498	0,002
	Erro	36	317817,238	8828,257			

	Total						
	corrigid	37	419322,000				
	o						
	Modelo	1	129171,857	129171,857	0,220	10,178	0,003
	Erro	36	456891,143	12691,421			
CG>GC	Total						
	corrigid	37	586063,000				
	o						
	Modelo	1	2304754,71	2304754,71	0,235	11,072	0,002
			4	4			
	Erro	36	7493767,28	208160,202			
C:G>T:A			6				
	Total						
	corrigid	37	9798522,00				
	o		0				

Os dados do presente estudo demonstram variações nos riscos relativos para cada classe de substituição de base, porém, apenas os eventos A:T>C:G (12%), A:T>G:C (8%), C:G>G:C (11%) e C:G>T:A (5%) alcançaram significância estatística. A *odds ratio* foi sensível o suficiente para demonstrar uma diferença estatisticamente significativa apenas para A:T>C:G (15%), expondo um aumento na chance desse evento ocorrer na população exposta (Tabela 4).

Tabela 4. Estimativa do Risco Relativo e do Odds Ratio de uma SNV ocorrer na prole de um indivíduo exposto acidentalmente a doses baixas e alta de radiação ionizante de ¹³⁷Cs comparado ao grupo controle.

	A:T>C:G	A:T>G:C	A:T>T:A	C:G>A:T	C:G>G:C	C:G>T:A
Risco Relativo	1,12	1,08	1,02	1,04	1,11	1,05
IC inferior	1,04	1,05	0,9	0,97	1,04	1,02
IC superior	1,2	1,1	1,12	1,11	1,18	1,07
Z	2,95	5,55	0,35	1,17	3,18	3,27
P	0,0031	0,0001	0,7289	0,2449	0,0015	0,0011
Conclusão	S	S	NS	NS	S	S
Odds Ratio	1,15	0,92	1,00	1,06	0,94	0,95
IC inferior	1,06	0,89	0,92	0,99	0,85	0,89

IC superior	1,24	0,95	1,1	1,14	1,03	1,02
Z	3,436	4,511	0,069	1,68	1,36	1,289
P	0,0006	0,0001	0,9449	0,0932	0,173	0,1973
Conclusão	S	NS	NS	NS	NS	NS

S: Significativo

NS: Não significativo

No estudo de Lynch (2010) também foi encontrado uma predominância de alterações A:T>G:C e G:C>A:T entre as mutações de substituição de base no genoma humano. Ele relata que em primatas, as transições C→T surgem em sítios de dinucleotídeos CpG, aproximadamente 15 vezes a taxa de mutação observada em outros sítios, ostensivamente por causa da desaminação oxidativa espontânea de citosinas metiladas em sítios CpG. Os CpGs nas células somáticas humanas são 20% a 80% metilados, embora o grau de metilação nas células da linhagem seja menos claro, outros mecanismos, ainda não elucidados, devem ser responsáveis pela taxa elevada da mutação G:C>A:T.

Em um estudo na população da Islândia, foi usado o sequenciamento para entender como a idade e o sexo dos pais transmissores afetam as mutações *de novo*. Foi notado que as mães transmitem relativamente mais substituições do tipo C>T. O efeito da idade parental foi significativo para cada classe mutacional, com os maiores efeitos observados para mutações T>C. Também foi notado que o espectro mutacional foi mais afetado pela idade materna do que paterna (JÓNSSON et al., 2017; YANG et al., 2019).

As transições T>C são, na verdade, uma característica da exposição à radiação gama e são o evento mutacional espontâneo mais esperado. Elas ocorrem através de mecanismos dependentes de contexto de sequência visando preferencialmente dinucleotídeos de pirimidina, ou seja, uma alta proporção de alterações de pares de bases em dinucleotídeos CpG (BELFIELD et al. 2012).

No entanto, existem diversos relatos sobre um aumento de mutações A·T→G·C (LYNCH, 2010; LEE et al., 2019; YANG et al., 2019) e até uma possível assinatura caracterizada por essas transições encontradas em cânceres humanos primários, embora nenhuma tenha sido especificamente atribuída a esse processo mutacional até agora. A adenina pode desaminar para hipoxantina a uma taxa de 10% da taxa de desaminação da citosina. O produto emparelha-se preferencialmente com a citosina durante a replicação e pode dar origem a transições A·T→G·C (HELLEDAY; ESHTAD; NIK-ZAINAL, 2014).

A radiação gera lesões no DNA através da deposição direta de energia no DNA, bem como pela ação indireta de espécies químicas reativas formadas próximas ao DNA atribuídas à formação de radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$) através da radiólise da água próxima ao DNA. É provável que a espécie reativa de oxigênio elevados induza 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8-oxo-dG), que pode formar pares de bases com adenina em vez de citosina durante a replicação do DNA e leva a transversões GC TA (YANG et al., 2019).

A divergência com os resultados de outros estudos que identificam aumento da mutação GCTA pode indicar uma certa independência dos padrões de mutação induzidos por RI observados aqui daqueles observados em células naturais não expostas ou de alterações puramente relacionadas ao câncer, que podem estar relacionadas a diferenças mecanicistas, bem como taxa de dose e exposição.

Uma implicação desses achados de regiões hipermutáveis de origem materna é que a distribuição genômica de variantes pode ser usada para fazer inferências sobre diferenças sexuais de longo prazo na idade dos pais em populações expostas a RI. Porém, é preciso cautela no uso e interpretação das estimativas das frequências de mutação transgeracional.

Quando analisamos as médias das substituições de base do tipo transição e transversão, foi observado uma maior proporção de transições nos filhos de casos e controles, porém a diferença não é estatisticamente significativa (Figura 16). A dominância das transições sobre as transversões tem sido documentada há muito tempo (DA CRUZ, 1997; GUO et al., 2012; YANG et al., 2019; LEITE FILHO et al., 2020), as relações transição/transversão são um indicador consistente e útil para avaliação de qualidade de dados para todas as plataformas NGS (NATH et al., 2020).

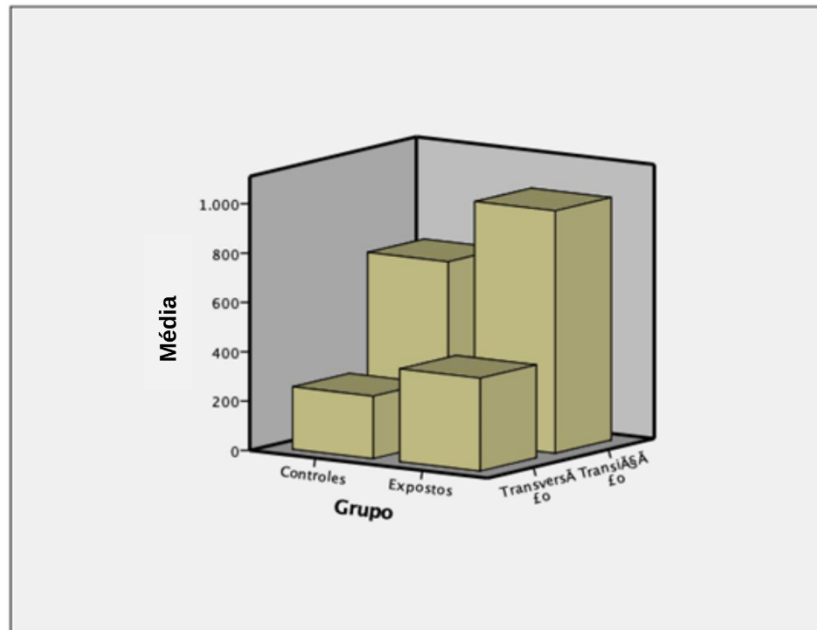


Figura 16. Indica a proporção de mutações do tipo transição e transversão nos grupos controle e casos da população de Goiânia exposta acidentalmente a baixas doses de radiação ionizante.

Parece que esse aumento de transição está relacionado com a regulação do ciclo celular. No estudo de Romanenko e colaboradores (2009) com infecção urinária crônica de pessoas exposta à RI no acidente de Chernobyl, foi observado uma transição desregulada do ciclo celular que leva a uma maior chance de transformação maligna com o possível desenvolvimento de carcinoma de bexiga preferencialmente de alto estágio e alto grau entre a população na Ucrânia. Além disso, foi documentado uma alteração significativa na regulação da transição do ciclo celular associada ao aumento da ativação de processos proliferativos e superexpressão da proteína PCNA, juntamente com alterações nos processos de ubiquitinação e sumoilação em associação com proteólise não programada aberrante de muitos reguladores do ciclo celular. Além disso, o reparo do DNA parece ser um evento precoce na resposta adaptativa induzida pela radiação. O esgotamento da capacidade das vias de reparo de excisão de bases e nucleotídeos associado à cistite muito recorrentes em pessoas radioexpostas no acidente de Chernobyl pode estar relacionado ao potencial carcinogênico das lesões uroteliais.

O Sequenciamento de Nova Geração se mostrou eficiente para o rastreamento de SNV e representa um grande avanço para o estudo de mutações induzidas por RI. Na revisão de Du, Pan e Chen (2017), foi descrito como o NGS foi utilizado para detectar mutações germinativas e somáticas e também um resumo sobre a mutagenicidade de 20 produtos químicos e físicos. Entre estes produtos está a radiação ultravioleta (UV) e os Raios X, os resultados mostraram um aumento estatisticamente não significativo dos espectros de mutações entre o tratamento e o controle. Os resultados de sequenciamento disponíveis

confirmam basicamente a mutagenicidade desses agentes avaliados com métodos tradicionais. Esses estudos de mutação baseados em NGS nos ajudam a avaliar melhor a mutagenicidade desses produtos e os mecanismos subjacentes, e a avançar nosso conhecimento sobre mutagênese radio-induzida.

As plataformas e pipelines de bioinformática de NGS são ideais para a detecção de SNV. Na verdade, as primeiras aplicações clínicas do NGS foram projetadas para detectar SNV em doenças hereditárias e adquiridas e, por essa razão, os pipelines de bioinformática necessários para a detecção sensível e específica de substituições de par de base único estão entre os mais avançados em NGS (SPENCER, ZHANG E PFEIFER, 2015).

Diferentes vias biológicas entre os efeitos de baixas e altas doses são consideradas e comprovadas por meio de sofisticados estudos celulares e moleculares. Além disso, há muito interesse nas interações entre suscetibilidade genética e exposição a baixas doses. Embora a biologia da radiação não possa fornecer evidências diretas dos efeitos de baixas doses na saúde humana, estudos abrangentes entre alta e baixa dose é necessário para a melhor compreensão do mecanismo radiobiológico, facilitaria os estudos epidemiológicos e melhoraria a precisão de uma relação dose-resposta em níveis de baixas doses (SEONG et al., 2016).

Quanto aos efeitos transgeracionais, vários tipos de RI podem induzir um estado de instabilidade genética nas células germinativas de indivíduos expostos a pequenas doses que podem ser transmitidas à prole (BURGIO, PISCITELLI E MIGLIORE, 2018). No entanto, em Goiânia não há registros nos filhos nascidos de pais expostos à radiação, nenhum excesso de malformações congênitas e nenhum aumento significativo de tumores (CURADO et al., 2019). Ao longo dos anos, com análise de DNA transgeracional retrospectiva, foi possível detectar um aumento na frequência de mutações da linhagem germinativas utilizando diversos biomarcadores (ARRUDA et al., 2008; DA CRUZ et al., 2008; COSTA et al., 2011; COSTA et al., 2017; LEITE FILHO et al., 2020). Sinal indireto e paradigmático da instabilidade genômica progressiva, que se verificou ser o principal efeito de uma exposição a baixas doses de radiação. Esses estudos demonstram que os mecanismos de dano da exposição a baixas doses de radiação são fundamentalmente diferentes daqueles em altas doses.

Além da exposição à RI, precisa se levar em conta o envelhecimento natural desta população e hábitos que são prejudiciais à saúde, todas essas situações aumentam a preocupação e os cuidados no que se refere à prevenção do câncer, diagnóstico precoce e

estudos como este, nas gerações futuras desses indivíduos expostos. O conhecimento científico obtido a partir de estudos epidemiológicos de pessoas que foram expostas a RI, tem um papel importante na melhoria da gestão da saúde, cuidados médicos e bem-estar desses indivíduos (KAMIYA et al., 2015).

O monitoramento é necessário para prevenir um desfecho inesperado e para contribuir com a prevenção da saúde dos radioacidentados. O estudo de grupos expostos a baixa dose é indispensável para poder determinar melhor a dose-resposta em humanos e poder fornecer mais informações sobre efeitos estocásticos de doses baixas e muito baixas. Para fortalecer os estudos de mutagênese na área de radiação foi publicado um artigo para a revista genética na escola em que o objetivo foi reunir dados sobre o monitoramento da saúde genética dos indivíduos expostos acidentalmente e ocupacionalmente à radiação ionizante de ^{137}Cs (Anexo XI).

O algoritmo SIPO se apresentou eficaz para ser usado como ferramenta adicional na detecção de DM de SNV de pessoas expostas à RI. Adicionalmente, este estudo foi de grande relevância, pois permitiu avaliar o incremento de indução de SNV novas e identificar a sua origem na prole de indivíduos expostos à RI fornecendo subsídios para novos estudos e abordagens multicêntricos envolvendo populações humanas expostas aos mais diversos agentes mutagênicos.

6. Conclusão

A análise da frequência de substituições de base *de novo* de origem germinativa a partir de dados de sequenciamento de nova geração de pais biológicos, expostos acidentalmente a baixas e altas doses de RI de ^{137}Cs durante o acidente em Goiânia permitiu alcançar as seguintes conclusões:

- Os indivíduos expostos contribuíram em torno de 39% de incremento na média global de DM comparado ao controle. As mães expostas contribuíram em torno de 44% de incremento na média global de DM comparado ao controle.
- A idade dos progenitores à concepção e o sexo teve efeito sobre a frequência de mutações de DM *de novo* de SNV autossômicos
- A mutação A:T>C:G (12%) teve aumento de risco relativo estatisticamente significativo de acontecer na prole dos indivíduos expostos.
- A *Odds Ratio* foi sensível o suficiente para demonstrar uma diferença estatisticamente significativa para a mutação A:T>C:G, correspondendo a um aumento de 15% na chance desse evento ocorrer na prole de população exposta.
- A maior variabilidade foi observada para a substituição de base A:T>G:C, sendo que 34% desta variabilidade pode ser explicada pela dose absorvida dos progenitores.

7. Referências bibliográficas

- ADEWOYE, Adeolu B. et al. (2015). **The genome-wide effects of ionizing radiation on mutation induction in the mammalian germline.** *Nature communications*, v. 6, n. 1, p. 1-8.
- ALESSIO, Nicola et al (2015). **Low dose radiation induced senescence of human mesenchymal stromal cells and impaired the autophagy process.** *Oncotarget*, v. 6, n. 10, p. 815.
- ALIZADEH, Elahe; ORLANDO, Thomas M.; SANCHE, Léon (2015). **Biomolecular damage induced by ionizing radiation: the direct and indirect effects of low-energy electrons on DNA.** *Annual review of physical chemistry*, v. 66, p. 379-398.
- ANDREWS, S. (2010). **FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.** Data [Online]. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- ARRUDA, J. T., SILVA, D. M., SILVA, C. C., MOURA, K. K., & DA CRUZ, A. D. (2008). **Homologous recombination between HERVs causes duplications in the AZFa region of men accidentally exposed to cesium-137 in Goiânia.** *Genet Mol Res*, 7(7), 1063-1069.
- BEHJATI, Sam et al. (2016). **Mutational signatures of ionizing radiation in second malignancies.** *Nature communications*, v. 7, n. 1, p. 1-8.
- BELFIELD, Eric J. et al. (2012). **Genome-wide analysis of mutations in mutant lineages selected following fast-neutron irradiation mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*.** *Genome research*, v. 22, n. 7, p. 1306-1315.
- BOORA, Ganesh K. et al. (2015). **Exome-level comparison of primary well-differentiated neuroendocrine tumors and their cell lines.** *Cancer genetics*, v. 208, n. 7-8, p. 374-381.
- BOLGER, A. M., LOHSE, M., & USADEL, B. (2014). **Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data.** *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.
- BRASH, Douglas E (2015). **UV signature mutations.** *Photochemistry and photobiology*, v. 91, n. 1, p. 15-26.
- BURGIO, Ernesto; PISCITELLI, Prisco; MIGLIORE, Lucia. (2018). **Ionizing radiation and human health: Reviewing models of exposure and mechanisms of cellular damage. An epigenetic perspective.** *International journal of environmental research and public health*, v. 15, n. 9, p. 1971.

CAPRIOTTI, Emidio; ALTMAN, Russ B.; BROMBERG, Yana (2013). **Collective judgment predicts disease-associated single nucleotide variants.** *BMC genomics*, v. 14, n. S3, p. S2.

C.A.R.A. Disponível em < <http://www.cesio137goiania.go.gov.br/>>. Acesso em 30 de Abril de 2020.

COSTA, E. O. A. et al. (2011). **The effect of low-dose exposure on germline microsatellite mutation rates in humans accidentally exposed to caesium-137 in Goiania.** *Mutagenesis*, p. 1-5.

COSTA, E. O. A.; PINTO, I. P.; GONÇALVES, M. W.; et al. (2018). **Small de novo CNV as biomarkers of parental exposure to low doses of ionizing radiation of caesium-137.** *Scientific reports*, 8(1), 5914.

CURADO, Maria Paula et al. (2019). **Cancer incidence in the cohort exposed to Cesium-137 accident in Goiânia (Brazil) in 1987.** *Journal of Health & Biological Sciences*, v. 7, n. 3 (Jul-Set), p. 228-232.

DA CRUZ, A. D.; MCARTHUR, A. G.; SILVA, C. C.; et al. (1994). **Human micronucleus counts are correlated with age, smoking, and cesium-137 dose in the Goiania (Brazil) radiological accident.** *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 313(1), 57-68.

DA CRUZ, A. D.; CURRY, J.; CURADO, M. P.; GLICKMAN, B. W. (1996). **Monitoring *hprt* mutant frequency over time in T-lymphocytes of people accidentally exposed to high doses of ionizing radiation.** *Environmental and molecular mutagenesis*, 27(3), 165-175.

DA CRUZ, A. D.; GLICKMAN, B. W. (1997). **Monitoring the genetic health of humans accidentally exposed to ionizing radiation of cesium-137 in Goiania, Brazil.** (pp. 5705-5705). University of Victoria.

DA CRUZ, A. D.; VOLPE, J. P.; SADDI, V.; et al. (1997). **Radiation risk estimation in human populations: Lessons from the radiological accident in Brazil.** *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 373(2), 207-214.

DA CRUZ, A. D.; E SILVA, D. D. M.; DA SILVA, C. C.; et al. (2008). **Microsatellite mutations in the offspring of irradiated parents 19 years after the Cesium-137 accident.** *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 652(2), 175-179.

DA SILVA, C. C.; DA CRUZ, A. D. (2002). **An easy procedure for cytogenetic analysis of aged chromosome preparations using FISH–WCP probes.** *Chromosome Research*, 10(3), 233-238.

DA SILVA, Telma Camargo (2017). **Silêncios da dor: enfoque geracional e agência no caso do desastre radioativo de Goiânia, Brasil.** *Iberoamericana–Nordic Journal of Latin American and Caribbean Studies*, v. 46, n. 1.

DESOUKY, Omar; DING, Nan; ZHOU, Guangming (2015). **Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation.** *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, v. 8, n. 2, p. 247-254.

DROST, J. B.; LEE, W. R. (1995). **Biological basis of germline mutation: comparisons of spontaneous germline mutation rates among drosophila, mouse, and human.** *Environmental and molecular mutagenesis*, 25(S2), 48-64.

DU, Hua; PAN, Bohu; CHEN, Tao. (2017). **Evaluation of chemical mutagenicity using next generation sequencing: a review.** *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, v. 35, n. 3, p. 140-158.

DU, Y.; et al. (2018). **Strategies for identification of mutations induced by carbon-ion beam irradiation in Arabidopsis thaliana by whole genome re-sequencing.** *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 807, 21-30.

EL-SHARKASY, M. M.; BADR, M. S (2018). **Modeling DNA & RNA mutation using mset and topology.** *International Journal of Biomathematics*, v. 11, n. 04, p. 1850058.

ELSHIRE RJ, GLAUBITZ JC, SUN Q et al. (2011) **A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species.** *PLoS ONE*, 6(5): e19379.

ESCALONA, Merly; ROCHA, Sara; POSADA, David (2016). **A comparison of tools for the simulation of genomic next-generation sequencing data.** *Nature Reviews Genetics*, v. 17, n. 8, p. 459.

FLORES, Bráulio Cançado. *Monitoramento genético retrospectivo em população potencialmente exposta à radiação ionizante.* Dissertação (Mestrado em Genética) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, 2008.

FORAY, Nicolas; BOURGUIGNON, Michel; HAMADA, Nobuyuki (2016). **Individual response to ionizing radiation.** *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, v. 770, p. 369-386.

GOLDMANN, Jakob M. et al. (2016). **Parent-of-origin-specific signatures of *de novo* mutations.** *Nature Genetics*, v. 48, n. 8, p. 935.

GOLDMANN, Jakob M. et al. (2021). **Differences in the number of *de novo* mutations between individuals are due to small family-specific effects and stochasticity.** *Genome research*, v. 31, n. 9, p. 1513-1518.

GORIELY, Anne (2016). **Decoding germline *de novo* point mutations.** *Nature genetics*, v. 48, n. 8, p. 823.

GUO, Yan et al. (2012). **The use of next generation sequencing technology to study the effect of radiation therapy on mitochondrial DNA mutation.** *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 744, n. 2, p. 154-160.

HALL, Janet et al. (2017). **Ionizing radiation biomarkers in epidemiological studies—an update.** *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, v. 771, p. 59-84.

HELLEDAY, Thomas; ESHTAD, Saeed; NIK-ZAINAL, Serena. (2014). **Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers.** *Nature Reviews Genetics*, v. 15, n. 9, p. 585-598.

HERATE, C., & SABATIER, L. (2020). **Retrospective biodosimetry techniques: Focus on cytogenetics assays for individuals exposed to ionizing radiation.** *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 783, 108287.

HORAI, Makiko et al. (2018). **Detection of *de novo* single nucleotide variants in offspring of atomic-bomb survivors close to the hypocenter by whole-genome sequencing.** *Journal of human genetics*, v. 63, n. 3, p. 357-363.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **The Radiological Accident in Goiânia.** Vienna: ©IEAE, 1988.

JAAKKO PÖYRY ENGENHARIA LTDA. (1994). **Depósito Definitivo dos Rejeitos Radioativos oriundos do Acidente Radiológico com ¹³⁷Cs ocorrido em Goiânia/Goiás - Estudo de Impacto Ambiental.** *EIA/RIMA*, São Paulo.

- JÓNSSON, Hákon et al. (2017). **Parental influence on human germline de novo mutations in 1,548 trios from Iceland.** *Nature*, v. 549, n. 7673, p. 519-522.
- KAMIYA, Kenji et al. (2015). **Long-term effects of radiation exposure on health.** *The lancet*, v. 386, n. 9992, p. 469-478,.
- KANAKOGLU, Dimitrios S. et al. (2020). **Effects of High-Dose Ionizing Radiation in Human Gene Expression: A Meta-Analysis.** *International journal of molecular sciences*, v. 21, n. 6, p. 1938.
- KITAHARA, Cari M. et al. (2015). **A new era of low-dose radiation epidemiology.** *Current environmental health reports*, v. 2, n. 3, p. 236-249.
- LEE, Chang-Lung et al. (2019). **Mutational landscape in genetically engineered, carcinogen-induced, and radiation-induced mouse sarcoma.** *JCI insight*, v. 4, n. 13.
- LEITE FILHO, Hugo Pereira et al. (2020). **Deviation from Mendelian transmission of autosomal SNP can be used to estimate germline mutations in humans exposed to ionizing radiation.** *Plos one*, v. 15, n. 10, p. e0233941.
- LESTAEVEL, P.; RACINE, R.; BENSOUSSAN, H.; et al. (2010). **Césium 137: propriétés et effets biologiques après contamination interne.** *Médecine Nucléaire*, 34(2), 108-118.
- Li, H. (2013). **Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM.** *arXiv preprint arXiv:1303.3997*.
- LYNCH, Michael. (2010). **Rate, molecular spectrum, and consequences of human mutation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 3, p. 961-968.
- MA, R.; DENG, L.; XIA, Y.; et al. (2017). **A clear bias in parental origin of de novo pathogenic CNV related to intellectual disability, developmental delay and multiple congenital anomalies.** *Scientific reports*, 7, 44446.
- MAKOVA, Kateryna D.; HARDISON, Ross C (2015). **The effects of chromatin organization on variation in mutation rates in the genome.** *Nature Reviews Genetics*, v. 16, n. 4, p. 213-223.
- MATIOLI, Sergio Russo; FERNANDES, Flora M. C. **Biologia molecular e evolução.** São Paulo; Holos Editora, 2012.

- MILHOLLAND, Brandon et al. (2017). **Differences between germline and somatic mutation rates in humans and mice.** *Nature communications*, v. 8, n. 1, p. 1-8.
- MØLLER, Anders Pape; MOUSSEAU, Timothy A (2015). **Strong effects of ionizing radiation from Chernobyl on mutation rates.** *Scientific reports*, v. 5, p. 8363.
- MØLLER, Anders Pape; MOUSSEAU, Timothy Alexander (2016). **Are organisms adapting to ionizing radiation at Chernobyl?.** *Trends in ecology & evolution*, v. 31, n. 4, p. 281-289.
- MORGAN, William F.; SOWA, Marianne B (2013). **Non-targeted effects induced by ionizing radiation: mechanisms and potential impact on radiation induced health effects.** *Cancer letters*, v. 356, n. 1, p. 17-21.
- MOTTA, Ludymila Brandão. *Genotipagem por sequenciamento para identificação de SNP e associação com características agrônômicas em Coffea canephora*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo, 2016.
- NARENDRAN, Nadia; LUZHNA, Lidia; KOVALCHUK, Olga. (2019). **Sex difference of radiation response in occupational and accidental exposure.** *Frontiers in genetics*, v. 10, p. 260.
- NATARAJAN, A.T.; SANTOS S.J.; DARROUDI F.; et al. (1998). **¹³⁷Cesium-induced chromosome aberrations analyzed by fluorescence in situ hybridization: eight years follow up of the Goiânia radiation accident victims.** *Mutation Research*. 400 299–312.
- NATH, Neetika et al. (2018). **Exome sequencing discloses ionizing-radiation-induced DNA variants in the genome of human gingiva fibroblasts.** *Health physics*, v. 115, n. 1, p. 151-160.
- NATH, Neetika et al. (2020). **Ionizing Radiation Alters the Transition/Transversion Ratio in the Exome of Human Gingiva Fibroblasts.** *Health Physics*, v. 119, n. 1, p. 109-117.
- NESTA, Alex V.; TAFUR, Denisse; BECK, Christine R. (2021). **Hotspots of human mutation.** *Trends in Genetics*, v. 37, n. 8, p. 717-729.
- NUNES, Hugo Freire. *Avaliação da translocação t(14;18) MBR em indivíduos expostos a baixas doses de radiação de ¹³⁷CsCl em Goiânia, Goiás, Brasil*. Dissertação (Mestrado em Genética) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, 2011.

NUNES, H. F., LARANJEIRA, A. B. A., YUNES, J. A., COSTA, E. O. A., MELO, C. O. D. A., SILVA, D. D. M., & CRUZ, A. D. D. C. (2013). **Assessment of BCL2/J (H) translocation in healthy individuals exposed to low-level radiation of ¹³⁷CsCl in Goiânia, Goiás, Brazil.** *Genetics and Molecular Research* 12 (1): 28-36

OLIVEIRA, Lorryayne Guimarães. *O papel das duplicações segmentares na formação de variação do número de cópias de novo após a exposição parental a doses baixas de radiação ionizante observadas na geração F1 de indivíduos acidentalmente expostos ao Césio 137.* Dissertação (Mestrado em Genética) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, 2018.

PENG, Ze et al. (2020) **Comparison of SNP Calling Pipelines and NGS Platforms to Predict the Genomic Regions Harboring Candidate Genes for Nodulation in Cultivated Peanut.** *Frontiers in Genetics*, v. 11, p. 222,

RAHBARI, Raheleh et al. (2016). **Timing, rates and spectra of human germline mutation.** *Nature genetics*, v. 48, n. 2, p. 126.

ROBERTS, L. (1987). **Radiation accident grips Goiania.** *Science*, 238(4830), 1028-1032.

RÖDEL, Franz et al. (2015). **Contribution of the immune system to bystander and non-targeted effects of ionizing radiation.** *Cancer letters*, v. 356, n. 1, p. 105-113.

RODRIGUES, Lucas Henrique Nascimento Silva. *CNV de novo no cromossomo x da prole em resposta a exposição parental a baixas doses de radiação ionizante.* Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal de Goiás, 2019.

ROMANENKO, Alina et al. (2009). **Urinary bladder carcinogenesis induced by chronic exposure to persistent low-dose ionizing radiation after Chernobyl accident.** *Carcinogenesis*, v. 30, n. 11, p. 1821-1831.

ROMM, H.; WILKINS, R. C.; COLEMAN, C. N.; et al. (2011). **Biological Dosimetry by the Triage Dicentric Chromosome Assay: Potential Implications for Treatment of Acute Radiation Syndrome in Radiological Mass Casualties.** *Radiation Research*, 175, 397–404

ROZENTAL, J. J.; CUNHA, P.; OLIVEIRA, C. A. (1989). **Aspects of the initial and recovery phases of the radiological accident in Goiania.** In *Proc. Int. Symp. Recovery Operations in the Event of a Nuclear Accident or Radiological Emergency, IAEA, Vienna* (pp. 593-597).

SAGE, Evelyne; SHIKAZONO, Naoya (2017). **Radiation-induced clustered DNA lesions: Repair and mutagenesis.** *Free Radical Biology and Medicine*, v. 107, p. 125-135.

SALPIETRO, V., MANOLE, A., EFTHYMIU, S., & HOULDEN, H. (2018). **A review of copy number variants in inherited neuropathies.** *Current genomics*, 19(6), 412-419.

SANKARANARAYANAN, K.; NIKJOO, H. (2015). **Genome-based, mechanism-driven computational modeling of risks of ionizing radiation: The next frontier in genetic risk estimation?.** *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 764, 1-15.

SARTORI, P., SEPEL, L., & LORETO, E. (2008). **Radiações: Moléculas e Genes-Atividades didático-experimentais**, Ed. *Sociedade Brasileira de Genética*, ISBN, 978-85.

SEONG, Ki Moon et al. (2016). **Is the linear no-threshold dose-response paradigm still necessary for the assessment of health effects of low dose radiation?.** *Journal of Korean medical science*, v. 31, n. Suppl 1, p. S10-S23.

SILVA, Cláudio Carlos da. *Avaliação Citogenética de Indivíduos Expostos Acidentalmente à Radiação Ionizante de Césio-137 em Goiânia (Brasil)*. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Universidade Federal de Goiás, 2000.

SILVA, Juliana Ferreira da. *Mutações Germinativas na Prole de Pessoas Expostas Ocupacionalmente à Radiação Ionizante de Césio-137*. Dissertação (Mestrado em Genética) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, 2016.

SISRAD. Disponível em:
<https://www.saude.gov.br/sistemas-de-saude/indicadores-de-saude/7682-sisrad-sistema-de-monitoramento-de-radioacidentados-agrivos-E2%80%8B%E2%80%8B>. Acesso em 24 de junho de 2020.

SPENCER, David H.; ZHANG, Bin; PFEIFER, John. (2015). **Single nucleotide variant detection using next generation sequencing.** *In: Clinical Genomics. Academic Press.* p. 109-127.

SZUMIEL, I. (2015). **Ionizing radiation-induced oxidative stress, epigenetic changes and genomic instability: The pivotal role of mitochondria.** *International Journal of Radiation Biology*, 91(1), 1–12.

- TORKAMANEH, Davoud et al. (2017). **Fast-GBS: a new pipeline for the efficient and highly accurate calling of SNP from genotyping-by-sequencing data.** *BMC bioinformatics*, v. 18, n. 1, p. 5.
- VAN DER AUWERA, G. A., & O'CONNOR, B. D. (2020). **Genomics in the cloud: using Docker, GATK, and WDL in Terra.** *O'Reilly Media*.
- VAN DIJK, Erwin L. et al. (2014). **Ten years of next-generation sequencing technology.** *Trends in genetics*, v. 30, n. 9, p. 418-426.
- VIEIRA, S. D. A. (2013). **Césio-137, um drama recontado.** *Estudos Avançados*, 27(77), 217-236.
- WONG, Wendy SW et al. (2016). **New observations on maternal age effect on germline de novo mutations.** *Nature communications*, v. 7, n. 1, p. 1-10.
- YAHYAPOUR, Rasoul et al. (2018). **Mechanisms of radiation bystander and non-targeted effects: implications to radiation carcinogenesis and radiotherapy.** *Current radiopharmaceuticals*, v. 11, n. 1, p. 34-45.
- YANG, Guili et al. (2019). **Genome-wide comparisons of mutations induced by carbon-ion beam and gamma-rays irradiation in rice via resequencing multiple mutants.** *Frontiers in plant science*, p. 1514.

8. Anexo

Anexo I

**Questionário para o monitoramento dos indivíduos acidentalmente expostos ao
césio-137**

Identificação: PCG __ F __ - __

Iniciais:

DADOS PESSOAIS

Nome: _____

—

Data de nascimento: __/__/__ **Idade:** _____ **Sexo:** F()

M() **RG:** _____ **Org. Exp.** _____ **CPF:** __. __. __ - __ **Estado Civil:**

Cônjuge:

Endereço:

Bairro: _____ **Cidade:** _____ **Estado:** _____ **CEP:**

Telefone:() _____ **Celular:**() _____ **Naturalidade:** _____ **Nacionalidade:**

Filiação:

Pai:

Mãe:

DADOS

1. O Senhor (a) fez transfusão sanguínea nos últimos 90 dias? Sim () Não ()

2. Possui filhos:

Sim () Não () Se sim, quantos? _____ Antes ou depois do acidente: Antes

() Depois()

Nome (s) do filho(s):

1. _____ 2. _____
3. _____ 4. _____

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

Sim () Não ()

Se sim, qual(is) distúrbio(s)?

4. Faz uso de bebida alcoólica?

Sim () Não () Se sim, com qual frequência: Na semana? _____ dias No mês? _____ dias
No ano? _____ dias

Nesses dias qual a quantidade de bebida é ingerida? _____ Qual Tipo?: () Destilado
() Fermentada

Nos últimos 90 dias fez uso de bebidas alcóolicas?

Se sim, com qual frequência:

Nesses dias qual a quantidade ingerida? _____ Tipo: () Destilado
() Fermentada

Já utilizou?

Se sim, com qual frequência: Na semana? _____ dias No mês? _____ dias No
ano? _____ dias

Nesses dias qual a quantidade de bebida era ingerida? _____ Qual Tipo?: () Destilado
() Fermentada

5. É fumante?

Sim () Não () Se sim, por quanto tempo? _____ Quantos cigarros
dia? _____

Já fumou?

Sim () Não () Se sim, por quanto tempo fumou? _____ Há quanto tempo
parou? _____

Quantos cigarros dia? _____

6. Possuía alguma doença antes do acidente?

Sim () Não () Qual (is)?

Se sim, fez usos de medicamentos? Sim () Não () Qual (is)?

7. Possui alguma doença depois do acidente?

Sim () Não () Qual (is)?

Se sim, utiliza algum medicamento? Sim () Não () Qual (is)? _____

8. Faz uso contínuo de algum medicamento?

Sim () Não () Se sim, qual(is): _____

Há quanto tempo faz uso?

Fez uso de algum outro medicamento nos últimos dias?

Sim () Não () Se sim, qual(is): _____

Por quanto tempo? _____

9. Faz uso de substâncias ilícitas?

Sim () Não () Se sim, há quanto tempo? _____
Qual(is)? _____

Já usou outras substâncias ilícitas:

Sim () Não () Se sim, há quanto tempo? _____

Qual(is) _____

–

10. Trabalha:

Sim () Não () Se sim, há quanto tempo? _____ Qual profissão? _____

Anexo II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

I. Este projeto tem como objetivo avaliar e monitorar a saúde genética dos indivíduos expostos ao Césio-137, e será feito uma análise para estabelecer a frequência de variações genéticas, a partir de dados de uma técnica inovadora. Nesse estudo não será feito a investigação de doenças genéticas. Será feito a inclusão de um grupo controle. Esse grupo será composto por participantes sem histórico de exposição à radiação ionizante, a fim de comparar os resultados obtidos.

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

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

IV. Após a coleta de sangue e os procedimentos metodológicos o material biológico será armazenado. Ficarão sob a responsabilidade do pesquisador Aparecido Divino da Cruz e este material poderá ser retirado a qualquer momento pelo participante do estudo. Caso haja a possibilidade do participante ser incluído em pesquisas futuras, o mesmo deverá assinar um novo TCLE.

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

VI. Os benefícios dessa pesquisa serão os resultados obtidos após a realização da técnica sequenciamento de nova geração que trará informações importantes na identificação de variações genéticas após a contaminação com o Césio-137 e também o participante receberá orientação e explicação para compreender os efeitos da radiação no genoma.

VII. O senhor (a) tem a opção de tomar conhecimento ou não dos resultados das variações genéticas. Caso você queira saber dos resultados das variações genéticas, poderá ser encaminhado ao aconselhamento genético, que é um procedimento de assistência gratuita oferecida pela equipe do projeto, a fim de esclarecer os resultados obtidos e responder dúvidas que poderão surgir.

VIII. A participação no estudo não acarretará custos para você e também não haverá nenhuma remuneração financeira. Os gastos necessários para sua participação na pesquisa serão

assumidos pelos pesquisadores. Fica também garantida indenização em casos de danos comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial (justiça comum).

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

X. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios. O(s) pesquisador(es) irá(ão) tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo e as informações colhidas serão utilizadas somente para fins científicos.

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

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

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

Goiânia, ____, de _____, de 201__.

Assinatura do participante

Data

Assinatura do responsável pelo estudo

Data

Anexo III

TERMO DE ASSENTIMENTO

Grupo 1 (4 a 7 anos)

Você está sendo convidado (a) para participar da Pesquisa sob o título “**Determinação do espectro e taxa de mutações germinativas decorrentes da exposição parental à radiação ionizante do Césio-137**”. Seu responsável permitiu que você participe. Você não precisa participar da pesquisa se não quiser e não terá nenhum problema se desistir. Em caso de dúvida, você poderá entrar em contato comigo, pesquisador (a) responsável Aparecido Divino da Cruz, nos telefones: (62) 3046-1443/(62) 3946-1385 ou e-mail acruz@pucgoias.edu.br.

Queremos te chamar para participar do meu estudo, mas primeiramente quero te contar sobre um grupo de pessoas que se envolveram em um acidente com um elemento muito perigoso em Goiânia há muitos anos atrás, antes mesmo de você nascer e com esse estudo queremos contar com sua ajuda para avaliar a saúde das pessoas que sofreram esse acidente, você deve estar se perguntando por que poderia se encaixar nessa história. É pelo fato de alguns dos seus pais terem participado desse acidente de alguma forma. Para isso iremos precisar que você seja bem forte e nos deixe tirar umas gotinhas de sangue com apenas uma picadinha, e não vai doer muito. Nós iremos fazer algumas perguntas para os seus pais sobre o seu nascimento, para saber se você pode fazer parte desse estudo. Com essa pesquisa nós queremos saber sobre a saúde genética das pessoas que de alguma forma teve contato com o acidente. O estudo da genética é o estudo para sabermos o que recebemos dos nossos pais. Durante a o período que estiver participando desse estudo você poderá sentir um pouco de dor, mas logo passa e depois poderá ter alguma dor no local ou poderá ficar roxa. Mas se você quiser parar,

é só pedir. Se durante essa pesquisa você sentir algum mal estar, nós te ajudaremos o mais rápido possível. Qualquer dúvida que você tiver, pode me perguntar quando quiser.

Eu, _____ aceito participar da pesquisa. Entendi que posso desistir de participar a qualquer momento e que isto não terá nenhum problema. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis.

Goiânia, ____, de _____, de 201__.

Assinatura do responsável

___/___/___
Data

Assinatura do pesquisador

___/___/___
Data

Anexo IV

TERMO DE ASSENTIMENTO

Grupo 2 (8 a 10 anos)

Você está sendo convidado (a) para participar da Pesquisa sob o título “**Determinação do espectro e taxa de mutações germinativas decorrentes da exposição parental à radiação ionizante do Césio-137**”. Seu responsável permitiu que você participe. Você não precisa participar da pesquisa se não quiser e não terá nenhum problema se desistir. Em caso de dúvida, você poderá entrar em contato comigo, pesquisador (a) responsável Aparecido Divino da Cruz, nos telefones: (62) 3046-1443/(62) 3946-1385 ou e-mail acruz@pucgoias.edu.br.

Queremos te chamar para participar do meu estudo, mas primeiramente quero te contar sobre um grupo de pessoas que se envolveram em um acidente com um elemento muito perigoso em Goiânia há muitos anos atrás, antes mesmo de você nascer e com esse estudo queremos contar com sua ajuda para avaliar a saúde das pessoas que sofreram esse acidente, você deve estar se perguntando por que poderia se encaixar nessa história. É pelo fato de alguns dos seus pais terem participado desse acidente de alguma forma. Se você quiser participar, iremos coletar seu sangue e realizaremos uma análise genética utilizando uma nova tecnologia. Os riscos que você terá ao participar do estudo são um pouco de dor no local ou poderá ficar roxo, mas se você quiser parar, é só pedir. Caso aconteça algo de errado, você receberá assistência total e sem custo. Este estudo tem como benefício acompanhar a saúde genética das pessoas expostas acidentalmente à baixas doses de RI de césio-137. Os resultados da pesquisa serão divulgados, mas não daremos o seu nome aos outros. Qualquer dúvida que você tiver, pode me perguntar quando quiser.

Eu, _____ aceito participar da pesquisa. Entendi que posso desistir de participar a qualquer momento e que isto não terá nenhum problema. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis.

Goiânia, ____, de _____, de 201__.

Assinatura do menor participante

___/___/___
Data

Assinatura do pesquisador

___/___/___
Data

Anexo V

TERMO DE ASSENTIMENTO

Grupo 3 (11 a 14 anos)

Você está sendo convidado (a) para participar da Pesquisa sob o título “**Determinação do espectro e taxa de mutações germinativas decorrentes da exposição parental à radiação ionizante do Césio-137**”. Seu responsável permitiu que você participe. Você não precisa participar da pesquisa se não quiser e não terá nenhum problema se desistir. Em caso de dúvida, você poderá entrar em contato comigo, pesquisador (a) responsável Aparecido Divino da Cruz, nos telefones: (62) 3046-1443/(62) 3946-1385 ou e-mail acruz@pucgoias.edu.br.

Esta pesquisa tem como objetivo avaliar um grupo de pessoas que se envolveram em um acidente com um elemento radioativo muito perigoso em Goiânia há muitos anos atrás, que ficou conhecido como o maior acidente desse nível fora de uma usina nuclear. Esse acidente ocorreu antes de você nascer, e com essa história queremos contar com sua ajuda para avaliar a saúde das pessoas que sofreram esse acidente. Você deve estar se perguntando por que poderia se encaixar nessa história. É pelo fato de algum dos seus pais terem participado desse acidente de alguma forma. Se você quiser participar, iremos coletar seu sangue e realizaremos uma análise genética utilizando uma nova tecnologia. Os riscos que você terá ao participar do estudo são um pouco de dor no local ou poderá ficar roxo, mas se você quiser parar, é só pedir. Caso aconteça algo de errado, você receberá assistência total e sem custo. Este estudo tem como benefício acompanhar a saúde genética das pessoas expostas acidentalmente à baixas doses de RI de césio-137. Os resultados da pesquisa serão divulgados, mas não daremos o seu nome aos outros. Qualquer dúvida que você tiver, pode me perguntar quando quiser.

Eu, _____ aceito participar da pesquisa. Entendi que posso desistir de participar a qualquer momento e que isto não terá nenhum problema. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis.

Goiânia, ____, de _____, de 201_.

Assinatura do menor participante

___/___/___
Data

Assinatura do pesquisador

___/___/___
Data

Anexo VI

TERMO DE ASSENTIMENTO

Grupo 4 (15 a 18 anos incompleto)

Você está sendo convidado (a) para participar da Pesquisa sob o título “**Determinação do espectro e taxa de mutações germinativas decorrentes da exposição parental à radiação ionizante do Césio-137**”. Seu responsável permitiu que você participe. Você não precisa participar da pesquisa se não quiser e não terá nenhum problema se desistir. Em caso de dúvida, você poderá entrar em contato comigo, pesquisador (a) responsável Aparecido Divino da Cruz, nos telefones: (62) 3046-1443/(62) 3946-1385 ou e-mail acruz@pucgoias.edu.br.

Esta pesquisa tem como objetivo avaliar os indivíduos expostos a doses baixas de radiação ionizante de césio-137 que se envolveram no acidente radiológico em Goiânia no ano de 1987. Se você quiser participar, iremos coletar seu sangue e realizaremos uma análise genética utilizando uma nova tecnologia. Os riscos que você terá ao participar do estudo são um pouco de dor no local ou poderá ficar roxo, mas se você quiser parar, é só pedir. Caso aconteça algo de errado, você receberá assistência total e sem custo. Este estudo tem como benefício acompanhar a saúde genética das pessoas expostas acidentalmente à baixas doses de RI de césio-137. Os resultados da pesquisa serão divulgados, mas não daremos o seu nome aos outros. Qualquer dúvida que você tiver, pode me perguntar quando quiser.

Eu, _____ aceito participar da pesquisa. Entendi que posso desistir de participar a qualquer momento e que isto não terá nenhum problema. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis.

Goiânia, ____, de _____, de 201__.

Assinatura do menor participante

___/___/___
Data

___/___/___

Assinatura do pesquisador

Data

Anexo VII

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3. No caso de Biobanco:

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

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

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

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

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

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

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

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

I - necessidade de novo consentimento a cada pesquisa; e

II - dispensa de novo consentimento a cada pesquisa.

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

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

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

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

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

6. O consentimento livre e esclarecido referente à coleta, depósito, armazenamento, utilização e descarte de material biológico humano em Biorrepositório é formalizado

por meio de TCLE específico para cada pesquisa, conforme preconizado nas resoluções do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

I - O pesquisador e instituição brasileiros devem ter direito ao acesso e à utilização, em pesquisas futuras, do material biológico humano armazenado no exterior, não

necessariamente das amostras por ele depositadas pelo pesquisador, garantida, no mínimo, a proporcionalidade da participação.

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

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

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

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

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

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

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

a) justificativa para utilização do material;

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

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

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

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

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

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

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

ALEXANDRE ROCHA SANTOS PADILHA
Presidente do Conselho Nacional de Saúde

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

ALEXANDRE ROCHA SANTOS PADILHA
Ministro de Estado da Saúde

ANEXO VIII

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO/PURIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE 50 – 300 μ L DE SANGUE TOTAL – Illustra™ GE Healthcare:

*** PROCEDIMENTO:**

1. Pipetar 20 μ L de PROTEINASE K no fundo de um tubo de microcentrífuga (eppendorf) de 1,5 mL;

2. Adicionar até 300 μ L de sangue total ao eppendorf (ideal 200 μ L);

Este protocolo é adequado para 50 – 300 μ L de sangue total, tampão leucocitário e células da medula óssea. A performance ótima é obtida com 200 μ L de sangue total. Quando o volume for menos do que 200 μ L, fazer o volume da amostra ficar até 200 μ L com PBS.

3. Adicionar 400 μ L de Tampão de Lise tipo 10 ao tubo com amostra. Misturar bem no vórtex por 15 segundos.

Para assegurar eficiente lise, é essencial que a amostra e o tampão AL sejam misturados completamente para produzir uma solução homogênea.

4. Incubar à temperatura ambiente por 10 minutos com intermitentes misturas no vórtex para auxiliar a lise.

No final deste estágio a cor da reação terá mudado de vermelho para marrom escuro.

5. Pré-aquecer o Tampão de Eluição tipo 5 no banho-maria à 70 °C.

6. Centrifugar brevemente o eppendorf de 1,5 mL para remover gotas de dentro da tampa.

7. Aplicar, cuidadosamente, a amostra no centro da mini coluna com um tubo coletor fornecido, usando uma pipeta, sem molhar a borda. Feche a tampa da coluna e centrifugar por 1 minuto à 12.000 rpm. Descartar o tubo contendo o filtrado e colocar a mini coluna em um tubo coletor de 2 mL limpo (fornecido).

8. Cuidadosamente abra a mini coluna e adicione 500 µL de Tampão de Lise tipo 10 à coluna. Centrifugar por 1 minuto à 12.000 rpm. Descartar o tubo contendo o filtrado e colocar a mini coluna em um tubo coletor de 2 mL limpo (fornecido).

Este passo assegura a completa lise das células e desnatura qualquer resíduo de proteína.

9. Cuidadosamente abra a mini coluna e adicione 500 µL de Tampão de Lavagem tipo 6 à coluna. Centrifugar por 3 minutos à 12.000 rpm. Descartar o tubo coletor contendo o filtrado. Colocar a mini coluna em outro tubo coletor (não fornecido) e centrifugar novamente por 1 minuto à 12.000 rpm.

Se qualquer solução de lavagem vem a ter contato com a coluna, re-centrifugar por 1 minuto. A presença de etanol no DNA genômico eluído pode afetar muitas aplicações. O DNA genômico preso à matrix de sílica está altamente purificado e pronto para a eluição.

10. Colocar a mini coluna em um eppendorf de 1,5 mL (não fornecido). Cuidadosamente abra a mini coluna e adicione 200 µL de Tampão de Eluição tipo 5, pré-aquecido, diretamente no centro da coluna.

Pré-aquecer o Tampão de Eluição tipo 5 à 70 °C ante do uso. O volume atual recuperado será de 80 – 100 % do volume do tampão aplicado na coluna. Mude de ponteira entre as amostras, para reduzir a variação de volume das amostras eluídas.

11. Incubar a coluna por 1 minuto à temperatura ambiente.

Não incubar muito mais do que 1 minuto, para obter um DNA genômico de boa qualidade.

12. Centrifugar por 1 minuto à 12.000 rpm para recuperar o DNA genômico. Armazenar o DNA genômico purificado à – 20 °C.

Anexo IX

Construção da biblioteca GBS para amostras de humanos otimizado a partir do protocolo sugerido por Elshire et al. (2011).

Para dar início à construção da biblioteca GBS são necessários 100ng de um DNA de alta qualidade proveniente das amostras. Desse modo, para avaliar a sua qualidade, o DNA recebido foi quantificado e teve sua relação de absorvância 260/280nm definida em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) (Tabela 1). Como o DNA de baixa qualidade não digere completamente, a amostra de DNA ideal é aquela que apresenta valores superiores a 1,6 na relação de absorvância 260/280nm. Amostras consideradas de boa qualidade, livres de contaminação por proteína, geralmente apresentam valores entre 1,7 a 1,9 na relação.

Em seguida, a integridade do DNA foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5% (Figura 1) e sua concentração foi estimada no fluorímetro Qubit (Invitrogen). As amostras foram então normalizadas à uma concentração de 5ng/μL.

Tabela 1. Relação das amostras de humanos que farão parte da biblioteca GBS, suas concentrações e razões de absorvância 260/280nm, estimadas em espectrofotômetro NanoDrop, e concentrações estimadas por meio do fluorímetro Qubit.

ID	Amostra	Nanodrop		
		(ng/μL)	A260/A280	Qubit (ng/μL)
1	PCG02 F07-1MFN	32,1	1,69	22,1
2	09/02 MRS	37,2	1,72	27,2
3	09/04ERSF	28,4	1,66	18,4
4	PCGO3 F06-1 PMSP	44	1,85	34
5	PCG03 F06-2 TSPS	33,9	1,87	23,9
6	PCG03 F06-3 FSPS	52,6	1,85	42,6
7	22/04 ISPS	38,8	1,83	28,8
8	22/05 CAPS	26,7	1,8	16,7
9	12/01 SNF	32,8	1,82	22,8
10	12/02 YNB	24,3	1,73	14,3
11	12/03 ASB	21,1	1,7	11,1

12	15/01 MAR	31,7	1,69	21,7
13	15/02 IPR	29,9	1,45	19,9
14	15/03 MRP	15,2	1,8	5,2
15	21/01	15,3	1,64	5,3
16	21/02	35,8	1,81	25,8
17	21/03	33,3	1,83	23,3
18	ACGH 001 – 1F	37,9	1,79	27,9
19	ACGH 001 – 2M	27,3	1,86	17,3
20	ACGH001 – 3P	26,5	1,68	16,5
21	ACGH 005 – 1F	56,7	1,77	46,3
22	ACGH 005 – 2M	89,3	1,86	79,8
23	ACGH 005 – 3P	46,4	1,78	36,8
24	CMA 008 – 1F	86,4	1,85	76,9
25	CMA 008 – 2M	46,9	1,68	36,4
26	CMA 008 – 3P	49,5	1,76	39,2
27	CMA016 – 1F	35,4	1,71	25,3
28	CMA016 – 2M	36,6	1,83	26,4
29	CMA 016 – 3P	43,1	1,70	33,7
30	CMA025	45,1	1,72	35,1
31	CMA025 – 2M	61,3	1,79	51,8
32	CMA 025 – 3P	67,1	1,81	57,5

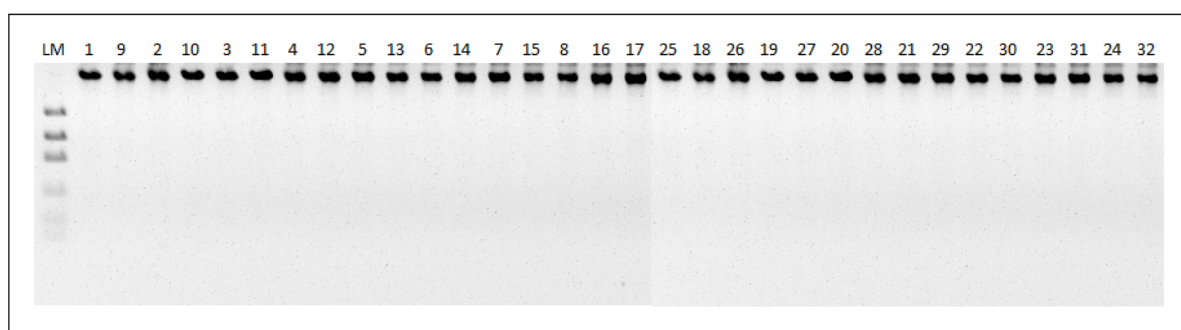


Figura 1. DNA genômico das amostras de humanos utilizadas para a construção da biblioteca GBS. A numeração dos canaletas corresponde à coluna "ID" da Tabela 1 apresentada acima. LM = Padrão de peso molecular *Low Mass Ladder* (Invitrogen). A primeira banda do

marcador representa o fragmento de 2.000 pb, com a concentração conhecida de 100ng

Digestão

Para a redução da complexidade do genoma de cada amostra (digestão) foi utilizada a enzima de restrição *PstI*. Antes que todas as amostras fossem digeridas, a ação da enzima foi testada em duas únicas amostras (otimização) com resultados satisfatórios. Concluída a etapa de digestão, 3µL dos produtos foram aplicados no gel de agarose 1,5% para verificar o seu sucesso (Figura 2). Os resultados obtidos mostram que o corte com a enzima *PstI* apresentou uma digestão satisfatória, em que é visualizado um rastro homogêneo referente aos diversos fragmentos de DNA gerados. As amostras digeridas foram então liofilizadas a vácuo, para posterior ligação dos adaptadores *barcodes* e dos adaptadores comuns aos fragmentos de DNA.

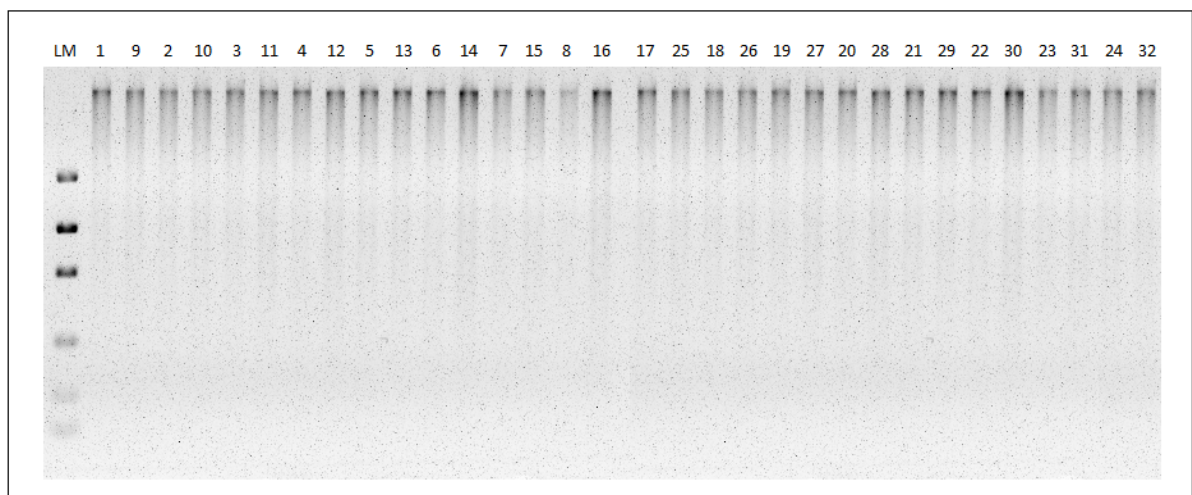


Figura 2. Digestão do DNA genômico das 32 amostras de humanos com a enzima *PstI*. A numeração dos canaletas corresponde à coluna "ID" da Tabela 1 apresentada acima. LM = Padrão de peso molecular *Low Mass Ladder* (Invitrogen). A primeira banda do marcador representa o fragmento de 2.000 pb, com a concentração conhecida de 100ng.

Ligação de adaptadores

Uma vez digerida, cada amostra de DNA a ser sequenciada recebeu um adaptador com seqüências indexadoras (*barcodes*), o que permitirá mais tarde, rastrear as seqüências geradas para cada uma delas. À essas seqüências *barcodes* são ligados adaptadores *barcodes*, e às

extremidades de corte específicas da enzima de restrição utilizada é ligado um segundo adaptador com uma sequência comum, utilizado como iniciador.

A concentração dos adaptadores nas amostras de DNA é crítica para o sucesso do método. A escassez de adaptadores leva a formação de quimeras entre as moléculas de DNA, enquanto que a abundância resulta na formação excessiva de dímeros. Testes foram realizados com quantidades decrescentes dos adaptadores até resultar em um fragmento do tamanho esperado (200-450pb) e ausência de dímeros de adaptadores. A preparação dos adaptadores e os testes para avaliação da concentração necessária foram realizados de acordo com o [suporte S1](#) publicado por Elshire et al. (2011). Na Tabela 3 estão descritos os adaptadores *barcodes* referentes a cada amostra.

Tabela 2. Amostras de humanos, seus adaptadores *barcode* e respectivas sequências.

ID	Amostra	Barcode	Sequência
1	PCG02 F07-1MFN	PstI_B09	AACCA
2	09/02 MRS	PstI_B10	CCACG
3	09/04ERSF	PstI_B11	TATAA
4	PCGO3 F06-1 PMSP	PstI_B12	GAGCG
5	PCG03 F06-2 TSPS	PstI_B13	ACATA
6	PCG03 F06-3 FSPS	PstI_B14	CTCAG
7	22/04 ISPS	PstI_B15	TCTGG
8	22/05 CAPS	PstI_B16	CGGCA
9	12/01 SNF	PstI_B17	GAAGA
10	12/02 YNB	PstI_B18	ACGAG
11	12/03 ASB	PstI_B19	TTCTA
12	15/01 MAR	PstI_B20	AGTCG
13	15/02 IPR	PstI_B21	GCCAA
14	15/03 MRP	PstI_B22	TAATG

15	21/01	PstI_B23	GTTCA
16	21/02	PstI_B24	GGCGG
17	21/03	PstI_B25	CAGAT
18	ACGH 001 – 1F	PstI_B26	ACTGCA
19	ACGH 001 – 2M	PstI_B27	CTGCCA
20	ACGH001 – 3P	PstI_B28	TGATCA
21	ACGH 005 – 1F	PstI_B29	AAGTCA
22	ACGH 005 – 2M	PstI_B30	CGTACA
23	ACGH 005 – 3P	PstI_B31	TTCGCA
24	CMA 008 – 1F	PstI_B32	GTAACA
25	CMA 008 – 2M	PstI_B33	GATCCA
26	CMA 008 – 3P	PstI_B34	ACATCG
27	CMA016 – 1F	PstI_B35	TCGCAA
28	CMA016 – 2M	PstI_B36	CGCTGA
29	CMA 016 – 3P	PstI_B37	AACGTG
30	CMA025	PstI_B38	CCTAAG
31	CMA025 – 2M	PstI_B39	TTACGA
32	CMA 025 – 3P	PstI_B40	ATGGCG

Amplificação

Após a ligação dos adaptadores *barcodes*, cada indivíduo poderá ser diferenciado. Assim, foi feito um *pool* com 5µL de cada amostra. Em seguida 30µL do *pool* foram purificados com *beads* magnéticas (*Agencourt AMPure XP – BECKMAN COULTER*). Os fragmentos de restrição gerados foram amplificados com cada um dos seguintes iniciadores:

(A)

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCG
ATCT

(B)

5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGGTCTCGGCATTCCTGCTGAACCGCTCTT
CCGATCT

Estes *primers* contêm sequências complementares para amplificar os fragmentos de restrição

com os adaptadores ligados, além de sítios de ligação do oligonucleotídeo na *flowcell* Illumina. As reações foram feitas com uma amostra de água para monitorar possível contaminação e um controle positivo (Figura 3). Após a amplificação, o produto de PCR foi novamente purificado com *beads* magnéticas (*Agencourt AMPure XP – BECKMAN CULLTER*) e o produto purificado foi visualizado em gel de agarose 1,5% (Figura 4). Nessa etapa, a biblioteca deve conter fragmentos entre 200-450 pares de bases.

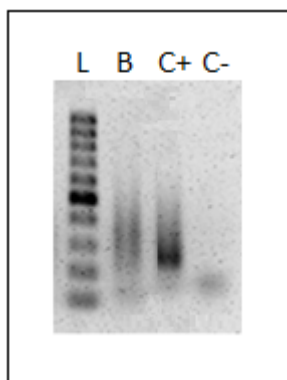


Figura 3. Biblioteca GBS de humanos (N=32). L = Padrão de peso molecular *100pb Ladder* (Invitrogen); B = produto de PCR; C+ = controle positivo da reação de PCR; C- = controle negativo

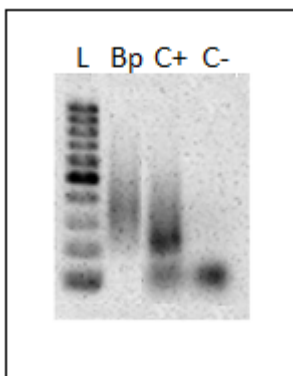


Figura 4. Biblioteca GBS de humanos (N=32) após purificação com *beads* magnéticas. L = Padrão de peso molecular *100pb Ladder* (Invitrogen); Bp = produto de PCR purificado com *beads* magnéticas; C+ = controle positivo da reação de PCR, sem purificação; C- = controle negativo

Validação

A qualidade de uma biblioteca GBS é avaliada no equipamento BioAnalyzer Agilent 2100, utilizando-se o kit *High Sensitivity DNA*. Em uma biblioteca de boa qualidade é esperada a ausência de dímeros de *primers* e excesso de adaptadores (picos entre 100 e 150pb), e a maior parte dos fragmentos de interesse estão entre 200pb e 450pb. A Figura 5 indica os resultados do BioAnalyzer Agilent 2100 para a bibliotecas GBS construída com amostras de humanos.

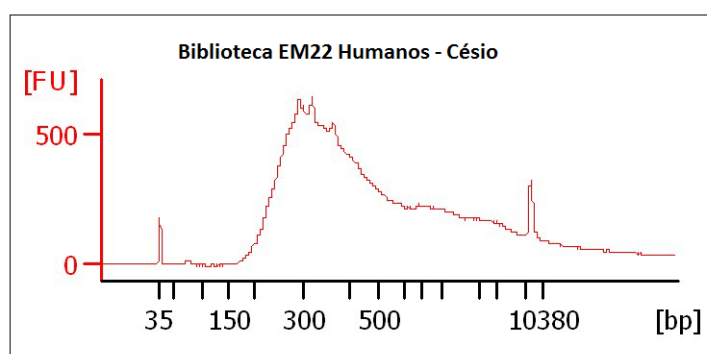


Figura 5. Eletroferograma gerado pelo BioAnalyzer Agilent 2100 para a biblioteca GBS de humanos. Os picos de 35 e 10.380pb correspondem ao padrão de peso molecular do kit *High Sensitivity DNA*.

Quantificação

Antes do sequenciamento a biblioteca foi quantificada por meio de uma PCR em tempo real com o *KAPA Biosystems Quantification Kit* (Illumina) (Tabela 3). A amostra foi então diluída para 17pM e enviada para o centro de genômica da ESALQ/USP para ser sequenciada na plataforma HiSeq 2500 Illumina (Illumina, Inc., San Diego, CA), modo *high output single-end* (kit HiSeq v4, 100 ciclos).

Tabela 3. Quantificação da biblioteca GBS de humanos com o *KAPA Biosystems Quantification Kit*.

Pesquisador	Amostra	Diluição	Ct	[] pM qPCR	10X nM	[] estoque	Tamanh o
EcoMol_Humanos	EM22	1_20000 0	12,21	1,3193	13,19	131,93	290

ANEXO X

Dados descritivos dos grupos caso e controle para as gerações parental e F1 incluídos no estudo sobre a indução de mutação germinativa na prole de indivíduos expostos acidentalmente a altas e baixas doses de radiação ionizante de césio-137.

Família	Idade à concepção (anos)		Idade (anos)	Sexo	DM				
	Paterna	Materna	F1	F1	Paterna	Materna	Desconhecido	Pat ou Mat	Total
T1	40	36	9	Feminino	989	1051	1	84	2125
T2	22	21	9	Masculino	844	966	1	101	1912
T3	26	26	25	Feminino	878	1061	3	82	2024
T4	42	42	5	Feminino	994	986	1	77	2058
T5	47	36	9	Masculino	794	938	0	113	1895
T6	36 ^x	33 ^x	27	Masculino	5666	2654	7	1141	9468
T7	25 ^x	28 ^x	30	Feminino	955	811	1	68	1835
T8	28	27 ^x	14	Masculino	1126	1043	0	91	2260
T9	33	32 ^x	9	Masculino	888	885	1	87	1861
T10	32	35 ^x	27	Feminino	937	1233	1	60	2231
T11	30	33 ^x	29	Feminino	931	1195	1	89	2216
T12	33	36 ^x	26	Masculino	880	1133	1	57	2071
T13	18 ^x	27	26	Masculino	962	1114	1	125	2202

T14	38	27 ^x	20	Feminino	1013	903	0	88	2004
T15	18	20 ^x	8	Masculino	1025	741	0	63	1829
T16	21	24 ^x	2	Feminino	1140	988	1	89	2218
T17	47 ^x	30	18	Masculino	901	878	0	90	1869
T18	21 ^x	19	12	Feminino	946	1074	0	103	2123
T19	18 ^x	16	15	Feminino	731	1022	1	45	1799

Individuo Exposto: ^x

ANEXO XI

Artigo “Como a genética contribuiu para compreender os efeitos biológicos da exposição humana à radiação ionizante de césio-137?” publicado na revista Genética na Escola.

Como a genética contribuiu para compreender os efeitos biológicos da exposição humana à radiação ionizante de Césio-137?



**Lorrayne Guimarães Oliveira³, Samara Socorro Silva Pereira³,
Elza Maria Gonçalves Santos Uchoa³, Daniela de Melo e Silva³,
Emília Oliveira Alves Costa¹, Thaís Cidália Vieira Gigonza^{2,3},
Cláudio Carlos da Silva^{1,2,4}, Aparecido Divino da Cruz^{1,2,3}**

¹Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Escola de Ciências Médicas e da Vida, Programa de Mestrado em Genética, Grupo de Pesquisa Replicon, Goiânia, GO

²Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular, Secretaria Estadual de Saúde de Goiás

³Universidade Federal de Goiás, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Campus Samambaia, Goiânia, GO

⁴Universidade Estadual de Goiás, Unidade de Goiânia, Goiânia, GO

Autor para correspondência –acruz@pucgoias.edu.br

Palavras-chave: césio-137, radiação, mutação

Há 34 anos ocorreu em Goiânia, Goiás (Brasil), o maior acidente radiológico em área urbana, tendo como consequência a exposição humana, animal, vegetal e ambiental pelo Césio-137. As vítimas do acidente manifestaram contaminação externa e/ou interna a radiações ionizantes para doses que variaram até 7 Gy e se viu a necessidade do acompanhamento da saúde genética dessas pessoas. Tecidos biológicos são extremamente vulneráveis à radiação ionizante que pode causar acúmulo gradual de danos no DNA, por exemplo. As exposições a baixas doses, por sua vez, causam uma **instabilidade genômica** progressiva. Melhorias nas tecnologias de análise genômica proporcionaram a chance de investigar, com alto nível de precisão, diversos tipos de biomarcadores, possibilitando uma estimativa real do risco genético de populações exposta à RI.

Histórico do acidente em Goiânia com Césio-137

Em 13 de setembro de 1987, em Goiânia, capital do Estado de Goiás, foi encontrada uma cápsula de chumbo de um equipamento de teleterapia descartada pelo Instituto Goiano de **Radioterapia** (IGR), num local abandonado e parcialmente demolido sem qualquer advertência ou avisos sobre os riscos associados ao equipamento.

Dois sucateiros, que passavam pelo local abandonado e vendo aquele monte de ferro e chumbo desprezados, presumiram que o material poderia ter algum valor como sucata. Removeram os destroços do local, levaram para casa e, posteriormente, para um ferro velho para serem comercializados (Figura 1).

O cabeçote de chumbo era a blindagem para 19,26 g de cloreto de césio-137, um sal radioativo comumente usado para o tratamento do câncer. A blindagem foi rompida e a fonte radioativa do equipamento liberada. Subsequentemente, as partes foram levadas ao ferro velho. A ruptura da fonte permitiu acesso ao cloreto de césio que era altamente solúvel e prontamente dispersável no meio ambiente. Ao se deparar com aquele sal, o dono do ferro velho, sem entender o que de

fato era aquilo, notou que, no escuro, o pó que saía da cápsula emitia uma luz azul refulgente (Figura 1B). Fascinado com aquela descoberta, mostrou o material radioativo para amigos, vizinhos e familiares (Figura 1C).

Com isso, o césio-137 radioativo, liberado da cápsula, passou a circular na região central de Goiânia, contaminando pessoas e ambientes por onde espalhou. O irmão do dono do ferro-velho, ao visitá-lo levou um pouco da substância para casa, pois também ficou intrigado com aquele fenômeno. Chegando em casa, mostrou para os filhos, incluindo a filha de 7 anos, que ficou deslumbrada com aquele pó e brincou durante horas com ele. Durante o jantar, ela ingeriu os alimentos com as mãos contaminadas com o sal radioativo (Figura 1D).

Após alguns dias, diversas pessoas exibiram sintomas gastrointestinais resultantes da exposição à radiação, como náuseas, vômitos e diarreia. Uma das vítimas pressupôs que os sintomas eram em virtude do pó e, com a ajuda de um funcionário do ferro velho, levou a cápsula de Césio-137 de ônibus à Vigilância Sanitária de Goiânia que, em menos de 24 horas, identificou a substância como radioativa (Figura 1E).

A Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), policiais e bombeiros militares foram acionados no dia 29 de setembro, dando início à descontaminação da região

Instabilidade genômica - Nome dado à ocorrência de efeitos numa célula irradiada e em suas descendentes. Mesmo após várias gerações da célula parental irradiada, a instabilidade pode ser observada.

Radioterapia - especialidade médica na qual se utilizam radiações ionizantes para tratamento oncológico. A radiação é emitida por um aparelho, que fica distante do paciente, apontado para o local a ser tratado.

e a mitigação dos riscos para a população local. Mais de 112,8 mil pessoas foram monitoradas, 249 pessoas estavam contaminadas, entre estas, 120 possuíam roupas e sapatos contaminados e 129 manifestaram contaminação externa e /ou interna com o radionuclídeo (Figura 1F). Dezenas de pessoas apresentaram a síndrome aguda da radiação e, dentre elas, uma passou por

cirurgia de amputação do antebraço e 4 pessoas foram a óbito na fase aguda do acidente. Atualmente, os rejeitos radioativos provenientes do acidente radiológico com césio-137 estão depositados em um repositório permanente em Abadia de Goiás, em uma Unidade de Conservação Ambiental de 160 hectares, sob vigilância e monitoramento constante da CNEN.



Figura 1. Linha do tempo dos eventos do acidente com Césio-137 em Goiânia (Goiás – Brasil). **A:** Dois sucateiros tiraram a cápsula dos escombros para vendê-la. **B:** O dono do ferro velho, que comprou a cápsula, percebeu que, no escuro, o pó possuía um brilho azul. **C:** O dono do ferro velho mostrou a cápsula aos vizinhos e amigos. **D:** A sobrinha do dono do ferro velho ingeriu um ovo com as mãos sujas de Césio-137. **E:** Duas vítimas levaram a cápsula para a Vigilância Sanitária de ônibus. **F:** Monitoramento da exposição da população à radiação ionizante.

Em 1988, a partir da necessidade de acompanhamento da população exposta ao Césio-137, o governo de Goiás instituiu a Fundação Leide das Neves Ferreira, nome de uma das vítimas fatais do acidente. As competências dessa fundação foram transferidas em 1999 para a Secretaria Estadual da Saúde de Goiás que, atualmente, conta com o Centro de Assistência aos Radioacidentados (C.A.R.A). O C.A.R.A possui atribuições de atendimento médico, odontológico, psicológico, assistência farmacêutica e social e monitoramento biológico mediante pesquisas científicas para a avaliação da saúde genética da população exposta e seus familiares.

Neste artigo, reunimos dados sobre o monitoramento da saúde genética dos indivíduos expostos acidentalmente e ocupacionalmente à radiação ionizante de césio-137, realizado pelo Núcleo de Pesquisa Replicon da PUC Goiás, em parceria do Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular que faz parte do Laboratório Central da Secretaria de Saúde do Estado de Goiás (LaGene/LACEN/SES-GO), durante as três décadas de acompanhamento da saúde genética da população goiana exposta à radiação ionizante.



Afinal, por que o Césio-137 é radioativo?

O Césio-137 foi descoberto em 1860 por Robert Wilhelm Bunsen e Gustave Robert Kirchhoff na água mineral de Durkheim, na Alemanha, por espectroscopia de emissão da luz azul, de onde deriva seu nome em latim, *caesium*, céu azul. O césio possui 31 isótopos, dentre eles, apenas o isótopo 133 é estável e naturalmente presente em dois minérios, polucita e rodozita. Todos os outros isótopos são radioativos e denominados radionuclídeos ou radioisótopos.

Um radionuclídeo é um átomo energeticamente instável, que possui núcleos atômicos com o mesmo número de prótons, mas diferentes números de nêutrons. Portanto, ao estabilizar o núcleo, emite radiação ionizante. Este fenômeno é conhecido com decaimento. No caso do Césio-137, o decaimento ocorre pela liberação de partículas β , que são elétrons de alta energia (pósitrons), e fica com excesso de prótons, transformando-se em bário radioativo e que, por emissão de radiação gama, é uma onda eletromagnética formada por fótons altamente energéticos. Assim, o Césio-137 decai para o um estado estável de bário (Ba-137) (Figura 2). A radiação ionizante emitida pelo césio-137 é utilizada para fins médicos em radioterapia e braquiterapia para o tratamento de tumores malignos responsivos à radioterapia.

Braquiterapia - Tratamento oncológico através do qual a radiação será emitida de uma fonte de dentro do corpo do paciente, em contato com o local a ser tratado.

Tumores malignos - São células replicadas de maneira desordenada e descontrolada, formando os tumores que, geralmente, desenvolvem-se rapidamente e podem proliferar pelo corpo, invadindo tecidos vizinhos.

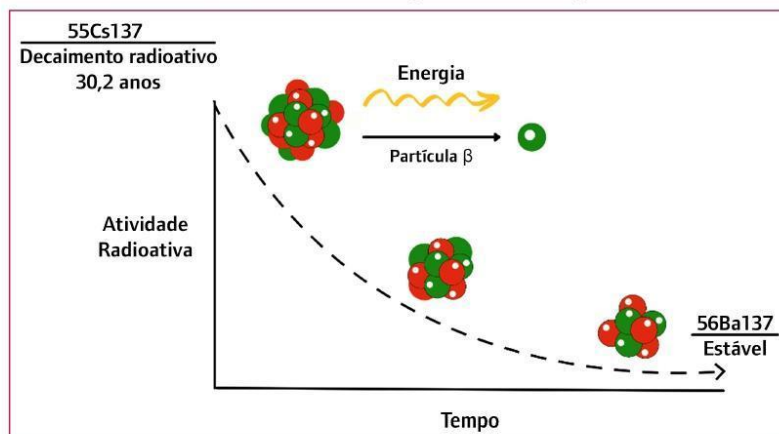


Figura 2. Decaimento radioativo do Césio-137. A meia vida deste radioisótopo é de 30,2, que é o intervalo de tempo necessário para que o número inicial de núcleos seja reduzido à metade do valor inicial. O decaimento radioativo do césio-137 ocorre pela diminuição gradual de massa e atividade e se torna um elemento estável quando decai para Ba-137.

O que é radiação e quais as consequências no organismo exposto?

As radiações ionizantes existem no planeta Terra desde a sua origem, sendo, portanto, um fenômeno natural. No final do século XIX, com a aplicação das radiações ionizantes em benefício da humanidade, os efeitos para a saúde humana tornaram-se evidentes. A radiação tem aplicação ampla na medicina do diagnóstico para o tratamento de doenças, na indústria e para fins bélicos. Diversos equipamentos médicos empregam radionuclídeos para variadas utilidades como radiografia, mamografia, tomografia computadorizada, entre outras. Devido às diversas aplicabilidades da radiação, a população fica sujeita a riscos de exposição acidental, ambiental e ocupacional.

A radiação é uma forma de energia que se propaga em **ondas eletromagnéticas e/ou partículas**. Quando a energia radioativa atinge as células ou os tecidos, inicia-se uma série de processos que ocorrem em nanossegundos. O primeiro evento é a interação entre radiação e células. Quando há colisão da energia radioativa sobre átomos nas células viáveis, ocorre a **ejeção dos elétrons**. Este fenômeno é chamado de ionização e, a radiação que o provoca, de radiação ionizante.

Nos seres humanos, a exposição aguda ao **césio-137** conduz, na maioria dos casos, à **aplasia** da medula óssea caracterizada por uma diminuição de células brancas do sangue e deficiência imune, como foi relatado no acidente em Goiânia. A exposição a doses elevadas de **césio-137** é caracterizada pela indução da **síndrome de mielossupressão** observada após irradiação aguda com radiação ionizante.

A exposição à radiação ionizante pode causar reações teciduais que resultam em morte ou dano celular, conhecido como efeito determinístico. Nesse contexto, quanto maior a dose, mais severo o efeito (Figura 2). Um exemplo de efeito determinístico é a **radiolesão** da pele, que podem variar de um leve avermelhamento no local irradiado até a formação de grandes bolhas e necrose. Outros efeitos determinísticos observáveis incluem o aparecimento de catarata, doenças vasculares cardíacas e cerebrais. Por outro lado, existem efeitos que podem surgir sem que uma dose limite de radiação tenha sido ultrapassada, sendo conhecidos como efeitos estocásticos (Figura 3). Os efeitos estocásticos são tardios e sua ocorrência é probabilística. Dentre os diversos efeitos estocásticos decorrentes de exposição à radiação, encontram-se o desenvolvimento de células tumorais, o envelhecimento precoce, a diminuição da longevidade, as mutações gênicas e as alterações cromossômicas.

Ondas eletromagnéticas e/ou partículas - A forma como a radiação se propaga, seja em forma de onda, seja em forma de partícula, está relacionada à forma como ela é observada. As ondas de radiação eletromagnética são uma oscilação de campo magnético com campo elétrico que se propagam no vácuo transportando energia como acontece com as ondas eletromagnéticas, raios-x e gama. As partículas são uma estrutura diminuta e atingem somente um local em um dado instante como as partículas α , β , prótons, nêutrons.

Aplasia - A aplasia é uma doença caracterizada pela alteração no funcionamento da medula óssea. A medula óssea é responsável pela produção das células do sangue e a aplasia é caracterizada como a substituição do tecido medular normal por tecido gorduroso e, portanto, leva a concentrações baixas de hemácias, plaquetas e leucócitos pela circulação sanguínea.

Ejeção de elétrons - Evento que acontece quando a ionização expulsa o elétron de um átomo ou de uma molécula, ao qual ele está ligado por força elétrica.

Síndrome de mielossupressão - É uma condição na qual a atividade da medula óssea é diminuída, resultando em menor número de glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas. A ocorrência da síndrome de mielossupressão é resultante da exposição a doses agudas de radiação ionizante.

Radiolesões - Denominação dada a qualquer tipo de lesão causada por exposição à radiação.

Um **evento mutacional** pode ocorrer em qualquer célula do organismo. Em células somáticas ocorre durante a replicação do DNA que precede uma divisão mitótica, sendo o câncer o efeito estocástico mais comumente associado à exposição individual à energia

radioativa. Na linhagem germinativa as mutações podem ocorrer durante a replicação do DNA que precede a meiose. As mutações fixadas no genoma das células germinativas podem ser transmitidas ao longo das gerações.

Evento mutacional - Processo do mecanismo molecular pelo qual uma molécula de DNA sofre alterações sequenciais de nucleotídeos.

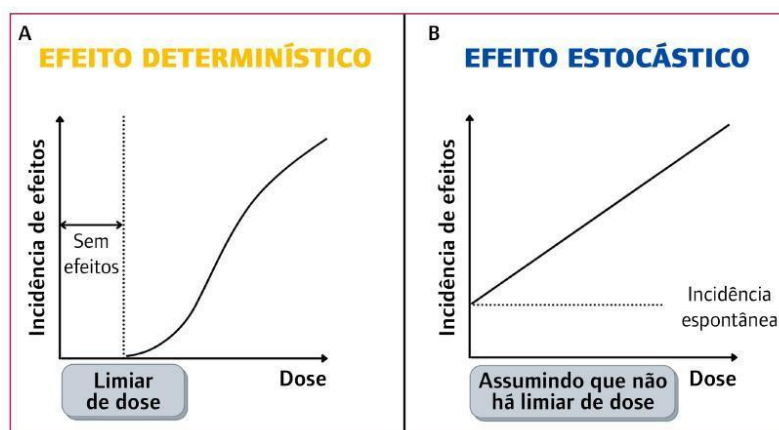


Figura 3. Dose e resposta dos efeitos determinísticos e estocásticos. **A:** Uma das características dos efeitos determinísticos é a existência da dose limite. A exposição à radiação acima desse nível é danosa para o organismo e, quanto mais alta a dose, mais severo o efeito. **B:** Não existe dose limiar para efeitos estocásticos. Nesse tipo de efeito, mesmo em doses extremamente baixas, a exposição à radiação pode causar alguns efeitos.

Como a energia radiativa pode causar dano ao DNA?

A integridade da informação genética é essencial para a manutenção da vida, por isso, algumas pessoas presumem que o DNA está isolado do ambiente celular de modo que o torna inalcançável por agentes endógenos e exógenos. Mas, o que não se deve esquecer, é que a maior biomolécula do nosso organismo, o DNA, evoluiu de modo que é possível haver interações com agentes físicos, químicos e biológicos, podendo contribuir positivamente ou negativamente para a seleção natural.

Os esforços científicos para compreender as interações que ocorrem entre a molécula de DNA e os agentes ambientais resultaram em um importante campo de estudo, denominado mutagênese. O foco da mutagênese é

compreender quais são os mecanismos moleculares envolvidos nos processos pré e pós mutacionais, sejam eles espontâneos ou induzidos e quais as **biomoléculas** envolvidas nos sistemas de reparo do DNA.

As mutações espontâneas são alterações ocasionais na sequência na molécula de DNA produzidas sem estímulo de algum agente mutagênico, indutor de mutações. As mutações espontâneas geralmente ocorrem devido a erros durante a replicação do DNA, como erro na incorporação de base e pareamento incorreto durante a replicação. As mutações induzidas são alterações na sequência do DNA que ocorrem devido à exposição do DNA a agentes mutagênicos, podendo ser físicos, químicos ou biológicos (Figura 4).

A radiação ionizante é um exemplo de agente físico com capacidade de induzir mutações no DNA. Os danos provocados pela radiação ionizante podem ser diretos, quando há depósito da energia radioativa diretamente na molécula de DNA, e/ou indiretos, quando moléculas irradiadas pro-

Biomoléculas - As biomoléculas são compostos químicos que, em geral, são compostas por carbono, além de hidrogênio, oxigênio e nitrogênio. Biomoléculas organizam-se, interagem e configuram as características fundamentais dos seres vivos.

duzem íons que atacam o DNA. O principal processo indireto de dano ao DNA pela radiação ionizante é causado pela **radiólise**, sendo a radiohidrólise o mais eficiente dos ataques nucleofísicos ao DNA. Na radiohidrólise, a energia radioativa depositada sobre moléculas de água produz espécies

reativas de oxigênio que interagem com o DNA causando lesões potencialmente mutagênicas. Os danos na molécula de DNA, induzidas pelas radiações ionizantes, podem ser lesões em um ou poucos nucleotídeos, quebras de fita simples do DNA ou de dupla fita do DNA (Figura 5).

Radiólise - É a quebra de uma ou várias ligações químicas, resultante da exposição à radiação ionizante.

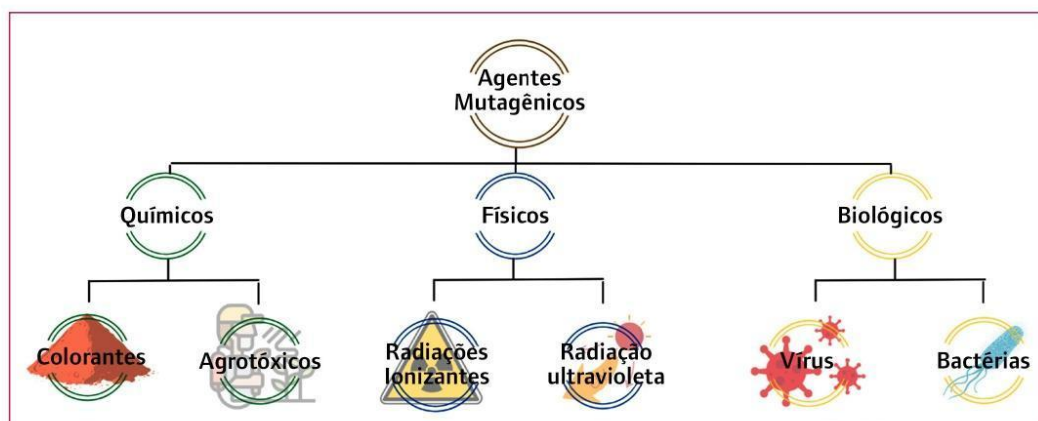


Figura 4. A natureza dos agentes mutagênicos. Os agentes mutagênicos são capazes de induzir mutação no genoma das células expostas.

O monitoramento de exposição do sistema biológico a agentes genotóxicos e mutagênicos consiste em avaliar e interpretar parâmetros biológicos e/ou ambientais com a finalidade de detectar possíveis riscos à saúde. Biomarcadores são parâmetros biológicos

quantificáveis que podem estar alterados devido à interação do sistema biológico com um agente estressor. A quantificação dos biomarcadores gera informações úteis para os estudos de biomonitoramento, proteção e mitigação de riscos.

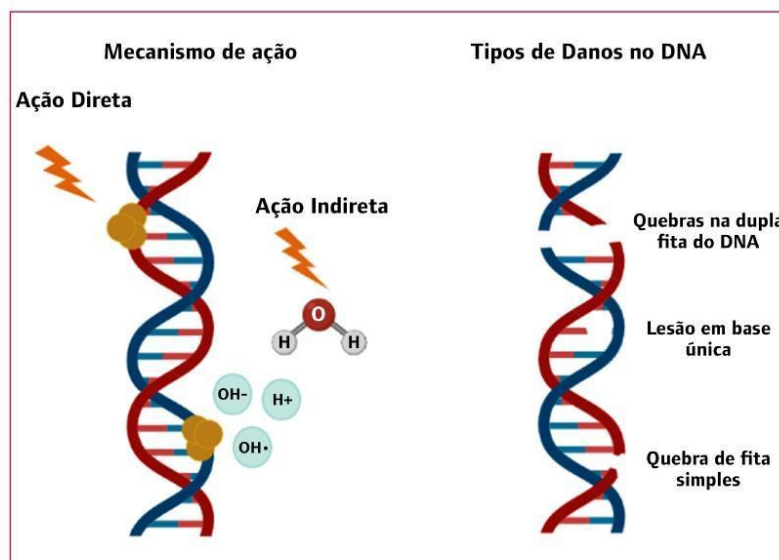


Figura 5. Representação esquemática dos efeitos diretos e indiretos da radiação no DNA e os tipos de danos que essas interações podem causar na molécula. Na ação direta, a radiação danifica o DNA sem intermediários; na ação indireta, a radiação interage com a molécula de água produzindo radiólises da água e assim danificando o DNA.

Em meados de 1970, a natureza das mutações induzidas por radiação foi amplamente inferida de relações dose-efeito com diversos biomarcadores. Os danos na molécula de DNA podem ser quantificados, sendo, portanto, um parâmetro de análise usado como biomarcadores de exposição e/ou de efeito. As lesões provocadas na molécula de DNA são usadas para investigar a genotoxicidade e a mutagenicidade da exposição. Para quantificar os danos genotóxicos, são empregadas metodologias que têm como princípio separar e observar fragmentos da molécula de DNA.

Uma metodologia frequentemente usada para a investigação da genotoxicidade é o teste cometa. O princípio do teste é a visualização direta de danos no DNA em células individuais por meio de uma **corrida eletroforética**. Esta técnica apresenta alta sensibilidade para a detecção de danos genotóxicos e possui a reprodutibilidade simples e rápida. Em

função do tratamento aplicado, durante a eletroforese, o DNA íntegro permanecerá no **nucleoide**, enquanto o DNA fragmentado migrará por força de um campo elétrico uniforme durante a eletroforese, gerando uma imagem que lembra um cometa com uma cabeça e uma cauda, daí o nome do ensaio (Figura 6).

Os biomarcadores mais frequentemente usados para investigar o dano mutagênico induzido pela exposição do DNA à radiação são as aberrações cromossômicas e os micronúcleos. A frequência de aberrações cromossômicas é o marcador de exposição de preferência desde a década de 1960. A metodologia é sensível, permitindo estimar doses absorvidas tão baixas quanto 0,1 **Gray**. Este ensaio é visto como o método mais eficaz para a **dosimetria biológica** na faixa de doses de radiação que ocorre em acidentes em massa.

Corrida eletroforética - É uma técnica que separa moléculas biológicas com base em seu tamanho, quando submetidas a um campo elétrico. Como o DNA possui carga negativa, ele migrará quando sujeito ao dipolo de um campo elétrico uniforme.

Nucleoide - O DNA geralmente é acondicionado em suborganelas chamadas nucleoides, que tornam-se visíveis quando corados com um corante que se liga ao DNA.

Gray - Grandeza física usada para avaliar a quantidade de radiação absorvida pelo tecido.

Dosimetria biológica - Técnica utilizada para determinar a dose de radiação recebida por um indivíduo através de efeitos biológicos induzidos.

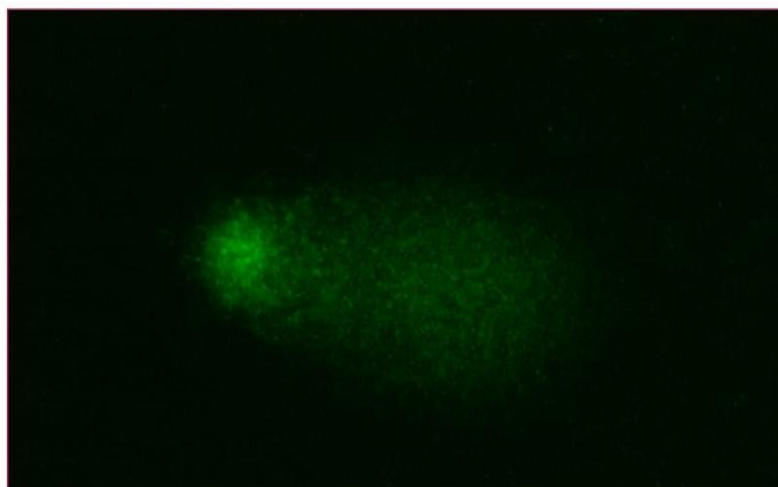


Figura 6. Nucleoide submetido ao teste cometa. A imagem mostra um nucleoide celular com quebras de diversos tamanhos de DNA causada por radiação ionizante que possui efeito estocástico. A célula foi submetida à corrida eletroforética em um campo elétrico uniforme, que permite a separação dos fragmentos, fazendo com que os menores migrem com uma velocidade maior formando um arraste. O sentido de migração é para o polo negativo, na imagem caracterizado pelo arraste, que lembra um cometa.

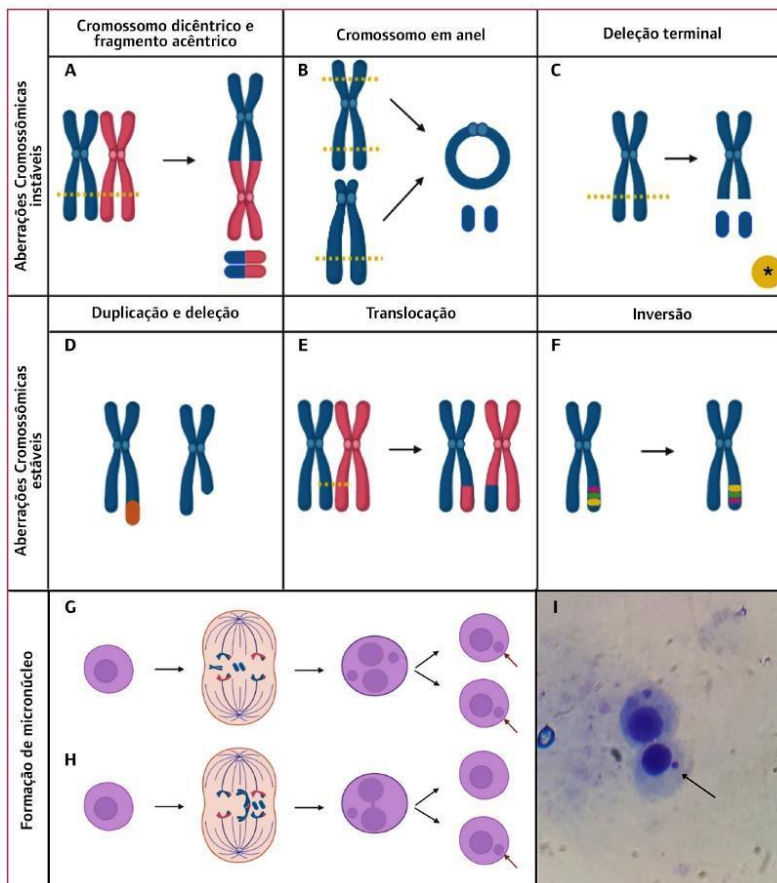
Os números de quebras envolvidas e a forma como os segmentos interagirão entre as extremidades quebradas determinam os tipos de rearranjos que serão formados. As aberrações cromossômicas podem ser classificadas como instáveis e estáveis. As aberrações cromossômicas instáveis caracterizam-se por alterações

na estrutura dos cromossomos, sendo mais amplamente quantificadas em casos de exposições recentes à radiação ionizante. As aberrações cromossômicas estáveis tendem a permanecer nas células ao longo dos processos de divisão celular. A figura 7 retrata os tipos mais comuns de aberrações cromossômicas.

Os micronúcleos são um subproduto das aberrações cromossômicas instáveis ou de perdas de cromossomos inteiros. A quantidade de micronúcleos presentes nas células é proporcional à dose de RI absorvida. Os micronúcleos consistem de pequena massa nuclear revestida por membrana com aparência de um pequeno núcleo, porém separada do núcleo celular. O diâmetro do micronúcleo é menor que 1/3 do núcleo principal, e, portanto, pode ser facilmente diferenciado em uma célula binucleada. Os micronúcleos são originados durante a divisão celular decorrente da não disjunção cromossômica, geralmente ocasionada por lesões no DNA, que não foram reparadas pelo sistema de reparo (figura 7).

Mais recentemente, diversos estudos têm investigado o papel da variação estrutural do genoma que possui tamanho intermediário, conhecida como Variação do Número de Cópias (do inglês, *Copy Number Variants - CNV*), que envolve rearranjos variáveis de ganhos e/ou perdas do conteúdo de DNA como biomarcadores de efeito de agentes mutagênicos. Evidências demonstram que a exposição à radiação ionizante resulta em um aumento significativo na formação de CNV *de novo* em células irradiadas. As CNVs, contendo perdas genômicas, parecem ser mais comumente induzidas por radiações que causam deleções no DNA. Elas surgem como resultado de reparo ou erro de reparo de DSBs e SSBs na molécula de DNA.

Figura 7. Representação esquemática dos tipos de aberrações cromossômicas instáveis e estáveis e da formação de micronúcleo. **A.** Os cromossomos dicêntricos são originados a partir de quebras das extremidades teloméricas de dois cromossomos distintos, que se reúnem de forma errada, formando uma estrutura com 2 centrômeros e fragmentos acêntricos. **B.** O cromossomo em anel surge de duas quebras, ambas no mesmo cromossomo, flanqueando o centrômero. As extremidades quebradas são ligadas, formando-se um anel que inclui o centrômero e um fragmento acêntrico. **C.** Nas deleções terminais há rompimento de um segmento terminal e um fragmento acêntrico é originado. (*Os fragmentos acêntricos produzidos pelas quebras são instáveis, ou seja, são perdidos durante o processo de divisão celular.) **D.** As radiações ionizantes podem causar diferentes tipos de ganhos e perdas de fragmentos cromossômicos. **E.** A translocação é a transferência de um segmento de um cromossomo para outro não-homólogo. **F.** As inversões surgem a partir de duas quebras nos cromossomos e cada fragmento reorganiza-se de forma invertida, podendo ou não envolver o centrômero. **G.** Os micronúcleos (indicados pelas setas) são originados durante a divisão celular derivados da não disjunção cromossômica geralmente ocasionadas por lesões no DNA. **H.** Formação de micronúcleos a partir de fragmentos acêntricos e cromossomos inteiros atrasados. **I.** Formação de micronúcleos a partir de fragmentos acêntricos e pontes citoplasmáticas a partir de cromossomos dicêntricos. **I.** Células submetidas ao teste de micronúcleo. A seta indica, na imagem, uma célula com um micronúcleo ao lado de um núcleo principal.



Nos últimos anos, o rápido desenvolvimento de tecnologias de análise genômica tem proporcionado a chance de investigar, com alto nível de precisão, diversos tipos de variantes genéticas. Consequentemente, estimativas mais precisas sobre o risco genético da população exposta à radiação ionizante podem ser obtidas. Inovações nas técnicas de sequenciamento do genoma humano vêm sendo refinadas em um ritmo rápido e está permitindo um progresso fascinante e valioso na compreensão de variantes de DNA induzidos por radiação ionizante em toda a extensão do genoma. Recentemente, a tecnologia do **Sequenciamento de Nova Geração** analisou o genoma dos **liquidators** e seus filhos, confirmando a capacidade revolucionária das metodologias genômicas aplicadas à mutagênese ambiental.

Em Goiás, diversas metodologias de biomonitoramento foram empregadas no acompanhamento do efeito genético da RI nas pessoas expostas e seus familiares durante o acidente com césio-137 (figura 8). O avanço das tecnologias de análise genômica foi proporcionando chances de investigar, com alto nível de precisão, diversos tipos de variantes genômicas. Os resultados destes estudos verificaram danos gênicos e cromossômicos, além de um aumento na incidência de mu-

tações no genoma dos filhos dos indivíduos expostos. Esta população apresenta doenças comuns como diabetes, osteoporose, alergias, gastrites, entre outros, porém são inquestionáveis os inúmeros agravos de cunho psicossocial que as pessoas envolvidas enfrentam. Portanto, é importante a continuidade do monitoramento da saúde dessas pessoas, pois é uma das maneiras de mitigação dos efeitos deletérios da RI.

Para saber mais

NOUAILHETAS, Y. *Radiações Ionizantes e a vida*. Rio de Janeiro: Comissão Nacional de Energia Nuclear, 2005.

OKUNO, E. Efeitos biológicos das radiações ionizantes: acidente radiológico de Goiânia. *Estudos Avançados* v.27, n. 77, p. 185-200, 2013.

ROZENTAL, J.J.; CUNHA, P.; OLIVEIRA, C. A. 1989. *Aspects of the initial and recovery phases of the radiological accident in Goiânia*. In Proc. Int. Symp. Recovery Operations in the Event of a Nuclear Accident or Radiological Emergency, IAEA, Vienna (p. 593-597).

UCHOA, Elza Maria Gonçalves Santos. *Cesium 137: Integrative Review of the genetic biomonitoring of individuals exposed to ionizing radiation in the Goiânia radiological accident in Goiânia, from 1988 to 2021*. Dissertação (Mestrado em Genética) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, 2021.

Sequenciamento de Nova Geração (NGS) - Método de sequenciamento do todo ou de algumas partes do DNA em um curto período. É de fácil acesso a diversos bancos de dados que disponibilizam centenas de mutações genéticas, e tem baixo custo.

Liquidators - Bombeiros, militares, operários e voluntários que ajudaram a reduzir as consequências do acidente nuclear de Chernobyl, foram assim denominados.

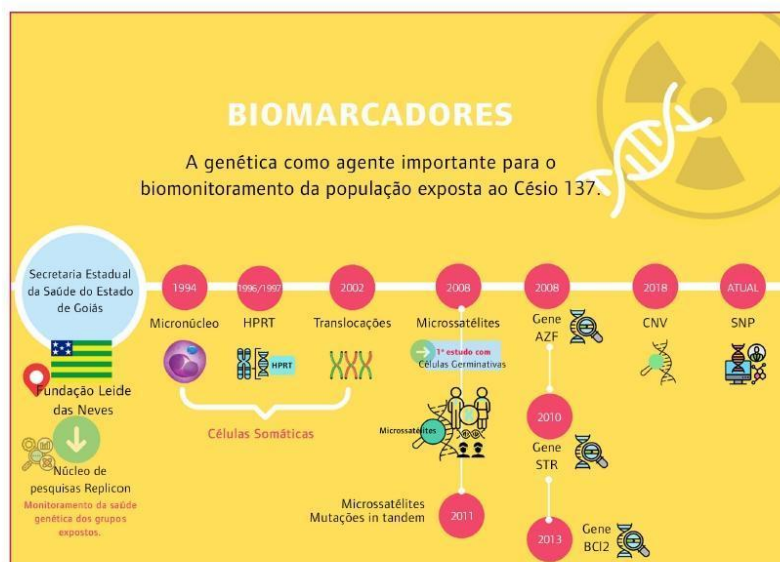


Figura 8. Linha do tempo do biomonitoramento genético da população exposta ao Césio-137 de 1987 até o momento atual.