

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS
ENERGÉTICAS E NUCLEARES (PROTEN)**

**PROTOCOLO PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DA RADIAÇÃO
IONIZANTE NA ATIVIDADE DA GLICOPROTEÍNA-P**

NEYLIANE FRASSINETTI GONÇALVES DOS SANTOS

**RECIFE – PERNAMBUCO – BRASIL
FEVEREIRO – 2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**PROCOLO PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DA RADIAÇÃO
IONIZANTE NA ATIVIDADE DA GLICOPROTEÍNA-P**

NEYLIANE FRASSINETTI GONÇALVES DOS SANTOS

**PROTOCOLO PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DA RADIAÇÃO
IONIZANTE NA ATIVIDADE DA GLICOPROTEÍNA-P**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, do Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Dosimetria e Instrumentação Nuclear.

ORIENTADOR: PROF. DR. ADEMIR DE JESUS AMARAL (DEN – UFPE)

CO-ORIENTADOR: PROFa. Dra. CÍNTIA GONSALVES DE FARIA MACHADO (HEMOPE/UPE)

RECIFE – PERNAMBUCO – BRASIL

FEVEREIRO – 2008

S231p

Santos, Neyliane Frassinetti Gonçalves de.

Protocolo para avaliação do efeito da radiação ionizante na atividade da glicoproteína -P / Neyliane Frassinetti Gonçalves dos Santos. - Recife: O Autor, 2008.

64 folhas, il : figs., tabs.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares (PROTEN), 2008.

Inclui Bibliografia e Apêndices.

1. Energia nuclear. 2. Glicoproteína-P. 3. Citometria de fluxo. 4. Radioterapia. I. Título.

UFPE

621.042

CDD (22. ed.)

BCTG/2008-074

PROTOCOLO PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DA RADIAÇÃO IONIZANTE NA ATIVIDADE DA GLICOPROTEÍNA-P

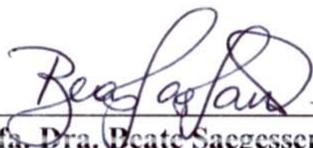
Neyliane Frassinetti Gonçalves dos Santos

APROVADA EM: 25.02.2008

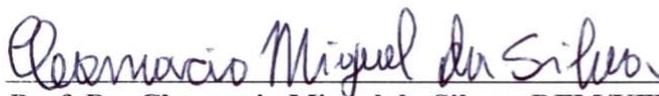
ORIENTADOR: Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Cíntia Gonsalves de Faria Machado

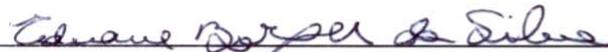
COMISSÃO EXAMINADORA:



Profa. Dra. Deate Saegesser Santos – DCF/UFPE

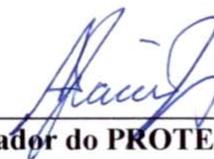


Prof. Dr. Cleomacio Miguel da Silva – DFM/UFPE



Profa. Dra. Edvane Borges da Silva – CAV/UFPE

Visto e permitida a impressão



Coordenador do PROTEN/DEN/UFPE

*À memória de “tia” Lécia e vovô José,
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à fonte de todas as minhas forças: obrigada meu **Deus**, meu pai e senhor, por nunca me abandonar e me guiar nesta e em todas as caminhadas.

À minha família: minha mãe **Neuza**, meus irmãos **Emanuelle**, **Julyanne** e **Ítalo**, minha avó **Eunice** e meu sobrinho **Gabriel**. Por ser um instrumento divino que me dedica tanto amor, que compreende minha ausência, que torce por mim e se esforça para que meus passos pareçam sempre menos penosos e mais gloriosos.

À “tia” **Lécia** (*in memorian*), onde tudo começou. À professora que vibrou a cada vitória e me apoiou em cada tropeço. Àquela que me amou como uma mãe ama seu filho. Comemorou minha entrada no mestrado, mas teve que ir antes de me ver pós-graduada. Tia, meu amor e gratidão são para sempre.

Ao meu orientador, **Prof. Ademir Amaral**, por ter acreditado e confiado em mim, e por tanto esforço para meu crescimento e aprimoramento profissional. Agradeço os ensinamentos, a paciência, a compreensão, o carinho e a amizade construída.

À minha co-orientadora, **Dra. Cíntia Machado**, por ter me indicado a este Programa, confiando em meu potencial. Sou grata pelo carinho, confiança, orientações, ensinamentos e amizade.

Aos **amigos do Grupo de Estudos em Radioproteção e Radioecologia (GERAR)**, em especial a **Mariana**, **Marcela** e **Fárida**, pela amizade, paciência, companheirismo, discussões e incentivo.

Aos **amigos da Unidade de Laboratórios Especializados (UNILABE) da Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE)**, em especial à **Maria Amélia**, “Amelinha”, pelo auxílio dado nos treinamentos e pela amizade maior ainda.

Aos meus **amigos de convivência**, em especial a **Thatiana, Karol, Wiviane, Valcley, Diogo, André, Leonardo, Aluízio, Fernando e Lauro**, por terem se mostrado mais meus amigos do que eu poderia imaginar. Pelo apoio e amizade sempre presente em seus atos, e maiores ainda nesta fase tão importante da minha vida.

Aos **participantes da pesquisa**, por contribuírem nesta busca do conhecimento.

Ao pessoal do **Departamento de Energia Nuclear (DEN)**: aos **amigos**, pela agradável convivência; aos **professores**, pelo aprendizado e aos **funcionários**, pelo auxílio.

Aos membros das bancas examinadoras: **Profa. Dra. Adriana Fontes, Profa. Dra. Beate Saegesser, Prof. Dr. Cleomácio Miguel, Profa. Dra. Edvane Borges, Profa. Dra. Elba Lúcia Cavalcanti, Profa. Dra. Maria do Socorro Cavalcanti e Prof. Dr. Waldeciro Colaço**, pelas contribuições a deste trabalho.

À **UNILABE – HEMOPE**, em especial ao **Laboratório de Imunofenotipagem**, por disponibilizar seu espaço, equipamentos e insumos.

Ao **Centro de Radioterapia de Pernambuco (CERAPE)**, em especial ao **Dr. Jonathan Melo**, por disponibilizar o aparelho de radioterapia para irradiação das amostras.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RESUMO

SUMMARY

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Tratamento do câncer	3
2.2 Resistência celular	5
2.2.1 Resistência a múltiplas drogas.....	6
2.3 Glicoproteína-P	7
2.3.1 Estrutura e mecanismo de ação	8
2.3.2 Moléculas reconhecidas pela glicoproteína-P	10
2.3.3 Sítios de expressão	11
2.3.4 Função fisiológica	11
2.4 Tratamento combinado – radioterapia e quimioterapia	12
2.4.1 Resistência radioinduzida a múltiplas drogas.....	14
2.4.2 Linfócitos como modelo biológico para danos radioinduzidos.....	15
2.5 Métodos de identificação da resistência associada à glicoproteína-P	17
2.5.1 Citometria de fluxo	18
2.5.2 Expressão da glicoproteína-P	23
2.5.3 Atividade da glicoproteína-P	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Aspectos éticos	26
3.2 Escolha da casuística	27

3.2.1 Critérios de seleção e inclusão.....	27
3.2.2 Critérios de exclusão	27
3.3 Coleta e separação das amostras.....	28
3.4 Irradiação das amostras.....	29
3.4.1 Escolha das doses	29
3.4.2 Processo de irradiação das amostras.....	30
3.5 Obtenção de células mononucleares	31
3.5.1 Lavagem das células e obtenção da suspensão celular.....	33
3.6 Teste funcional da glicoproteína-P.....	33
3.6.1 Ensaio da rodamina 123	34
3.6.2 Inibição com verapamil	34
3.6.3 Identificação das subpopulações linfocitárias T.....	36
3.6.4 Aquisição e análise dos dados em citômetro de fluxo.....	37
3.6.4.1 Parâmetros de aquisição	37
3.6.4.2 Análise por porcentagem.....	38
3.6.4.3 Análise por índice médio de fluorescência.....	39
3.7 Análise estatística.....	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 Contagem de linfócitos	40
5.2 Delimitação das subpopulações linfocitárias T.....	41
5.3 Atividade da glicoproteína-P nas subpopulações T.....	42
5.4 Atividade da glicoproteína-P na subpopulação T CD4.....	44
5.5 Atividade da glicoproteína-P na subpopulação T CD8.....	47
5.6 Avaliação do protocolo estabelecido e resultados obtidos	49
6 CONCLUSÕES.....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
APÊNDICES	61
APÊNDICE 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	61

APÊNDICE 2 – Formulário de acompanhamento do experimento	62
<i>ANEXOS</i>	64
ANEXO 1 – Cópia do Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	64

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Representação esquemática da estrutura da glicoproteína-P (modelo linear).....	8
Figura 2 – Efluxo de substratos mediado pela glicoproteína-P	9
Figura 3 – Linfócito periférico humano de aspecto normal	15
Figura 4 – Ligação específica de anticorpos marcados com fluorocromos a antígenos presentes na superfície celular.....	18
Figura 5 – Captação da luz dispersa por detectores, frontal (FSC) e lateral (SSC)	20
Figura 6 – Distribuição normal das populações celulares presentes no sangue periférico humano, diferenciadas quanto ao tamanho (FSC) e complexidade celular (SSC).....	21
Figura 7 – Diagrama dos filtros e detectores do sistema óptico.....	22
Figura 8 - Fluxograma de coleta e separação das amostras.....	28
Figura 9 - Irradiação das amostras em uma bomba de Cobalto-60	30
Figura 10 – Separação celular de amostra sanguínea por gradiente de densidade em Ficoll...	32
Figura 11 - Esquema da separação dos grupos para incubação com ou sem verapamil	35
Figura 12 – <i>Dot plots</i> com <i>gates</i> delimitando as populações de interesse	37
Figura 13 – <i>Dot plot</i> bidimensional dividido em quatro quadrantes	38
Figura 14 – Apresentação gráfica e numérica dos eventos relativos aos linfócitos (em R1) e a cada subpopulação de interesse (em R2)	41
Figura 15 – <i>Dot plot</i> bidimensional ilustrando ausência de efluxo de Rh123 na subpopulação linfocitária CD4 em amostra incubada com VPM	42
Figura 16 – <i>Dot plot</i> bidimensional ilustrando efluxo de Rh123 na subpopulação linfocitária CD4	43
Figura 17 – Histograma na análise funcional da glicoproteína-P.....	44
Figura 18 – Distribuição da porcentagem de efluxo das células CD4 de acordo com o grupo (média, desvio padrão, mínimo e máximo).....	45
Figura 19 – Distribuição do índice médio de fluorescência (IMF) das células CD4 de acordo com o grupo (média, desvio padrão, mínimo e máximo).....	45
Figura 20 – Distribuição da porcentagem de efluxo das células CD8 de acordo com o grupo (média, desvio padrão, mínimo e máximo).....	47
Figura 21 – Distribuição do índice médio de fluorescência (IMF) das células CD8 de acordo com o grupo (média, desvio padrão, mínimo e máximo).....	48

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Substratos e inibidores com os quais a glicoproteína-P interage.....	10
Tabela 2 – Anticorpos empregados na pesquisa imunológica da glicoproteína-P	23
Tabela 3 – Anticorpos monoclonais utilizados na identificação dos linfócitos T	36
Tabela 4 – Contagem de linfócitos (valor absoluto) nas amostras controle.....	40
Tabela 5 – Linfócitos CD4 e CD8 nas amostras controle e irradiadas.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	Sítio de ligação de ATP
Ac	Anticorpo
ADP	Adenosina difosfato
Ag	Antígeno
Ar ⁺	Íon argônio
ATP	Adenosina trifosfato
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CERAPE	Centro de Radioterapia de Pernambuco
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
Da	Dalton
DEN	Departamento de Energia Nuclear
DIOC ₂	3,3'-dietiloxacarbocianina iodeto
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FL	Fluorescência
FSC	Canal de dispersão frontal
GERAR	Grupo de Estudos em Radioproteção e Radioecologia
Gp-P	Glicoproteína-P
Gy	Gray
HEMOPE	Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco
IAEA	Agência Internacional de Energia Atômica
ICQ	Imunocitoquímica
ICRP	Comissão Internacional de Proteção Radiológica
IFN	Interferon
IHQ	Imunohistoquímica
IL	Interleucina
IMF	Índice médio de fluorescência
LL	Inferior e à esquerda
LP	Filtro longpass
LR	Inferior e à direita

MDR	Resistência a múltiplas drogas
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
mRNA	RNA mensageiro
MRP	Proteína relacionada à resistência a múltiplas drogas
NK	Natural killer
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Ficoeritrina
PE-Cy	Combinado de ficoeritrina e cianina
pH	Potencial hidrogeniônico
Pi	Fosfato inorgânico
PMT	Tubo fotomultiplicador
PROTEN	Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares
QT	Quimioterapia
Rh123	Rodamina 123
RNA	Ácido ribonucléico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Radioterapia
SBF	Soro bovino fetal
SI	Sistema Internacional de Unidades
SP	Filtro shortpass
SSC	Canal de dispersão lateral
Sv	Sievert
Th	T auxiliar
TMO	Transplante de medula óssea
TNF	Fator de necrose tumoral
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UL	Superior e à esquerda
UNILABE	Unidade de Laboratórios Especializados
UPE	Universidade de Pernambuco
UR	Superior e à direita
VPM	Verapamil

PROTOCOLO PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DA RADIAÇÃO IONIZANTE NA ATIVIDADE DA GLICOPROTEÍNA-P

Autora: Neyliane Frassinetti Gonçalves dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral (DEN – UFPE)

Co-orientadora: Profa. Dra. Cíntia Gonsalves de Faria Machado (HEMOPE/UPE)

RESUMO

Alterações na atividade da glicoproteína-P (gp-P) resultantes da exposição individual à radiação ionizante podem ser cruciais para a eficácia de tratamentos que empregam radioterapia antes da quimioterapia. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo para avaliar o efeito da radiação ionizante na atividade da gp-P. Amostras de sangue periférico de cinco indivíduos sadios foram irradiadas *in vitro*, separadamente, a partir de uma fonte de cobalto-60, de sorte a receber doses de 0,5 e 2,0 Gy, sendo mantida uma amostra não-irradiada como controle. A atividade da gp-P foi analisada nos linfócitos T CD4 e CD8 através do ensaio de efluxo da rodamina 123 utilizando citometria de fluxo (total 60 leituras), com resultados em porcentagem e índice médio de fluorescência. A comparação da atividade média da gp-P entre os grupos de amostras controle e irradiadas indicou não haver influência da irradiação na atividade da gp-P nos linfócitos T. Entretanto, numa avaliação indivíduo por indivíduo, observou-se mudanças na funcionalidade da gp-P em amostras irradiadas, para alguns casos e doses absorvidas. A análise simultânea dos parâmetros de porcentagem e índice médio de fluorescência mostrou-se fundamental na intercomparação das amostras irradiadas e controle de cada doador. Como base nos resultados obtidos, o protocolo proposto foi considerado adequado para análise da atividade da gp-P após estresse radioativo, configurando-se num importante fator prognóstico à adequação de tratamento paciente-específico, em particular para indivíduos suspeitos de apresentarem resistência radioinduzida a múltiplas drogas.

Palavras-chave: glicoproteína-P . análise funcional . citometria de fluxo . radioterapia . resistência a múltiplas drogas

PROTOCOL TO EVALUATION OF THE IONIZING RADIATION EFFECT ON P-GLYCOPROTEIN ACTIVITY

Author: Neyliane Frassinetti Gonçalves dos Santos

Adviser: Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral (DEN – UFPE)

Co-adviser: Profa. Dra. Cíntia Gonsalves de Faria Machado (HEMOPE/UPE)

SUMMARY

Changes on P-glycoprotein (P-gp) activity after individual exposure to ionizing radiation may be crucial to the effectiveness of treatments which employ radiotherapy prior to chemotherapy. In this context, the aim of this work was to establish a protocol to evaluate the ionizing radiation effect on P-gp activity. Peripheral blood samples of five healthy individuals were separately irradiated *in vitro*, from a cobalt-60 source, in order to receive 0,5 and 2,0 Gy, being kept one no-irradiated sample as control. P-gp activity was analyzed for CD4 and CD8 T lymphocytes, through rhodamine 123-efflux assay by flow cytometry (total 60 readings), and scored as percentage and mean fluorescence index. The comparison of mean P-gp activity among groups of control and irradiated samples indicated that there is no influence of irradiation on P-gp activity in T lymphocytes. However, in a subject-by-subject evaluation, were pointed out changes on P-gp function in irradiated samples, for some cases and absorbed doses. The simultaneous analysis of percentage and mean fluorescence index parameters showed to be essential for the intercomparison of irradiated and control samples of each donor. As base on results obtained, the proposed protocol was considered adequate for P-gp activity assessing after radioactive stress, configuring it as important prognostic factor to right patient-specific treatment, particularly for individuals that may present radioinduced multidrug resistance.

Key-works: p-glycoprotein activity . functional analysis . flow cytometry . radiotherapy . multidrug resistance

1 INTRODUÇÃO

O sucesso de diversas modalidades terapêuticas que tornam possível o tratamento do câncer é seriamente limitado por modificações fenotípicas que ocorrem nas células-alvo e lhes confere resistência ao efeito citotóxico dos agentes administrados. O fenótipo considerado como principal fator de limitação ao tratamento do câncer é denominado resistência a múltiplas drogas (MDR) (GOTTESMAN; LING, 2006).

A MDR é multifatorial, mas sua associação mais freqüente e bem estudada é com a ação da proteína transmembrana glicoproteína-P (gp-P). Esta proteína exerce uma importante função fisiológica de proteção celular por reconhecer e bombear, para fora da célula, uma gama ampla de compostos citotóxicos. Entretanto, esta mesma propriedade apresenta-se como uma limitação à eficácia dos quimioterápicos, pois muitos agentes antineoplásicos e outras drogas e substâncias de relevância clínica são substratos da gp-P.

Na tentativa de melhorar a citotoxicidade terapêutica, alguns protocolos valem-se da estratégia de combinação de quimioterapia (QT) com radioterapia (RT) visando à otimização do controle de processos celulares alterados e destruição do clone neoplásico. Entretanto, a radiação ionizante já foi identificada como um agente físico envolvido na regulação pré- e pós-transcrição da gp-P (SUKHAI; PIQUETTE-MILLER, 2000). Nesse contexto, o caso particular da administração da RT antes da QT deve ser investigado pela possibilidade de indução ou potencialização de um fenótipo MDR por interação da radiação ionizante com a gp-P.

Vários estudos sugerem que a radiação ionizante pode aumentar a estabilidade e a vida média da gp-P ou induzir mutações e respostas celulares que elevam as taxas de transcrição do gene que a codifica, resultando na sua superexpressão, mas pouco se sabe

sobre possíveis efeitos quanto à atividade da gp-P (McLEAN; HILL, 1993; SUKHAI; PIQUETTE-MILLER, 2000). Este parâmetro funcional pode ser avaliado em diversas células do corpo humano, mas surge um interesse particular em estudá-lo nos linfócitos, pois estas células são radiosensíveis, de fácil obtenção e manipulação em laboratório, e alvo de ação de compostos reconhecidos pela gp-P (IAEA, 2001; MARZOLINI et al., 2004).

Nesse contexto, o objetivo principal desta pesquisa foi padronizar um protocolo para avaliar o efeito da radiação ionizante na atividade da gp-P.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tratamento do câncer

O câncer é definido como o conjunto de doenças malignas resultantes de alterações graves nos mecanismos regulatórios de diferenciação e proliferação celular, que ocasionam a perda do controle do crescimento nas células de um determinado tecido (FLECK, 1992). O tratamento destas desordens é feito de acordo com as condições gerais do paciente e as características do tumor, e diversas modalidades terapêuticas podem ser empregadas, sozinhas ou em combinação, com este fim (MURAD; KATZ, 1996; STEEL, 1997).

A cirurgia é a opção terapêutica mais antiga e consiste na remoção do tecido lesado junto com uma parte sadia do tecido em seus arredores (margem de segurança), o que fornece bons resultados em casos de tumores sólidos primários, bem delimitados e minimamente invasivos (STEEL, 1997).

A radioterapia (RT) consiste na aplicação direcionada de radiação ionizante com o intuito de danificar e destruir as células cancerosas localizadas no campo delimitado, por indução da apoptose. Esta modalidade vem sendo amplamente empregada para o tratamento de tumores sólidos, com controle em longo prazo. Por causar danos mínimos ao tecido normal nas proximidades do tumor, a RT é ideal para casos de lesões em órgãos vitais e em tecidos que não possam ser cortados (STEEL, 1997; HALL, 2000).

Diversos tipos de radiação podem ser empregados com fins radioterápicos. Dentre eles, os mais frequentemente utilizados são os raios X de alta energia produzidos por um aparelho denominado acelerador linear, e os raios gama emitidos por isótopos radioativos como o Cobalto-60, o Iodo-131 e o Césio-137 (STEEL, 1997; HALL, 2000).

Apesar de todas as vantagens obtidas pela cirurgia e RT no tratamento de tumores sólidos, cerca de 50% de todos os casos de câncer correspondem a neoplasias potencialmente invasivas – denominadas metástases – onde as células malignas desprendem-se do tecido e se disseminam para outras regiões do corpo, originando focos secundários da doença. Para estes casos, assim como para neoplasias circulantes por natureza – como leucemias e linfomas – é essencial que o tratamento atinja as células na circulação, o que não é possível com cirurgia nem com RT, mas sim com a quimioterapia (QT) (AMBUDKAR et al., 2006).

A QT consiste na administração de compostos químicos (quimioterápicos) que são distribuídos pelo corpo através da circulação, onde atuam nos processos de divisão e crescimento celular visando à indução da morte e controle das células malignas. O emprego desta modalidade tem fornecido bons resultados também no tratamento de tumores localizados, por diminuição da carga tumoral localizada. Assim, frente às diversas possibilidades de aplicação, pode-se considerar a QT como a modalidade mais amplamente utilizada (WATERS; MARAVEYAS, 2007).

Os princípios da cirurgia, RT e QT, somados aos avanços na compreensão da fisiologia do câncer, têm sido utilizados para o desenvolvimento de outras modalidades terapêuticas, como o transplante de medula óssea (TMO) e a hormonioterapia.

O TMO já é bastante utilizado no tratamento de câncer hematológico e consiste na destruição da medula óssea doente (com RT, QT ou ambos) e reconstrução do ambiente medular através da infusão de células precursoras sadias (APELLBAUM, 1996). A hormonioterapia consiste na realização de cirurgia ou uso de medicamentos visando evitar que hormônios naturais do corpo atinjam as células de câncer e estimulem seu desenvolvimento (FERREIRA, 2007).

O avanço tecnológico também tem permitido a criação de terapêuticas mais refinadas, com aplicações promissoras no campo da cancerologia. A imunoterapia, por exemplo, consiste em aumentar a competência do organismo em lidar com o tumor através do estímulo de reações imunes com anticorpos monoclonais contra antígenos tumorais e citocinas (ROSENBERG, 1999).

Outro bom exemplo da contribuição tecnológica é a terapia fotodinâmica, que consiste na destruição localizada do tecido anormal por ativação com luz laser de um composto fotosensibilizador. Este composto é administrado por via intravenosa, acumula-se em células que se reproduzem rapidamente e, ao ser excitado, gera formas de oxigênio tóxicas que induzem necrose ou inviabilização da célula (MACHADO, 2000; SIMPLICIO, 2002).

2.2 Resistência celular

O sucesso do tratamento oncológico depende do controle eficaz da massa tumoral. Considerando que a quase totalidade das modalidades terapêuticas depende diretamente da resposta celular, modificações fenotípicas¹ que permitam que as células-alvo resistam ao efeito citotóxico dos agentes administrados podem limitar seriamente a eficácia do tratamento do câncer (ARVELO et al., 2000).

Vários mecanismos operam para impedir a indução de morte celular por ação de drogas e envolvem os diferentes níveis de ação citotóxica destes compostos, dos quais os mais investigados e com significância clínica são:

- 1) Captação da droga pela célula:** pode ser alterada ao nível de membrana ou quando o agente já se encontra dentro da célula tumoral, com o aumento do efluxo. Este mecanismo é mediado pela ativação de bombas dependentes de energia, como a glicoproteína-P (gp-P) e a proteína associada à resistência a múltiplas drogas (MRP);
- 2) Distribuição celular:** a ativação ou preservação da atividade da droga na célula pode ser alterada por sua detoxificação² ou por incapacitação do sistema ativador. A ativação de enzimas do sistema glutatona e o seqüestro da droga em vesículas celulares são exemplos deste mecanismo de resistência;

¹Fenótipo: conjunto de caracteres detectáveis de um organismo, determinado pela interação entre seu genótipo (patrimônio hereditário) e o meio ou por circunstâncias particulares de seu desenvolvimento

²Retirada do caráter tóxico de um composto

- 3) **Ação da droga no alvo:** pode ser modificada por alterações nas moléculas-alvo que resultam na diminuição da afinidade do composto. As mutações no gene da topoisomerase são o melhor exemplo deste mecanismo. Pode haver também um aumento do reparo no alvo lesado devido, por exemplo, ao aumento da atividade dos mecanismos de reparo do ácido desoxirribonucléico (DNA), abolição da sinalização intracelular da ocorrência do dano ao DNA ou ambos os eventos;
- 4) **Bloqueio no ciclo celular, morte da célula ou ambos:** alterações nestes níveis resultam de alterações dos genes controladores da apoptose, como mutações do gene p53 e ativação do gene Bcl-2 (ARVELO et al., 2000; STAVROVSKAYA, 2000; DEL GIGLIO, 2001).

As modificações que induzem a resistência podem estar ligadas a características próprias do organismo ou a alguma patologia específica, e resultar na resistência antes do início do tratamento (resistência intrínseca). Estas alterações podem, ainda, surgir no decorrer da terapia (resistência adquirida) (ARVELO et al., 2000).

Devido à sua importância para o melhoramento da eficácia das estratégias terapêuticas, a caracterização *in vitro* e *in vivo* dos mecanismos envolvidos na resistência tornou-se alvo de intenso estudo. Além disso, o estudo de parâmetros preditivos da resposta ao tratamento pode evitar a administração de tratamento não profícuo para o paciente, em detrimento da pronta instituição de outro esquema terapêutico com maior chance de eficácia (DEL GIGLIO, 2001; GOTTESMAN; LING, 2006).

2.2.1 Resistência a múltiplas drogas

Uma das tentativas mais utilizadas de contornar a resistência consiste em otimizar a indução da apoptose através da administração simultânea de várias drogas com estruturas e alvos de ação celular diferentes. Este protocolo, denominado poliquimioterapia, também é empregado para que doses menores de uma droga muito citotóxica possam ser administradas sem prejuízo ao efeito final desejado, que é “complementado” pela ação de outra droga (STAVROVSKAYA, 2000; GOTTESMAN; LING, 2006).

O emprego deste protocolo terapêutico evidenciou um tipo particular de resistência denominado resistência a múltiplas drogas (*multidrug resistance* – MDR), que é considerado o principal fator de limitação ao tratamento do câncer (GOTTESMAN; LING, 2006). Neste caso, o tratamento com uma droga resulta na resistência cruzada a diversos quimioterápicos não-relacionados (divergem quanto à estrutura, modo de ação e alvo celular), que abrangem diversos compostos hidrofóbicos naturais, seus análogos semi-sintéticos e análogos sintéticos (NIELSEN; SKOVSGAARD, 1992; STAVROVSKAYA, 2000).

Apesar de o fenótipo MDR ser multifatorial, a associação mais freqüente e bem estudada envolve uma proteína transmembrana denominada glicoproteína-P (gp-P), que é necessária e suficiente à aquisição do fenótipo em questão e por isso considerada o alvo mais importante nos estudos relativos a MDR (GOTTESMAN et al., 1996; ARVELO et al., 2000; GOTTESMAN; LING, 2006).

2.3 Glicoproteína-P

A glicoproteína-P (gp-P) é um membro bem caracterizado da superfamília de transportadores com sítio de ligação para moléculas de adenosina trifosfato (ATP), denominada ABC (*adenosine tri-phosphate-binding cassette*) (HENESSY, SPIERS, 2006).

A superfamília ABC é altamente conservada e abrange mais de 100 proteínas, expressas por diversas espécies, que incluem desde bactérias e plantas a mamíferos. Nestes organismos, as proteínas estão envolvidas no transporte ativo para realização de diversas funções, como expulsão de compostos nocivos, ingestão de nutrientes, transporte de íons, transporte de peptídeos e sinalização celular (DEAN; ANNILO, 2005; HENESSY, SPIERS, 2006).

Em humanos, a gp-P apresenta duas isoformas, codificadas pelos genes *MDR1* e *MDR2* (também referido como MDR3), ambos localizados no braço longo do cromossomo 7 (7q21). Apesar da homologia de 60% entre eles, o fenótipo MDR é associado apenas ao produto do gene *MDR1* (BODOR et al., 2005; HENESSY, SPIERS, 2006).

2.3.1 Estrutura e mecanismo de ação

A gp-P é um polipeptídeo de 170 kDa (quilodaltons³) constituído por cerca de 1.280 aminoácidos, organizados em duas metades (ou domínios) estruturalmente homólogas e funcionalmente integradas, ligadas por uma região flexível. A Figura 1 apresenta um esquema do modelo linear da estrutura da gp-P (ARVELO et al., 2000; STAVROVSKAYA, 2000).

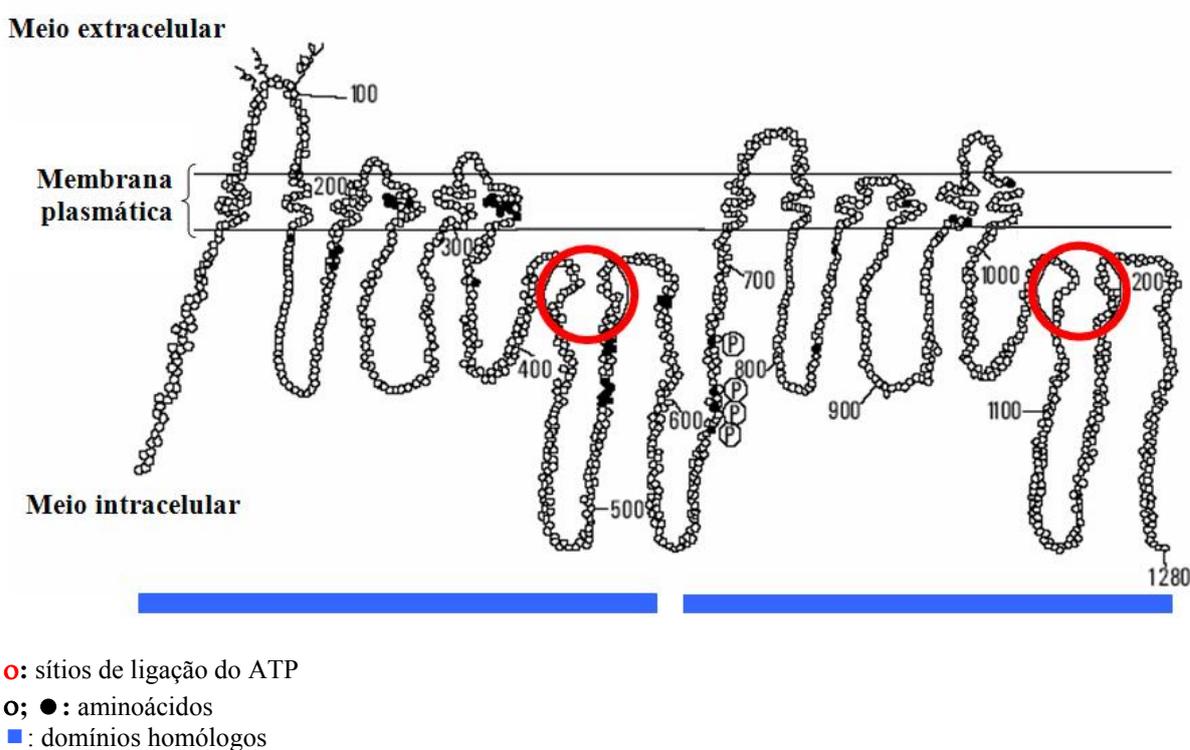


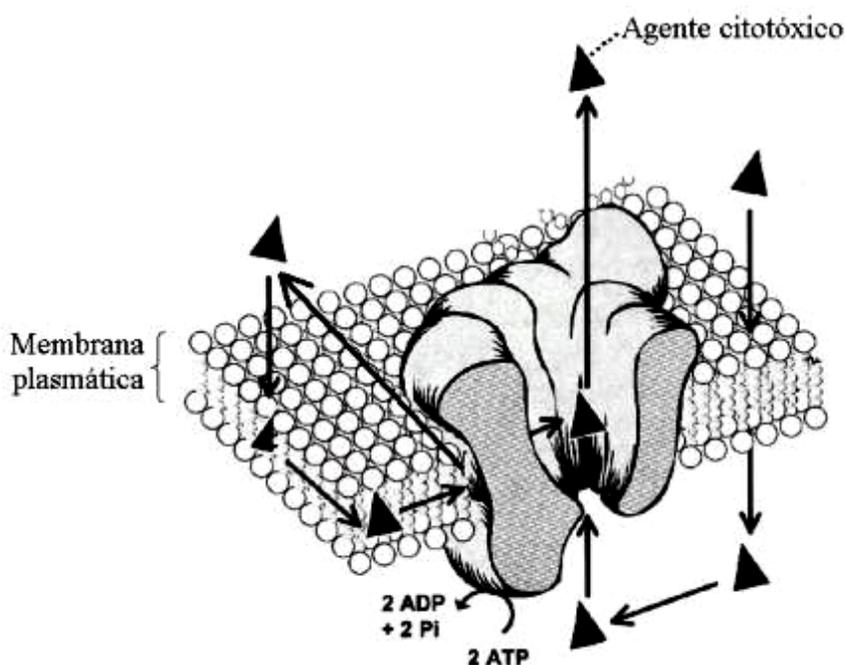
Figura 1 – Representação esquemática da estrutura da glicoproteína-P (modelo linear) (modificado de ÁGUILA et al., 1998)

Cada metade contém seis segmentos intercalados na membrana, de forma que a convergência dos dois domínios forma um canal de doze lados que permite a comunicação entre os meios intracelular e extracelular, caracterizando a gp-P como uma proteína transmembrana. Os três sítios de glicosilação que emergem da primeira alça extracelular provavelmente estão envolvidos na estabilidade da proteína (ARVELO et al., 2000).

³ Dalton (Da): unidade de massa atômica que equivale a 1/12 da massa do carbono-12; 1 kDa = 1.000 Da

Cada metade contém ainda um domínio citoplasmático com o sítio de ligação do ATP onde, de algum modo, a energia de hidrólise é traduzida para que a proteína exerça sua função (ARVELO et al., 2000).

O mecanismo de ação primária da gp-P, ilustrado na Figura 2, consiste basicamente no transporte ativo das moléculas que reconhece, do meio intra para o extracelular, resultando na redução do seu acúmulo intracelular e inibindo, conseqüente, a morte celular. O reconhecimento e transporte das moléculas podem ocorrer ao nível de membrana (mecanismo explicado pelo modelo “*flippase*”⁴) ou no meio intracelular (mecanismo explicado pelo modelo “bomba de vácuo hidrofóbica”⁵) (JOHNSTONE et al., 2000; SAUNA et al., 2001; HENESSY; SPIERS, 2006).



* ADP: adenosina difosfato; ATP: adenosina trifosfato; Pi: fosfato inorgânico.

Figura 2 – Efluxo de substratos mediado pela glicoproteína-P (modificado de MARZOLINI et al., 2004)

⁴ Segundo este modelo, a gp-P intercepta a droga enquanto ela se move na membrana e “flipa” (“lança”) a droga da camada mais interna para a mais externa, e daí para o meio extracelular, diretamente da membrana externa ou através do centro do poro

⁵ Segundo este modelo, a gp-P forma uma via hidrofílica, transportando o substrato do meio intracelular para o extracelular, através do centro do poro

2.3.2 Moléculas reconhecidas pela glicoproteína-P

Apesar de não se compreender ao certo o mecanismo de reconhecimento das moléculas pela gp-P, sabe-se que esta proteína interage com uma gama ampla de compostos, estruturalmente e funcionalmente diferentes, alguns dos quais estão listados na Tabela 1 (MARZOLINI et al., 2004; TANDON et al., 2006).

Tabela 1 – Substratos e inibidores com os quais a glicoproteína-P interage

Compostos	Exemplos
Drogas antineoplásicas	Antibióticos (actinomicina D), ciclosporina-A, cisplatina, docetaxel, antraciclina (doxorubicina, daunorubicina), topotecan, mitoxantrone, mitomicina-C, paclitaxel, epipodofilotoxinas (teniposide, etoposide), imatinib, alcalóides da vinca (vincristina, vinblastina)
Drogas cardiovasculares (cardiotônicos; agentes redutores de lipídeos)	Atorvastatina, lovastatina, bunitrolol, celiprolol, talinolol, diltiazem, digoxina, digitoxina, losartan, quinidina, verapamil
Glicocorticóides	Aldosterona, cortisol, dexametasona, metilprednisolona
Drogas antivirais (inibidores da HIV protease)	Amprenavir, indinavir, saquinavir, nelfinavir, ritonavir
Agentes antibacterianos	Eritromicina, esparfloxacina, levofloxacina, pazufloxacina, tetraciclina
Antifúngicos	Itraconazol
Imunossupressores	Ciclosporina, sirolimus, tacrolimus, valsopodar
Antiepilépticos	Fenobarbital, fenotoína
Corantes	Rodamina-123, 3,3'-dietiloxacarbocianina iodeto (DIOC ₂), bisbenzimidazol (Hoescht 33342)
Outros agentes citotóxicos	Domperidone, cimetidine, loperamida (antidiarréico), ondansetron (antiemético), cloroquina, colchicina (agente antigota), morfina, ivermectina (anti-helmíntico)

(MARZOLINI et al., 2004; TANDON et al., 2006)

2.3.3 Sítios de expressão

A gp-P funcionalmente ativa pode ser encontrada em diversos tecidos normais. Os principais sítios são: membrana apical de células epiteliais de tecidos especializados com função secretória/excretória (córtex da adrenal, epitélio do cólon, jejuno, túbulos proximais dos rins e ductos biliares do fígado); trofoblastos da placenta; células endoteliais de vasos sanguíneos capilares de sítios da barreira hematoencefálica e hematotesticular (CORDON-CARDO et al., 1990; FLENS et al., 1996; GOTTESMAN et al., 1996).

Células tronco hematopoéticas, células dendríticas apresentadoras de antígeno e linfócitos T, B e NK também já foram identificados como sítios de expressão da gp-P (CHAUDARY; RONINSON, 1991; BUNTING et al., 2000).

2.3.4 Função fisiológica

As evidências acerca da função da gp-P indicam que esta proteína não é essencial às funções fisiológicas sob condições normais (sem agressão), mas desempenha uma função importante na resposta celular contra o estresse (CORDON-CARDO et al., 1990; SCHINKEL, 1998; SUKHAI; PIQUETTE-MILLER, 2000).

É certo que a principal função da gp-P reside na proteção dos tecidos contra compostos citotóxicos. Por este motivo, as drogas são os agentes mais relacionados à regulação desta proteína (JOHNSTONE et al., 2000; TANDON et al., 2006).

Entretanto, as funções biológicas da gp-P não são completamente definidas. Diversas influências ambientais ou patológicas podem regular a gp-P e induzir a redução ou aumento da sua expressão ou atividade (funcionalidade) através de mecanismos complexos. Proteínas de choque térmico, radiação, estresse genotóxico, mediadores inflamatórios, citocinas e fatores de crescimento são alguns destes agentes reguladores (FLENS et al., 1996; GOTTESMAN et al., 1996; SUKHAI; PIQUETTE-MILLER, 2000).

Sugere-se que esta proteína atue também na regulação da sobrevivência, diferenciação e proliferação celular. No primeiro caso, a gp-P pode fornecer resistência à apoptose radioinduzida e resistência específica à morte celular mediada por fator de necrose tumoral (TNF) e proteína Fas⁶, elevando o limiar para a morte celular (CHAUDARY; RONINSON, 1991; BUNTING et al., 2000; JOHNSTONE et al., 2000; RUTH; RONINSON, 2000; RUEFLI; JOHNSTONE, 2003).

Estudos sugerem que a gp-P também atua na resposta imune, principalmente na promoção da atividade citolítica de linfócitos natural killer (NK) e T citotóxicos, denominados CD8. Polipeptídeos como as citocinas, particularmente a interleucina (IL)-1 β , IL-2 e IL-4 e o interferon (IFN)-gama, podem ser transportados através da membrana e facilitam a migração de células dendríticas (que capturam antígenos) para uma determinada região (CHONG et al., 1993; JOHNSTONE et al., 2000).

A evidência da importância da gp-P nas células imunes é confirmada pela observação de diminuição na atividade desta proteína nas diferentes subpopulações linfocitárias em função da idade, uma vez que algumas funções celulares normais como secreção e transporte de algumas citocinas, ativação celular, citotoxicidade e citólise tendem a declinar com a idade (YUNG, 2000; MACHADO et al., 2003).

Embora a gp-P transporte uma ampla gama de compostos visando proteger órgãos vitais, o que é vantajoso, ela também pode ser um problema quando altera a captação dos agentes medicamentosos e interfere na captação das drogas pelos tecidos-alvos. Muitos dos substratos da gp-P são compostos utilizados com fins terapêuticos, e alterações na resposta limitam a destruição das células tumorais, resultando na MDR (HENNESSY; SPIERS, 2006; TANDON et al., 2006).

2.4 Tratamento combinado – radioterapia e quimioterapia

O tratamento combinado consiste no emprego de mais de uma modalidade terapêutica visando a proteção de tecidos normais ou a otimização da citotoxicidade

⁶ Fas: proteína de superfície envolvida na apoptose

terapêutica (STEEL, 1997; HALL, 2000). Dentre as associações possíveis, o tratamento com RT e QT representa uma opção promissora para a erradicação das células anormais do corpo (CHAWAPUN, 2006; FERREIRA, 2007).

De acordo com o objetivo e expectativa da combinação, a associação entre RT e QT pode ser feita de quatro formas:

- *QT adjuvante* (QT após tratamento com RT): indicada para o controle de metástases que possam se manifestar após o tratamento local e no condicionamento para TMO;
- *QT neoadjuvante* (QT antes do tratamento com RT): visa tornar o tumor localizado mais controlável (por diminuição da carga tumoral) e limitar a manifestação de reincidência, atuando sobre as células disseminadas de forma precoce, ou no condicionamento para TMO;
- *QT e RT concomitantes*: visa o tratamento do tumor de forma local e disseminada, favorecendo o efeito aditivo e/ou sensibilizante das drogas;
- *RT e QT alternadas*: uma modalidade é “fragmentada” em vários ciclos de tratamentos, e a outra é administrada entre estes ciclos (RT-QT-RT; QT-RT-QT) (AZNAR, 2005; FERREIRA, 2007).

Apesar dos resultados promissores obtidos, já têm sido relatados casos de MDR em pacientes tratados com RT antes da QT, o que sugere a existência de um fenômeno que surge a partir de um mecanismo biológico e celular distinto do operado após a seleção de drogas, mas que induz ou seleciona a resistência da mesma forma (McLEAN et al., 1993; HILL et al., 1990; HILL et al., 1994).

2.4.1 Resistência radioinduzida a múltiplas drogas

A regulação dos níveis da gp-P pode envolver transcrição e amplificação do gene, estabilidade e processamento do RNA mensageiro (mRNA), incorporação da proteína na membrana plasmática e regulação de sua estabilidade protéica. A radiação é um dos agentes reguladores da gp-P, mas a forma como atua neste processo requer maiores investigações (SUKHAI; PIQUETTE-MILLER, 2000).

Evidências indicam que, ao interagir com a célula, a radiação ionizante pode induzir mutações e respostas celulares que alteram as taxas de transcrição do gene que codifica a gp-P, em geral induzindo aumento destas taxas. Fatores de transcrição, proteínas de sinalização celular e proteínas de reparo têm sido identificadas como envolvidas neste processo (McLEAN et al., 1993; HILL et al., 1994; SUKHAI; PIQUETTE-MILLER, 2000; JOHNSON et al, 2005).

Outros dados sugerem também o envolvimento de modificações na tradução ou na pós-tradução da gp-P, evidenciadas pelo aumento da estabilidade da proteína após a exposição a radiação (vida média de 40 horas contra 17 horas apresentadas em células controle, ilustrando menor 'turnover') sem qualquer elevação concomitante do mRNA, numa mudança provavelmente estável (HILL et al., 1990; McLEAN; HILL, 1993; HILL et al., 1994; SUKHAI; PIQUETTE-MILLER, 2000).

Nas investigações da gp-P, o parâmetro expressão tem sido intensamente explorado, mas pouco se sabe acerca de mudanças na atividade desta proteína, ainda mais sob condições de exposição à radiação ionizante (HOFFMEYER et al., 2000; SUKHAI; PIQUETTE-MILLER, 2000; MARZOLINI et al., 2004).

Alterações na funcionalidade da gp-P podem estar envolvidas com a sua estrutura conformacional ou talvez com o desequilíbrio radioinduzido da membrana biológica, mas o papel das membranas como alvo no dano biológico resultante de exposição à radiação ionizante ainda é pouco esclarecido. Estas informações são importantes, pois se acredita que efeitos que não possam ser explicados pelo dano direto ao DNA podem,

possivelmente, ser estudados pelos efeitos nas membranas celulares (EIDUS, 2000; BENDERITTER et al., 2003; SAINT-GEORGES, 2004).

2.4.2 Linfócitos como modelo biológico para danos radioinduzidos

Informações corretas acerca dos danos radioinduzidos no tecido vivo dependem do emprego de modelos biológicos apropriados (IAEA, 2001).

Os linfócitos circulantes no sangue periférico são considerados o modelo ideal a ser utilizado com este fim, pois são células altamente diferenciadas, sensíveis à radiação ($B > T > NK$) e capazes de armazenar os danos radioinduzidos em qualquer lugar do corpo por um tempo relativamente longo. Além disso, são obtidas facilmente através de uma punção venosa e são de fácil manutenção e manipulação em laboratório (IAEA, 2001; MORI et al., 2005).

Os linfócitos são células que constituem 25 a 35% do total de células brancas (leucócitos⁷) do sangue periférico e apresentam-se morfologicamente como células pequenas e arredondadas, com citoplasma escasso e um grande núcleo esférico. Na Figura 3, a seta aponta para um linfócito humano de aspecto normal observado ao microscópio ótico.

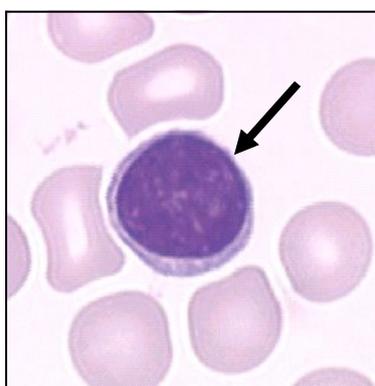


Figura 3 – Linfócito periférico humano de aspecto normal (VALENSI, 2005)

⁷ Leucócitos: granulócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos), linfócitos e monócitos.

Todos os linfócitos se originam de um precursor da medula óssea e passam por estágios complexos e distintos de maturação durante os quais adquirem características fenotípicas que distinguem três subtipos – os linfócitos T, os linfócitos B e os linfócitos NK – que exercem diferentes funções fisiológicas na circulação. De forma geral, os linfócitos exercem um papel importante na resposta imune por eliminação direta de células tumorais e infectadas por vírus através da lise e secreção de citocinas que atraem e ativam diferentes células imunes (PEAKMAN; VERGANI, 1997; ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Os linfócitos T representam cerca de 65 a 80% dos linfócitos circulantes (valor que não muda significativamente com a idade) (YUNG, 2000). São maturados no timo e atuam na regulação de reações imunológicas e secreção de citocinas responsáveis pela multiplicação e diferenciação de diversos tipos celulares. Os linfócitos T são subdivididos em duas subpopulações distintas, funcional e fenotipicamente: os linfócitos CD4 e CD8 (PEAKMAN; VERGANI, 1997; ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Os linfócitos que expressam o antígeno CD4 de membrana são denominados T CD4 ou auxiliares, que representam de 50 a 60% dos linfócitos circulantes e são capazes de promover a resposta imunológica e produzir anticorpos auxiliares (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

A subpopulação T apresenta dois subtipos, o T auxiliar 1 (Th1 – *T helper 1*), que secreta citocinas em resposta à estimulação por IL-2 e IFN-gama, e o T auxiliar 2 (Th2 – *T helper 2*), que secreta citocinas em resposta à estimulação por IL-4. Já os linfócitos que expressam o antígeno CD8 de membrana são denominados T CD8 ou citotóxicos, que representam de 20 a 25% dos linfócitos circulantes e são capazes de diminuir respostas imunológicas e matar células-alvo (PEAKMAN; VERGANI, 1997; ZAGO et al., 2004; ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Os linfócitos B correspondem a 5 a 15 % dos linfócitos circulantes. São maturados na MO antes de serem liberados na circulação, onde atuam no reconhecimento de antígenos específicos através de moléculas de imunoglobulinas presentes na membrana plasmática as quais atuam como receptores celulares de superfície (PEAKMAN; VERGANI, 1997; ZAGO et al., 2004).

Os linfócitos NK, cujo processo de maturação ainda é pouco conhecido, são a minoria dos linfócitos circulantes (cerca de 10 %). Estes linfócitos atuam na lise de células alvo (infectadas por vírus ou tumorais) sem participação da molécula do complexo de histocompatibilidade principal (*major histocompatibility complex* – MHC) (PEAKMAN; VERGANI, 1997; ZAGO et al., 2004).

A escolha dos linfócitos como modelo biológico em pesquisa sobre MDR é coerente, pois além das características já citadas, estas células são alvos de ação de compostos reconhecidos pela gp-P (MARZOLINI et al., 2004).

2.5 Métodos de identificação da resistência associada à glicoproteína-P

A identificação da resistência associada à gp-P pode ser feita através de métodos moleculares ou imunológicos. Cada um destes métodos apresenta vantagens e desvantagens, e a escolha de qual método utilizar depende do objetivo da pesquisa (BECK et al., 1996).

Métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), Northern blot, Southern blot e Western blot, são altamente refinados e sensíveis para a pesquisa do gene *MDR1* (BECK et al., 1996).

Os métodos imunológicos, como a imunohistoquímica (IHQ), imunocitoquímica (ICQ) e a citometria de fluxo, são ideais à investigação de parâmetros ligados à proteína propriamente dita (como expressão e características funcionais) e à distinção destes parâmetros entre as diferentes subpopulações celulares presentes na amostra (BECK et al., 1996; KRISHAN et al., 1997).

Os métodos imunológicos são métodos de avaliação da expressão de antígenos celulares (Ag) e baseiam-se na detecção da formação de complexos entre estes epítopos e anticorpos ligados a marcadores passíveis de detecção (Ac*), que podem ser fluorocromos ou enzimas (SWITZER; GARRITY, 1999).

A técnica da imunofluorescência direta baseia-se na ligação direta por especificidade entre o anticorpo marcado e o epítipo celular (Ag-Ac*), como ilustrado na Figura 4, enquanto a técnica da imunofluorescência indireta baseia-se na ligação indireta entre o anticorpo marcado e o epítipo, que é mediado por um anticorpo secundário (Ac) com especificidade contra ambos (Ag-Ac-Ac*) (SWITZER; GARRITY, 1999).

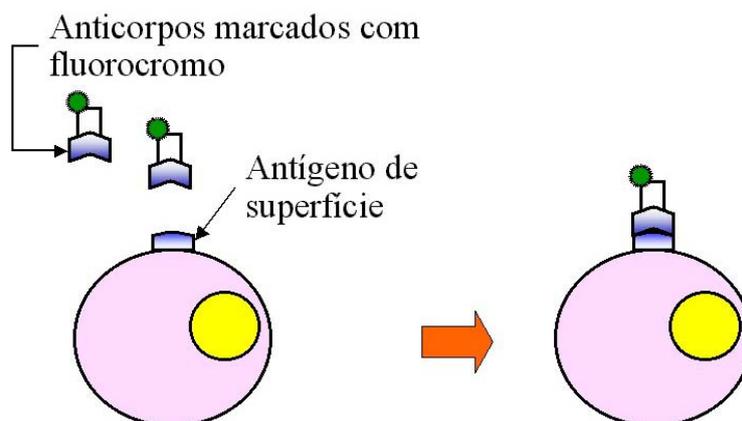


Figura 4 – Ligação específica de anticorpos marcados com fluorocromos a antígenos presentes na superfície celular

A identificação da gp-P e de moléculas que caracterizem grupos celulares pode ser realizada através de métodos imunológicos mais simples, como a ICQ (que utiliza células em suspensão ou fixadas em lâminas) e a IHQ (utiliza cortes de tecidos fixados em lâminas) (KRISHAN et al., 1997; SWITZER; GARRITY, 1999).

Métodos mais avançados, como a citometria de fluxo a laser, a microscopia de fluorescência e a microscopia confocal, somam o princípio das técnicas mais simples à tecnologia, possibilitando, adicionalmente, o estudo do transporte e da distribuição intracelular de drogas ou outros compostos fluorescentes (KRISHAN et al., 1997).

2.5.1 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é um método de estudo celular que permite o rastreamento rápido e altamente sensível de um número grande de células presentes em uma suspensão

para definição de múltiplas propriedades físicas e biológicas. Além disso, trata-se de uma ferramenta semi-automatizada, que emprega técnicas de alta reprodutibilidade (BACAL; FAULHABER, 2003).

Nas análises empregando citometria de fluxo, as células de interesse são incubadas, em suspensão, com anticorpos monoclonais ligados a fluorocromos. Outros compostos, como drogas e corantes, também podem ser utilizados em citometria, contanto que apresentem a propriedade de fluorescência (BACAL; FAULHABER, 2003).

As informações relativas às células presentes na suspensão são obtidas pela detecção de luz dispersa e da fluorescência emitida pelas substâncias fluorescentes, que indicam a quantidade e intensidade de formação dos complexos Ag-Ac* ou a distribuição de um composto fluorescente (SWITZER; GARRITY, 1999; BACAL; FAULHABER, 2003).

A amostra celular preparada é introduzida por aspiração no equipamento de análise denominado citômetro de fluxo, que é constituído de três sistemas físicos complementares: o sistema de fluxo, o sistema óptico e o sistema eletrônico (INTRODUCTION, 2000).

No sistema de fluxo, as células aspiradas são conduzidas por um fluxo de líquido isotônico de forma alinhada até o sistema óptico, onde um feixe de laser é disposto em um ângulo de 90 graus com o fluxo celular em um compartimento denominado câmara “*flow cell*”. O alinhamento das células permite que uma única célula seja interceptada por vez pelo laser (INTRODUCTION, 2000).

O laser de íon argônio (Ar^+) é o mais comumente usado em citometria de fluxo, pois o comprimento de onda emitido (488 nm: espectro de luz azul esverdeado), corresponde à faixa na qual se obtêm as maiores absorções para as fluorescências comumente utilizadas em citometria, como o isotiocianato de fluoresceína (FITC) ($\lambda_{emissão}$ 530 nm, verde) e a ficoeritrina (*phycoerythrin* - PE) ($\lambda_{emissão}$ 570 nm, laranja). Esta propriedade permite que mais de um fluorocromo possa ser detectado e, conseqüentemente, mais de um antígeno ou parâmetro seja analisado (INTRODUCTION, 2000; BACAL; FAULHABER, 2003).

Ao incidir sobre uma célula, a luz do laser é dispersa e coletada por dois detectores, conforme ilustrado na Figura 5.

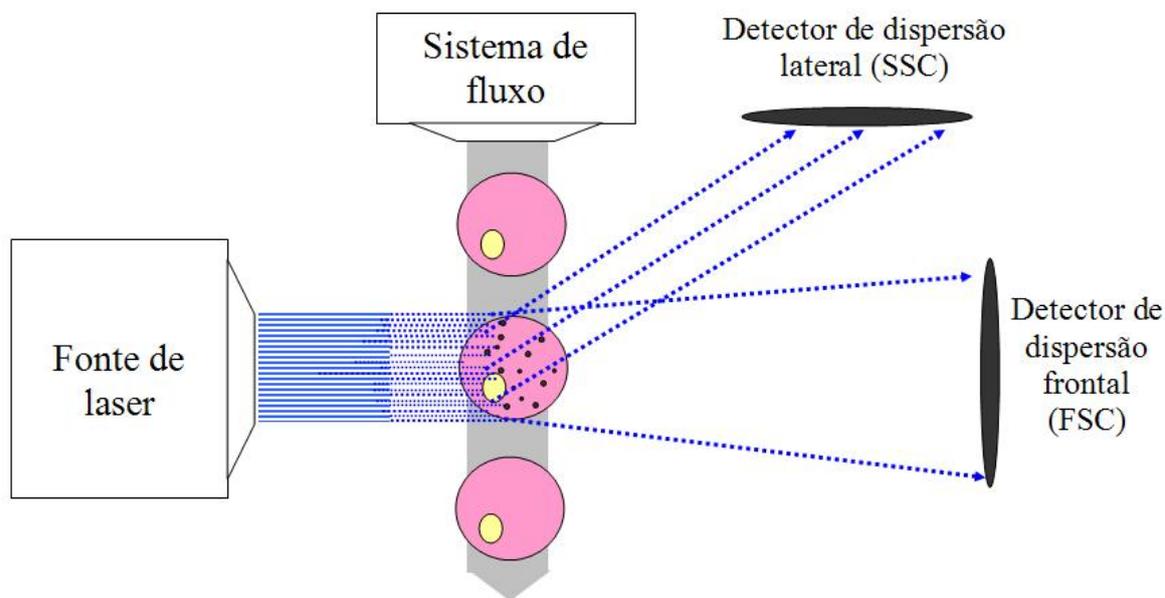


Figura 5 – Captação da luz dispersa por detectores, frontal (FSC) e lateral (SSC)

O detector de dispersão frontal (*Forward Scatter Channel* ou FSC) é um fotodiodo que coleta os sinais fortes dos raios dispersos em ângulos estreitos em relação ao eixo do laser, que são proporcionais ao tamanho da célula. O detector de dispersão lateral (*Side Scatter Channel* ou SSC) é um tipo de fotodetector mais sensível, o qual é denominado fotomultiplicadora, que coleta e amplifica os sinais fracos dos raios dispersos lateralmente, os quais são proporcionais à complexidade interna da célula (BACAL; FAULHABER, 2003; INTRODUCTION, 2000).

Correlacionando as medidas de tamanho (FSC) e complexidade (SSC), é possível diferenciar os vários tipos celulares presentes em uma amostra heterogênea. Na Figura 6 pode-se visualizar a distribuição normal da população de células do sangue periférico (hemácias, linfócitos, granulócitos e monócitos).

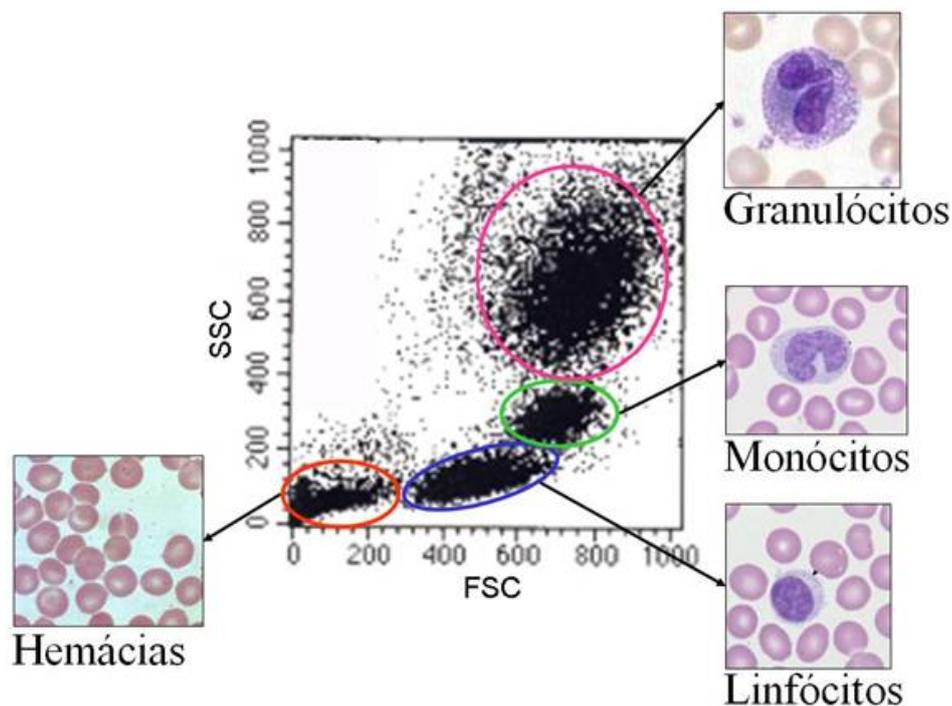


Figura 6 – Distribuição normal das populações celulares presentes no sangue periférico humano, diferenciadas quanto ao tamanho (FSC) e complexidade celular (SSC)

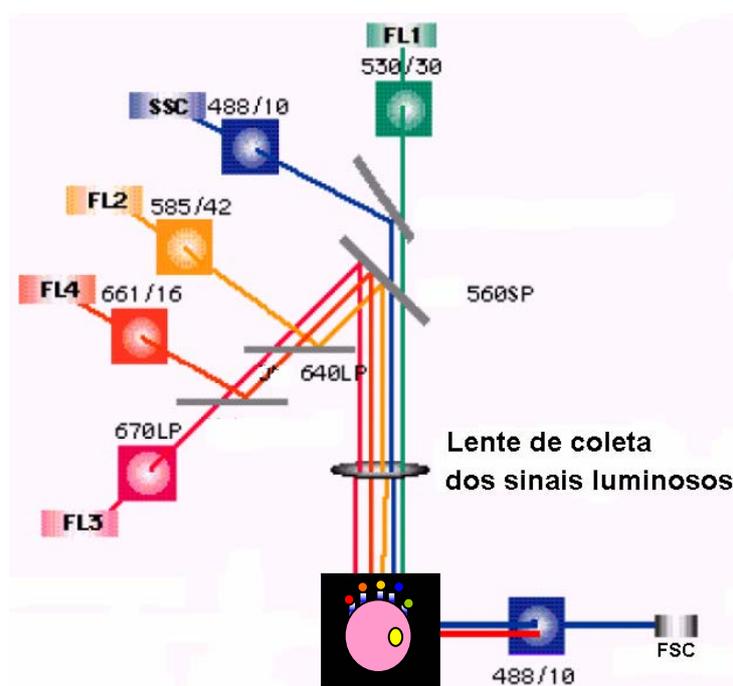
A visualização desta distribuição torna mais fácil a realização de análises subseqüentes, como a correlação da expressão antigênica a uma determinada subpopulação presente em uma amostra heterogênea. A delimitação de uma população pode ser feita com o emprego de um limite gráfico denominado *gate* (BECTON AND DICKINSON COMPANY, 2000).

A marcação das células em análise com fluorocromos permite a identificação de populações distintas, presentes em uma mistura complexa, de acordo com os antígenos que elas expressam. Além disso, se a fluorescência advém de um composto pelo qual a célula apresenta afinidade, a exemplo de drogas ou corantes, é possível investigar também a distribuição intracelular do composto (SWITZER; GARRITY, 1999).

Quando o laser incide sobre o fluorocromo, sua energia é absorvida e leva os elétrons da molécula a um estado de excitação. Após certo tempo, quando a estabilidade é reobtida por retorno dos elétrons ao estado inicial, há a emissão de um fóton de luz, caracterizando a fluorescência. Cada fluorocromo possui um espectro de

absorção e emissão, que são limitados a uma estreita faixa (BUSHONG, 1997; INTRODUCTION, 2000).

No sistema óptico, os sinais luminosos emitidos são coletados por lentes e direcionados para um sistema de espelhos ópticos e filtros que permite a passagem de uma estreita faixa de comprimento de onda e direciona cada sinal de fluorescência (FL) até seu detector específico, como ilustrado na Figura 7, para análise de cada parâmetro separadamente (INTRODUCTION, 2000).



FL: fluorescência; FSC (*forward scatter*): detector de dispersão frontal; LP (*longpass*): filtro que permite a passagem de um comprimento de onda maior que o especificado; SP (*shortpass*): filtro que permite a passagem de um comprimento de onda menor que o especificado; SSC (*side scatter*): detector de dispersão lateral

Figura 7 – Diagrama dos filtros e detectores do sistema óptico (modificado de INTRODUCTION, 2000)

A quantidade e intensidade de fluorescência por cada célula da população fornecem informações sobre a reação positiva para cada anticorpo ou corante. A marcação simultânea das células com diferentes fluorocromos facilita o trabalho técnico de detecção e quantificação de vários antígenos co-expressos, o que permite a correlação

de várias informações relativas a uma célula (INTRODUCTION, 2000; BACAL; FAULHABER, 2003).

No sistema eletrônico, todos os sinais detectados são convertidos proporcionalmente em sinais eletrônicos, que são processados, coletados e armazenados no sistema computacional sob a forma de gráficos ou números (INTRODUCTION, 2000).

2.5.2 Expressão da glicoproteína-P

A detecção da presença da gp-P na membrana celular pode ser feita através de métodos imunológicos. Alguns dos anticorpos com afinidade específica para esta proteína são listados na Tabela 2 (SWITZER; GARRITY, 1999; BACAL; FAULHABER, 2003).

Tabela 2 – Anticorpos empregados na pesquisa imunológica da glicoproteína-P

Anticorpo anti-glicoproteína-P	Porção detectada da glicoproteína-P
C219	Epítipo intracelular carboxi-terminal
C494	Epítipo extracelular
JSB-1	Epítipo intracelular
4E3*	Epítipo extracelular
MRK-16*	Epítipo extracelular
HYB-241*	Epítipo extracelular
HYB-612*	Epítipo extracelular
UIC-2*	Epítipo extracelular

(modificado de BECK et al., 1996; KRISHAN et al., 1997)

Na detecção da expressão da gp-P, é recomendada a utilização de anticorpos que reconheçam o epítipo extracelular (BECK et al., 1996; KRISHAN et al., 1997).

A quantificação da gp-P na superfície celular não fornece informações funcionais sobre esta proteína (KRISHAN et al., 1997; KRUTZIK et al., 2004). Entretanto, estudos

sugerem que há uma forte correlação inversa entre os níveis de expressão da gp-P e a retenção de corantes fluorescentes, de forma que a expressão da gp-P poderia ser inferida através da análise funcional desta proteína (CHAUDHARY et al., 1992).

2.5.3 Atividade da glicoproteína-P

O estudo da atividade da gp-P pode ser feito utilizando uma técnica de eficácia comprovada, alta reprodutibilidade e sensibilidade denominada análise funcional (CHAUDARY et al., 1992; VASCONCELOS et al., 2006).

Esta técnica baseia-se na avaliação do grau de efluxo pós-captação de corantes ou drogas fluorescentes que sejam substratos da gp-P, utilizando a citometria de fluxo. Estas moléculas são transportadas para o interior da célula, mas como se trata de substratos da gp-P, são reconhecidas e bombeadas para fora da célula, de forma que a retenção do substrato é inversamente correlacionada à atividade da gp-P (CHAUDARY et al., 1992; VASCONCELOS et al., 2006).

Os corantes fornecem estimativas funcionais melhores que as drogas, provavelmente por apresentarem uma cinética mais favorável, já que muitas drogas precisam ser metabolizadas antes de serem reconhecidas. Dentre os vários fluorocromos substratos da gp-P, a rodamina 123 (*rhodamine 123* – Rh123) é considerada o padrão ouro para detecção do fenótipo funcional, sendo o substrato mais específico para a gp-P (BECK et al., 1996; VASCONCELOS et al., 2006).

A Rh123 é um corante catiônico lipofílico que fluoresce em verde quando estimulado pelo laser argônio. O influxo e efluxo deste corante, que se incorpora na mitocôndria de células vivas, ocorrem de forma rápida, fornecendo alta sensibilidade à técnica (VASCONCELOS et al., 2006; WANG et al., 2006).

É preferível que a medida do efluxo do substrato seja feita em presença e ausência de um modulador da gp-P, pois a análise da inibição da gp-P garante que o efluxo detectado nas amostras “não-inibidas” seja resultante da atividade da gp-P nas células, e

não da incorporação incompleta do substrato, o que aumenta a confiabilidade das informações acerca do efluxo (DRACH et al., 1992). O modulador mais indicado para análise funcional é o verapamil (VPM), que inibe o efluxo de Rh123 de forma não competitiva (WANG et al., 2006).

Como a atividade da gp-P pode ser investigada em diversas células do corpo humano, a marcação simultânea das células avaliadas funcionalmente com anticorpos monoclonais permite identificar a atividade da gp-P nas diferentes subpopulações celulares ou até mesmo a análise simultânea da atividade e expressão da gp-P (KRISHAN et al., 1997; BACAL; FAULHABER, 2003).

Nos linfócitos normais do sangue periférico, a atividade da gp-P varia de indivíduo para indivíduo, mas pode ser detectada em todas as subpopulações. Em geral, observa-se uma atividade nos linfócitos NK maior que nos linfócitos T ($CD8 > CD4$), que por sua vez apresenta-se maior que nos linfócitos B (COON et al., 1991; CHAUDARY et al., 1992; DRACH et al., 1992; MACHADO et al., 2003).

Diante das informações apresentadas, a obtenção de dados acerca da interação da radiação ionizante com a gp-P é importante para avaliar a eficácia do tratamento de tumores onde a RT seja utilizada antes da QT. A maioria dos trabalhos encontrados na literatura investiga os efeitos da radiação sobre a expressão da gp-P, mas pouco se sabe sobre possíveis efeitos em sua atividade.

Nesse contexto, o objetivo principal desta pesquisa foi a padronização de um protocolo metodológico para avaliar a influência da radiação ionizante na atividade da gp-P. Nesta investigação, os linfócitos do sangue periférico foram utilizados como modelo biológico, e a técnica do ensaio da Rh123 – que utiliza a citometria de fluxo, como ferramenta metodológica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

No intuito de padronizar um protocolo para avaliar a influência da radiação ionizante na atividade da gp-P, foram utilizadas amostras de sangue periférico coletadas de indivíduos hígidos. As amostras foram irradiadas *in vitro*, mantendo-se uma amostra não-irradiada como controle. Todas as amostras foram processadas para separação dos leucócitos.

O teste funcional da gp-P nos linfócitos foi realizado por citometria de fluxo através do ensaio do efluxo do corante fluorescente Rh123, com inibição do efluxo com VPM. Neste estudo, a investigação da atividade da gp-P foi restrita aos linfócitos T, que correspondem à subpopulação linfocitária mais representativa, quantitativamente (65 a 80 %), e que são alvo de muitos compostos reconhecidos pela gp-P (MARZOLINI et al., 2004; ABBAS; LICHTMAN, 2005; VALENSI, 2005).

3.1 Aspectos éticos

A pesquisa foi realizada com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE) (parecer nº 52/07, Anexo 1).

Após serem instruídos quanto ao objetivo da pesquisa e aos procedimentos previstos a serem realizados, os indivíduos em concordância assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice 1), permitindo a coleta da amostra sanguínea e a utilização dos dados obtidos no estudo como instrumento de divulgação científica.

3.2 Escolha da casuística

3.2.1 Critérios de seleção e inclusão

- Ser do sexo feminino (embora não haja relatos de variações quanto ao sexo, foram estudados apenas indivíduos do sexo feminino como forma de uniformizar os dados);
- Estar dentro da faixa de idade entre 20 e 40 anos (nos linfócitos T do sangue periférico, a atividade diminui com a idade. Não há diferenças significantes dentro da faixa escolhida) (MACHADO et al., 2003);
- Ser um indivíduo hígido, sem conhecimento de patologias no período da coleta das amostras;
- Estar fora de uso de medicação que possa aumentar a atividade da gp-P (MARZOLINI et al., 2004);
- Assinar o termo de consentimento livre e esclarecido para autorizar sua participação na pesquisa.

3.2.2 Critérios de exclusão

- Ser do sexo masculino;
- Estar fora da faixa de idade estabelecida para este estudo;
- Apresentar alguma patologia;
- Estar em uso de medicação que possa alterar a atividade da gp-P;
- Recusar-se em participar da pesquisa.

Com base nestes critérios, a casuística consistiu em 05 indivíduos (para manter o anonimato dos participantes, a identificação dos mesmos foi feita através de letras): **A** (36 anos); **B** (22 anos); **C** (28 anos); **D** (24 anos) e **E** (25 anos).

3.3 Coleta e separação das amostras

Um formulário padronizado para este estudo (Apêndice 2) foi utilizado para o acompanhamento de todos os procedimentos técnicos realizados.

As coletas das amostras sanguíneas foram realizadas no HEMOPE, obedecendo aos procedimentos de biossegurança. Após assepsia do local com álcool a 70 %, 30 mL de sangue periférico foram colhidos em ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), por punção venosa. O EDTA é o anticoagulante de escolha nas análises por citometria de fluxo (BACAL; FAULHABER, 2003).

A amostra total coletada foi dividida em 3 alíquotas de 10 mL. Uma alíquota não foi irradiada, sendo considerada como o controle negativo para a condição de exposição à radiação. As outras duas amostras foram submetidas à irradiação, com doses diferentes. A Figura 8 ilustra o fluxograma desta separação da amostra.

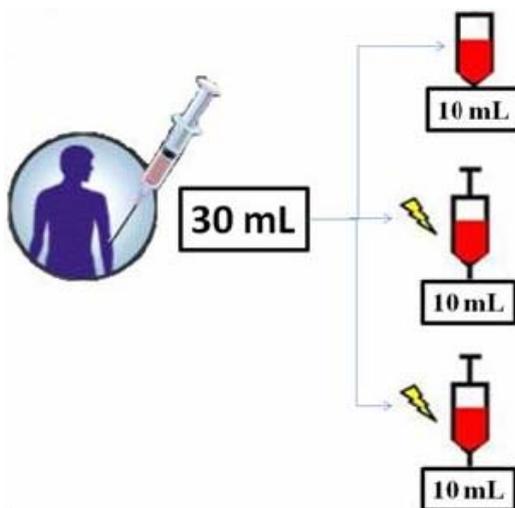


Figura 8 - Fluxograma de coleta e separação das amostras

Foram retiradas alíquotas de 500 μL da amostra controle para obtenção do número de linfócitos em contador eletrônico automático (Coulter T-890, Coulter Corporation, Florida, USA), visando à constatação na normalidade quantitativa destas células.

Confirmada esta normalidade, as seringas contendo as amostras a serem irradiadas foram acondicionadas à temperatura ambiente em recipiente térmico e encaminhadas para a irradiação.

3.4 Irradiação das amostras

A irradiação das amostras foi realizada no Centro de Radioterapia de Pernambuco (CERAPE), utilizando radiação gama originada de uma bomba de Cobalto-60 (*THERATRON 780, Atomic Energy of Canada Limited*), cuja taxa de exposição foi de $251 \text{ cGy} \cdot \text{min}^{-1}$ no período em que as amostras foram irradiadas.

3.4.1 Escolha das doses

A escolha das doses a serem empregadas neste experimento foi baseada nas doses administradas para tratamento de tumores humanos, que podem variar de paciente para paciente segundo fatores como tamanho e tipo do tumor, radiosensibilidade e condição geral do indivíduo (HALL, 2000).

A dose 1 foi estabelecida com base no limite máximo anual recomendado para trabalhadores ocupacionalmente expostos à radiação ionizante, estabelecido pela Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN 3.01, 1988), de 50 mSv (miliSieverts⁸). Optou-se por administrar uma dose dez vezes maior que este limite, que corresponde à dose absorvida de **0,5 Grays (Gy⁹)**, para a radiação gama¹⁰ (ICRP 60, 1990).

⁸ Sievert (Sv): unidade especial para dose equivalente. $1 \text{ Sv} = 1 \text{ J} \cdot \text{kg}^{-1}$; $1 \text{ Sv} = 1.000 \text{ mSv}$

⁹ Gray (Gy): unidade do Sistema Internacional de Unidades (SI) para dose absorvida. $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J} \cdot \text{kg}^{-1}$

¹⁰ Conversão dose equivalente \rightarrow dose absorvida: dose efetiva vezes fator de ponderação (fator numérico adimensional cujo valor varia de acordo com a capacidade de cada tipo de radiação de induzir determinado efeito biológico). Para radiação gama, o fator de ponderação é igual a 1.

A dose 2 foi estabelecida com base na faixa de dose onde indivíduos expostos de forma aguda à radiação ionizante apresentam alterações hematológicas (redução na contagem de glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas: 2 a 10 Gy) (BUSHONG, 1997). Dentro desta faixa, foi escolhida a dose de **2,0 Gy**, que é compatível com a sobrevivência celular *in vitro* (doses maiores que 4 Gy podem inviabilizar as células a serem estudadas sob estas condições).

3.4.2 Processo de irradiação das amostras

O processo de irradiação das amostras, ilustrado na Figura 9, foi realizado utilizando um bloco construído pelo Grupo de Estudos em Radioproteção e Radioecologia (GERAR – DEN – UFPE) para fins de simulação das interações da radiação ionizante com o sistema biológico *in vivo* através da irradiação de pequenas amostras.

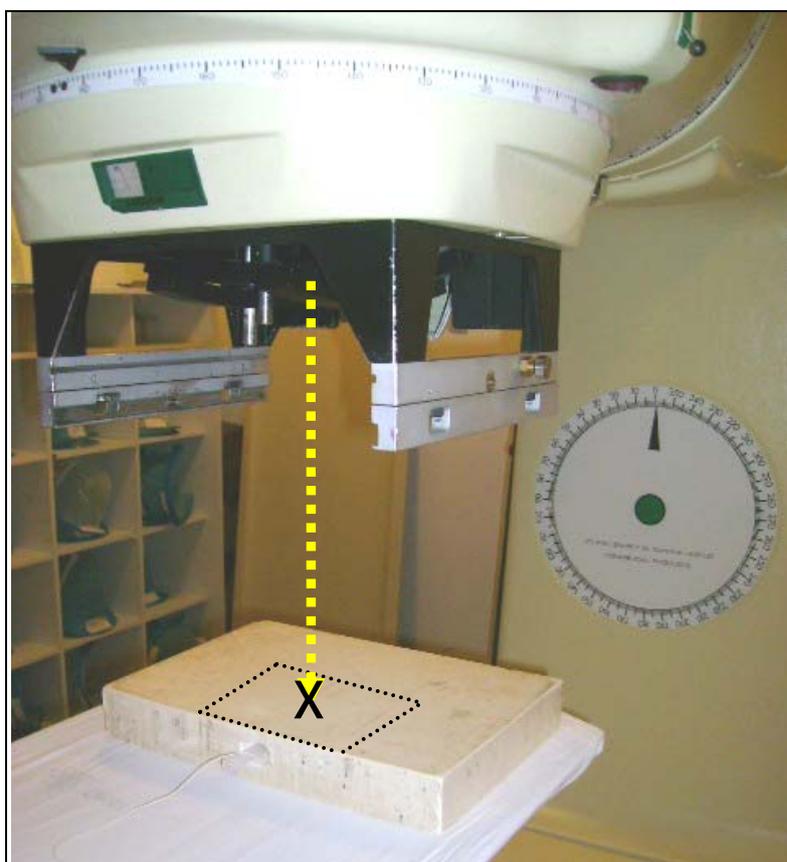


Figura 9 - Irradiação das amostras em uma bomba de Cobalto-60

Construído em Mix-D¹¹ (um material com densidade equivale à do tecido mole humano; $\rho = 0,99 \text{ g.cm}^{-3}$), o bloco possui um orifício lateral por onde deve ser introduzida uma seringa plástica de 10 mL (seringa padrão: Becton Dickinson). Um campo de irradiação de dimensões $15 \times 15 \text{ cm}^2$ traçado em sua face superior (representado pela forma pontilhada) foi modelado de forma que seu ponto central (apontado pelo “X”) corresponde ao local onde a fonte irradiadora deve ser posicionada a uma distância de 80 cm. Este ponto coincide com o centro da seringa, e o conjunto destes fatores garante uma irradiação homogênea da amostra contida no interior do bloco.

As seringas contendo as amostras foram introduzidas, uma por vez, no bloco de Mix-D e, submetidas à irradiação com as respectivas doses (0,5 e 2,0 Gy). Cada amostra foi identificada com a dose recebida e as seringas foram encaminhadas, à temperatura ambiente em recipiente térmico, ao Laboratório de Imunofenotipagem, que pertence à Unidade de Laboratórios Especializados (UNILABE) do HEMOPE.

Para a realização do estudo da atividade da gp-P, é necessário que o intervalo máximo entre a coleta e a realização da técnica fosse de, no máximo, 24 horas, e este tempo foi obedecido (tempo máximo: 3 horas).

Antes do início da manipulação das amostras, foram retiradas alíquotas de 500 μL de cada seringa para obtenção da contagem de linfócitos. Os procedimentos técnicos subsequentes foram realizados da mesma forma e ao mesmo tempo, tanto nas amostras controle quanto nas amostras irradiadas.

3.5 Obtenção de células mononucleares

A separação celular em fases por gradiente de densidade utilizando Ficoll é uma técnica amplamente empregada para a separação dos leucócitos das outras células contidas na amostra sanguínea, o que facilita o isolamento dos linfócitos *in vitro*.

¹¹ Material esbranquiçado, sólido e quebradiço, composto de 77,8% de carbono, 13,4% de hidrogênio, 3,5% de oxigênio, 3% de magnésio e 1,4% de titânio.

Após a retirada da alíquota, cada amostra foi diluída em partes iguais com solução tamponada com fosfato (*phosphate-buffered saline* – PBS¹²), homogeneizada e, utilizando uma pipeta Pasteur plástica, foi distribuída em tubos contendo Ficoll (densidade < 1,077 g/mL; GE Healthcare, Sweden), na proporção 3:1. Para otimizar a separação celular, esta distribuição foi realizada lentamente, pelas paredes, para evitar mistura do sangue com o Ficoll.

Os tubos foram centrifugados a 400 x g, durante 20 minutos, à temperatura ambiente, em centrífuga comum (Z513K, Hermle Labortechnik, Germany). Este procedimento possibilita uma migração diferencial das células por densidade, formando camadas. A Figura 10 ilustra, de forma esquemática, a distribuição das diferentes camadas formadas após a centrifugação de uma amostra de sangue periférico.

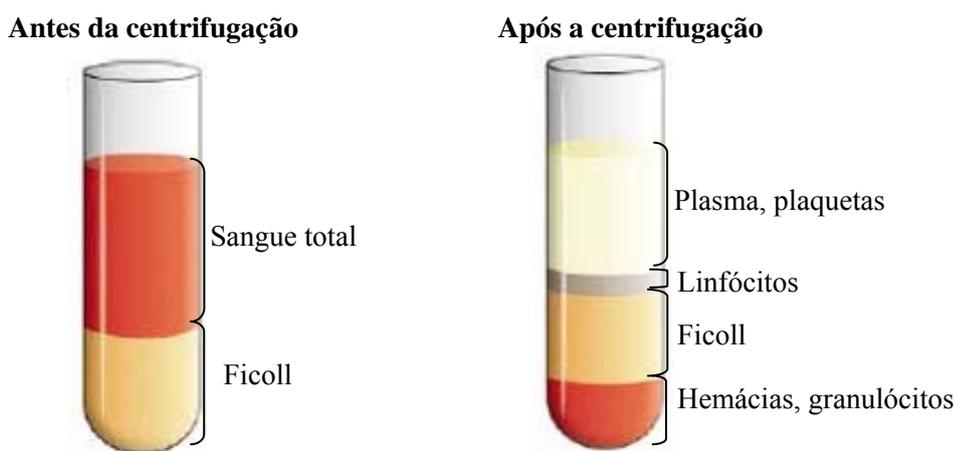


Figura 10 – Separação celular de amostra sanguínea por gradiente de densidade em Ficoll (<http://www.ebiotrade.com/newsf/pic/20051020104525.jpg>)

Devido à sua baixa densidade, os linfócitos são encontrados no anel formado na interface entre o plasma e o Ficoll, denominado anel leucocitário, que foi coletado cuidadosamente com pipeta Pasteur e transferido para um tubo cônico plástico com capacidade total de 14 mL, onde foi submetido a lavagens para retirada de resíduos de plaquetas, Ficoll e plasma.

¹² PBS: solução salina isotônica (concentração igual à do corpo humano) amplamente utilizada na diluição de substâncias e em lavagens celulares por não alterar o pH das soluções (solução tampão) e não apresentar toxicidade às células em uma suspensão.

3.5.1 Lavagem das células e obtenção da suspensão celular

Foi adicionado PBS simples ao tubo cônico contendo os leucócitos até cerca da metade da capacidade total do tubo. O tubo foi homogeneizado em vórtex e, após adição de PBS até a capacidade total do tubo e nova homogeneização, o material foi submetido à centrifugação a 1.427 x g durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o tubo tampado foi agitado para que o precipitado celular fosse desfeito. Este procedimento de lavagem foi repetido mais duas vezes, sob condições de centrifugação de 400 x g durante 10 minutos.

Após descarte do sobrenadante, o precipitado celular foi desfeito por agitação vigorosa e ressuspenso em 1 mL de meio de cultura RPMI-1640 (Cultilab, Campinas, BR) contendo L-glutamina (aminoácido nutriente), bicarbonato de sódio (eleva pH do meio), hepes (tampão orgânico) e gamicina (antibiótico) e suplementado com 5 % de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab, Campinas, BR) estéril e inativado (RPMI + SBF 5%).

A suspensão foi levada ao contador eletrônico automático para aferição da concentração celular (número absoluto de leucócitos), cujo valor ideal é de 5×10^6 células/mL. Quando necessário, foram realizados ajustes (diluições) do concentrado até a obtenção da concentração ideal.

3.6 Teste funcional da glicoproteína-P

A avaliação da atividade da gp-P foi realizada de acordo com a técnica descrita por Chaudhary e colaboradores (1992) e , que se baseia na análise do efluxo do corante fluorescente rodamina 123 (Rh123) na presença e ausência de um inibidor específico da gp-P, o verapamil (VPM), utilizando a citometria de fluxo (CHAUDHARY et al., 1992; PÉTRIZ; GARCÍA-LÓPEZ, 1997).

Considerado que variáveis como a citotoxicidade da Rh123 e o efeito do modulador da gp-P pode alterar a resolução das medidas de efluxo (PÉTRIZ; GARCÍA-LÓPEZ, 1997; WANG et al., 2006), os procedimentos foram realizados de forma cuidadosa, sempre atentando para os tempos de incubação e temperatura ideal de ação dos reagentes.

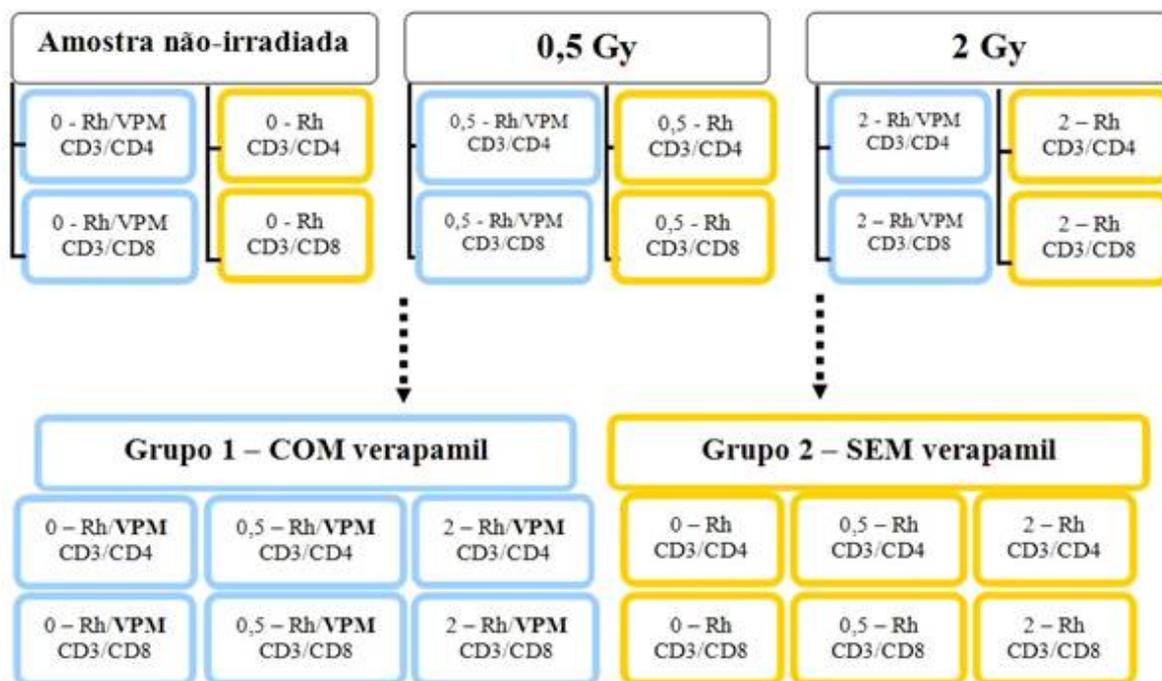
3.6.1 Ensaio da rodamina 123

Para o ensaio da Rh123 foram utilizados doze tubos Falcon (Becton-Dickinson), quatro para cada amostra (não irradiada; irradiada com 0,5 Gy; irradiada com 2,0 Gy). Em cada tubo, foram incubados 100 μ L da devida suspensão celular com 2 mL de uma solução de Rh123 (Sigma-R8007) a 200 ng/mL (preparada em RPMI + SBF 5 % e mantida ao abrigo da luz para evitar perda da fluorescência por excitação prévia do corante).

Após incubação em banho-maria a 37 °C, ao abrigo da luz, durante 20 minutos, o material foi submetido à centrifugação a 700 x g durante 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado, desfeito por agitação. Para retirar o excesso de Rh123 presente na amostra, foi realizada uma lavagem com 2 mL de RPMI + SBF 5 % por centrifugação a 700 x g durante 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado, novamente desfeito por agitação.

3.6.2 Inibição com verapamil

Para que a análise da atividade da gp-P fosse realizada de forma confiável, o experimento foi dividido em dois grupos. Um grupo seguiu sem inibição com VPM, para detecção do efluxo da Rh123, e o outro foi incubado com VPM, para aferição do efluxo mínimo. A Figura 11 apresenta de forma esquematizada esta divisão do experimento, com a devida identificação dos reagentes empregados.



*Rh: rodamina123; VPM: verapamil

Figura 11 - Esquema da separação dos grupos para incubação com ou sem verapamil

No ensaio para o grupo 1, os tubos foram colocados em banho de gelo e receberam 2 mL de solução de RPMI + SBF 5 % mais VPM (Sigma-V4629) a 0,2 mg/mL a 8 °C. Após homogeneização em agitador vórtex, os tubos foram incubados, ainda em banho de gelo, a 8 °C (temperatura de geladeira) ao abrigo da luz, durante 1 hora e 30 minutos. O tubo contendo a solução de VPM deve ser mantido em banho de gelo durante todo o tempo do experimento, pois a temperatura de manutenção e ação do VPM é em torno de 8°C.

No ensaio para o grupo 2, os tubos receberam 2 ml de solução de RPMI + SBF 5 % e, após homogeneização em agitador vórtex, foram incubados em banho-maria a 37 °C, ao abrigo da luz, durante 1 hora e 30 minutos.

Após a incubação, todos os tubos (grupos 1 e 2) foram centrifugados a 700 x g durante 5 minutos em centrífuga refrigerada (8 °C). O sobrenadante foi desprezado e o precipitado, desfeito por agitação. Para os procedimentos subsequentes, os tubos foram mantidos em gelo e as centrifugações, realizadas em centrífuga refrigerada.

3.6.3 Identificação das subpopulações linfocitárias T

A identificação dos linfócitos T foi realizada através da marcação dos antígenos de superfície com anticorpos monoclonais. A Tabela 3 apresenta os anticorpos que foram utilizados neste estudo para identificação específica da população de linfócitos T e, nesta população, as subpopulações T auxiliares e citotóxicos.

Tabela 3 – Anticorpos monoclonais utilizados na identificação dos linfócitos T

Anticorpo	Fluorocromo	Marcação	Fonte comercial
CD3	PE-Cy5.5*	Todos os linfócitos T	FK Biotecnologia
CD4	PE**	Linfócitos T auxiliares	Becton Dickinson
CD8	PE**	Linfócitos T citotóxicos	Immunotech

*PE-Cy5.5: sistema de conjugados tandem que combina ficoeritrina (PE) e cianina, $\lambda_{\text{emissão}} = 675 \text{ nm}$

**PE: ficoeritrina, $\lambda_{\text{emissão}} = 570 \text{ nm}$

A diluição ótima para as aplicações foi de 10 μL para cada 10^6 células. Assim, de acordo com a identificação inscrita, cada tubo recebeu 5 μL do anticorpo monoclonal anti-CD3 PE-Cy5.5 e 5 μL do anti-CD4 PE ou do anti-CD8 PE. Os tubos foram homogeneizados em agitador vórtex e incubados ao abrigo da luz, em banho de gelo, a 8 °C, por 20 minutos.

O excesso de anticorpo e as ligações inespecíficas foram retirados após lavagem com 2 mL de RPMI + SBF 5 % com VPM, por centrifugação em centrífuga refrigerada (8 °C) a 700 x g durante 5 minutos.

O sobrenadante foi desprezado e o precipitado celular, após ser desfeito por agitação, foi ressuspenso com 1 mL da solução de RPMI + SBF 5 % com VPM. Depois de homogeneizado em vórtex, o material foi submetido à aquisição e análise em citômetro de fluxo.

3.6.4 Aquisição e análise dos dados em citômetro de fluxo

A leitura das amostras foram realizadas no Laboratório de Imunofenotipagem – UNILABE – HEMOPE, em citômetro de fluxo tipo *FACSCalibur*TM (Becton-Dickinson, San Jose, Ca, USA) equipado com laser argônio. A aquisição e análise (tratamento) dos dados foram realizadas empregando o software *Cell Quest*TM versão 3.1 (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA).

3.6.4.1 Parâmetros de aquisição

Em cada análise, 50.000 eventos foram adquiridos. Estes eventos foram analisados segundo os parâmetros de tamanho e complexidade celular e positividade para os anticorpos utilizados, sendo apresentados como pontos dispersos em gráficos bidimensionais (*dot plots*) como os ilustrados na Figura 12.

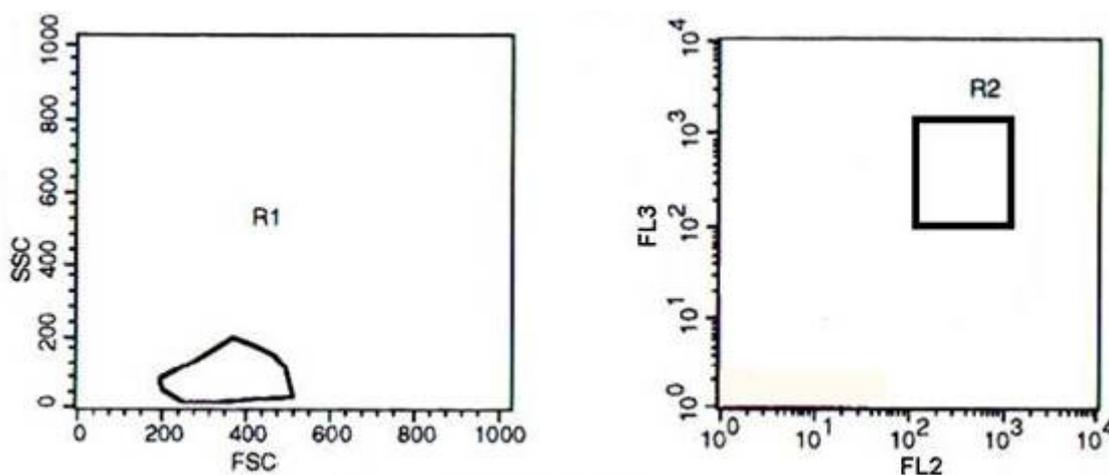


Figura 12 – *Dot plots* com *gates* delimitando as populações de interesse

Para tornar as aquisições ainda mais fáceis e específicas, *gates* foram utilizadas para delimitar populações específicas. Na análise relacionando os parâmetros de tamanho (FSC) e complexidade celular (SSC), uma *gate* (R1) foi delimitada na região correspondente aos linfócitos.

A partir dos eventos delimitados em R1, foi realizada a análise relacionando a positividade para os anticorpos específicos marcados com PE (FL2) e PE-Cy5.5 (FL3), que foram visualizados em um segundo gráfico. Uma *gate* (R2) foi delimitada para selecionar apenas a subpopulação linfocitária positiva para as duas fluorescências, ou seja, a subpopulação T CD4⁺ ou T CD8⁺ presente na região R1. Um resumo dos dados quantitativos relativos aos eventos representados nos gráficos é fornecido pelo sistema.

Após a delimitação da subpopulação de interesse em R2, foram adquiridas as leituras da fluorescência verde da Rh123 ($\lambda_{\text{emissão}} = 534 \text{ nm}$) em FL1. Os resultados foram analisados quanto à porcentagem e quanto aos valores do índice médio de fluorescência (IMF).

3.6.4.2 Análise por porcentagem

A dinâmica de fluxo foi visualizada em *dot plots* bidimensionais onde a fluorescência da Rh123 foi representada no eixo *x* e a fluorescência do marcador PE, no eixo *y*. Cada *dot plot* foi dividido em quatro quadrantes, como o visualizado na Figura 13.

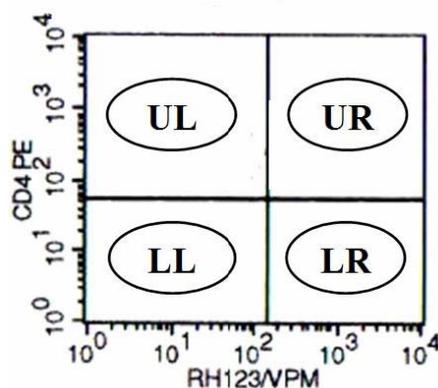


Figura 13 – *Dot plot* bidimensional dividido em quatro quadrantes

No quadrante LL (*Low Left* - inferior e à esquerda) foi representada a população de células negativas para ambos os parâmetros. Nos quadrantes LR (*Low Right* - inferior e à

direita) e UL (*Up Left* - superior e à esquerda) foram representadas as populações celulares positivas para apenas um parâmetro, representado no eixo x ou y , respectivamente. A população celular positiva para ambos os parâmetros foi representada no quadrante UR (*Up Right* - superior e à direita).

Para análise da dinâmica do efluxo de Rh123, apenas os quadrantes superiores (UL e UR) foram considerados, pois não interessam os eventos não relacionados à subpopulação que se quer estudar, representada no eixo y .

3.6.4.3 Análise por índice médio de fluorescência

Em situações de caráter funcional, o IMF é empregado como medida da concentração intracelular média do reagente de toda a amostra.

O cálculo do IMF para teste funcional do efluxo de Rh123 \pm modulador para a gp-P foi feito com base nas recomendações do "*French Drug Resistance Network*", onde o IMF é a relação aritmética entre a intensidade média de fluorescência da suspensão celular com Rh123 e VPM e um valor similar estimado na suspensão celular só com Rh123 (MARIE et al., 1997).

3.7 Análise estatística

A estatística descritiva foi utilizada para obtenção dos valores da média e desvio padrão de cada grupo analisado (controle, irradiado com 0.5 Gy e irradiado com 2.0 Gy).

Diferenças estatisticamente significantes entre os grupos foram analisadas usando o teste não-paramétrico U de Mann-Whitney com nível de significância de 5%, confirmadas pela análise da variância (ANOVA). Para tanto, utilizou-se o programa BioEstat 5.0 na análise estatística dos dados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Contagem de linfócitos

Um dos critérios utilizados para a definição do indivíduo hígido foi a contagem normal de linfócitos na amostra controle. Os valores absolutos obtidos nesta contagem estão apresentados na Tabela 4, por indivíduo.

Tabela 4 – Contagem de linfócitos (valor absoluto) nas amostras controle

Indivíduo	Linfócitos/mm ³
A	1.400
B	1.900
C	2.150
D	2.710
E	1.690

A faixa padrão de linfócitos para indivíduos hígidos, segundo a IAEA (2001) e Zago e colaboradores (2004), é de 1.300 a 4.800/mm³. A faixa de normalidade do equipamento utilizado (Coulter T-890) é de 600 a 3.400/mm³. Como pode ser observado na Tabela 4, os níveis de concentração de linfócitos nos indivíduos estudados apresentaram-se dentro dos valores padrões, confirmando os indivíduos participantes como sujeitos hígidos.

5.2 Delimitação das subpopulações linfocitárias T

A Figura 14 ilustra os gráficos obtidos nas análises por citometria de fluxo para delimitação de cada subpopulação linfocitária T, que também é apresentada numericamente.

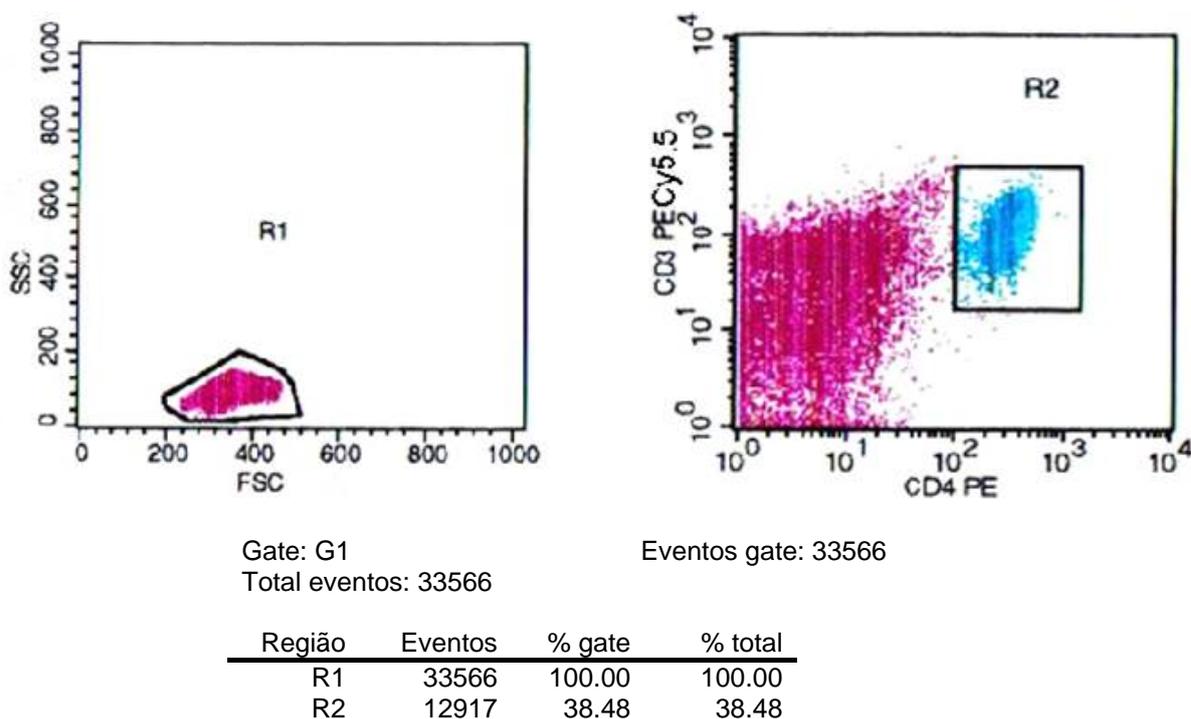


Figura 14 – Apresentação gráfica e numérica dos eventos relativos aos linfócitos (em R1) e a cada subpopulação de interesse (em R2)

Considerando que os eventos em R2 foram obtidos a partir de R1, os valores dos eventos em R2 correspondem a quanto dos linfócitos totais corresponde à subpopulação de interesse. Os valores numéricos correspondentes a estes eventos estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Linfócitos CD4 e CD8 nas amostras controle e irradiadas

Dose (Gy)	Linfócitos CD4 (%)	Linfócitos CD8 (%)
	\bar{X} *	\bar{X} *
	Mín – Máx**	Mín – Máx**
Controle	42,34	24,13
	40,32 – 46,99	16,28 – 30,49
0,5	41,24	24,14
	38,80 – 46,96	15,03 – 31,08
2,0	39,45	22,95
	33,77 – 42,71	15,11 – 28,76

*Média; **Mín = mínimo; Máx=máximo

Em condições normais, a relação entre as subpopulações T CD4 e CD8 é de aproximadamente 2:1 (MACHADO, 2002; ZAGO et al., 2004). Os resultados obtidos foram compatíveis com estes dados obtidos da literatura, confirmando que a população delimitada nas *gates* corresponde às subpopulações de interesse.

5.3 Atividade da glicoproteína-P nas subpopulações T

A Figura 15 exemplifica a localização dos eventos adquiridos a partir da análise de amostras incubadas com Rh123 e VPM.

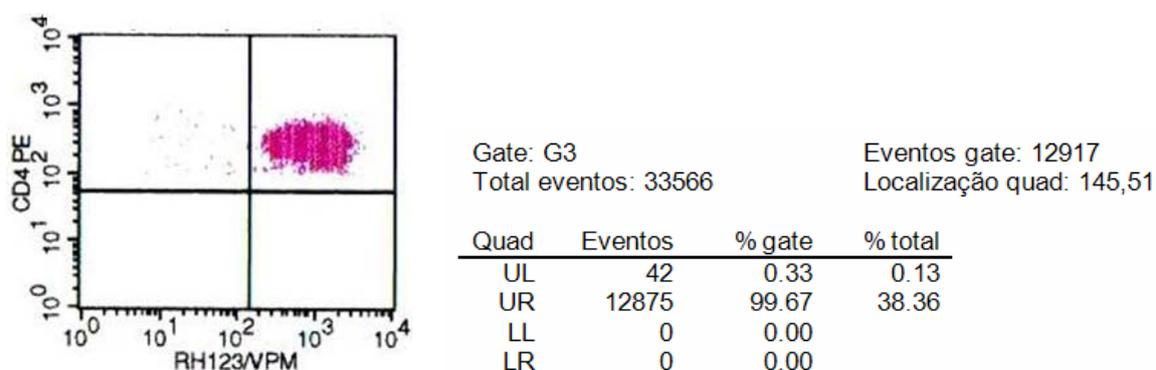


Figura 15 – Dot plot bidimensional ilustrando ausência de efluxo de Rh123 na subpopulação linfocitária CD4 em amostra incubada com VPM

A inibição do efluxo pelo VPM retém a Rh123 no interior da célula, e o sistema identifica a positividade para a Rh123 na subpopulação de interesse, ilustrando estes eventos no quadrante superior e à direita.

As análises destas amostras evidenciaram a incorporação da Rh123 pela célula, garantindo que os eventos identificados como efluxo da Rh123 quando a amostra foi incubada em ausência de VPM são decorrentes da atividade da gp-P. Os dados relativos a esta primeira análise foram utilizados também para posterior cálculo do IMF.

A Figura 16 ilustra a dinâmica visualizada nas amostras incubadas apenas com Rh123.

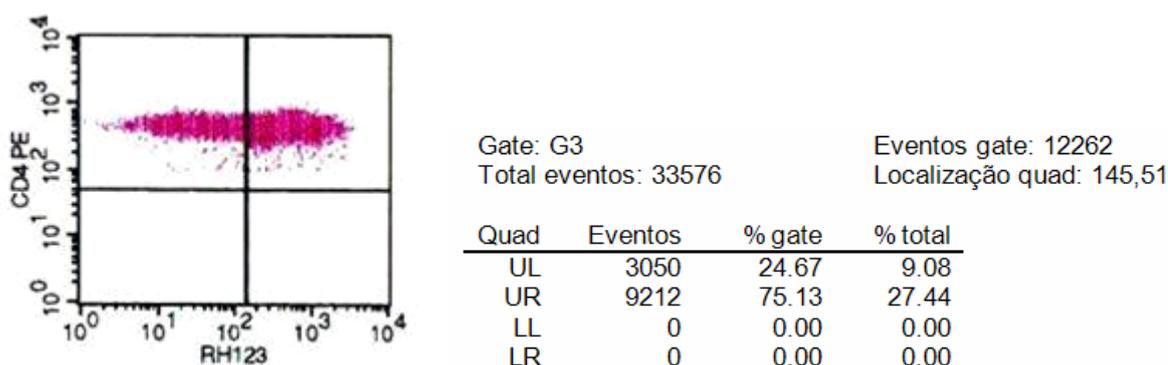
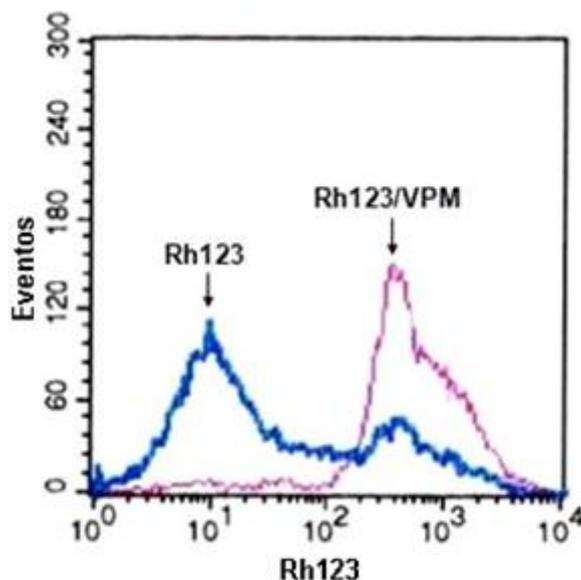


Figura 16 – *Dot plot* bidimensional ilustrando efluxo de Rh123 na subpopulação linfocitária CD4

A Rh123 é incorporada à célula (por isso pode-se identificar eventos também no quadrante UR), mas a atividade da gp-P é evidenciada pela extrusão da Rh123, representada pela positividade apenas para o anticorpo monoclonal (já que a Rh123 encontra-se apenas no meio extracelular), representada no quadrante UL.

Por outro lado, os dados de intensidade média de fluorescência nas amostras incubadas com e sem VPM foram superpostos em um histograma, o recurso gráfico ideal para apresentação de um único parâmetro. A Figura 17 ilustra um histograma deste tipo de análise.



Parâmetro X: FL1 – Rh123/VPM (Log)

Marcador	Direita, esquerda	Eventos	% gate	% total	Média	CV	Mediana	Canal pico	
Todos	1,	9910	23617	100.00	100.00	729.13	103.69	465.55	333

Parâmetro X: FL1 – Rh123 (Log)

Marcador	Direita, esquerda	Eventos	% gate	% total	Média	CV	Mediana	Canal pico	
Todos	1,	9910	26199	100.00	100.00	201.33	235.04	18.77	9

Figura 17 – Histograma na análise funcional da glicoproteína-P

Neste gráfico, o número de eventos foi representado no eixo y e a intensidade do sinal, representada no eixo x. Em cada amostra, os sinais mais intensos são dispostos à direita, enquanto à esquerda ficam localizados os menos intensos.

Nesta mesma figura são exemplificadas duas situações: em azul observa-se o sinal emitido a partir de uma amostra incubada apenas com Rh123; em vermelho, observa-se o sinal resultante de uma amostra incubada com Rh123 e VPM. Os valores utilizados no cálculo do IMF são apresentados no quadro-resumo com os valores estatísticos, como a média de todos os eventos.

5.4 Atividade da glicoproteína-P na subpopulação T CD4

A Figura 18 ilustra o box-plot com a porcentagem de efluxo por atividade da gp-P na subpopulação T CD4.

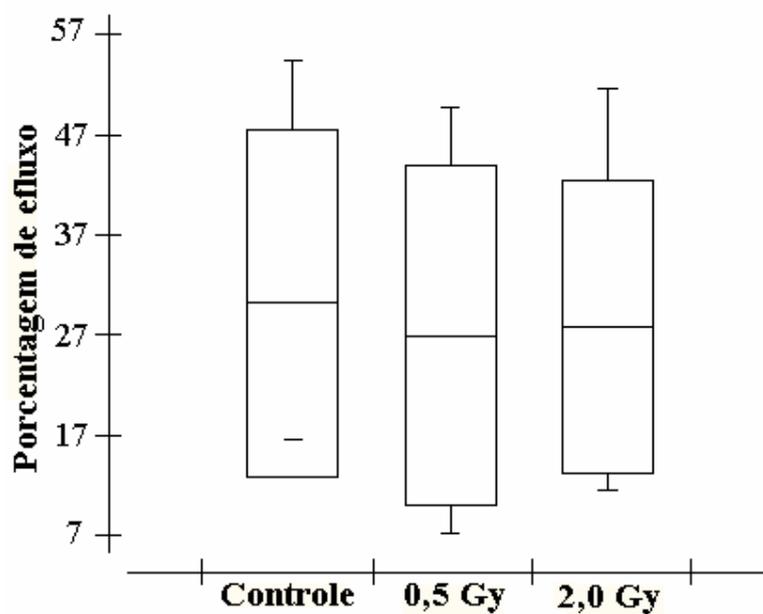


Figura 18 – Distribuição da porcentagem de efluxo das células CD4 de acordo com o grupo (média, desvio padrão, mínimo e máximo)

A Figura 19 ilustra o box-plot com a distribuição da atividade da gp-P avaliada por IMF na subpopulação T CD4.

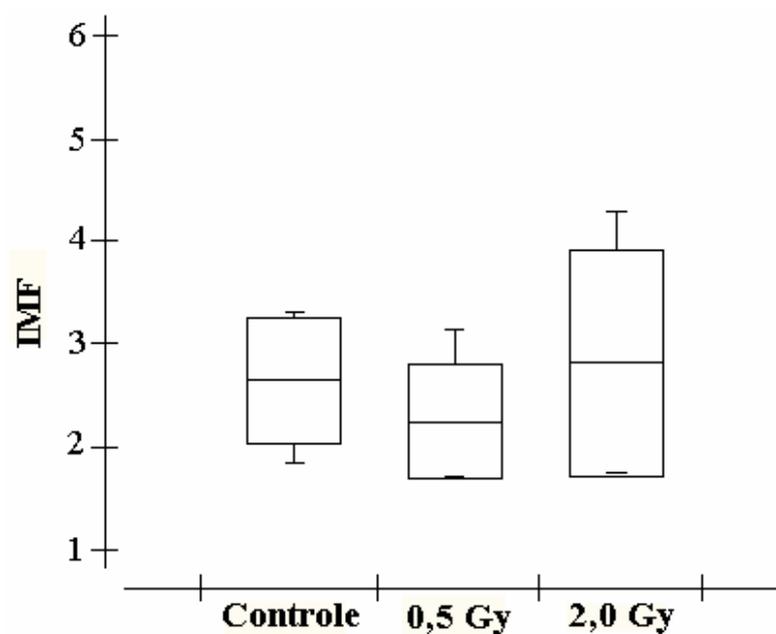


Figura 19 – Distribuição do índice médio de fluorescência (IMF) das células CD4 de acordo com o grupo (média, desvio padrão, mínimo e máximo)

A atividade média das amostras controle foi de $(30,24 \pm 17,34)\%$, com mínimo de 16,69% e máximo de 54,51%. Em termos de IMF, a atividade média desta proteína foi de $2,64 \pm 0,61$, com variação de 1,84 a 3,3. Estes valores da atividade da gp-P em linfócitos CD4 normais são similares aos obtidos em outros trabalhos (DRACH et al., 1992; MACHADO et al., 2003; COON et al., 1991; MEADEN et al, 2002).

Considerando-se os valores mínimos e máximos para dados percentuais e de IMF, pode-se observar que os valores normais variam numa ampla faixa. Esta variabilidade pode ser associada a características fisiológicas próprias ou devido a algum estresse fisiológico, sem sinais clínicos, que participe do mecanismo de regulação da gp-P. Esses fatores podem ter controlado a atividade da proteína, pré ou pós-transcrição (SUKHAI; PIQUETTE-MILLER, 2000; SARKADI et al., 2006).

Para as amostras irradiadas, a atividade média para as amostras expostas a 0,5 Gy foi de $(27 \pm 17,01)\%$, com mínimo de 7,11 e máximo de 49,74%, tendo IMF de $2,33 \pm 0,55$, com mínimo de 1,7 e máximo de 3,14. Para as amostras expostas a 2,0 Gy, as atividades médias foram de $(27,91 \pm 14,65)\%$, com variação de 11,51 a 51,62%, e $2,80 \pm 0,49$, com mínimo de 1,74 e máximo de 4,28.

O resultado do teste de Mann-Whitney, para um nível de confiança de 95%, confirmado pelo teste ANOVA, revelou que não houve diferença significativa na atividade da gp-P nos linfócitos CD4, para os três grupos, tanto nas análises por porcentagem quanto por IMF.

Foram realizadas também análises indivíduo por indivíduo, comparando-se as amostras irradiadas em relação a sua própria amostra controle. Para os linfócitos T CD4, foram observadas mudanças na atividade da gp-P maiores que 20%, sem correlação com a dose absorvida, nos indivíduos A, D e E. Em alguns destes casos, a identificação desta variação só foi possível através da análise simultânea da porcentagem e do IMF, pois um parâmetro mostrou-se alterado enquanto o outro não.

As alterações foram observadas na amostra irradiada com 0,5 Gy para os indivíduos A e D e, na amostra irradiada com 2,0 Gy, para A, D e E. Nestes casos, a mudança parece

indicar MDR (por aumento na atividade da gp-P) na amostra do indivíduo A irradiada a 2,0 Gy.

5.5 Atividade da glicoproteína-P na subpopulação T CD8

A Figura 20 ilustra o box-plot com a porcentagem de efluxo por atividade da gp-P na subpopulação T CD8.

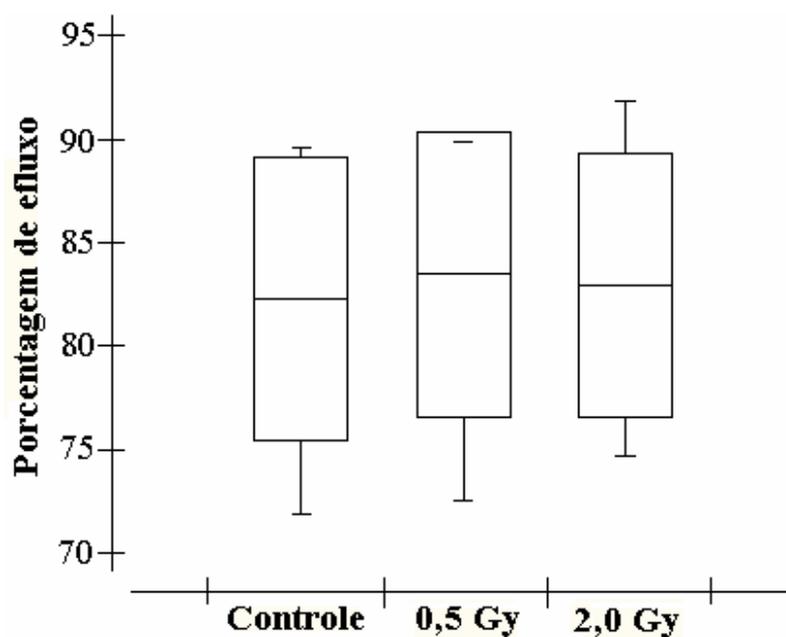


Figura 20 – Distribuição da porcentagem de efluxo das células CD8 de acordo com o grupo (média, desvio padrão, mínimo e máximo)

A Figura 21 ilustra o box-plot com a distribuição da atividade da gp-P avaliada por IMF na subpopulação T CD8.

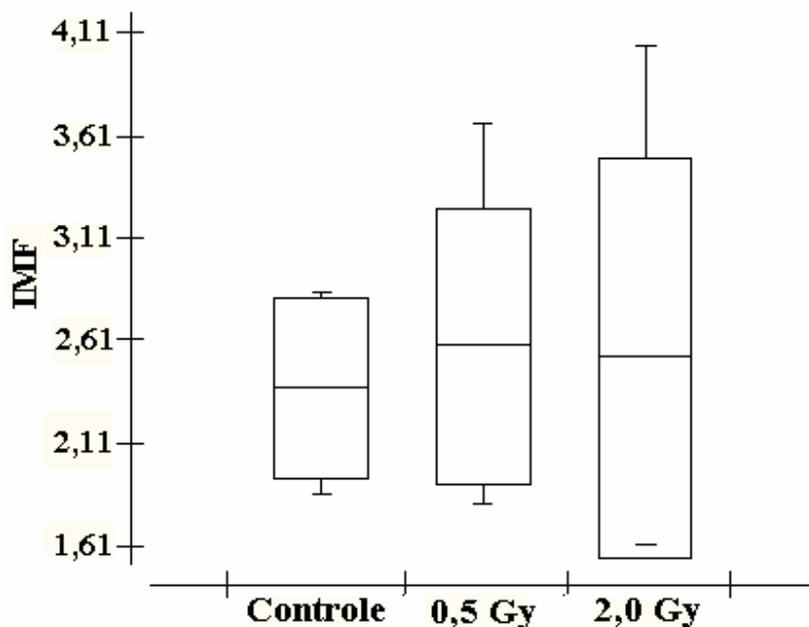


Figura 21 – Distribuição do índice médio de fluorescência (IMF) das células CD8 de acordo com o grupo (média, desvio padrão, mínimo e máximo)

A média da atividade da gp-P para este grupo de linfócitos, nas amostras controle, foi de $(82,25 \pm 6,85)\%$, com variação de 71,85 a 89,57%, e IMF de $2,37 \pm 0,44$, com variação de 1,86 a 2,84.

O comportamento da gp-P nos linfócitos CD8 normais, identificado neste estudo, é similar ao obtido em outros trabalhos (DRACH et al., 1992; MACHADO et al., 2003; COON et al., 1991; MEADEN et al., 2002). Os valores mínimo e máximo indicam que há uma variabilidade normal da atividade da gp-P na subpopulação CD8, mas que esta é menos evidente que nos linfócitos CD4. Isto pode indicar que os linfócitos T CD8 são menos influenciados por fatores reguladores da gp-P (SUKHAI; PIQUETTE-MILLER, 2000; SARKADI et al., 2006).

Para as amostras irradiadas com 0,5 Gy, a atividade média da gp-P foi de $(83,44 \pm 6,92)\%$, com mínimo de 72,50 e máximo de 89,84%, e IMF de $2,58 \pm 0,68$, com variação de 1,81 a 3,67. Para as amostras irradiadas com 2,0 Gy, a atividade média da gp-P foi de $(82,89 \pm 6,40)\%$, com mínimo de 74,66 e máximo de 91,77%, e IMF de $2,53 \pm 0,98$, com mínimo de 1,61 e máximo de 4,04.

As diferenças entre os desvios padrões para os dados percentuais e de IMF em ambas as subpopulações T apontam o IMF como um parâmetro confiável, neste caso até mais que o parâmetro convencionalmente empregado para análises em citometria de fluxo, a porcentagem.

O resultado do teste de Mann-Whitney, com nível de confiança de 95%, confirmado pela ANOVA, revelou que não houve diferença significativa na atividade da gp-P nos linfócitos CD8, entre o grupo controle e as amostras irradiadas e entre as amostras irradiadas, tanto nas análises por porcentagem quanto por IMF.

Nas análises indivíduo por indivíduo, assim como para os linfócitos CD4, foram observadas mudanças na atividade da gp-P maiores que 20%, sem correlação com a dose absorvida, em alguns casos, através da análise simultânea da porcentagem e do IMF.

Nas amostras irradiadas com 0,5 Gy, foram observadas mudanças nos indivíduos A e B, e na amostra irradiada com 2,0 Gy, nos indivíduos A e D. Nestes casos, a mudança parece indicar MDR em ambas as amostras irradiadas do indivíduo A e na amostra do indivíduo B irradiada a 0,5 Gy.

Considerando os dados relativos a ambas as subpopulações T, as alterações indicam aumento da atividade da gp-P nos indivíduos A e B, que apontariam para uma possível susceptibilidade à MDR radioinduzida.

5.6 Avaliação do protocolo estabelecido e resultados obtidos

O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo que possibilitasse avaliar o efeito da radiação ionizante na atividade da gp-P. Este protocolo é interessante quanto à sua aplicabilidade prática na investigação de parâmetros prognósticos em tratamentos empregando RT antes da QT.

Considerando que os efeitos biológicos de linfócitos irradiados *in vitro* e *in vivo* são semelhantes (IAEA, 2001), as análises *in vitro* permitiriam antecipar reações *in vivo* de

células sob as mesmas condições de irradiação. Mesmo que este estudo tenha sido restrito às subpopulações linfocitárias T CD4 e CD8, a análise é relevante, pois mudanças radioinduzidas nestes linfócitos, em particular, poderiam alterar as concentrações intracelulares de muitas drogas ou imunossupressores em transplantados ou pacientes com câncer, resultando na resistência mesmo com níveis de componentes sanguíneos adequados (DRACH et al., 1996; VASQUEZ et al., 2005; SARKADI et al., 2006).

Embora alguns estudos defendam que a determinação da expressão da gp-P por citometria de fluxo seja o método mais adequado de investigação de MDR, o ensaio do efluxo da Rh123 é considerado muito mais sensível para este fim (MEADEN et al., 2002; VASQUEZ et al., 2005).

A metodologia desenvolvida neste trabalho indica o ensaio do efluxo da Rh123 como um método confiável e sensível para a análise funcional da gp-P, em conformidade com outros trabalhos (BECK et al., 1996; MARIE et al., 1997; MEADEN et al., 2002; VASCONCELOS et al., 2006). Adicionalmente, este protocolo confirma a viabilidade do ensaio do efluxo da Rh123 para estudo da atividade da gp-P em células após a irradiação.

Para a análise de células após a irradiação, este estudo sugere a análise simultânea da porcentagem (parâmetro usado convencionalmente nas análises de dados por citometria de fluxo) e do IMF (parâmetro emergente sugerido nos testes funcionais por natureza) como instrumento importante para evitar resultados falso-positivos ou falso-negativos. Adicionalmente, o IMF emerge como um parâmetro que oferece alta confiabilidade aos dados.

Entre os três grupos de amostras estudadas (controle, irradiadas com 0,5 e irradiadas com 2,0 Gy), a atividade da gp-P não apresentou diferenças significativas, para um nível de confiança de 95%. A partir destes resultados, infere-se que, de forma geral, a estabilidade na função da gp-P após exposição a um agente não-químico pode ser um fator necessário para a preservação do papel de proteção da gp-P, que é filogeneticamente bem conservado (DEAN; ANNILO, 2005).

Apesar desta impressão quanto a um comportamento geral, as investigações indivíduo por indivíduo sugerem que a gp-P pode responder de maneira diferente para algumas doses, tipos celulares e indivíduos.

Considerando todas estas informações, pode-se inferir que a avaliação da atividade da gp-P, com base no protocolo aqui estabelecido, é adequada para mensurar alterações na gp-P após irradiação, que podem ser importantes como fator prognóstico à adequação de tratamento paciente-específico. As evidências identificadas podem ser solidificadas com uma amostra maior.

6 CONCLUSÕES

- O protocolo padronizado mostrou-se adequado para avaliação do efeito da radiação ionizante na atividade da gp-P;
- Os resultados gerais indicam não haver influência direta da radiação ionizante na atividade da gp-P, embora a análise simultânea dos resultados percentuais e de IMF das amostras irradiadas em relação à sua amostra controle apontem para variações significativas em um mesmo indivíduo;
- Os dados obtidos no estabelecimento deste protocolo sugerem a atividade da gp-P como possível fator prognóstico para o tratamento paciente-específico em protocolos onde a RT é administrada antes da QT (BEGG, 1997; STEWART; SAUNDERS, 1997; VASQUEZ et al, 2005), pela possibilidade de identificação de susceptibilidade individual à MDR radioinduzida;
- O protocolo estabelecido neste trabalho poderá ser empregado na investigação da atividade da gp-P utilizando uma casuística maior, para confirmar estes resultados preliminares, assim como na investigação de situações envolvendo exposição a outros tipos de radiação, diferentes níveis de dose, bem como outras subpopulações linfocitárias e tipos celulares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**. Tradução de Claudia Reali da 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 580 p.

ÁGUILA, J. F.; RAMOS, O. C.; ÁLVAREZ, I. V.; VÁSQUÉZ, R. P. Resistência a drogas mediada por la glicoproteína-P. **Revista Cubana de Oncologia**, v. 14, n. 2, p. 111-120, 1998.

AMBUDKAR, S. V.; KIM, I.-W.; SAUNDA, Z. E. The power of the pump: mechanisms of action of P-glycoprotein. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, n. 5, p. 392-400, 2006.

APPELBAUM, F. R. The use of bone marrow and peripheral blood stem cell transplantation in the treatment of cancer. **CA – A Cancer Journal for Clinicians**, v. 46, n. 3, p. 142-164, 1996.

ARVELO, F.; MERENTES, E.; COTTE, C. Resistencia multidroga (MDR) o pleiotropica. **Acta Científica Venezolana**, v. 51, n. 1, p. 45-52, 2000.

AZNAR, M. R. Indicaciones de radioterapia según la intención de tratamiento. **Tecnología Radiológica**, n. 57, p. 22-24, 2005.

BACAL, N. S.; FAULHABER, M. H. W. **Aplicação prática em citometria de fluxo**. São Paulo: Atheneu, 2003. 90 p.

BECK, W. T.; GROGAN, T. M.; WILLMAN, C. L.; CORDON-CARDO, C.; PARHAM, D. M.; KUTTESCH, J. F.; ANDREEFF, M.; BATES, S. E.; BERARD, C. W.; BOYETT, J. M.; BROPHY, N. A.; BROXTERMAN, H. J.; CHAN, H. S. L.; DALTON, W. S.; DIETEL, M.; FOJO, A. T.; GASCOYNE, R. D.; HEAD, D.; HOUGHTON, P. J.; SRIVASTAVA, D. K.; LEHNERT, M.; LEITH, C. P.; PAIETTA, E.; PAVELIC, Z. P.; RIMSZA, L.; RONINSON, I. B.; SIKIC, B. I.; TWENTYMAN, P. R.; WARNKE, R.; WEINSTEIN, R. Methods to detect P-glycoprotein-associated multidrug resistance in patients tumors: consensus recommendations. **Cancer Research**, v. 56, n. 13, p. 3010-3020, July 1, 1996.

BEGG, A. C. Individualization of radiotherapy. In: STEEL, G. G. **Basic clinical radiobiology**. 2nd ed. London: Arnold; 1997. p. 234-245.

BENDERITTER, M.; VINCENT-GENOD, L.; POUGET, J. P.; VOISIN, P. The cell membrane as a biosensor of oxidative stress induced by radiation exposure: a multiparameter investigation. **Radiation Research**, v. 159, n. 4, p. 471-483, April 2003.

BODOR, M.; KELLY, E. J.; HO, R. J. Characterization of the human MDR1 gene. **American Association of Pharmaceutical Scientists Journal**, v. 7, n. 1, p. E1-E5., 2005

BUNTING, K. D.; ZHOU, S.; LU, T.; SORRENTINO, B. P. Enforced P-glycoprotein pump function in murine bone marrow cells results in expansion of side population stem cells in vitro and repopulating cells in vivo. **Blood**, v. 96, n. 3, p. 902-909, August 1, 2000.

BUSHONG, S. C. **Radiologic science for technologists: physics, biology, and protection**. 6th. ed. St. Louis: Mosby, 1997. p. 449-461

CHAUDARY, P. M.; MECHETNER, E. B.; RONINSON, I. B. Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes. **Blood**, v. 80, n. 11, p. 2735-2739, December 1, 1992.

CHAUDARY, P. M.; RONINSON, I. B. Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in a human hematopoietic stem cells. **Cell**, v. 66, n. 1, p. 85-94, July 12, 1991.

CHAWAPUN, N. Update on clinical radiobiology. **Biomedical Imaging and Intervention Journal**, v. 2, n. 1, e 22, 2006.

CHONG, A. S. F.; MARKHAM, P. N.; GEBEL, H. M.; BINES, S. D.; COON, J. S. Diverse multidrug-resistance-modification agents inhibit cytotoxic activity of natural killer cells. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v. 36, n. 2, p. 133-139, March 1993.

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR (CNEN). **Diretrizes básicas de radioproteção**. Resolução CNEN 12/88, NE 3.01, publicada em agosto, 1988.

COON, J. S.; WANG, Y.; BINES, S. D.; MARKHAM, P. N.; CHONG, A. S. F.; GEBEL, H. M. Multidrug resistance activity in human lymphocytes. **Human Immunology**, v. 32, n. 2, p. 134-140, October 1991.

CORDON-CARDO, C.; O'BRIEN, J. P.; BOCCIA, J.; CASALS, D.; BERTINO, J. R.; MELAMED, M. R. Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 38, n. 9, p. 1277-1287, 1990.

DEAN, M.; ANNILO, T. Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 6, p.:123-142, 2005.

DEL GIGLIO, A. Resistência à quimioterapia: uma revisão para o oncologista. **Revista da Sociedade brasileira de Cancerologia**, ano IV, n. 14, p. 32, 2001.

DRACH, J.; GSUR, A.; HAMILTON, G. ZHAO, S.; ANGERLER, J.; FIEGL, M.; ZOJER, N.; RADERER, M.; HABERL, I.; ANDREEFF, M.; HUBER, H. Involvement of P-glycoprotein in the transmembrane transport of interleukin-2 (IL-2), IL-4, and interferon- γ in normal human T lymphocytes. **Blood**, v. 99, p. 1747-1754, 1996.

DRACH, D.; ZHAO, S.; DRACH, J.; MAHADEVIA, R.; GATTRINGER, C.; HUBER, H.; ANDREEFF, M. Subpopulations of normal peripheral blood and bone marrow cells express a functional multidrug resistant phenotype. **Blood**, v. 80, n. 11, p. 2729-2734, December 1, 1992.

EIDUS, L. K. Hypothesis regarding a membrane-associated mechanism of biological action due to low-dose ionizing radiation. **Radiation and Environmental Biophysics**, v. 39, n. 3, p. 189-195, September 2000.

FERREIRA, P. R. F. **Tratamento combinado em oncologia/quimioterapia, hormonioterapia, radioterapia**. Porto Alegre: Artmed, 2007. 316 p.

FLECK, J. F. **Câncer: integração clínico-biológica**. Rio de Janeiro: Médica e Científica, 1992. 432 p. ISBN 85-7199-042-5.

FLENS, M. J.; ZAMAN, G. J. R.; van der VALK, P.; IZQUIERDO, M. A.; SCHROEIJERS, A. B.; SCHEFFER, G. L.; van der GROEP, P.; de HAAS, M.; MEIJER, C. J. L. M.; SCHEPER, R. J. Tissue distribution of the multidrug resistance protein. **American Journal of Pathology**, v. 148, n. 4, p. 1237-1247, April 1996.

GOTTESMAN, M. M.; LING, V. The molecular basis of multidrug resistance in cancer: the early years of P-glycoprotein research. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 580, p. 998-1009, 2006.

GOTTESMAN, M. M.; PASTAN, I.; AMBUDKAR, S. V. P-glycoprotein and multidrug resistance. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 6, n. 5, p. 610-617, 1996.

HALL, E. J. **Radiobiology for the radiologist**. 5th. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 388 p.

HENNESSY, M.; SPIERS, J. P. A primer on the mechanics of P-glycoprotein, the multidrug transporter. **Pharmacological Research**, 2006. Doi: 10.1016/j.phrs.2006.10.007.

HILL, B. T.; DEUCHARS, K.; HOSKING, L. K.; LING, V.; WHELAN, R. D. H. Overexpression of P-glycoprotein in mammalian tumor cell lines after fractionated X irradiation *in vitro*. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, p. 607-612, 1990.

HILL, B. T.; WHELAN, R. D. H.; HURST, H. C.; McLEAN, S. Identification of a distinctive P-glycoprotein-mediated resistance phenotype in human ovarian carcinoma cells after their in vitro exposure to fractionated X-irradiation. **Cancer**, v. 73, n. 12, p. 2990-2999, June 15, 1994.

HOFFMEYER, S.; BURK, O.; von RICHTER, O.; ARNOLD, H. P.; BROCKMÖLLER, J.; JOHNE, A.; CASCORBI, I.; GERLOFF, I.; ROOTS, L.; EICHELBAUM, M.; BRINKMANN, U. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity *in vivo*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 7, p. 3473-3478, 2000.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA). **Cytogenetic analysis for radiation dose assessment: a manual**. Technical report series n. 405. Viena: IAEA, 2001. 127 p.

INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION (ICRP). **Recommendations of the International Commission on Radiological Protection**. ICRP Report 60. New York: Pergamon Press, 1990.

INTRODUCTION to flow cytometry: a learning guide. Manual part number: 11-11032-01. San Jose: Becton, Dickinson and Company, April 2000.

JOHNSON, R. A.; SHEPARD, E. M.; SCOTTO, K. W. Differential regulation of MDR1 transcription by the p53 family members. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 14, p. 13213-13219, 2005.

JOHNSTONE, R. W.; RUEFLI, A. A.; SMYTH, M. J. Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein?. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 25, n. 1, p. 1-6, January 2000.

KRISHAN, A.; SAUERTEING, A.; ANDRITSCH, I.; WELLHAM, L. Flow cytometric analysis of the multiple drug resistance phenotype. **Leukemia**, v. 11, n. 7, p. 1138-1146, July 1997.

KRUTZIK, P. O.; IRISH, J. M.; NOLAN, G. P.; PEREZ, O. D. Analysis of protein phosphorylation and cellular signaling events by flow cytometry: techniques and clinical applications. **Clinical Immunology**, v. 110, n. 3, p. 206-221, March 2004.

MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de ação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 237-243, 2000.

MACHADO, C. G. **Atividade da glicoproteína-P em linfócitos do sangue periférico de indivíduos normais: variação com a idade**. 2002. 123 f. Tese (Doutorado em Medicina)–

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2002.

MACHADO, C. G.; CALADO, R. L.; GARCIA, A. B.; FALCÃO, R. P. Age-related changes of the multidrug resistance P-glycoprotein function in normal human peripheral blood T lymphocytes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 12, p. 1653-1657, 2003.

MARIE, J. P.; HUET, S.; FAUSSAT, A. M.; PERROT, J. Y.; CHEVILLARD, S.; BARBU, V.; BAYLE, C.; BOUTONNAT, J.; CALVO, F.; CAMPOS-GUYOTAT, L.; COLOSETTI, P.; CAZIN, J. L.; de CREMOUX, P.; DELVINCOURT, C.; DEMUR, C.; DRENOU, B.; FENNETEAU, O.; FEUILLARD, J.; GARNIER-SWILLEROT, A.; GENNE, P.; GORISSE, M. C.; GOSSELIN, P.; JOUAULT, H.; LACAVE, R.; LE CALVEZ, G.; LÉGLISE, M. C.; LÉONCE, S.; MANFAIT, M.; MAYNADIÉ, M.; MERLE-BÉRAL, H.; MERLIN, J. L.; MOUSSEAU, M.; MORJANI, H.; PICARD, F.; PINGUET, F.; PONCELET, P.; RACADOT, E.; RAPHAEL, M.; RICHARD, B.; ROSSI, J. F.; SCHELEGEL, N.; VIELH, P.; ZHOU, D. C.; ROBERT, J. Multicentric evaluation of the MDR phenotype in leukemia. **Leukemia**, v. 11, p. 1086-1094, 1997.

MARZOLINI, C.; PAUS, E.; BUCLIN, T.; KIM, R. B. Polimorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 75, p. 13-33, 2004.

McLEAN, S.; HILL, B. T. Evidence of post-translational regulation of P-glycoprotein associated with the expression of a distinctive multiple drug-resistant phenotype in Chinese hamster ovary cells. **European Journal of Cancer**, v. 29A, n. 16, p. 2243-2248, 1993.

McLEAN, S.; HOSKING, L. K.; HILL, B. T. Dominant expression of multiple drug resistance after *in vitro* X-irradiation exposure in intraespecific chinese hamster ovary hybrid cells. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 85, n. 1, p. 48-53, January 6, 1993.

MEADEN, E. R.; HOGGARD, P. G.; KHOO, S. H.; BACK, D. G. Determination of P-gp and MRP1 expression and function in peripheral blood mononuclear cells in vivo. **Journal of Immunological Methods**, v. 262, p. 159-165, 2002.

MORI, M.; BENOTMANE, M. A.; TIRONE, I.; HOOGHE-PETERS, E. L.; DESAINTE, C. Transcriptional response to ionizing radiation in lymphocyte subsets. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, p. 1489-1501, 2005.

MURAD, A. M.; KATZ, A. **Oncologia: bases clínicas do tratamento**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 435 p.

NIELSEN, D.; SKOVSGAARD, T. P-glycoprotein as multidrug transporter: a critical review of current multidrug resistant cell lines. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1132, p. 169-183, 1992.

PEAKMAN, M.; VERGANI, D. **Imunologia básica e clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

PÉTRIZ, J.; GARCÍA-LOPEZ, J. Flow cytometric analysis of P-glycoprotein function using rhodamine 123. **Leukemia**, v. 11, p. 1124-1130, 1997.

ROSENBERG, S. A. A new era of cancer immunotherapy: converting theory to performance. **CA – A Cancer Journal for Clinicians**, v. 49, n. 2, p. 70-73, 1999.

RUEFLI, A. A.; JOHNSTONE, R. W. A role for P-glycoprotein in regulating cell growth and survival. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v. 4, n. 1, p. 31-37, 2003.

RUTH, A. C.; RONINSON, I. B. Effects of the multidrug transporter P-glycoprotein on cellular responses to ionizing radiation. **Cancer Research**, v. 60, n. 10, p. 2576-2578, May 15, 2000.

SAINT-GEORGES, L. Low-dose ionizing radiation exposure: understanding the risk for cellular transformation. **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents**, v. 18, n. 2, p. 96-100, 2004.

SARKADI, B.; HOMOLYA, L.; SZAKÁCS, G.; VÁRADI, A. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system. **Physiological Reviews**, v. 86, n. 4, p. 1179-1236, 2006.

SAUNA, Z. E.; SMITH, M. M.; MÜLLER, M.; KERR, K. M.; AMBUDKAR, S. V. The mechanism of action of multidrug-resistance-linked P-glycoprotein. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 33, n. 6, 2001.

SCHINKEL, A. H. Pharmacological insights from P-glycoprotein knockout mice. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 36, p. 9-13, 1998.

SEPARAÇÃO CELULAR DA AMOSTRA SANGUÍNEA POR GRADIENTE DE DENSIDADE UTILIZANDO FICOLL. Disponível em <<http://www.ebiotrade.com/newsf/pic/20051020104525.jpg>>. Acesso em 02/04/2007 às 14:35 hs.

SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 801-807, 2002.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry: the principles and practice of statistics in biological research**. 3rd. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1995.

STAVROVSKAYA, A. A. Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. **Biochemistry (Moscow)**, v. 65, n. 1, p. 95-106, 2000. Translated from **Biokhimiya**, v. 65, n. 1, p. 112-116. 2000

STELL, G. G. **Basic clinical radiobiology**. 2nd. ed. London: Arnold, 1997. 254 p.

STEWART, F. A.; SAUNDERS, M. I. Combined radiotherapy and chemotherapy: clinical applications and evaluation. In: STEEL, G. G. **Basic clinical radiobiology**. 2nd ed. London: Arnold; 1997. p. 195-202.

SUKHAI, M.; PIQUETTE-MILLER, M. Regulation of the multidrug resistance genes by stress signals. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 2, p. 268-280, 2000.

SWITZER, R. L.; GARRITY, L. F. Experimental biochemistry. 3rd. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1999. 451 p.

TANDON, V. R.; KAPOOR, B.; BANO, G.; GUPTA, S.; GILLANI, Z.; GUPTA, S.; KOUR, D. P-glycoprotein: pharmacological relevance. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 38, n. 1, p. 13-24, Feb 2006.

VALENSI, F. Morphologie des cellules sanguines normales. **EMC-Hématologie**, v. 2, n. 1, p. 1-13, March 2005.

VASCONCELOS, F. C.; CAVALCANTI JÚNIOR, G. B.; SILVA, K. L.; MEIS, E.; KWEE, J. K.; RUNJANEK, V. M.; MAIA, R. C. Contrasting features of MDR phenotype in leukemias by using two fluorochromes: implications for clinical practice. **Leukemia Research**, 2006, doi:10.1016/j.leukres.2006.07.016.

VASQUEZ, E. M.; PETRENKO, Y.; JACOBSEN, V.; SIFONTIS, N. M.; TESTA, G.; SANKARY, H.; BENEDETTI, E. An assessment of P-glycoprotein expression and activity in peripheral blood lymphocytes of transplant candidates. **Transplantation Procedures**, v. 37, p. 175-177, 2005.

WANG, Y.; HAO, D.; STEIN, W. D.; YANG, L. A kinetic study of Rhodamine123 pumping by P-glycoprotein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1758, p. 1671-1676, 2006.

WATERS, S. H.; MARAVEYAS, A. Chemotherapy in the management of malignant disease: current practice and future directions. **Journal of Radiotherapy in Practice**, v. 6, p. 3-10, 2007.

YUNG, B. L. Changes in immune function with age. **Rheumatic Diseases Clinics of North America**, v. 26, n. 3, p. 455-473, August 2000.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e prática**. São Paulo: Atheneu, 2004. 1081 p.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, _____, abaixo-assinado, dou meu consentimento livre e esclarecido para participar como voluntário do projeto de pesquisa intitulado **“INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO IONIZANTE NA ATIVIDADE DA GLICOPROTEÍNA-P EM LINFÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO”**¹³, sob responsabilidade da pesquisadora Neyliane Frassinetti Gonçalves dos Santos, estudante de Mestrado do Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco.

Assinando este Termo de Consentimento, estou certo de que:

- 1) O objetivo da pesquisa é estabelecer um protocolo metodológico para avaliação da atividade da glicoproteína-P em linfócitos T do sangue periférico humano irradiados *in vitro* e relacionar os resultados obtidos à evidência do fenótipo de resistência a múltiplas drogas induzido pela radiação ionizante, verificando também a aplicabilidade de possíveis alterações como biomarcadores;
- 2) Os resultados obtidos por meio da pesquisa serão utilizados apenas para alcançar o objetivo do trabalho (exposto acima), incluída sua publicação em literatura científica especializada e apresentação em eventos científicos. Nestas situações, todas as medidas serão tomadas para assegurar a confidencialidade e a privacidade dos meus dados pessoais;
- 3) Obtive todas as informações necessárias para poder decidir conscientemente sobre minha participação na referida pesquisa e estou livre para interromper a qualquer momento a minha participação na mesma, se assim o desejar;
- 4) Poderei entrar em contato com membros da equipe de pesquisa no telefone (81) 2126.8253 ramal 375, e com o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação HEMOPE no telefone (81) 3416.4669 para apresentar recursos ou reclamações em relação à pesquisa ou ensaio clínico, o qual tomará as medidas cabíveis.

Local _____, Data ____ / _____ / _____.

Assinatura do voluntário

RG nº

Assinatura do pesquisador

RG nº

¹³ O título do projeto está diferente do título definitivo da dissertação. Entretanto, como os objetivos e a metodologia não foram alterados, o parecer continua válido para a realização do estudo.

APÊNDICE 2 – Formulário de acompanhamento do experimento

FICHA DE ACOMPANHAMENTO DO EXPERIMENTO

Coleta do material

Código: _____

Tipo de material biológico: _____

Material utilizado (insumos): _____

Procedimento: Sem “problemas”

Problemas _____

Solução: Sim _____

Não _____

Irradiação

Instituição: _____

Data/hora: _____

Equipamento utilizado: _____

Taxa de dose: _____

Tempo de exposição calculado para dose de 0,5 Gy: _____

Tempo de exposição calculado para dose de 2,0 Gy: _____

Procedimento: Sem “problemas”

Problemas _____

Solução: Sim _____

Não _____

Leucometria

Instituição: _____

Data: _____

Equipamento utilizado: _____

Procedimento: Sem “problemas” Problemas _____Solução: Sim _____ Não _____

Resultados: _____

Ensaio do efluxo de rodamina123

Instituição: _____

Data: _____

Equipamento utilizado: _____

Material utilizado (insumos): _____

Procedimento: Sem “problemas” Problemas/etapa _____Solução: Sim _____ Não _____

Resultados: _____

ANEXOS

ANEXO 1 – Cópia do Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



Fundação HEMOPE

Comitê de Ética em Pesquisa

1 - DADOS SOBRE O PROJETO

PARECER N 052/07 A

Título do Projeto: Influência da Radiação Ionizante na Atividade da Glicoproteína-P em Linfócitos do Sangue Periférico Humano¹⁴

Instituição Solicitante: UFPE

Local do Desenvolvimento do Projeto: Fundação HEMOPE

Responsável: Neyliane Frassinetti Gonçalves dos Santos

Identidade: 6.318.041 **CPF:** 049.131.564-38

Endereço: Av. Prof. Luiz Freire, 1000 - Recife - PE - CEP: 50740-540 **Telefone:** 81 – 2126.8253

Finalidade: Dissertação de mestrado

2 - COMENTÁRIO DOS RELATORES

Objetivo: Padronizar um protocolo de análise para avaliar a influência da radiação ionizante na atividade da glicoproteína-P em linfócitos do sangue periférico humano por citometria de fluxo.

Objetivos Específicos: Analisar adequação da técnica e metodologia utilizadas: Verificar diferenças na atividade entre amostras irradiadas e não-irradiadas: Avaliar a atividade da gp-P como parâmetro prognóstico em protocolo terapêutico que empregue a RT antes da QT. **Metodologia:** Será baseada na técnica de citometria de fluxo. As amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis serão coletadas na Fundação Hemope e encaminhadas ao Centro de Radioterapia de Pernambuco (CERAPE), onde serão irradiadas *in vitro* com doses pré-estabelecidas previamente pelo GERAR. Após a irradiação, as amostras retornarão ao Hemope, e será realizado o ensaio da rodamina123 no Laboratório de Imunofenotipagem da Unidade de Laboratórios Especializados (UNILABE).

3 - PARECER DO RELATOR: De acordo com a Res. 196/96 o protocolo de pesquisa está **APROVADO**, uma vez que este não colide, aparentemente com os princípios básicos da bioética – não-maleficência, a beneficência, a autonomia e a justiça, além do sigilo. É o parecer.

4 – INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem prejuízo a seu cuidado. (Res. 196/96 – Item IV.1.f, devendo receber uma cópia do termo de Consentimento Livre e Esclarecido, por ele assinado (Item IV.2.d)
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após serem analisadas as razões da descontinuidade, pelo CEP, que o aprovou (Res. CND Item III. 1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou, quando constatar a superioridade do registro oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3)
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave, ocorrido – mesmo que tenha sido em outro centro e enviar notificação ao CEP e ANVISA, junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-los também à ANVISA, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97. Item III 2.e).
- Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

Fundação HEMOPE
 Dra. Emília Santos
 Comitê de Ética em Pesquisa

¹⁴ O parecer foi elaborado a partir do projeto deste trabalho, e por isso está diferente do título definitivo da dissertação. Entretanto, como objetivos e metodologia não foram alterados, o parecer continua válido

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)