

**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 DA EXPRESSÃO DO GENE *ABL*  
SOB ESTRESSE RADIOATIVO**

**FÁRIDA COELI DE BARROS CORREIA MELO**

**RECIFE – PERNAMBUCO – BRASIL  
MARÇO – 2008**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**PROTOCOLO PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA *ABL*  
SOB ESTRESSE RADIOATIVO**

**FÁRIDA COELI DE BARROS CORREIA MELO**

**PROTOCOLO PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GENE *ABL*  
SOB ESTRESSE RADIOATIVO**

Dissertação de Mestrado 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 à 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: PROF. DR. RAUL ANTÔNIO MORAIS MELO (HEMOPE)**

**RECIFE – PERNAMBUCO – BRASIL**

**MARÇO – 2008**

**M528p****Melo, Fária Coeli de Barros Correia.**

Protocolo para avaliação da expressão gene *ABL* sob estresse radioativo / Fária Coeli de Barros C. Melo . - Recife: O Autor, 2008. xvi, 72 folhas, il : figs., tabs.

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

Inclui Bibliografia e Apêndices.

1. Energia Nuclear. 2. Biomarcador. 3. Radiação Ionizante. 4. Gene *ABL*. I. Título.

**UFPE****612.01448****CDD (22. ed.)****BCTG/2008-109**

# PROTOCOLO PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *ABL* SOB ESTRESSE RADIOATIVO

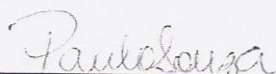
Fárida Coeli de Barros Correia Melo

APROVADA EM: 31.03.2008

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Raul Antônio Morais Melo

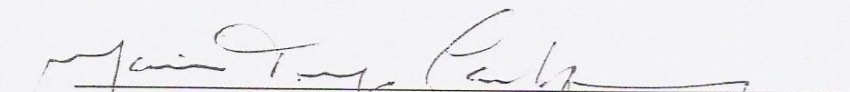
COMISSÃO EXAMINADORA:



Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza – DG/UPE

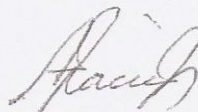


Profa. Dra. Adriana Fontes – DRB/UFPE



Profa. Dra. Maria Tereza Cartaxo Muniz - DCB/UPE

Visto e permitida a impressão



Coordenador do PROTEN/DEN/UFPE

## A Canoa

Em um largo rio, de difícil travessia, havia um barqueiro que  
atravessava  
as pessoas de um lado para o outro.  
Em uma das viagens, iam um advogado e uma professora.  
Como quem gosta de falar muito, o advogado pergunta ao barqueiro:  
Companheiro, você entende de leis?  
Não. - Responde o barqueiro.  
E o advogado compadecido:  
É pena, você perdeu metade da vida!  
A professora muito social entra na conversa:  
Seu barqueiro, você sabe ler e escrever?  
Também não. - Responde o remador.  
Que pena! - Condói-se a mestra - Você perdeu metade da vida!  
Nisso chega uma onda bastante forte e vira o barco.  
O canoeiro preocupado pergunta:  
Vocês sabem nadar?  
Não! - Responderam eles rapidamente.  
Então é uma pena - Conclui o barqueiro  
- Vocês perderam toda a vida!

*Não há saber mais ou saber menos:*

*Há saberes diferentes*

Paulo Freire

## **DEDICATÓRIA**

**Dedico este trabalho à Nuncy, Raul, Regina Coeli e Rafael.**



## AGRADECIMENTOS

À **Nuncy**, por sua coragem de ter sido mãe e pai e por acreditar que a educação seria a maior herança para suas filhas.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral**, pela oportunidade e confiança depositada na minha capacidade de trabalho.

Ao meu co-orientador **Prof. Dr. Raul Antônio Morais Melo**, pelo apoio, incentivo e infinita paciência.

Aos membros da banca **Prof. Dr. Divaldo Sampaio, Prof<sup>a</sup>. Dra. Tereza Cartaxo, Prof. Dr. Paulo Roberto de Souza, Prof<sup>a</sup>. Dra. Laélia Campos, Prof<sup>a</sup>. Dra. Edvane Borges, Prof<sup>a</sup>. Dra. Adriana Fontes** pelas sugestões apropriadas e enriquecedoras.

À **Fundação Hemope** (Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco), pela infra-estrutura essencial a realização deste trabalho.

Ao **CERAPE** (Centro de Radioterapia de Pernambuco), em nome do **Dr. Jonathan Melo**, pela disponibilização de sua equipe nas irradiações das amostras, bem como **Dra. Taciana Soares**, pela contribuição quanto aos parâmetros físicos.

Ao **Prof. Dr. José Alexandre Rodrigues Lemos** da Universidade Federal do Pará (UFPA) e Hemocentro do Pará (HEMOPA), pelas valiosas sugestões fundamentais ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Rommel Burbano** da Universidade Federal do Pará (UFPA), pela contribuição sobre cultura celular.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular do Hemope, **Washington Batista das Neves** e **Michelline Gomes Magalhães**, pelo apoio, companheirismo e por compartilharem com paciência as dificuldades vividas durante o mestrado.

As colegas do Laboratório de Citogenética do Hemope, **Dra. Márcia Costa** e **Dra. Júlia Netto** por terem disponibilizado a estrutura do laboratório.

Aos colegas do **GERAR** (Grupo de Estudos e Radioproteção e Radioecologia) pelas sugestões e torcida. A agradável e descontraída companhia de vocês tornou este trabalho mais gratificante.

Aos professores, colegas e funcionários do **DEN** (Departamento de Energia Nuclear) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), pelo convívio saudável durante o mestrado.

À **Maria José** e **Rosângela Leite** com a presteza das coletas das amostras.

À secretaria do Departamento de Energia Nuclear, **Magali Ferreira**, sempre prestativa e eficiente.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação e para que este trabalho fosse realizado. E não foram poucos!!

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<i>LISTA DE FIGURAS</i> .....	<i>xiii</i>
<i>LISTA DE TABELAS</i> .....	<i>xv</i>
<i>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</i> .....	<i>xvi</i>
<i>RESUMO</i> .....	<i>xviii</i>
<i>SUMMARY</i> .....	<i>xix</i>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>21</b>
<b>2.1 Efeitos biológicos das radiações ionizantes</b> .....	<b>21</b>
<b>2.2 Classificação dos efeitos biológicos</b> .....	<b>22</b>
2.2.1 Efeitos determinísticos e estocásticos .....	23
2.2.2 Síndrome Aguda da Radiação .....	23
2.2.3 Efeitos imediatos e tardios .....	24
2.2.4 Efeitos somáticos e hereditários .....	24
2.2.5 Efeitos diretos e indiretos .....	24
<b>2.3 Métodos dosimétricos</b> .....	<b>26</b>
<b>2.5 Radiosensibilidade</b> .....	<b>30</b>
<b>2.6 Linfócitos</b> .....	<b>31</b>
<b>2.7 Ciclo celular</b> .....	<b>32</b>
<b>2.9 Proto-oncogene</b> .....	<b>34</b>
<b>2.10 Os genes constitutivos</b> .....	<b>36</b>
<b>2.11 O gene <i>ABL</i></b> .....	<b>38</b>

2.12 Reação em Cadeia da Polimerase Convencional .....	41
2.13 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real.....	42
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>47</b>
3.1 Objetivo Geral.....	47
3.2 Objetivos Específicos .....	47
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>48</b>
4.1 Tipo de estudo .....	48
4.2 Amostragem e operacionalização .....	48
4.3 Coleta de material .....	49
4.4 Perfil dos indivíduos voluntários .....	49
4.5 Condições de irradiação.....	50
4.6 Preparação celular .....	51
4.7 Cultura celular .....	52
4.8 Viabilidade celular .....	52
4.9 Extração do RNA .....	53
4.10 Transcrição reversa .....	54
4.11 Avaliação do cDNA .....	54
4.12 PCR em Tempo Real.....	55
4.13 Quantificação da expressão gênica .....	56
4.14 Análise estatística .....	57
4.15 Qualidade dos instrumentos de medida.....	57
4.16 Aspectos éticos.....	58
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>59</b>
5.1 Estudos preliminares .....	59
5.2 Análises das amostras de sangue .....	59
5.3 Quantidade e qualidade do RNA e cDNA .....	60
5.4 Especificidade.....	61

5.5 Reprodutibilidade .....	63
5.6 Níveis de expressão do gene <i>ABL</i> .....	64
6 <i>DISCUSSÃO</i> .....	69
7 <i>CONCLUSÕES</i> .....	73
8 <i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i> .....	74
<i>APÊNDICES</i> .....	81
APÊNDICE I – Termo de consentimento livre e esclarecido .....	81
APÊNDICE II – Questionário do doador voluntário .....	82
APÊNDICE III – Parecer de Ética em Pesquisa.....	84
APÊNDICE IV – Fluxograma das etapas metodológicas .....	85
APÊNDICE V – Resultados da expressão do gene <i>ABL</i> .....	86
<i>ANEXOS</i> .....	88
ANEXO 1 – Grandezas em dosimetria (ICRP 60 , 1990).....	88

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1</b> – Interação de radiações de alto e baixo LET.....	22
<b>Figura 2</b> – Efeitos diretos e indiretos da radiação ionizante sobre a molécula de DNA.....	25
<b>Figura 3</b> – Linfócito normal em esfregaço de sangue periférico, corado por May-Grünwald Giemsa.....	31
<b>Figura 4</b> – Ciclo celular.....	33
<b>Figura 5</b> – Fator de crescimento epidermal (EGF).....	36
<b>Figura 6</b> – Estrutura do gene <i>ABL</i> .....	38
<b>Figura 7</b> – Domínio estrutural do gene <i>ABL</i> .....	39
<b>Figura 8</b> – DNA danificado por via de sinalização.....	40
<b>Figura 9</b> – Reação em Cadeia da Polimerase. ....	41
<b>Figura 10</b> – Fita dupla de DNA intercalada por corante fluorescente Sybr Green. ....	44
<b>Figura 11</b> – Esquema de curva de amplificação do PCR em Tempo Real ....	45
<b>Figura 12</b> – Separação celular de amostra sanguínea por gradiente de Ficoll ....	52
<b>Figura 13</b> – Smart Cycler – Cepheid.....	56
<b>Figura 14</b> – Resultados da análise de integridade do RNA total, exibindo RNA de 28S, 18S.....	60
<b>Figura 15</b> – Resultado de análise da eficiência da transcrição (cDNA) através do teste de .. controle RT- PCR Multiplex em gel de agarose a 2%.....	61
<b>Figura 16</b> – Produtos da amplificação da PCR em Tempo Real confirmando presença do gene <i>ABL</i> (fragmento com bandas de tamanho 106 pb) ....	62
<b>Figura 17</b> – Curvas de dissociação demonstrando especificidade da reação e a ausência de dímeros de <i>primers</i> . ....	62
<b>Figura 18</b> – Resultados das amostras testadas em duplicatas dos indivíduos A, B, C, D e E	
<b>Figura 19</b> – Variação nos níveis de expressão do gene <i>ABL</i> após 3, 6 e 12 horas das amostras não irradiadas.....	65
<b>Figura 20</b> - Variação nos níveis de expressão do gene <i>ABL</i> após 3, 6 e 12 horas das amostras irradiadas a 1 Gy.....	48
<b>Figura 21</b> – Variação nos níveis de expressão do gene <i>ABL</i> após 3 e 12 horas das amostras irradiadas a 3 Gy. ....	66
<b>Figura 22</b> – Variação nos níveis de expressão do gene <i>ABL</i> das amostras.....	

não irradiadas e irradiadas a 1 e 3 Gy com 3 horas. ....	67
<b>Figura 23</b> – Variação nos níveis de expressão do gene <i>ABL</i> das amostras .....	
não irradiadas e irradiadas a 1 e 3 Gy com 6 horas .....	68
<b>Figura 24</b> – Variação nos níveis de expressão do gene <i>ABL</i> das amostras .....	
não irradiadas e irradiadas a 1 e 3 Gy com 12 horas. ....	68

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1</b> – Sumário dos efeitos clínicos de uma irradiação aguda. ....	24
<b>Tabela 2</b> – Limites primários anuais de dose equivalente de irradiação para indivíduos. ...	27
<b>Tabela 3</b> – Tipos e características de células de mamíferos e radiosensibilidade. ....	30
<b>Tabela 4</b> – Dados básicos sobre os indivíduos voluntários do estudo. ....	50
<b>Tabela 5</b> – Sequência de nucleotídeos utilizados na reação de Q-PCR .....	55
<b>Tabela 6</b> – Número de leucócitos e porcentagem de linfócitos das 5 amostras de doadores voluntários. ....	59
<b>Tabela 7</b> – Análise descritiva dos resultados do cálculo de expressão (Ce) do gene <i>ABL</i> das amostras não irradiadas (NI) e irradiadas a 1 Gy e 3 Gy. ....	64
<b>Tabela 8</b> – Valores do cycle threshold (Ct) e do cálculo de expressão (Ce) do gene <i>ABL</i> das amostras não irradiadas, em duplicata, segundo o tempo. ....	86
<b>Tabela 9</b> – Valores do cycle threshold (Ct) e do cálculo de expressão (Ce) do gene <i>ABL</i> das amostras irradiadas a 1 Gy, em duplicata, segundo o tempo. ....	86
<b>Tabela 10</b> – Valores do cycle threshold (Ct) e do cálculo de expressão (Ce) do gene <i>ABL</i> das amostras irradiadas a 3 Gy, em duplicata, segundo o tempo. ....	87
<b>Tabela 11</b> – Tipos, faixas e fatores de ponderação da radiação – $W_R$ (ICRP 60, 1990). ....	89
<b>Tabela 12</b> – Fatores de ponderação para tecidos ou órgãos - $W_T$ . ....	90



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABL	Vírus da Leucemia Murina de Abelson, ( <i>Abelson Murine Leukemia virus</i> )
AC	Aberrações cromossômicas
ACD	Ácido-Citrato-Dextrose
A-MuLV	Vírus da Leucemia Murina ( <i>Murine Leukemia Virus</i> )
BCR	Região de ponto de quebra ( <i>Breakpoint Cluster Region</i> )
$\beta$ -MG	Beta-2-microglobulina
BPLC	Boas Práticas em Laboratório Clínico
CDC	Controlador da Divisão Celular 2 ( <i>Cell Division Controller 2</i> )
CDKN1A	Inibidor de Quinase Dependente de Ciclina 1A ( <i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1 A</i> )
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CERAPE	Centro de Radioterapia de Pernambuco
Ct	Ciclo Limite ( <i>Cycle Threshold</i> )
D	Dose Absorvida
dATP	2'- Deoxyadenosina 5'- Trifosfato
dCTP	2'- Deoxycitidina 5'- Trifosfato
DE	Energia Média
dGTP	2'- Deoxyguanosina 5'- Trifosfato
dNTP	Desoxinucleotídeos Trifosfatados
dTTP	2'- Deoxytimidina 5'- Trifosfato
E	Dose Efetiva
GADD45	Parada no crescimento e danos no DNA do gene 45 ( <i>Growth Arrest and DNA Damage Gene 45</i> )
Hemope	Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco
H <sub>T</sub>	Dose equivalente no tecido ou órgão
IAEA	Agência Internacional de Energia Atômica ( <i>International Atomic Energy Agency</i> )
ICRP	Comissão Internacional de Proteção Radiológica ( <i>International Commission on Radiological Protection</i> )

ICRU	Comissão Internacional de Medidas e Unidades de Radiação ( <i>International Commission on Radiation Units and Measurements</i> )
K562	Linhagem eritroleucemia humana
Linfócitos B	Linfócitos derivados de análogo à Bolsa de Fabricius das aves
Linfócitos NK	Linfócitos <i>Natural Killer</i>
Linfócitos T	Linfócitos derivados do Timo
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
MeV	Mega elétron Volts
mRNA	Ácido Ribonucléico mensageiro
nm	Nanômetro
<i>PBGD</i>	Porfobilinogênio desaminase ( <i>Porphobilinogen deaminase</i> )
PBS	Tampão Fosfato Salino ( <i>Phosphate Buffer Saline</i> )
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
Q	Fator de Qualidade
Q-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa ( <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> )
RB	Retinoblastoma
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	(Transcriptase Reversa - Reação em Cadeia da Polimerase ( <i>Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction</i> ))
S	Svendberg
SH1	Domínio da região 1 homóloga do sarcoma <i>src</i> ( <i>src homology region 1 domain</i> )
SH2	Domínio da região 2 homóloga do sarcoma <i>src</i> ( <i>src homology region 2 domain</i> )
SH3	Domínio da região 3 homóloga do sarcoma <i>src</i> ( <i>src homology region 3 domain</i> )
SI	Sistema Internacional
<i>src</i>	Vírus do sarcoma de Rous - <i>src</i> ( <i>Rous Sarcoma Vírus</i> )
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
W <sub>R</sub>	Fator de Ponderação da Radiação
W <sub>T</sub>	Fator de Ponderação de Tecido ou Órgão

## PROTOCOLO PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *ABL* SOB ESTRESSE RADIOATIVO

**Autora: Fária Coeli de Barros Correia Melo**

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

**Co-orientador: Prof. Dr. Raul Antônio Morais Melo (HEMOPE)**

### RESUMO

As crescentes aplicações das radiações ionizantes, associadas à evolução das técnicas de análises moleculares, têm despertado grande interesse para identificação de marcadores moleculares de irradiação ocupacional ou acidental. Alguns genes envolvidos na resposta molecular ao estresse radioativo foram identificados pela alteração de sua capacidade de expressão. Entretanto, os métodos comumente utilizados para avaliação da expressão gênica são laboriosos e de alto custo. Neste trabalho, o gene *ABL* foi utilizado como base no estabelecimento de um protocolo para avaliação da expressão gênica em linfócitos, após irradiação gama. Para tanto, foram testadas amostras de sangue periférico de indivíduos sadios após 3, 6 e 12 horas de irradiação com doses de 1 e 3 Gy a partir de uma fonte de Cobalto-60. A técnica de avaliação empregada foi a de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real, tendo o fluoróforo *Sybr green* como intercalante de DNA. Em todas as etapas, amostras não irradiadas foram empregadas como controle. O RNA foi extraído dos linfócitos totais e o cDNA, sintetizado pelo método de transcrição reversa. Com base no protocolo desenvolvido, foi possível identificar um aumento na expressão do gene *ABL* na dose de 1 Gy, após seis horas. Entretanto, não foram evidenciadas variações estatisticamente significantes dos níveis de expressão desse gene nas demais condições analisadas. O protocolo estabelecido nessa pesquisa mostrou-se de fácil reprodução e rápido. Os recursos empregados para avaliação de sua eficácia constataram a confiabilidade do método, sugerindo sua aplicação em análises tanto dos níveis de expressão do gene *ABL*, quanto em investigações de genes candidatos a biomarcadores moleculares de exposição à radiação ionizante.

**Palavras-chave:** Biomarcador, Radiação Ionizante, Gene *ABL*, PCR em Tempo Real.

## PROTOCOL FOR EVALUATING THE *ABL* GENE EXPRESSION UNDER RADIOACTIVE STRESS

**Author: Farida Coeli de Barros Correia Melo**

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

**Co-adviser: Prof. Dr. Raul Antonio Morais Melo (HEMOPE)**

### SUMMARY

The growing of ionizing radiation applications, associated with the development of techniques for molecular analyses, has aroused great interest in the identification of molecular markers of occupational or accidental irradiation. Some genes involved in the molecular response to this physical stress have already been identified as a result of changes in their expression level. However, the methods commonly used for evaluating gene expression are laborious and costly. In this work, the *ABL* gene was used as a basis for the establishment of a protocol for the evaluation of gene expression in lymphocytes after gamma irradiation. For this purpose, samples of peripheral blood from healthy individuals were tested after 3, 6 and 12 hours of irradiation at doses of 1 and 3 Gy, from a Cobalt-60 source. The technique used for evaluation was the Real-time Polymerase Chain Reaction, employing the *Sybr Green* fluorophore as DNA intercalant. At all stages, non-irradiated samples were employed as controls. RNA was extracted from total lymphocytes and the cDNA synthesized by the reverse transcription method. Based on the protocol developed, it was possible to identify an increase in the expression of the *ABL* gene at a dose of 1 Gy after six hours. However, no statistically significant changes were observed in the levels of expression of this gene in the other conditions analyzed. The protocol established in this work proved to be easily reproducible and fast. The resources used for evaluation of its effectiveness showed the reliability of the method, suggesting its application in the analysis of both *ABL* expression levels and the search of potential genes to be used as molecular biomarkers of exposure to ionizing radiation.

**Key-words:** Biomarker, Ionizing Radiation, *ABL* gene, Real Time PCR.

## 1 INTRODUÇÃO

Os benefícios bem como os danos biológicos causados pela radiação ionizante (RI) têm sido assunto de grande interesse pelos cientistas de todo o mundo. Assim, tornou-se importante avaliar e controlar a exposição à radiação ionizante com intuito de minimizar os seus efeitos prejudiciais ao homem e maximizar os benefícios do seu uso.

A determinação da dose absorvida de radiação ionizante pode ser realizada direta e/ou indiretamente. Na avaliação direta, a dose é determinada com o auxílio de aparelhos sensíveis denominados dosímetros, tais como: dosímetros fotográficos, semicondutores, gasosos, químicos ou indiretamente com o emprego de modelos numéricos (GERMAIN, 1995).

A dosimetria física nem sempre oferece uma resposta substancial nos casos de exposição à radiação. Geralmente estas respostas são incompletas ou até mesmo inexistentes e, por esta razão, métodos alternativos com indicadores biológicos mais sensíveis, específicos, rápidos e não invasivos vêm sendo propostos na avaliação dos riscos associados à exposição individual ou coletiva (AMUNDSON *et al.*, 2001; GRACE *et al.*, 2005).

Mais recentemente, a avaliação de parâmetros biológicos sensíveis aos efeitos radioinduzidos vem sendo utilizada na monitoração individual denominada biodosimetria, tornando-se assim uma ferramenta complementar à dosimetria física. A dosimetria citogenética é um dos métodos mais empregados em biodosimetria e baseia-se principalmente na investigação das aberrações cromossômicas, analisando a presença de micronúcleos presentes em linfócitos irradiados do sangue periférico (AMARAL, 2002; VOISIN *et al.*, 2002).

Com o surgimento de técnicas baseadas em marcadores fluorescentes tais como a citometria de fluxo (CF), novas metodologias de dosimetria biológica vêm sendo propostas. Através desse método, diversas propriedades físicas e biológicas das células em suspensão podem ser determinadas, tais como: volume, morfologia e intensidade de fluorescência dessas células. A metodologia da CF se destaca como método de detecção da expressão de antígenos celulares, como por exemplo, a proteína p53 em linfócitos do sangue periférico humano (BACAL; FAULHABER, 2003).

Com o advento de tecnologias moleculares, pesquisas vêm sendo direcionadas para a identificação de genes que se correlacionem com a exposição à radiação ionizante. Alguns genes associados ao aparecimento do câncer, denominados de proto-oncogenes, apresentam resposta tempo e dose dependente à radiação que pode ser avaliada através de métodos qualitativos e quantitativos. MILLER e colaboradores (2002) demonstraram a modulação de diversos proto-oncogenes após irradiação. Os proto-oncogenes são genes envolvidos nos processos de proliferação e diferenciação celular normal. Ocorrendo alterações em suas estruturas (mutação, rearranjo), tornando-se um oncogene e essas podem levar à produção de uma proteína anormal.

O gene *ABL*, é um proto-oncogene largamente utilizado em ensaios da Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (Q-PCR), pode ser empregado como gene controle por apresentar expressão similar em diferentes tecidos. A Q-PCR é um refinamento da reação de PCR convencional desenvolvida por Kary Mullis e colaboradores em 1986. Essa técnica representa um grande avanço nos métodos moleculares e vem sendo empregada como método de quantificação da expressão gênica devido a sua alta sensibilidade, especificidade e praticidade, além de permitir o monitoramento dos produtos de amplificação em tempo real (BEILLARD *et al.*, 2003).

O objetivo desta pesquisa foi estabelecer um protocolo para PCR em tempo real no sentido de avaliar os níveis de expressão gênica sob estresse radioativo reprodutível e simples, utilizando o gene *ABL* como referência, a partir de linfócitos irradiados *ex vivo*.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

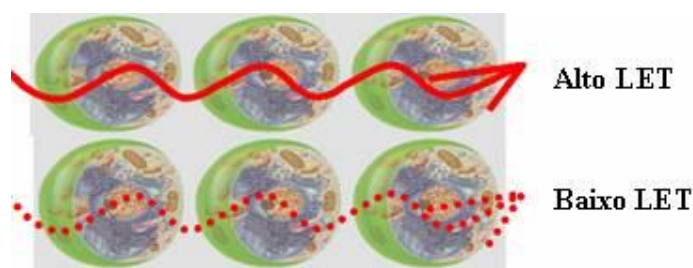
### 2.1 Efeitos biológicos das radiações ionizantes

Poucos acontecimentos na história da ciência revolucionaram tanto o mundo moderno quanto a descoberta dos raios-X em 1895 pelo pesquisador alemão *Wilhelm Conrad Röntgen* do Instituto de Física Julius Maximilians. Naquele ano, *Röntgen* descreveu com particularidades a maior parte das propriedades qualitativas básicas dos raios-X. A princípio utilizou a denominação de raios-X por não conhecer a natureza dessa radiação. Hoje, sabe-se que são radiações eletromagnéticas que se diferem dos raios de luz visível por possuírem alta energia. Em virtude de sua propriedade de atravessar objetos opacos, podem penetrar no corpo humano fotografando seu interior e trazendo um grande avanço do diagnóstico por imagem (DOWD; TILSON, 1999).

Um ano após a sua descoberta foram relatados, durante a reunião da Academia Francesa de Ciências, os primeiros efeitos deletérios atribuídos às radiações ionizantes. Foram descritas lesões cutâneas denominadas de radiodermite, queda de cabelo e aparecimento de câncer resultante da excessiva exposição aos raios-X nos técnicos responsáveis pela operação dos equipamentos (EARLY; LANDA, 1995).

A radiação ionizante caracteriza-se pela propagação de energia através da matéria liberando íons resultando em fenômenos físicos e químicos podendo também levar a alterações biológicas em nível molecular, celular, tissular e somático. A principal característica do efeito biológico causado pela radiação ionizante é a modificação morfológica e/ou fisiológica da estrutura celular (ICRP 60, 1990; AMUNDSON *et al.*, 2001).

A Comissão Internacional de Medidas e Unidades da Radiação - ICRU (*International Commission on Radiation Units and Measurements*) propôs uma grandeza denominada Transferência Linear de Energia - LET (*Linear Energy Transfer*), que é definida como a quantidade de energia que uma radiação deposita no tecido por unidade de trajetória percorrida (ICRU, 1970, IAEA, 2001), podendo essa energia ser de alto ou baixo LET, como ilustrado na **Figura 1**. As radiações consideradas de alto LET, tais como as partículas alfa, beta e nêutrons, atravessam pequenas distâncias e depositam grande quantidade de energia (GOODHEAD *et al.*, 1993). Por outro lado, as radiações de baixo LET como os raios-X e os raios- $\gamma$  são muito penetrantes, pois, possuem energia cinética suficiente para atravessar distâncias consideráveis nos tecidos (DOWD; TILSON, 1999; TAUHATA *et al.*, 2003).



**Figura 1** – Interação de radiações de alto e baixo LET

As lesões ao DNA causada pela radiação ionizante desempenham um papel importante entre os efeitos biológicos. Os mecanismos de reparo do DNA são essenciais, caso contrário podem levar a mutações, descontrole celular e iniciar o processo de transformação neoplásicas nos diferentes tipos celulares.

## 2.2 Classificação dos efeitos biológicos

Os efeitos biológicos decorrentes das radiações ionizantes podem ser classificados em determinístico e estocástico, segundo a sua probabilidade de ocorrência: imediato ou tardio, conforme seu tempo de aparecimento; ou do ponto de vista biológico, em somático ou hereditário (TAUHATA *et al.*, 2003; BUSHONG, 1997).



### 2.2.1 Efeitos determinísticos e estocásticos

Segundo MANESH (1985), existem dois tipos de efeitos das radiações ionizantes: os efeitos agudos que surgem logo após a irradiação, e os crônicos, que se manifestam algum tempo após a exposição. HENDEE, em 1993, classificou os efeitos das radiações ionizantes em determinísticos e estocásticos.

Os efeitos determinísticos são tanto mais graves quanto maior for a dose de radiação, podendo ocorrer poucas horas, dias, meses ou anos após a exposição. A gravidade e frequência variam com a dose e só ocorrem quando um limiar é excedido. São exemplos destes efeitos a catarata, a úlcera cutânea e a síndrome de Radiação Aguda (SAR).

Nos efeitos estocásticos ou aleatórios, a probabilidade de ocorrência cresce com o aumento da exposição do indivíduo a radiação, e não existe valor de dose limiar capaz de estabelecer claramente uma relação de “causa e efeito”. Eles estão relacionados a baixas doses de radiação, como aquelas decorrentes de exposição frequente às quais os profissionais que trabalham com radiação estão sujeitos. A mutagênese e a carcinogênese são exemplos típicos de efeito estocástico resultantes da radiação que podem se manifestar até vários anos após a exposição (ICRP, 1984; TAUHATA *et al.*, 2003).

### 2.2.2 Síndrome Aguda da Radiação

De um modo geral, a irradiação no corpo inteiro pode levar ao aparecimento de alguns sintomas e sinais, como ilustra a **Tabela 1**. O conjunto de tais sintomas e sinais é denominado de Síndrome Aguda da Radiação. O quadro após exposição de corpo inteiro à radiação compreende as seguintes fases:

- Fase inicial - é a fase onde os efeitos físicos provocados pela exposição ocorrem;
- Fase latente - é a fase em que as reações químicas provocadas pela exposição se processam;
- Fase crítica - é a fase onde o indivíduo apresenta a sintomatologia dos efeitos da exposição (ANDREUCCI, 2001).

**Tabela 1** – Sumário dos efeitos clínicos de uma irradiação aguda.

<b>Fases</b>	<b>Dose (Gy)</b>	<b>Sintomas e Sinais Clínicos</b>
<b>Prodrômica</b>	>1	Náusea, vômito e diarreia.
<b>Latente</b>	> 1 – 100	Nenhum.
<b>Hematológica</b>	2 – 10	Náusea, vômito, diarreia, anemia, leucopenia, hemorragia, febre e infecção.
<b>Gastrointestinal</b>	10 – 50	O mesmo que a hematológica mais desequilíbrio eletrolítico, letargia, fadiga, choque febre e infecção.
<b>Sistema Nervoso Central</b>	> 50	O mesmo da gastrointestinal, mais ataxia, edema, vasculite e meningite.

(BUSHONG, 1997)

### 2.2.3 Efeitos imediatos e tardios

Conforme o tempo de aparecimento, os efeitos da radiação ainda podem ser classificados em imediatos ou tardios. Os efeitos imediatos ocorrem em poucas horas até semanas após irradiação provocando, por exemplo, radiodermite, enquanto que os efeitos tardios aparecem após anos ou décadas podendo levar ao câncer (TAUHATA *et al.*, 2003).

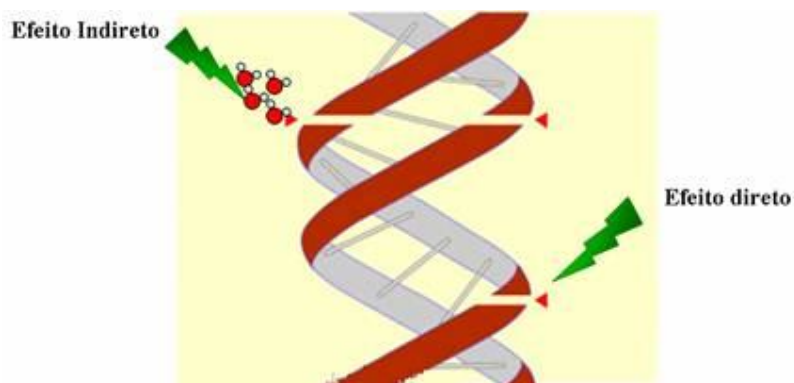
### 2.2.4 Efeitos somáticos e hereditários

Os efeitos biológicos da radiação dependem do tipo celular atingido e, neste caso, podem ser classificados em somáticos ou germinativos. No efeito somático, a célula atingida é responsável pela manutenção do funcionamento orgânico e no efeito genético a célula é responsável pela transmissão de informações às futuras gerações de indivíduos (BUSHONG, 1997).

### 2.2.5 Efeitos diretos e indiretos

Os danos provocados pelas radiações ionizantes são causados por dois mecanismos diferentes denominados efeitos diretos e indiretos. No efeito direto, a radiação interage

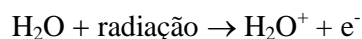
diretamente com as moléculas de DNA quebrando sua dupla fita e modificando a estrutura, como mostra a **Figura 2** (BUSHONG, 1997).



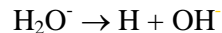
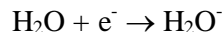
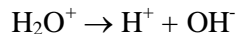
**Figura 2** – Efeitos diretos e indiretos da radiação ionizante sobre a molécula de DNA  
[Modificado de Francis Metzger, INRS]

No efeito indireto, a radiação atinge as moléculas de água formando elementos químicos ativos e altamente reativos, que correspondem aos radicais livres e outros agentes oxidantes. Este processo é conhecido como radiólise da água. Considerando que cerca de 80% de água correspondem ao peso corpóreo humano, e que, com essa interação da radiação ocorre modificação estrutural na molécula estima-se que boa parte dos danos causados a uma célula pela radiação ionizante ocorra através desse mecanismo (BUSHONG, 1997; FOEHRENBACH; CORDOLIANI, 2002).

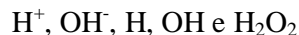
Um organismo complexo exposto às radiações sofre efeitos que podem ser classificados em 3 estágios. No primeiro estágio ocorrem fenômenos físicos, onde a energia é depositada na célula. Esse processo tem duração de fração de segundo ( $10^{-16}$  s) e pode ser descrito como:



Os fenômenos químicos sucedem aos físicos e provoca rupturas de ligações entre os átomos, formando radical num intervalo de tempo pequeno – que dura cerca de  $10^{-16}$  segundos, como descrito:



Os produtos destas reações são:



Os fenômenos biológicos da radiação são conseqüências dos fenômenos físicos e químicos que alteram as funções específicas das células provocando a sua morte prematura, impedindo a divisão celular. Dentre os efeitos que podem ser ocasionados, pode-se citar a mutagênese (SCAFF, 1997; TAUHATA *et al.*, 2003).

As grandezas físicas básicas e as grandezas operacionais são definidas pela Comissão Internacional de Unidades e Medidas de Radiação – ICRU e pela Comissão Internacional de Proteção Radiológica – ICRP (**ANEXO I**), responsáveis pela definição das grandezas limitantes de radioproteção, que foram padronizadas em: dose absorvida, dose equivalente e dose efetiva (TAUHATA *et al.*, 2003).

Diversos métodos dosimétricos surgiram da necessidade de quantificar a energia da radiação ionizante absorvida por unidade de massa pelo indivíduo exposto (DOWN; TILSON, 1999).

### 2.3 Métodos dosimétricos

O conhecimento dos níveis de doses na proteção radiológica é um passo importante para avaliar os riscos associados às exposições individuais ou coletivas. Com isso, instituições internacionais recomendam limites de dose para trabalhadores e indivíduos do público, com o objetivo de restringir esses riscos (AMARAL, 2002).

A dosimetria é a medida de uma quantidade de energia depositada em um meio e pode ser efetuado através do dosímetro, instrumento sensível aos efeitos físicos e cuja

finalidade é determinar o nível de doses de radiação recebida pelo usuário em um determinado período de tempo. O limite de dose anual de irradiação para trabalhadores e indivíduos do público, segundo as recomendações da Comissão Internacional de Proteção Radiológica é apresentado na **Tabela 2** (CNEN-NN – 3.01, 2005).

**Tabela 2** – Limites primários anuais de dose equivalente de irradiação para indivíduos.

<b>Indivíduo</b>	<b>Limite de dose anual para corpo inteiro</b>
Trabalhador <sup>1</sup>	20 mSv
Indivíduo do público <sup>2</sup>	1 mSv

<sup>1</sup> *Trabalhador – pessoa que, em consequência do seu trabalho a serviço da instalação, possa vir a receber, por ano, doses superiores aos limites primários para os indivíduos do público*

<sup>2</sup> *Indivíduo do Público – qualquer membro da população não exposto ocupacionalmente à radiação, inclusive trabalhadores, estudantes e estagiários quando ausentes das áreas restritas da instalação (CNEN-NN-3.01, 2005)*

A dosimetria física, introduzida no início do século XX, é o valor da dose absorvida avaliada com o auxílio de instrumentos sensíveis aos efeitos físicos da RI. Estes instrumentos são denominados de dosímetros que detectam a radiação e quantificam a dose absorvida (SCAFF, 1997). Quando utilizados corretamente, possuem uma boa acurácia na avaliação à exposição, porém medem somente a dose de radiação do aparelho e não a exposição potencial do indivíduo (GRACE *et al.*, 2005).

A dosimetria biológica ou biodosimetria consiste na estimativa de dose recebida por indivíduos potencialmente expostos à irradiação ionizante ou após exposição acidental. Ela é uma importante ferramenta para relacionar os danos ao material genético com a dose recebida e permite estimar a exposição em longo prazo, complementando a dosimetria física (VOISIN, 2002). Diferentes métodos podem ser empregados na dosimetria biológica, tais como os métodos clínico, citológico, citogenético, imunofenotípico e molecular.

A avaliação clínica ainda é bastante restrita e baseia-se nos sinais e sintomas apresentados pelos indivíduos investigados, tais como náuseas, vômitos, dores de cabeça e reações cutâneas (AMUNDSON *et al.*, 2001; AMORIM, 2003).

As células do sistema hematopoiético são particularmente sensíveis à radiação ionizante. As primeiras alterações são encontradas na contagem leucocitária do sangue periférico, onde se observa um declínio rápido dos linfócitos circulantes. Os granulócitos, plaquetas e reticulócitos desaparecem progressivamente e com isso aumenta a susceptibilidade do indivíduo à infecção oportunista, à anemia e ao sangramento (DAINIAK, 2002).

De todas as células do tecido hematopoiético, os linfócitos são os mais radiosensíveis. Eles são células diferenciadas que possuem uma vida média de 3 anos e encontram-se no sangue periférico na fase G<sub>0</sub> do ciclo celular (fase de quiescência). Devido a estas características são capazes de armazenar os danos biológicos (IAEA, 2001; DAINIAK, 2002; MORI *et al.*, 2005).

A dosimetria citogenética analisa os danos genéticos pela interação da radiação ao nível celular. Os indicadores biológicos de exposição à radiação ionizante mais utilizado são as aberrações cromossômicas instáveis e micronúcleo em linfócitos do sangue periférico.

As aberrações estáveis podem ser classificadas em translocações, deleções e inserções (envolvendo o mesmo cromossomo ou diferentes cromossomos), e podem ser identificadas através da técnica de bandeamento G ou da técnica de hibridização fluorescente *in situ* – FISH. Com essa última é possível identificar as translocações com o uso de sondas específicas de DNA onde o cromossomo é identificado por uma cor e as alterações são visualizadas pela junção de duas cores (IAEA, 2001).

Estudos comprovam que a quantificação de aberrações cromossômicas pode ser útil na percepção do risco à saúde como um biomarcador para a predisposição ao câncer, uma vez que o aumento da frequência de aberrações cromossômicas nos linfócitos do sangue periférico está associado com o aumento de risco de câncer (AU *et al.*, 2001; MAFFEI *et al.*, 2004). No entanto, essa metodologia é bastante demorada e necessita de pessoal qualificado para sua realização.

Outra opção técnica que também possui relevância como biomarcador de exposição à radiação ionizante por ser de fácil contagem e requerer um tempo menor de treinamento para a realização das análises, é a técnica de micronúcleos que são subprodutos das aberrações cromossômicas instáveis. Os micronúcleos são originados de cromossômicos inteiros durante a divisão celular, são constituídas de uma massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal (RIBEIRO *et al.*, 2003).

Uma técnica também eficaz para a investigação de exposição à RI eis de expressão da p53 utilizando a técnica de citometria de fluxo (CF). Em 2005, utilizando esta tecnologia da citometria de fluxo, Cavalcanti quantificou os níveis de expressão da proteína p53 após irradiação gama e demonstrou que amostras de sangue irradiado com doses acima de 0,5 Gy apresentaram níveis de expressão da proteína p53 com o aumento da dose absorvida no sangue periférico, sugerindo o emprego da quantificação da proteína p53 como biomarcador de exposição a RI.

A proteína p53 conhecida como a “guardiã do genoma” possui um papel primordial no processo de regulação do ciclo celular, atuando como importante gene supressor tumoral. Normalmente, em uma célula, a proteína p53 se encontra em baixas concentrações e possui uma vida média curta em torno de 20 dias. Assim, sob determinadas situações de estresse celular, como por exemplo, a exposição da célula à radiação ionizante, os níveis de p53 aumentam consideravelmente, podendo então ser quantificada (LEVINE, 1997).

Os avanços da genética molecular têm proporcionado novas perspectivas para elucidar a relação entre genes e seus produtos. Estudos foram propostos para utilizar biomarcadores moleculares de exposição à radiação ionizante (AMUNDSON *et al.*, 1999).

A identificação de genes radioinduzidos, especialmente aqueles que exibem resposta dose dependente, não só permite expandir o conhecimento do mecanismo dos diversos efeitos biológicos como também leva à busca de novos candidatos a biomarcadores de injúrias causadas pela radiação ionizante.

## 2.5 Radiossensibilidade

A radiossensibilidade celular corresponde ao grau e velocidade de resposta dos tecidos à irradiação, sendo alguns mais sensíveis que outros. O corpo humano é constituído por cerca de  $5 \times 10^{12}$  células, muitas das quais são altamente especializadas para o desempenho de determinadas funções (BUSHONG, 1997; SCAFF, 1997).

Na maioria das vezes, essas unidades obedecem à lei de Bergonié e Tribondeau (1906) que afirma que: “a radiossensibilidade celular é diretamente proporcional à sua atividade reprodutiva e inversamente proporcional ao seu grau de diferenciação”, logo, quanto maior o grau de especialização (quanto mais diferenciada for a célula), mais lentamente ela se dividirá. Uma exceção significativa a essa lei geral é dada pelos linfócitos que, embora só se dividam em condições excepcionais são extremamente radiossensíveis (BUSHONG, 1997; SCAFF, 1997), como mostra a **Tabela 3**.

**Tabela 3** – Tipos e características de células de mamíferos e radiossensibilidade.

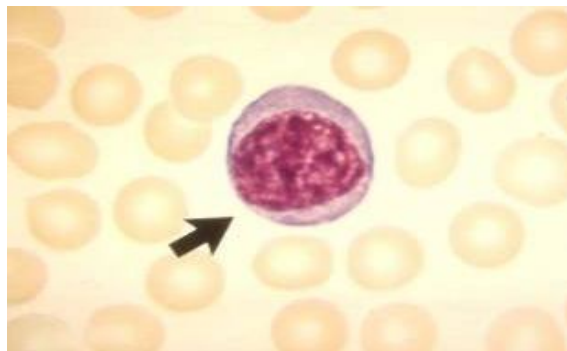
Célula	Capacidade de divisão	Nível de diferenciação	Radiossensibilidade
Eritroblastos, células das criptas intestinais, células basais da epiderme.	++++	+	++++
Mielócitos e espermatócitos.	++++	++	+++
Células dos rins, fígado, pâncreas e tireóide.	++	+++	++
Neurônios e células musculares.	-	++++	+

*Radiossensibilidade de algumas células de mamíferos onde a capacidade de divisão, o nível de radiossensibilidade e de diferenciação estão assinalados pelo símbolo “+” e ausências pelo símbolo “-”.* (Modificado de GARCIA, 1998).



## 2.6 Linfócitos

Os linfócitos do sangue periférico são células de um diâmetro que varia de 10 a 16  $\mu\text{m}$ , têm citoplasma escasso e núcleo redondo com cromatina condensada, como ilustra a **Figura 3** (ZAGO *et al.*, 2005).



**Figura 3** – Linfócito normal em esfregaço de sangue periférico, corado por May-Grünwald Giemsa

Do ponto de vista fisiológico, os linfócitos possuem três diferentes subpopulações celulares: os linfócitos T, B e NK - *natural killer* (ZAGO *et al.*, 2005).

Os linfócitos T são derivados do timo e correspondem à cerca de 70 a 80% dos linfócitos circulantes e originam-se de um precursor da medula óssea que posteriormente migra para o timo, onde a maturação destas células se completa. Eles estão envolvidos em processos de imunidade celular e na regulação da síntese de anticorpos (ZAGO *et al.*, 2005).

Os linfócitos B são células derivadas do homólogo humano da bursa de Fabricius (bolsa) das aves e correspondem a cerca de 5 a 15% dos linfócitos circulantes. Este subtipo linfocitário diferencia-se na medula óssea antes de ser liberado na circulação. A sua característica fundamental é a de possuir moléculas de imunoglobulinas que são produzidas endogenamente e encontram-se inseridas na membrana plasmática, onde atuam como receptores para antígenos específicos (ZAGO *et al.*, 2005).

Os linfócitos NK representam a minoria de células linfóides em circulação. Originam-se de um precursor linfóide na medula óssea – como as demais – e possuem um papel importante na defesa contra células malignas (ZAGO *et al.*, 2005).

O número de linfócitos no sangue periférico de um indivíduo adulto sadio apresenta valores normais de referência entre 1300 e 4800/mm<sup>3</sup>, dos quais 0,1% são renovados diariamente. Entretanto, em casos de irradiação de corpo inteiro com altas doses, uma das reações determinísticas imediatas é a rápida queda na contagem de linfócitos do sangue periférico. Isto deve ser levado em consideração quando há um curto período entre a exposição e a análise das amostras para biodosimetria (IAEA, 2001).

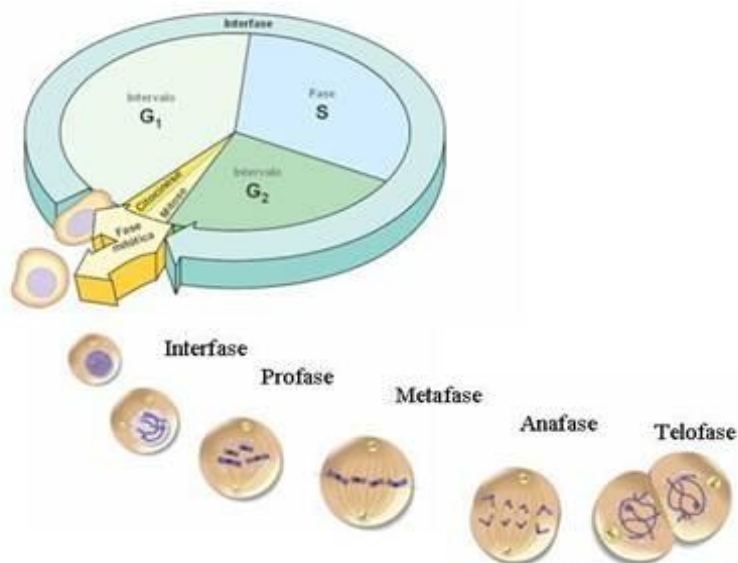
Os linfócitos normalmente se encontram no estágio de pré-síntese de DNA do ciclo celular, denominada de fase G<sub>0</sub>, sendo por isso capaz de armazenar alterações ou danos radioinduzidos (IAEA, 2001). Outro aspecto a ser considerado é que eles podem ser facilmente obtidos do sangue periférico e em grande quantidade. Além disso, uma fração da população de linfócitos possui uma expectativa de vida longa, de aproximadamente três anos, favorecendo ainda mais a manutenção da informação (IAEA, 1986; MORI *et al.*, 2005).

## 2.7 Ciclo celular

O ciclo celular é uma seqüência de eventos que envolvem a replicação periódica do DNA e a segregação deste DNA replicado com os constituintes celulares para as células filhas. Existem quatro fases do ciclo celular: G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> e M ou multiplicação com o tempo total de 12 horas. As duas fases G são chamadas de “*gap*” (intervalo); a fase S de síntese é o período de replicação do DNA e a fase M, mitótica marca a duplicação da célula (SNUSTAD; SIMMONS, 2001; DÍAZ *et al.*, 2003).

O evento inicial do ciclo celular, ilustrado na **Figura 4**, é o crescimento e aumento da massa celular, que ocorre após a multiplicação celular. Esta fase denominada de G<sub>1</sub> é a fase mais longa do ciclo celular e esse período é marcado por uma atividade bioquímica intensa: a célula aumenta seu material enzimático, suas organelas se replicam, assim como

outras moléculas e estruturas citoplasmáticas também aumentam em número, e conseqüentemente, o tamanho da célula (SNUSTAD; SIMMONS, 2001).



**Figura 4** – Ciclo celular  
([http://www.cientic.com/ciclo\\_pp7.html](http://www.cientic.com/ciclo_pp7.html))

As células em G<sub>1</sub> podem deter sua progressão no ciclo celular e entrar em estado de repouso especial chamado G<sub>0</sub>. Nesta fase de repouso há uma ausência de fatores de crescimento apropriados, o que leva as células a um estado de latência no ciclo celular no qual o sistema de controle não avança para G<sub>1</sub>. Caso a célula consiga passar pela fase G<sub>1</sub>, esta irá prosseguir no ciclo celular indo para fase S (DÍAZ *et al.*, 2003). Tempo total de 12 horas

Na fase S (síntese), as moléculas de DNA estão sendo ativamente replicadas – processo que dura aproximadamente nove horas. A célula adquire tamanho suficiente e sintetiza proteínas importantes, além do ATP (adenosina trifosfato) necessário (DÍAZ *et al.*, 2003).

Durante a fase G<sub>2</sub> ocorre a preparação para a mitose, fase na qual a célula produzirá repartições equitativas do material genético. A G<sub>2</sub> mitose dura cerca de quatro horas, e

neste período as moléculas de DNA começa a sofrer condensação da cromatina e a formarem cromossomos visíveis (DÍAZ *et al.*, 2003).

A fase M é a parte final do ciclo celular. O processo de multiplicação se completa em aproximadamente uma hora. As duas cromátides irmãs já se separaram, indo para células filhas geneticamente idênticas (SNUSTAD & SIMMONS, 2001).

## 2.9 Proto-oncogene

Um interesse especial nos proto-oncogenes no diagnóstico biodosimétrico tem surgido devido às suas características potenciais de apresentar resposta tempo e dose dependência à radiação ionizante.

A integridade e a função de um determinado tecido, assim como a sua função, são conferidas por um equilíbrio estabelecido entre proliferação e morte celular. Esse equilíbrio é mantido por meio de um complexo sistema de sinalização intra e extracelular. Quando esse equilíbrio é perdido, as células passam a se proliferar de forma anômala, formando uma massa de células desordenadas que constituem um tumor primário (CAMARGO; COSTA, 2003).

Os proto-oncogenes são genes normais presentes nas células e possuem um papel importante no crescimento e na diferenciação celular. Eles estão envolvidos na regulação positiva da proliferação celular e, quando alterados, se transformam em oncogenes, responsáveis pela conversão das células normais em células cancerosas. Alterações genéticas em proto-oncogenes estão freqüentemente associadas a um ganho de função e são dominantes em relação à carcinogênese (CAMARGO; COSTA, 2003).

Essas alterações podem ser do tipo biológico (vírus, bactérias), físicos (radiação ionizante) e químicos (álcool, fumo) que atuam sobre o DNA promovendo danos genéticos, sobretudo em determinados genes que controlam o crescimento, a diferenciação e morte programada da célula (CAMARGO; COSTA, 2003; CHOPIN *et al.*, 2001).

Existem três mecanismos genéticos responsáveis pela transformação dos proto-oncogenes em oncogenes:

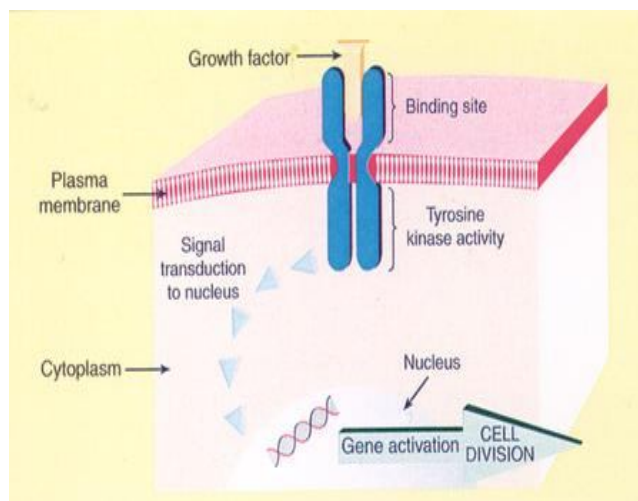
- Mutação;
- Amplificação;
- Rearranjo.

Atualmente os oncogenes são classificados de acordo com seu modo de atuação em:

- 1 – Fatores de crescimento;
- 2 – Receptores dos fatores de crescimento;
- 3 – Transdutores de sinal;
- 4 – Fatores de transcrição;

Os fatores de crescimento são proteínas que estimulam a divisão celular. Na ausência dessas proteínas, a célula normal sai do ciclo de divisão e entra em um estado quiescente conhecido como  $G_0$ . Vários oncogenes codificam proteínas que influenciam o crescimento e a diferenciação celular. O oncogene *sis* (vírus do sarcoma simian - *Simian Sarcoma Virus*), por exemplo, codifica uma das cadeias do PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas - *platelet derived growth factor*) e a célula mutada fica sobre controle autócrino, tornando-se menos sensível à regulação externa (CAMARGO; COSTA, 2003; ZAGO *et al.*, 2005).

Os receptores dos fatores de crescimento são proteínas transmembrânicas presentes na superfície da célula (**Figura 5**). Possuem um domínio externo ao qual se liga o fator de crescimento e um domínio citoplasmático capaz de ativar a cascata de sinalização intracelular. O EGF (fator de crescimento epidermal - *epidermal growth factor*) é um exemplo deste oncogene (CAMARGO; COSTA, 2003).



**Figura 5** – Fator de crescimento epidermal (EGF).  
(www. Medscape.com)

Os transdutores de sinal compreendem as proteínas localizadas na face interna da membrana citoplasmática envolvidas no processo de sinalização celular. Essas proteínas atuam em vias complexas como transdutoras ou amplificadoras do sinal desencadeado pela ligação do fator de crescimento ao seu receptor. Alterações nos comandos de proliferação celular podem ocorrer quando essas proteínas sofrem alterações estruturais fazendo com que elas emitam sinais proliferativos. O gene *ABL* é um exemplo de proto-oncogene desta classe (CAMARGO; COSTA, 2003; ZAGO *et al.*, 2005).

A última classe de proto-oncogene envolve proteínas nucleares que agem como fatores de transcrição regulando diretamente a expressão gênica. Eles possuem em sua estrutura domínios protéicos capazes de interagir com a região promotora dos genes. Os fatores de transcrição freqüentemente relacionados à formação de tumores são as proteínas das famílias MYC, FOS e JUN (CAMARGO; COSTA, 2003;).

## 2.10 Os genes constitutivos

O gene controle “ideal” deve ter expressão estável, com nível similar em todos os tecidos investigados, não sendo influenciado pelas condições experimentais (THELLIN *et al.*, 1999), estes genes são denominados de constitutivos ou *housekeeping*. Além disso, deve-se considerar com cuidado a escolha do gene controle, que deve ter uma eficiência de

amplificação aproximadamente igual ao gene alvo, não variando o nível de expressão na amostra do estudo. Dentre os genes controle utilizado pode-se citar o *ABL*, a  $\beta$ -actina, o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, o RNA ribossomal 18S, a  $\beta_2$ -microglobulina, as  $\beta$ -glucuronidases e o receptor de transferrina, entre outros (BAS *et al.*, 2004).

Entretanto alguns estudos consideram determinados genes controle inapropriados para a normalização de genes alvos específicos devido a diferenças significativas dos níveis de expressão ou quando da detecção de pseudogenes transcritos no gene controle (LION; KIDD, 1998; BUSTIN, 2002). Portanto, a seleção do gene controle é essencial para a interpretação das análises de quantificação dos genes de interesse (DHEDA *et al.*, 2004; BANDA *et al.*, 2007).

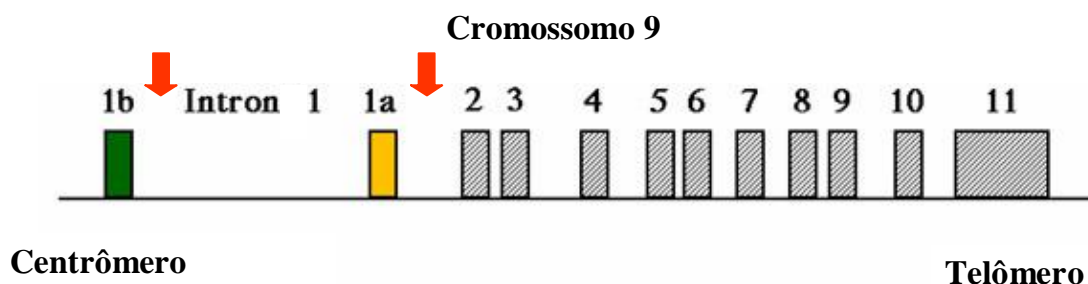
Em uma PCR em Tempo Real estes genes podem ser utilizados como controles para padronizar a quantidade de DNA ou RNA da reação. Assim, o nível de expressão do gene alvo é normalizado, com o objetivo de compensar as diferenças na quantidade de RNA mensageiro e qualidade entre diferentes amostras (AERTS *et al.*, 2004).

Estudos recentes de Beillard e colaboradores (2003) e Weisser e colaboradores (2004) resultaram na recomendação do gene *ABL* como controle mais confiável no diagnóstico e detecção da doença residual mínima em leucemias agudas, sendo o único gene constitutivo analisado e cujo nível de expressão não diferiu significativamente entre os tecidos e tipos de leucemias.

Existe interesse particular no gene *ABL* uma vez que no Laboratório de Biologia Molecular do Hemope ele é utilizado como gene normalizador para os testes de PCR em Tempo Real em pacientes com leucemia mielóide crônica.

## 2.11 O gene *ABL*

O gene *ABL* humano está localizado no braço longo do cromossomo 9 na região 9q34, ocupando uma região de aproximadamente 225 kb (quilobase)<sup>1</sup>. O gene possui 11 éxons<sup>2</sup>, sendo o 1a e 1b alternativos, como apresentado na **Figura 6** (CHISSOE *et al.*, 1995), e contém seqüências homólogas às seqüências do vírus da leucemia murina de Abelson, ou A-MuLV associados à transformação celular (ABELSON; RABSTEIN, 1970).



**Figura 6** – Estrutura do gene *ABL*  
([www.biologia.uniba.it/.../ematologia.html](http://www.biologia.uniba.it/.../ematologia.html))

Um mecanismo de *splicing*<sup>3</sup> alternativo determina dois tipos de RNAm transcritos: 1) RNAm de 6 kb, contendo éxons 1a -11; 2) RNAm de 7 kb, contendo os éxons 1b – 11. Os transcritos codificam uma proteína de 145 kDa (quilodaltos)<sup>4</sup> localizada no núcleo que pode ligar-se ao DNA e possui baixa atividade tirosina quinase (LEHNINGER, 2000). As alterações do *ABL* por rearranjo cromossômico ou transdução viral levam à transformação maligna como é o caso da Leucemia Mielóide Crônica - LMC (LANEUVILLE, 1995).

A proteína ABL possui vários domínios estruturais, como ilustrado na **Figura 7**, dos quais três (SH1 – SH3), encontram-se localizados na região amino-terminal e têm homologia ao *src* (*Rous Sarcoma Virus*). A proteína *src* é uma proteína tirosina quinase não receptora cuja função é a transdução de sinais de controle de crescimento provenientes

<sup>1</sup> Quilobase: unidade usual de comprimento de fragmentos de DNA equivalente a 1000 nucleotídeos.

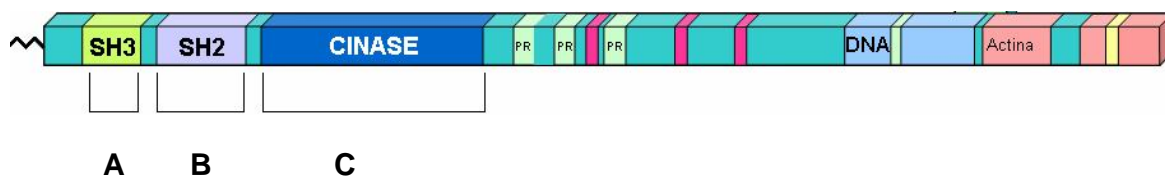
<sup>2</sup> Éxons: seqüências codificante de um gene que são traduzidas para uma proteína, após remoção dos íntrons.

<sup>3</sup> Splicing: processo que remove *íntrons* e junta os *éxons* durante a transcrição do RNA.

<sup>4</sup> Dalton: unidade de massa atômica, usada na biologia molecular, equivalente a 1/12 de massa do carbono-12. 1kDa=1000 Da.



dos receptores de superfície celular ativado. O domínio SH1 (*src homology region 1 domain*) tem função de tirosina quinase, enquanto o SH2 (*src homology region 2 domain*) e o SH3 (*src homology region 3 domain*) permitem interações com outras proteínas. O domínio SH2 reconhece tirosinas fosforiladas e as SH3, seqüências ricas em prolina (LEHNINGER, 2000).



**Figura 7** – Domínio estrutural do gene *ABL*.  
(Modificado de <[http://cmckb.cellmigration.org/domain\\_c\\_abl.html](http://cmckb.cellmigration.org/domain_c_abl.html)>)

\* A, B: domínios de interação com proteínas

\*C: domínio de função tirosina quinase

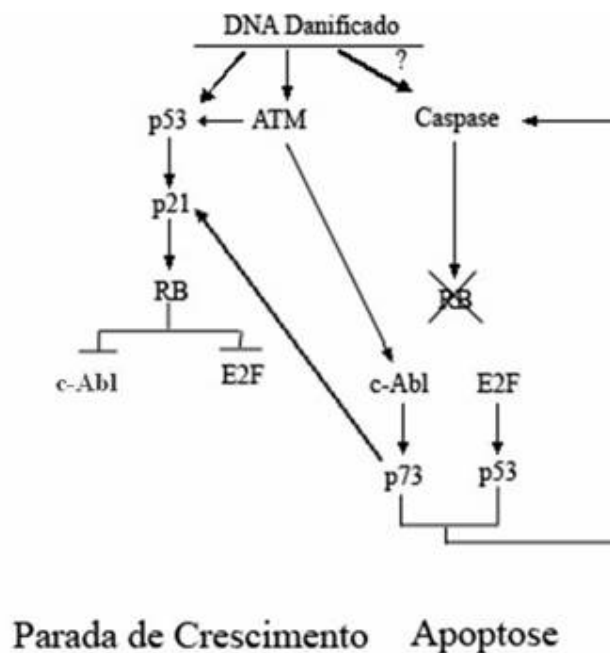
A tirosina quinase pertence a um grupo de proteínas envolvidas na regulação celular e é amplamente expressa. Ela se localiza no núcleo e se liga ao DNA (SAGLIO; CILLONI *et al.*, 2004). Esta atividade de ligação com o DNA é regulada pela fosforilação, mediada pelo CDC2 (Controlador da Divisão Celular 2 - *Cell Division Controller* 2), sugerindo uma função para o ABL no ciclo celular (LEE; NURSE, 1987).

Welch e Wang (1993) mostraram que a atividade tirosina quinase nuclear do ABL é regulada no ciclo celular através da interação específica com a proteína Retinoblastoma (RB). A tirosina quinase ABL nuclear pode aumentar a transcrição e esta atividade é inibida pela proteína RB. De acordo com Wang (2000), no DNA danificado pela radiação ionizante, agentes fisiológicos e farmacológicos podem ativar a tirosina quinase ABL, que induz apoptose.

A lesão do DNA pode induzir parada do crescimento ou apoptose celular, e a tirosina quinase c-ABL tem um papel na regulação desta apoptose. A proteína supressora de tumor p53 e a quinase ATM podem ativar ambas as respostas biológicas. A proteína retinoblastoma RB desempenha um papel também essencial na parada do crescimento. Nas

células sofrendo apoptose, a RB é clivada pelas caspases e degradada, e esta degradação da RB sensibiliza as células para apoptose. A ativação da tirosina quinase ABL pela lesão do DNA requer a função de ATM e inativação do RB (TAN; WANG, 1998).

O c-ABL ativado pode induzir a p73, um homólogo da proteína p53 com função apoptótica. A degradação e inativação de RB também ativa E2F que promove apoptose. É possível que ativação de p53, p73 e fator de transcrição E2F possam potencializar a ativação de caspases que finalmente realizam as funções de indução da apoptose. A ativação da via c-ABL/p73 pode também contribuir para indução da p21 e potencializar a função da p53 na parada do crescimento. O balanço e interação entre os componentes destas vias provavelmente determinam o destino das células após lesão do DNA. Esta cascata de eventos encontra-se esquematizada na **Figura 8** (WANG, 2000).

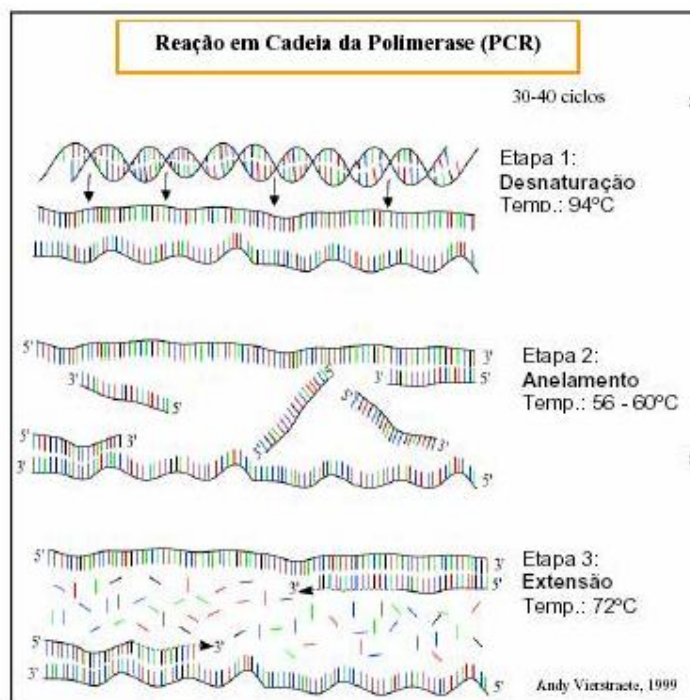


**Figura 8** – DNA danificado por via de sinalização.  
(WANG, 2000)

## 2.12 Reação em Cadeia da Polimerase Convencional

A Reação em Cadeia da Polimerase – PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foi introduzida por Saiki e cols (1985) e Mullis e cols (1986). O segredo do sucesso da PCR reside na capacidade que a metodologia possui de amplificar uma seqüência precisa de DNA aliada à sua simplicidade, reprodutibilidade, elevada sensibilidade e especificidade (EISENSTEIN, 1990).

A PCR baseia-se na síntese bidirecional e repetitiva de DNA através de uma região do ácido nucléico utilizando *primers* ou iniciadores na presença de reagentes termoestáveis, o que a torna uma técnica extremamente útil na amplificação e detecção de moléculas de DNA presentes em baixo número de cópias em uma determinada amostra biológica (EISENSTEIN, 1990). A **Figura 9** ilustra as etapas de uma PCR.



**Figura 9** – Reação em Cadeia da Polimerase.  
(<http://www.plantpath.wisc.edu/soyhealth/virus/virustech.htm>)

A amplificação da PCR requer um par de iniciadores, os quatro deoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs), íons de magnésio ( $MgCl_2$ ) e uma DNA polimerase termostável para sintetizar o DNA (MANIATIS *et al.*, 1982).

Três eventos distintos devem ocorrer durante a reação de PCR, a cada ciclo. O primeiro passo é a desnaturação, quando a reação é submetida a uma alta temperatura, geralmente em torno de  $90 - 95 ^\circ C$ , o que provoca o rompimento das pontes de hidrogênio entre as duas cadeias DNA molde. No segundo evento, a temperatura varia de  $50$  a  $65 ^\circ C$ , e ocorre o anelamento dos oligonucleotídeos (*primers*) às regiões complementares das fitas separadas. A temperatura eleva-se a  $72 ^\circ C$  para ocorrer a extensão, quando a enzima *Taq* DNA polimerase acrescenta nucleotídeos à fita complementar. O ciclo é repetido e em poucas horas têm-se milhões de cópias exatamente idênticas as originais (EISENSTEIN, 1990).

Na PCR convencional os produtos amplificados são separados por eletroforese em gel de agarose ou acrilamida, visualizados através da coloração com brometo de etídio e exposição à luz ultravioleta. O brometo de etídio é potencialmente cancerígeno conferindo uma desvantagem no uso dessa técnica.

### **2.13 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real**

A possibilidade de monitorar a PCR em tempo real (Q-PCR) revolucionou o processo de quantificação dos ácidos nucleicos. A primeira documentação foi publicada por Higuchi e colaboradores em 1993 e desde então tem favorecido o desenvolvimento de métodos de amplificação quantitativos.

Essa técnica é uma variante da reação de PCR convencional e sua peculiaridade é baseada no processo de amplificação monitorado em tempo real à medida que o produto desta amplificação está sendo formado. Com isso, não há necessidade de se observar o resultado em gel de agarose após o término da reação. O sistema é baseado na detecção e quantificação de um corante fluorescente que tem a característica de se intercalar ou anelar

ao alvo amplificado (LEE *et al.*, 1993; GINZINGER, 2002; WILHELM; PINGOUD, 2003).

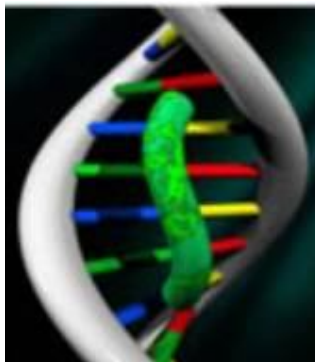
À medida que a reação prossegue e acumulam-se fragmentos em cadeia dupla produzidos pela PCR, a fluorescência aumenta e é captada pela unidade óptica do aparelho. A cinética do acúmulo desta fluorescência durante a amplificação é diretamente proporcional ao número inicial de cópias de DNA ou DNA complementar – cDNA (KWAN *et al.*, 2000).

Diferentes sistemas de marcação fluorescente podem ser utilizados, a depender da necessidade de sensibilidade/especificidade e da disponibilidade de recursos. O desenvolvimento de novas tecnologias para a marcação fluorescente tornou o sistema da Q-PCR mais acessível e disponível ao uso na rotina do laboratório clínico e de pesquisa (BUSTIN, 2000).

Um dos sistemas utilizado para estudo da expressão gênica é denominado de *TaqMan*, através de uma sonda marcada na extremidade 5' com um fluoróforo (*reporter*) e na extremidade 3' com um segundo fluoróforo (*quencher*) que inibe o *reporter*. A proximidade entre os dois fluoróforos impede que a emissão de fluorescência tenha níveis detectáveis (BUSTIN, 2000; DORAK, 2006).

Quando da hibridização dos *primers* e sonda, cuja região complementar estará na seqüência delimitada pelos dois *primers*, a enzima *Taq* polimerase inicia a extensão da nova fita. Quando a enzima atinge o local onde a sonda encontra-se hibridizada, devido a sua propriedade 5'-nuclease hidrolisa a sonda e libera assim o *reporter*. Este, por estar distante da interação com o *quencher*, emite fluorescência em níveis detectáveis. A enzima *Taq* reconhece apenas estruturas em dupla fita, por isso sondas não hibridizada permanecem intactas e não emitem fluorescência (BUSTIN, 2000; DORAK, 2006).

As sondas de hibridização possuem custos elevados, no entanto, a marcação do ácido nucléico por uma molécula que se intercala na fenda menor do DNA com estrutura de dupla fita, como ilustrado na **Figura 10**, é uma opção de custo acessível (BUSTIN, 2000; DORAK, 2006).

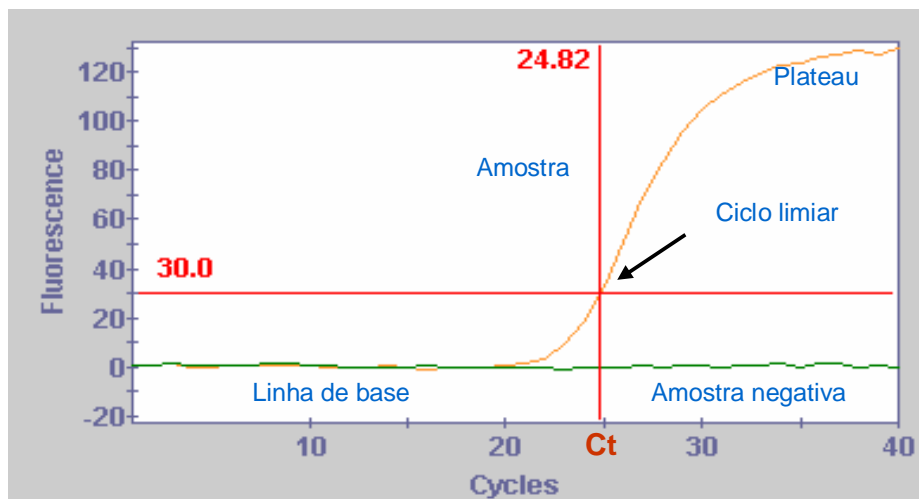


**Figura 10** – Fita dupla de DNA intercalada por corante fluorescente Sybr Green.  
(<http://core.nhri.org.tw/images/ABI7700-1.jpg>)

Inicialmente o marcador utilizado com a propriedade intercalante foi o brometo de etídio, posteriormente substituído pelo *Sybr green* devido ao seu potencial carcinogênico. A emissão de fluorescência na fase de desnaturação da molécula é baixa e aumenta proporcionalmente à quantidade de material genético em estado hibridizado, condição que ocorre a partir da etapa de anelamento e especialmente na extensão, quando é atingida uma máxima fluorescência. Uma limitação do método é que este não diferencia os produtos de PCR específicos dos inespecíficos, tais como DNA amplificado que esteja contaminando a amostra ou dímeros de *primer* (VANDERSOMPELE *et al.*, 2002).

A análise dos resultados de uma amplificação com *Sybr green* é feita a partir da curva de dissociação (curva de *melting*), que representa graficamente a derivativa negativa da fluorescência em relação à temperatura (GINZINGER, 2002). Após a PCR, essa curva é gerada por um aquecimento lento da dupla fita. Cada fita de DNA possui sua temperatura de *melting* específica ( $T_m$ ), definida como a temperatura em que 50% do DNA tornam-se fita simples. Estas temperaturas são determinadas pelo comprimento da dupla fita de DNA; a proporção de GC ( $T_m$  é maior em fragmentos ricos em GC) e o grau de complementariedade entre as fitas (HIGUCHI *et al.*, 1993). O produto presente na reação é considerado puro quando apenas uma única temperatura de dissociação é encontrada (DORAK, 2006).

A curva de amplificação do Q-PCR é uma representação gráfica do sinal de fluorescência *versus* o número de cópias de ciclos, como exemplificado na **Figura 11**.



**Figura 11** – Esquema de curva de amplificação do PCR em Tempo Real

\**Linha de Base = fase onde a intensidade da fluorescência não é suficiente para ser detectada.*

\**Ciclo Limiar (Ct) = ciclo onde a reação cruza o limiar de detecção.*

\**Plateau = fase onde não ocorre mais aumento no número de produtos.*

Durante a fase exponencial da Q-PCR, um ponto de corte *threshold* (limiar) no sinal de fluorescência é determinado, a partir do qual as amostras podem ser comparadas. O limiar é função da quantidade de fluorescência acumulada (*background* de fluorescência) e é calculado como dez vezes o desvio padrão da média do sinal da linha de base, que corresponde aos ciclos da PCR no qual este sinal é acumulado, abaixo dos limites de detecção (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; GINZINGER, 2002).

Quando o ciclo ultrapassa o limiar e alcança o quadrante de detecção é denominado de ciclo limiar ou Ct (*cycle threshold*). O valor do Ct é proporcional à quantidade da amostra inicial, portanto, quanto maior a quantidade de molde, mais baixa será o valor do Ct obtido na reação, sendo assim a base para as mensurações da quantidade de transcritos ou DNA. Cada ciclo corresponde a aproximadamente 2 vezes o valor inicial (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; GINZINGER, 2002).

A reação de amplificação em tempo real possui uma grande especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade, além de ser um método rápido e automático, pois dispensa a análise em gel de eletroforese – como ocorre na PCR convencional. Sua aplicação representa um grande avanço nos métodos moleculares por facilitar a

quantificação da expressão gênica em baixos níveis e em determinado tecido ou amostra biológica (JUNG *et al.*, 2000).

A PCR em Tempo Real é um sistema fechado que diminui o risco de contaminação, elimina a etapa de eletroforese em gel como na PCR convencional e a utilização do corante *Sybr green* oferece menor custo em relação ao uso de sondas e microarranjos.



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a expressão do gene *ABL* como potencial biomarcador de exposição à radiação ionizante.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- 1) Quantificar a expressão do gene *ABL* nas fases pré e pós-irradiação gama de linfócitos humanos do sangue periférico *ex vivo* através da técnica da PCR em Tempo Real;
- 2) Avaliar tempo e dose-dependência da expressão do gene *ABL* à radiação ionizante.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Tipo de estudo**

O estudo do tipo experimental de grupo único foi realizado no período de janeiro a julho de 2007, na Unidade de Laboratórios Especializados da Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco - HEMOPE e no Centro de Radioterapia de Pernambuco – CERAPE.

### **4.2 Amostragem e operacionalização**

Após consentimento informado (**Apêndice I**) e preenchimento de um questionário (**Apêndice II**), foram utilizadas amostras de sangue periférico de cinco indivíduos voluntários, adultos sadios de ambos os sexos, idades semelhantes e não fumantes. Os voluntários foram identificados pelos códigos A, B, C, D e E.

Indivíduos que tinham conhecimento de terem sido expostos a algum tipo de agente químico (hidrocarbonetos aromáticos como o benzeno, agrotóxicos, etc), físico (radiações ionizantes) ou biológico (vírus) passível de danificar a molécula de DNA foram excluídos do estudo uma vez que esses fatores nocivos podem lesar a célula primitiva sangüínea. Além disso, pode reduzir seu número e/ou provocar alterações estruturais ou citogenéticas, as quais têm como consequência a produção e/ou surgimento de linhagens de células anormais.

### 4.3 Coleta de material

A coleta da amostra de sangue foi obtida por meio de punção venosa periférica em ácido-citrato-dextrose (ACD) logo após anti-sepsia local com álcool a 70%. O anticoagulante ACD mostra vantagens em relação à heparina por permitir tanto a análise molecular quanto a cultura de células, dado que a heparina inibe as enzimas usadas no processo da PCR (BEUTLER *et al.*, 1990; FISCUS *et al.*, 2000).

De cada indivíduo voluntário foram coletados 60 mL de sangue distribuído da seguinte forma: 2 seringas de 10 mL cada identificadas pela taxa de radiação de 1 Gy; 2 seringas de 10 mL, identificadas pela taxa de radiação de 3 Gy e os 20 mL restantes foram utilizados como material não irradiado. Uma alíquota foi utilizada para avaliação do número de leucócitos e linfócitos através de contador automático (Cell Dyn. 3200 CS/SL – ABBOTT, EUA) no Laboratório de Citologia do Hemope.

O volume de sangue coletado para este estudo (60 mL) deveu-se à necessidade de padronização da técnica, no entanto na prática este volume pode ser reduzido para valores em torno de 5 mL.

As amostras devidamente identificadas foram acondicionadas em recipiente isotérmico com o intuito de reduzir possíveis interferências (ANVISA, RDC 302/2005) e garantir as mesmas condições tanto às amostras irradiadas quanto às não irradiadas.

### 4.4 Perfil dos indivíduos voluntários

A **Tabela 4** apresenta as informações obtidas através do questionário aplicado aos participantes da pesquisa. O predomínio foi de indivíduos do sexo feminino, a mediana de idade de 36 anos com extremos de 25 e 54 anos.

**Tabela 4** – Dados básicos sobre os indivíduos voluntários do estudo.

<b>Indivíduo</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>Fumante</b>	<b>Exposição conhecida a agentes lesivos ao DNA</b>
A	F	51	Não	Não
B	M	54	Não	Não
C	F	22	Não	Não
D	M	25	Não	Não
E	F	36	Não	Não

F = Feminino; M = Masculino

#### 4.5 Condições de irradiação

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*) com taxa de exposição de  $264 \text{ cGy} \cdot \text{min}^{-1}$  no período em que as amostras foram cujos tempos foram irradiadas.

A seringa de 10 mL foi introduzida no bloco de Mix-D<sup>5</sup> ( $\rho = 0,99 \text{ g/cm}^3$ ) de 2 cm de espessura e densidade semelhante ao tecido mole humano. O campo de irradiação possui dimensões de  $15 \times 15 \text{ cm}^2$  na fase superior e um ponto central que é posicionado a uma distância de 80 cm da fonte de radiação e que coincide com o centro da seringa, promovendo uma irradiação homogênea do material.

O intervalo de tempo entre o momento da coleta e a irradiação das amostras foi de aproximadamente 1 hora. O tempo de exposição das amostras a 1 Gy e 3 Gy com o uso da fonte de Cobalto-60 foram de 1 minuto e 22 segundos e 1 minuto e 44 segundos respectivamente.

Logo após a irradiação, as amostras foram levadas à Fundação Hemope para serem processadas no Laboratório de Biologia Molecular. Por se tratar de um material irradiado e não radioativo, o acondicionamento das amostras seguiu as mesmas diretrizes

<sup>5</sup> MixD - Material equivalente a tecido humano. Composição Química: Hidrogênio: 13,4%, Carbono: 77,8%, Titânio: 1,4%, Oxigênio: 3,5%. Forma física: sólida, quebradiça, esbranquiçada.

determinadas pela BPLC (Boas Práticas em Laboratório Clínico) para amostras rotineiras (MENDONÇA, 1998).

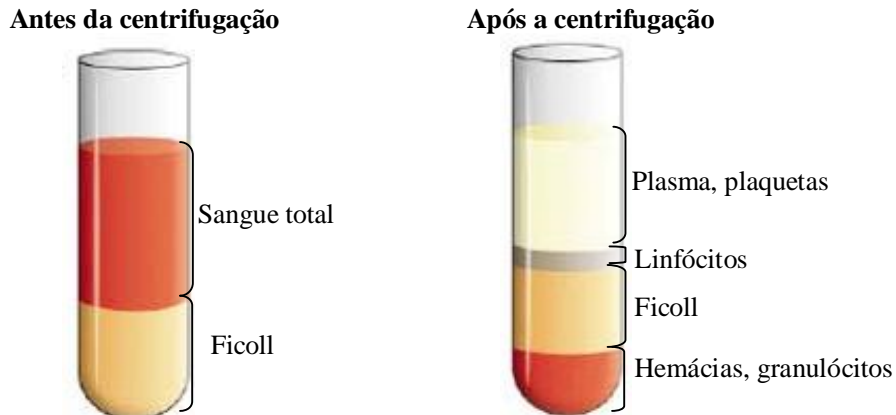
#### 4.6 Preparação celular

As amostras de sangue foram homogeneizadas por inversão, diluídas em Salina Tamponada com Fosfato – PBS [1x] na proporção de 1:1 (v/v), e processadas utilizando-se gradiente de densidade com Ficoll-Hypaque 1077 (Sigma – St. Louis, MO - USA) na proporção de 1:3 (v/v) como descrito por BOYUM (1968).

O gradiente Ficoll-Hypaque é formado por uma mistura de soluções de concentrações diferentes e crescentes que se distribuem ao longo do tubo ficando as soluções de maior densidade no fundo quando centrifugadas. Ele consiste de uma mistura de polissacarídeos neutros hidrofílicos de alta densidade que se dissolve prontamente em solução aquosa. A densidade do Ficoll é maior que a dos linfócitos e menor que a das hemácias e granulócitos.

Após centrifugação a 350 x g durante 18 minutos, essas células se agregam à polissacarose, sendo rapidamente sedimentadas, e os linfócitos e outras células mononucleares permanecem na interface plasmática. A contaminação por hemácias é mínima, e a maioria das plaquetas é removida por centrifugação de baixa velocidade durante as lavagens subseqüentes.

Após centrifugação a “nuvem” linfocitária é recuperada cuidadosamente e lavada em PBS [1x] visando à eliminação de resíduos protéicos que podem interferir na técnica (**Figura 12**). Uma segunda centrifugação é realizada a 350 x g durante 10 minutos e o sobrenadante é descartado, recuperando-se assim um botão celular. Este botão foi ressuspenso em 2 mL do meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 20% de Soro Bovino Fetal – SBF (Cultilab, Campinas, SP - Brasil) para estabelecer um ajuste na concentração celular de  $1 \times 10^6$  células/mL. A suspensão celular foi utilizada para a cultura de células linfocitárias.



**Figura 12** – Separação celular de amostra sanguínea por gradiente de Ficoll  
(<http://www.ebiotrade.com/newsf/pic/20051020104525.jpg>)

#### 4.7 Cultura celular

Dentre os diversos meios para cultivo de linfócitos que podem ser utilizados, o escolhido para esta pesquisa foi o *Roswell Park Memorial Institute* - RPMI 1640 (Sigma, St. Louis - USA), que é formado de uma mistura contendo vários sais, aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para a célula. O Soro Bovino Fetal – SBF (Cultilab, Campinas, SP - Brasil) possui em sua composição proteínas totais, albumina, globulinas, glicose, uréia, creatinina e hemoglobina.

Os linfócitos em suspensão obtidos foram ajustados a uma concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL e adicionados em garrafas próprias para cultivo contendo 4,0 mL de meio RPMI 1640, suplementado com 20% de SBF. As garrafas devidamente identificadas foram incubadas em estufa a  $37^\circ\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$  até o término do tempo de cultivo pré-estabelecido para extração do RNA de 3, 6 e 12 horas.

#### 4.8 Viabilidade celular

Como parâmetro para avaliar a viabilidade celular, foi utilizado o método de exclusão através da coloração com azul de Trypan (Sigma – St. Louis, MO, USA). Uma

alíquota de 50  $\mu\text{L}$  da suspensão de células foi diluída em azul de Trypan na mesma proporção (1:1). Em seguida a mistura foi incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. Uma pequena alíquota foi aplicada na câmara de Neubauer e observada ao microscópio óptico em aumento de 40x. A viabilidade celular foi obtida pela relação no número de células viáveis e das células totais. A viabilidade celular considerada para todas as amostras foi superior a 85% mesmo após separação, cultura e irradiação dos linfócitos.

#### 4.9 Extração do RNA

Após cultura, o material foi centrifugado a 450 x g durante 2 minutos para obtenção do botão celular e lavagem em PBS [1x] para a extração de RNA. O ácido ribonucléico total (RNA) das células de sangue periférico dos doadores voluntários foi extraído segundo o método modificado de Chomczynski e Sacchi (1987), utilizando o kit comercial *Trizol LS* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

A análise da expressão do gene *ABL* foi realizada antes da irradiação e com 6 e 12 horas após irradiação. A cada período de tempo as células eram retiradas da cultura, o RNA extraído, quantificado, cDNA sintetizado e amplificado.

A integridade do RNA foi verificada após coloração com brometo de etídio por eletroforese em gel de agarose a 2%, cuja análise foi realizada sob luz ultravioleta com auxílio de sistema de foto documentação (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, França) para visualização da intensidade das bandas referentes ao RNA ribossômico 28S, 18S.

A quantidade de RNA foi mensurada com base na relação da absorbância em espectrofotômetro de UV em 260 nm e 280 nm utilizando o aparelho Hitachi, modelo U-2001 (Tóquio, Japão). Nestas condições, uma unidade de DO (densidade óptica) equivale a 40  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de RNA. A relação entre as leituras realizadas a 260 e 280 nm foi utilizada como parâmetro na estimativa do grau de contaminação do RNA por proteínas sendo considerados adequados os valores entre 1,6 e 2,0 (MANIATIS *et al.*, 1982). A água utilizada para diluição do RNA e em todas as reações foi ultrapura, estéril tratada com

DEPC (Dietilpírocarbonato), inativador de RNases, seguindo protocolo de Maniatis *et al.* (1982).

#### 4.10 Transcrição reversa

O RNA de qualidade, desprovido de contaminação por DNA genômico foi quantificado e ajustado para concentração de 1,0 µg/µL e utilizado como molde para a síntese de cDNA pela ação da transcriptase reversa (RT). A síntese do cDNA foi realizada em um tubo de microcentrífuga com capacidade para 0,2 mL: 1,0 µL de oligonucleotídeo randômico (Promega, Madison, WI, EUA) na concentração de 0,2 µg/µL, 4,0 µL de RNA; água ultrapura e livre de RNases (Promega Madison, WI, EUA) completando para um volume final de 10,0 µL.

Após homogeneização, os tubos foram submetidos a 70 °C por 7 minutos para desnaturação do RNA e resfriados em banho de gelo por 3 minutos. A cada tubo, foi acrescentada uma mistura de 10,0 µL, que continha os seguintes reagentes: 4,0 µL de tampão 5x (Promega, Madison, WI, EUA); 2,5 µL de MgCl<sub>2</sub> na concentração de 25 mM; 1,0 mM de dNTP's na concentração de 10 mM; 1,0 µL de Transcriptase Reversa na concentração de 200 U/µL para permitir hibridização dos oligonucleotídeos aleatórios (hexâmero randômico) complementado com água ultrapura. Em seguida a mistura foi submetida a 42 °C por 60 minutos e, em seguida, a uma incubação de 70 °C por 15 minutos para desativação da enzima.

#### 4.11 Avaliação do cDNA

Na técnica RT-PCR Multiplex, diversos controles endógenos indicam se a síntese foi bem sucedida e, caso contrário, indica onde ocorreu a falha. O método consiste na amplificação de 4 controles endógenos: *BCR*, (*Break Point Region*) de 377pb; β<sub>2</sub>-microglobulina (beta-2-microglobulina), de 287 pb; *ABL*, de 193pb e *PBGD* (*porphobilinogen deaminase*), de 129 pb.



A ausência de amplificação do *BCR* indica comprometimento na síntese do cDNA de tamanho maiores. Além disso, a perda de amplificação de *ABL* ou  $\beta_2$ -microglobulina é indicativo de comprometimento da amostras de RNA. Finalmente, a ausência de *PBGD* mostra que o cDNA é inadequado para utilização, sendo necessário, portanto, adquirir uma nova amostra (LION; KIDD, 1998).

#### 4.12 PCR em Tempo Real

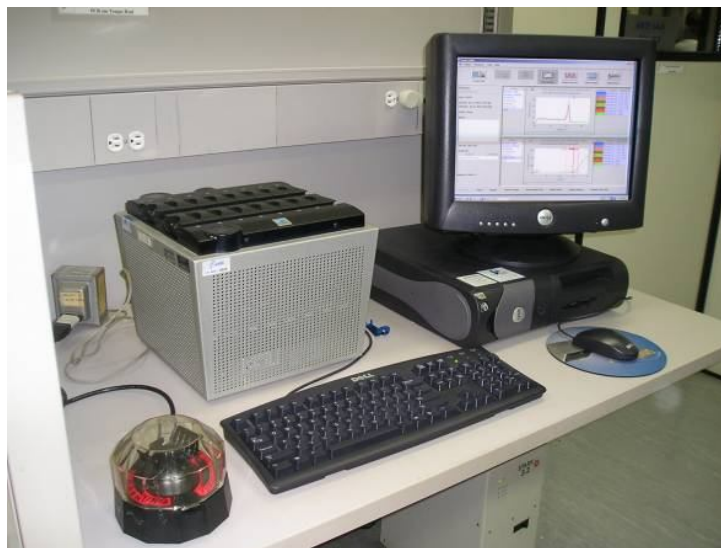
As reações de amplificação da PCR foram realizadas em duplicata com volume final de reação de 25  $\mu$ L contendo os seguintes reagentes: 12,5  $\mu$ L do *Sybr green* PCR Master Mix 2x (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), com os nucleotídeos desoxirribonucleotídeo 5'- trifosfato – dATP, dCTP, dTTP e dGTP com dUTP, tampão e AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, conforme instruções do fabricante, 8,5  $\mu$ L de água ultrapura, 1,0  $\mu$ L de cada oligonucleotídeo senso e anti-senso (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) na concentração de 25 pmol e por fim 2.0  $\mu$ L de cDNA. Na **Tabela 5** estão listadas as seqüências dos *primers* senso e anti-senso, utilizados na reação de Q-PCR.

**Tabela 5**– Seqüência de nucleotídeos utilizados na reação de Q-PCR

Oligonucleotídeos	Seqüência (5' - 3')
<i>ABL</i> senso	TGA TTA TAG CCT AAG ACC CGG A
<i>ABL</i> anti-senso	ACT GAA GCC GCT CGT TGG AAC TC

(MAURER, 1991)

Para a amplificação da PCR quantitativa utilizou-se o termociclador *SmartCycler* (Cepheid, Sunnyvale, CA, EUA), ilustrado na **Figura 13**, que tem como característica combinar simultaneamente amplificação e detecção. O fluoróforo *Sybr green* é um corante que se liga na alça menor da dupla fita de DNA emitindo luz fluorescente. A fluorescência é mensurada à medida que os produtos de amplificação são gerados. Quanto maior o número de duplas fitas de DNA formadas durante a reação de PCR, maior a emissão de fluorescência. A presença de DNA dupla fita na solução é capaz de aumentar essa emissão em até 10 vezes para uma mesma concentração de *Sybr green*.



**Figura 13** – Smart Cycler – Cepheid.  
(Laboratório de Biologia Molecular – Hemope)

O protocolo consistiu de 1 ciclo de desnaturação inicial a 94 °C por 30 segundos seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 65 °C por 30 segundos e uma extensão final de 72 °C por 30 segundos.

Ao final da reação de amplificação seguiu-se uma análise da curva de dissociação nas temperaturas de 60 °C a 95 °C. Através desta análise foi possível averiguar a especificidade da reação de amplificação, uma vez que o fluoróforo usado emite luz sempre que um dímero de DNA é formado.

#### **4.13 Quantificação da expressão gênica**

Para assegurar a reprodutibilidade, os ensaios da PCR foram realizados em duplicata e os dados foram transformados em valores absolutos para facilitar a análise. Os produtos (*amplicons*) obtidos durante a PCR em Tempo Real foram detectados através da curva de amplificação gerada ao longo da reação denominada de ciclo limiar da fase logarítmica da amplificação ou Ct (*Cycle threshold*). O Ct reflete o número do ciclo no qual a fluorescência gerada na reação atravessa o limiar ou linha de base e é inversamente

proporcional à concentração de DNA ou RNA da amostra analisada. Assim, uma unidade de Ct equivale ao dobro do produto amplificado de cópias iniciais de *amplicons*.

O valor do Ct foi utilizado para cálculo da quantidade de expressão após exportação dos valores obtidos para planilha *Excel* (*Microsoft Corporation*, USA). A quantificação da expressão gênica foi representada de forma absoluta através da fórmula  $2^{-Ct} \times 10^9$  (LEMOS *et al.*, 2005).

#### **4.14 Análise estatística**

A análise estatística dos dados foi realizada com o uso do software SPSS versão 13.0, através da comparação entre os grupos (sem e com irradiação a 1 e 3 Gy) em diferentes tempos (3, 6 e 12 horas). Os resultados são apresentados através de médias, desvios, valores máximos e mínimos e em gráficos *Box-Plot*, úteis para auxiliar nas comparações de medidas entre dois grupos.

O teste não-paramétrico *Wilcoxon signed rank* foi utilizado para comparação dos níveis de expressão em cada grupo nos diferentes tempos (3, 6 e 12 horas). Para comparação dos níveis de expressão entre os grupos (sem e com irradiação a 1 e 3 Gy) foi aplicado o teste *Mann-Whitney*. Os valores de “*p*” menores ou iguais a 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

#### **4.15 Qualidade dos instrumentos de medida**

Todos os procedimentos técnicos seguiram as BPLC (MENDONÇA, 1998), como o uso de cabine de fluxo laminar de luz UV, ponteiras descartáveis com barreira e pipetadores exclusivos para cada etapa do procedimento laboratorial. O descarte de amostras biológicas seguiu as Normas Brasileiras de Regulamentação – NBR 12809/93 – Manuseio de Resíduos de Serviços de Saúde da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Todas as reações foram realizadas utilizando um controle de contaminação da reação ausente de material genético. O controle positivo para a determinação da especificidade foi a linhagem celular oriunda de células da eritroleucemia humana (LOZZIO; LOZZIO, 1975).

#### **4.16 Aspectos éticos**

O estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da Fundação Hemope, sob o parecer de número 048/2006 (**Apêndice III**). Os doadores voluntários assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Estudos preliminares

Os estudos preliminares consistiram na avaliação da quantidade de sangue necessária para a realização dos experimentos, escolha do anticoagulante adequado, cultura e determinação da viabilidade celular, estabelecimento de doses e condições de irradiação, utilização de protocolos de extração, quantificação, qualificação e amplificação de ácidos nucléicos, bem como definição de métodos de análise dos resultados. Estes estudos foram realizados a partir da revisão bibliográfica, da experiência pessoal e de pesquisadores com a utilização de diferentes técnicas laboratoriais de investigação.

### 5.2 Análises das amostras de sangue

Foram realizados leucogramas nas amostras obtidas logo após cada coleta de sangue (**Tabela 6**).

**Tabela 6** – Número de leucócitos e porcentagem de linfócitos das 5 amostras de doadores voluntários.

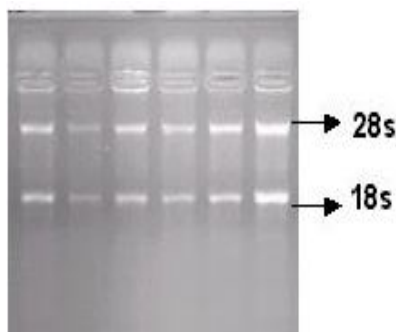
Indivíduo	Leucócitos (mm <sup>3</sup> )	Linfócitos (%)
A	4.400	32.8
B	8.500	29.4
C	2.700	49.3
D	4.500	42.3
E	6.900	37.0

Os resultados mostram que o número de leucócitos totais e a porcentagem de linfócitos dos indivíduos A, B, D e E encontravam-se dentro da faixa considerada de valores normais, ou seja, 4.500 a 11.000 por  $\text{mm}^3$  para os leucócitos totais e 20 a 50% para linfócitos (FAILLACE, 1995). O indivíduo C que apresentou o número de leucócitos de  $2.700 \text{ mm}^3$  afirmou posteriormente, que estava convalescendo de uma virose. Um segundo hemograma foi realizado e o número de leucócitos apresentou-se dentro da faixa de normalidade com  $5.400 \text{ mm}^3$  e 36% de linfócitos.

A viabilidade celular em todas as amostras testadas com a utilização do azul Trypan mostrou-se superior a 85% mesmo após separação, cultura e irradiação dos linfócitos.

### 5.3 Quantidade e qualidade do RNA e cDNA

O método de extração do RNA, através do kit *Trizol LS Reagent*, mostrou resultados satisfatórios quanto à quantidade e qualidade do material obtido e foi considerado adequado para a realização das análises. A integridade das amostras de RNA foi monitorada em géis de agarose a 2% corado com brometo de etídio. As amostras utilizadas nesse estudo apresentaram padrões característicos de qualidade do RNA ribossomal, com a presença de bandas referentes aos RNAs 28S<sup>6</sup> e 18S, como apresentado na **Figura 14**.

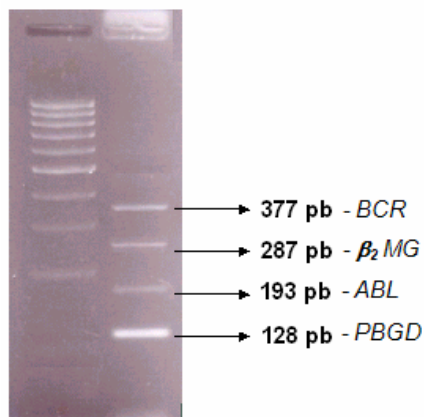


**Figura 14** – Resultados da análise de integridade do RNA total, exibindo RNA de 28S e 18S.

<sup>6</sup> Cada ribossoma é dissociável por centrifugação em duas subunidades, com coeficientes de sedimentação S (Svendberg), que nos eucariotos são de 40S e 60S. Cada subunidades possuem 18S e 28S de RNA.

Apesar de todas as amostras de RNA terem sido verificadas pelo padrão de bandas 28S e 18S em gel de agarose e quantificadas em espectrofotômetro, optou-se também por conferir previamente a qualidade dos cDNAs das amostras pelo método desenvolvido por LION & KIDD (1998). Isto porque diversos fatores podem influenciar a síntese do cDNA, como por exemplo, o nível de degradação do RNA da amostra sangüínea, os diferentes níveis de expressão dos RNAs mensageiros, o excesso de sal na extração do RNA ou até mesmo a eficiência da enzima transcriptase reversa.

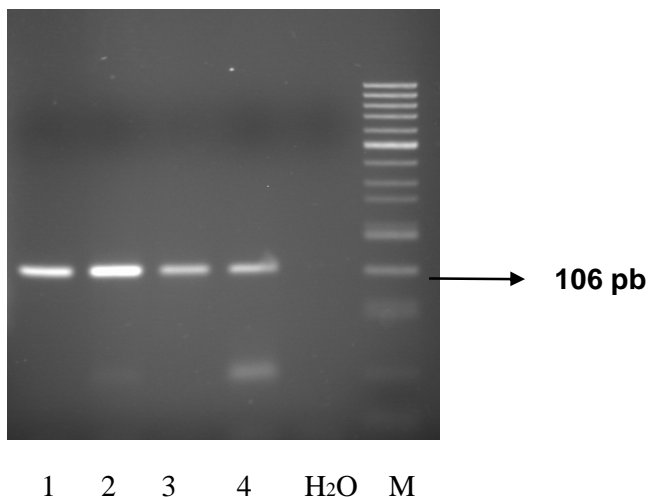
Assim, após sintetizar o cDNA de cada amostra foi realizado um controle de RT-PCR Multiplex para mostrar a qualidade do transcrito. O teste apresentou no mínimo 3 bandas correspondentes aos endógenos *BCR*,  $\beta_2$ -*MG*, *ABL* e *PBGD*. A **Figura 15** ilustra o perfil da amplificação do cDNA utilizado, demonstrando a qualidade adequada do produto da transcrição.



**Figura 15** – Resultado de análise da eficiência da transcrição (cDNA) através do teste de controle RT-PCR Multiplex em gel de agarose a 2%.

#### 5.4 Especificidade

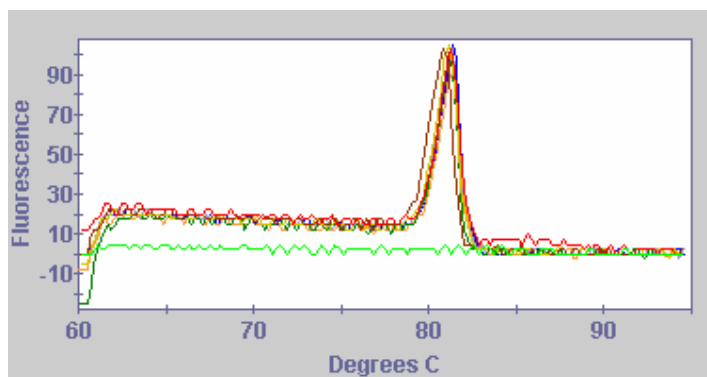
O estudo da especificidade do material amplificado foi realizado através de corrida em gel de agarose a 2% a partir do produto da Q-PCR, ilustrado na **Figura 16**.



**Figura 16** – Produtos da amplificação da PCR em Tempo Real confirmando presença do gene *ABL* (fragmento com bandas de tamanho 106 pb)

*1 = material não irradiado; 2 = material irradiado a 1 Gy; 3 = material irradiado a 3 Gy; H<sub>2</sub>O = controle branco (sem cDNA); M = marcador de 50 pb*

A especificidade também foi avaliada pela análise da curva de dissociação dos produtos da PCR em Tempo Real, ilustrada na **Figura 17**, com os valores de  $T_m$  obtidos em diferentes tempos e doses. As curvas mostram o pico de dissociação (ponto de *melting*) referente ao produto amplificado do gene em torno de 84 °C, tanto para as amostras quanto para o controle positivo com a linhagem celular K562. A curva sem o pico corresponde à água.

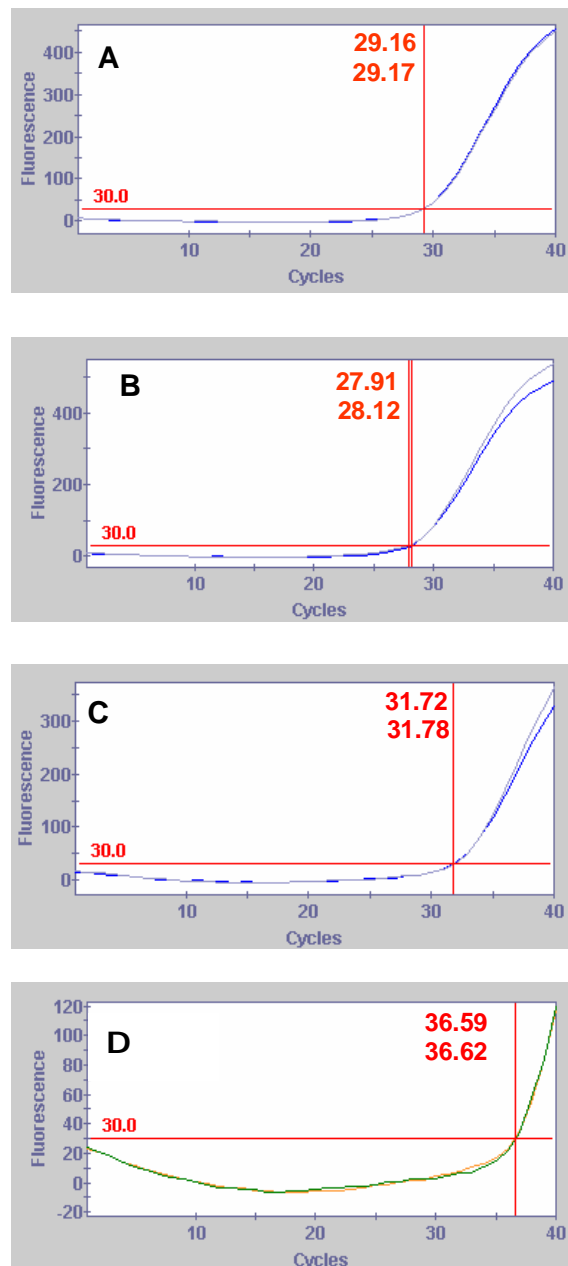


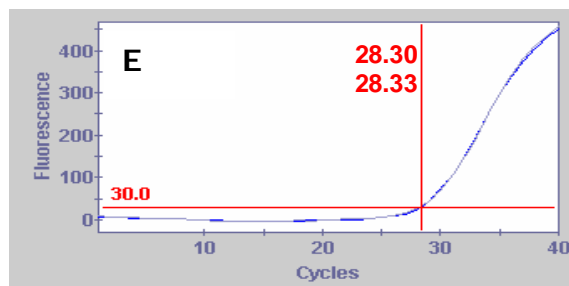
**Figura 17** – Curvas de dissociação demonstrando especificidade da reação e a ausência de dímeros de *primers*.



## 5.5 Reprodutibilidade

A **Figura 18** apresenta resultados da amplificação das amostras dos cinco voluntários testadas sob condições idênticas e em duplicata de modo a assegurar a reprodutibilidade dos resultados.





**Figura 18** – Resultados das amostras testadas em duplicatas dos indivíduos A, B, C, D e E

### 5.6 Níveis de expressão do gene *ABL*

Os níveis de expressão do gene *ABL* são apresentados em tabelas e gráficos e analisados em seguida. Os valores absolutos da expressão do gene *ABL* de todas as amostras estão disponíveis no **Apêndice V**. Na **Tabela 7** esses valores são apresentados de forma consolidada.

**Tabela 7** – Análise descritiva dos resultados do cálculo de expressão ( $C_e$ ) do gene *ABL* das amostras não irradiadas (NI) e irradiadas a 1 Gy e 3 Gy.

	NI			1 Gy			3 Gy		
	3 h	6 h	12 h	3 h	6 h	12 h	3 h	6 h	12 h
<b>Média</b>	2,054	1,126	3,062	1,047	3,541	4,128	1,335	1,314	1,522
<b>Mediana</b>	2,995	0,750	1,953	0,877	2,199	0,921	1,114	0,387	1,313
<b>DP</b>	1,684	1,626	3,673	0,826	3,589	5,301	1,188	2,058	1,487
<b>Mínimo</b>	0,004	0,0090	0,0150	0,1170	0,0170	0,0020	0,0180	0,0970	0,011
<b>Máximo</b>	3,965	5,568	9,968	2,803	10,107	15,970	3,993	6,052	4,048

**DP** = desvio padrão.

No intuito de avaliar a consistência da metodologia desenvolvida, foi idealizado um teste no sentido de se avaliar a resposta da expressão relativa do gene *ABL*, com base na variação de concentração a ser analisado. Para tanto, o  $C_t$  de duas amostras com concentrações  $C$  e  $C/100$ , foram avaliadas. Teoricamente, a diluição da concentração gênica em 100 vezes acarretaria uma variação deste parâmetro ( $C_t$ ) conforme definido a seguir:

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

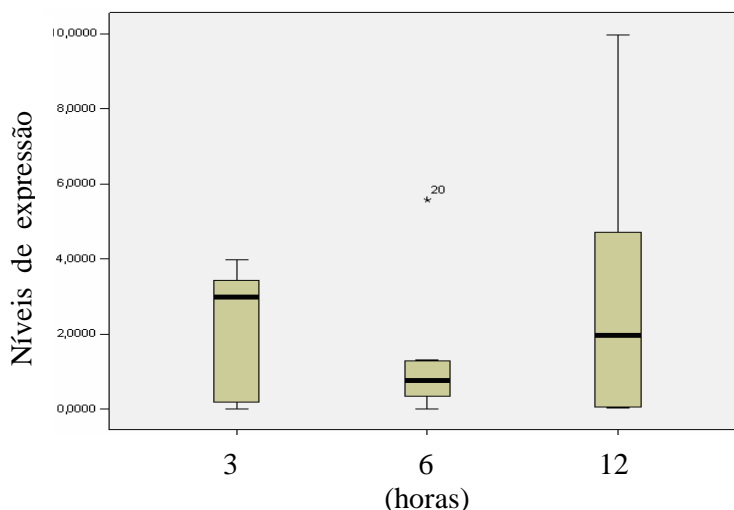
Onde:

- **R** representa a expressão relativa, a partir de ciclos limiares distintos;
- **$-\Delta\Delta Ct$**  é a diferença entre os ciclos limiares (*cycle threshold*).

Com base numa diluição 1/100 ( $R=1/100$ ), o valor teórico esperado para a diferença seria de 6,64, enquanto o valor obtido foi 5,92. Este resultado está bem próximo do valor esperado e sua diferença é explicada pelo fato que o fator teórico supõe um rendimento de replicação gênica ideal de 100%. Esse valor de rendimento pode ser influenciado por manuseio técnico.

As **Figuras 19, 20 e 21** ilustram a comparação dos níveis de expressão do gene *ABL* das amostras em função do tempo.

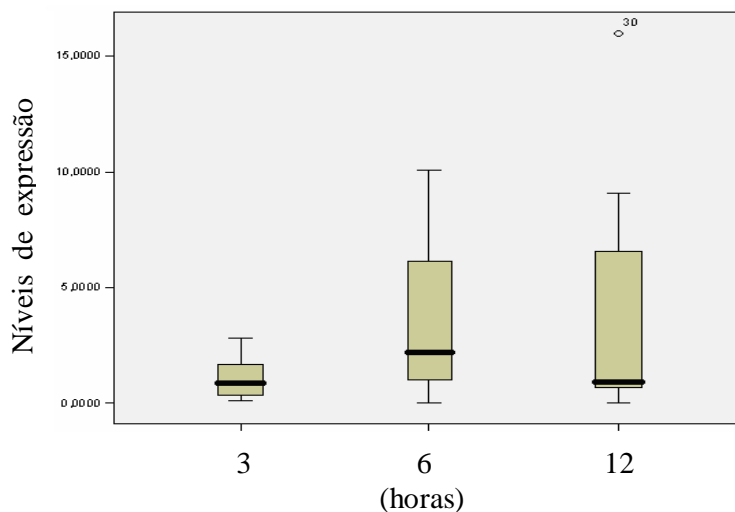
A análise dos resultados apresentados na **Figura 19** mostra não haver diferença estatisticamente significativa nos níveis de expressão do gene *ABL* das amostras não-irradiadas entre 3 e 6 horas ( $p = 0,203$ ), 3 e 12 horas ( $p = 0,878$ ) e 6 e 12 horas ( $p = 0,169$ ).



**Figura 19** – Variação nos níveis de expressão do gene *ABL* após 3, 6 e 12 horas das amostras não irradiadas.

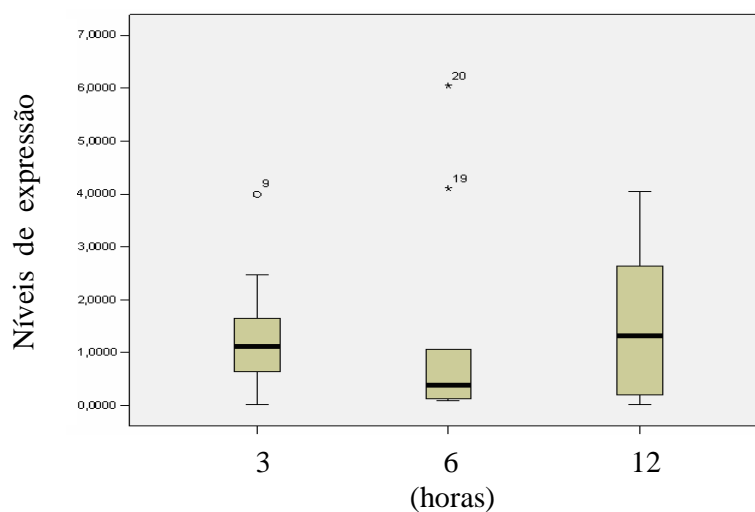
Os resultados apresentados na **Figura 20** mostraram aumento da expressão do gene *ABL* das amostras irradiadas a 1 Gy com 6 horas e que esta diferença é estatisticamente

significante quando comparada com 3 horas ( $p = 0,017$ ). Nas demais comparações, não houve diferença estatisticamente significativa, com valores de  $p = 0,074$  (3 e 12 horas) e  $p = 0,878$  (6 e 12 horas).



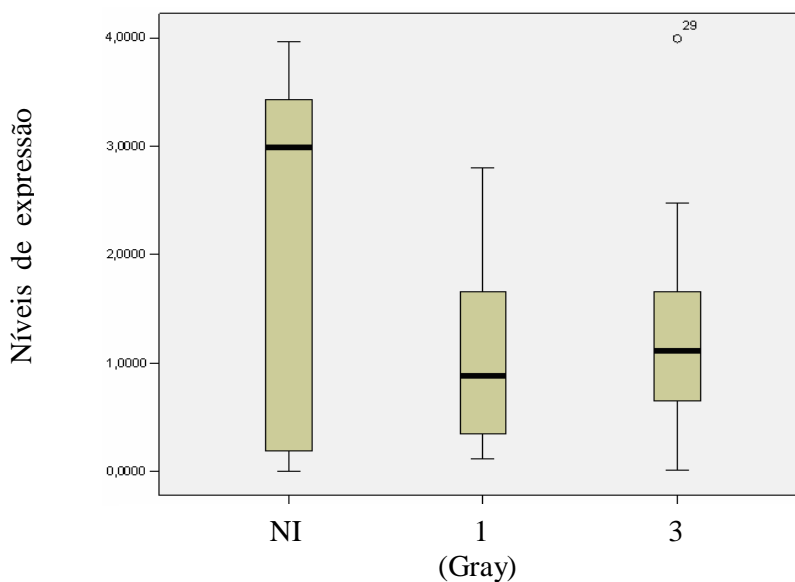
**Figura 20** – Variação nos níveis de expressão do gene *ABL* após 3, 6 e 12 horas das amostras irradiadas a 1 Gy.

A comparação dos níveis de expressão do gene *ABL* das amostras irradiadas a 3 Gy, cujos dados estão ilustrados na **Figura 21**, também não apresentaram variações estatisticamente significantes, com valores de  $p = 0,386$  (3 e 6 horas),  $p = 0,859$  (3 e 12 horas) e  $p = 0,575$  (6 e 12 horas).



**Figura 21** – Variação nos níveis de expressão do gene *ABL* após 3 e 12 horas das amostras irradiadas a 3 Gy.

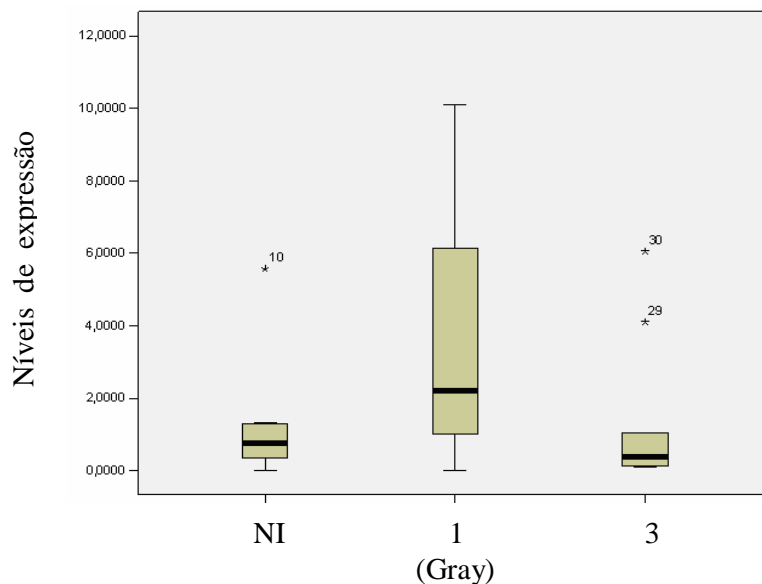
As **Figuras 22, 23 e 24** comparam os níveis de expressão do gene *ABL* dos grupos analisados em função da dose de irradiação e tempo de exposição.



**Figura 22** – Variação nos níveis de expressão do gene *ABL* das amostras não irradiadas e irradiadas a 1 e 3 Gy com 3 horas.

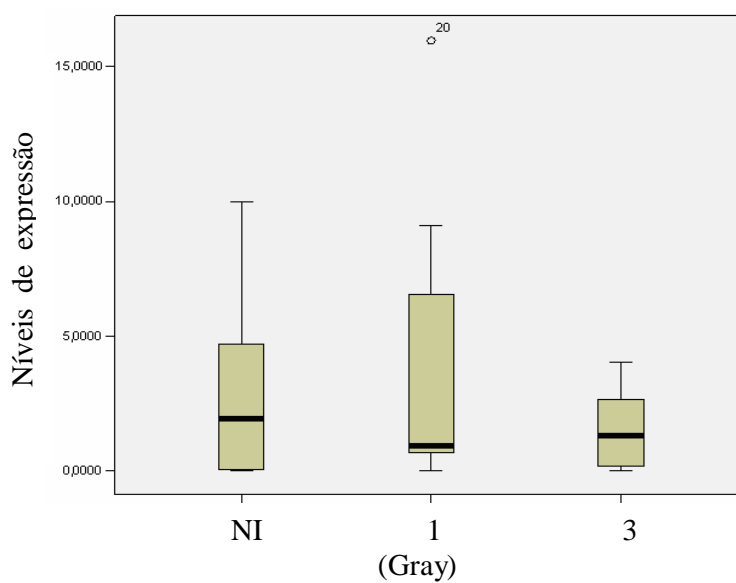
A análise dos resultados da **Figura 22** mostra não haver diferença estatisticamente significativa nos níveis de expressão do gene *ABL* com 3 horas, entre amostras não irradiadas e irradiadas a 1 Gy ( $p = 0,393$ ), não irradiadas e irradiadas a 3 Gy ( $p = 0,579$ ) e irradiadas a 1 e 3 Gy ( $p = 0,739$ ).

Os resultados apresentado na **Figura 23** indicam um aumento da expressão do gene *ABL* das amostras não irradiadas e irradiadas a 1 Gy com 6 horas e que esta diferença é estatisticamente significativa quando comparada com 3 horas ( $p = 0,043$ ). Nas demais comparações, não houve diferença estatisticamente significativa, com valores de  $p = 0,684$  (3 e 12) e  $p = 0,165$  (6 e 12).



**Figura 23** – Variação nos níveis de expressão do gene *ABL* das amostras não irradiadas e irradiadas a 1 e 3 Gy com 6 horas

A análise dos resultados sintetizados na **Figura 24** mostraram não haver diferença estatisticamente significativa nos níveis de expressão do gene *ABL* com 12 horas, entre amostras não irradiadas e irradiadas a 1 Gy ( $p = 0,071$ ), não irradiadas e irradiadas a 3 Gy ( $p = 0,631$ ) e irradiadas a 1 e 3 Gy ( $p = 0,684$ ).



**Figura 24** – Variação nos níveis de expressão do gene *ABL* das amostras não irradiadas e irradiadas a 1 e 3 Gy com 12 horas.

## 6 DISCUSSÃO

Apesar dos grandes avanços nos métodos empregados para biodosimetria, os trabalhos disponíveis utilizados de técnicas moleculares ainda são escasso na literatura científica.

AMUNDSON *et al.* (1999) estudaram células de linhagem mielóide humana e detectaram a indução de diversos genes responsivos a raios-gama em doses menores que 0,5 cGy. Dentre eles o *CDKN1A* (*Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A*) formalmente conhecido como *CIP1/WAF1* (*CDK-Interacting-Protein 1/Wildtype P53-Activated Fragment 1*) envolvido no controle do ciclo celular durante transição da fase G<sub>1</sub> à fase S nos mamíferos, enquanto que o gene *GADD45* (*DNA Damage-Inducible Gene 45*) um regulador do ciclo celular em gene de reparo do DNA.

AMUNDSON *et al.* (2000) analisaram RNA de células mononucleares 24 horas e 72 horas após serem submetidas à exposição de raios-gama na dose de 0,2 a 2 Gy. Utilizando a tecnologia de *Microarrays* (microarranjos)<sup>7</sup> contendo 6.728 genes foi constatado que 48 revelaram-se alterados de maneira significativa, enquanto que outros 7 genes não se alteravam quando comparados a um controle não submetido à radiação. Um grupo desses genes alterados foi selecionado para estudos: *CDKN1A*, *XPC I* (*Xeroderma Pigmentosum*) e *DDB2* (*DNA Damage-Binding Protein 2*) e este último foi o mais fortemente responsivo sugerindo que níveis relativos de expressão gênica em células do sangue periférico podem oferecer estimativas de exposição à irradiação ambiental.

BLAKELY *et al.* (2001) relataram a modulação do gene *c-HARAS* 17 horas após exposição a 1 Gy cuja expressão foi 9 vezes maior do que o gene controle  $\beta$ - actina em

---

<sup>7</sup>Microarrays – (microarranjos) Arranjos de clones de DNA imobilizados sobre uma lâmina de vidro para análise de expressão gênica de milhares de genes simultaneamente.

análise por *Northern blot*<sup>8</sup> e em seguida aperfeiçoou o protocolo de PCR em Tempo Real usando sistema *TaqMan*. Esse foi o primeiro gene candidato a ser marcador de exposição à radiação utilizando essa metodologia.

MILLER *et al* 2002 avaliaram o efeito de baixas doses (0,25 – 1,50 Gy) de radiação X na expressão de diversos proto-oncogenes, identificados como radio-induzidos (c-HARAS, c-src, c-met, c-jun, c-fos e c-myc) e  $\beta$ -actina em 0,25 a 17 horas após irradiação, usando linfócitos de sangue periférico humano *in vitro* e empregando como método a hibridização por *Northern blot*. Um aumento progressivo do tempo e dose dependente nos níveis de RNA mensageiro foi observado para o c-HARAS, enquanto os outros proto-oncogene variaram. Os níveis do gene controle  $\beta$ -actina inicialmente decresceram, porém, com 17 horas após irradiação retornaram aos níveis de controle.

Ainda em 2002, GRACE *et al.*, demonstraram rápida modulação do *GADD45* em sangue total humano com doses de 2 – 50 cGy avaliado em 24 e 48 horas após exposição à radiação gama confirmando a indução tempo-dependente desse proto-oncogene. Esse foi o primeiro trabalho relatando o uso da PCR em Tempo Real na avaliação da expressão gênica radioinduzida constatando sua eficiência como ferramenta para dosimetria biológica.

KANG *et al.* (2003) através da análise de microarranjos contendo seqüências de 2400 cDNA revelou a expressão significativa de 44 genes 12 horas após exposição em dose de 1 Gy em linfócitos humanos. Destes, 4 genes tiveram suas expressões aumentadas de maneira efetiva: *TRAIL* receptor 2 (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand 2*), *FHL2* (*Hemophagocytic Lymphohistiocytosis, Familial 2*), também conhecido como *DRAL* (*Four-And-A-Half Lim Domains 2*), *Cyclin protein gene* e *Cyclin G* envolvidos na regulação do ciclo celular.

Recentemente LONG *et al.* (2007), através da técnica de microarranjos e usando uma linhagem linfoblastóide humana, a AHH-1, submetida a doses de 0,05, 0,2, 0,5, 2,0 e

---

<sup>8</sup> Northern blot - técnica de transferência usada para detecção de RNA (total ou mensageiro), separados previamente por eletroforese, transferidos para um suporte através de membrana de nitrocelulose (blot) e hibridizado com sonda de DNA marcada.



10 Gy, 4 dias após radiação com Cobalto-60, observou que 0,05 Gy foi suficiente para induzir a resposta transcripcional de 25 genes, alguns dos quais estão envolvidos no sinal de transdução. Também 18 genes apresentaram baixa regulação na expressão e outros genes se alteraram somente em doses específicas. A técnica de *Northern blot* foi utilizada para análise confirmatória dos resultados e posteriormente quantificada pela Q-PCR, observando-se que o gene *XPC (Xeroderma pigmentosum)* induzido possuía resposta dose e tempo dependente. O gene atingiu seu pico em 4 horas após radiação em dose de 2 Gy de radiação e em 10 horas após a dose de 0,05 Gy. A indução do nível de expressão máxima ocorreu após 2 Gy (3.2 vezes maior) do que 0,05 Gy (1.93 vezes maior).

No conjunto, a pesquisa possibilitou estabelecer um protocolo com todas as etapas metodológicas de análise da expressão gênica para estudo de linfócitos humanos *ex vivo* após irradiação gama (**APÊNDICE IV**).

Com base no protocolo desenvolvido, foi possível identificar um aumento na expressão do gene *ABL* na dose de 1 Gy, após seis horas. Entretanto, não foram evidenciadas variações estatisticamente significantes dos níveis de expressão desse gene nas demais condições analisadas. O protocolo estabelecido nessa pesquisa mostrou-se de fácil reprodução e rápido. Os recursos empregados para avaliação de sua eficácia constataram a confiabilidade do método, sugerindo sua aplicação em análises tanto dos níveis de expressão do gene *ABL*, quanto em investigações de genes candidatos a biomarcadores moleculares de exposição à radiação ionizante.

Por outro lado, alguns aspectos não analisados na presente pesquisa devem ser considerados para estudos posteriores. Por exemplo, ampliar o número de indivíduos para estudo e avaliar o nível de expressão gênica no que se refere a gênero e faixa etária.

Também se deve levar em consideração que outros fatores biológicos possam afetar os níveis de expressão do gene. Além disso, em investigações de expressão gênica após irradiação, estudos comparativos com diferentes métodos são importantes no sentido de definir as diferentes limitações técnicas existentes.

As análises realizadas neste trabalho foram de caráter exploratório para investigar o uso do gene *ABL* como biomarcador molecular de exposição à radiação ionizante. A metodologia mostrou-se viável para análise *ex vivo* da expressão gênica em linfócitos pós-irradiação gama. A técnica Q-PCR viabiliza a análise da expressão de outros genes, tais como, o da proteína p53 e os proto-oncogenes *c-HARAS* e *GADD45*, potenciais candidatos a biomarcadores de exposição à radiação ionizante. Assim, abre-se nova linha de pesquisa utilizando métodos moleculares para análises de genes candidatos a controles ou alvos em biodosimetria.

## 7 CONCLUSÕES

O protocolo utilizado mostrou aumento da expressão do gene *ABL* a 1 Gy após 6 horas de exposição a radiação. Nos demais tempos e doses não se observou variações estatisticamente significantes;

Os métodos de coleta das amostras, processamento e análise utilizados nesta pesquisa mostraram-se adequados para o estudo da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (Q-PCR) em Tempo Real após irradiação devido à sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade dos testes;

O intervalo de tempo utilizado para a realização dos testes pode ser considerado adequado na tomada de decisão em situações reais de exposição acidental à radiação ionizante porém, o tempo de 6 horas após irradiação a 1 Gy merece prioridade nos estudos que visem avaliar o papel do gene *ABL* como biomarcador de exposição;

Embora pesquisas mais detalhadas sejam necessárias, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que o protocolo estabelecido é adequado para avaliação de biomarcadores moleculares em indivíduos expostos à radiação ionizante.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELSON, H. T.; RABSTEIN, L. S. Lymphosarcoma: virus-induced thymic-independent disease in mice. **Cancer Research**, v. 3, p. 2213-22, 1970.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Manuseio de resíduos de serviços de saúde – Procedimento**. Rio de Janeiro, 1993.

AERTS, J. L.; GONZALES, M. I.; TOPALIAN, S. L. Selection of appropriate control genes to assess expression of tumor antigens using real-time RT-PCR. **BioTechniques**, v. 36, p. 84-91. 2004.

AMARAL, A. Trends in biological dosimetry: an overview. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, n. especial, p. 119-124, September, 2002.

AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, supl. 1, 2003.

AMUNDSON, S. A.; BITTNER, M.; CHEN, Y. D. Induction of stress genes by low doses of gamma rays. **Radiation Research**, v. 152, p. 225-231, 1999.

AMUNDSON, S. A.; KHANH, T. D.; SOHRAB, S. Identification of potential mRNA biomarkers in peripheral blood lymphocytes for human exposure ionizing radiation. **Radiation Research**, v. 342-346, 2000.

AMUNDSON, S. A.; BITTNER, M.; MELTZER, P. Biological indicators for the identification of ionizing radiation exposure in humans. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v.1, n. 2, p. 211-219. 2001.

ANDREUCCI, Ricardo. **Curso básico de proteção radiológica**. 3 ed. São Paulo, 2001.

AU, W.; BADARY, O. A.; HEO, M. Y. Cytogenetic assays for monitoring populations exposed to environmental mutagens. **Occupational Medicine**, v. 16, p. 345-357, 2001.

BACAL, N. S.; FAULHABER, H. W. **Aplicações práticas de citometria de fluxo**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2003.

BANDA, M.; BOMMINENI, A.; THOMAS, R. A. et al. Evaluation and validation of housekeeping genes in response to ionizing radiation and chemical exposure for normalizing RNA expression in real-time PCR. **Mutagen**, 2007.

BAS, A.; FORSBERG, G.; HAMMARSTRÖM, S. Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 6, p. 566-73, 2004.

BEILLARD, E.; PALLISGAARD, N.; van der VILDEN, V. H. J. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemia patients using “real-time” quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) – a Europe against cancer program. **Leukemia**, v. 1, p.13, 2003.

BEUTLER, E.; GELBART, T.; KUHL, W. Interference of heparin with the polymerase chain reaction. **BioTechniques**, 9, 166. 1990.

BLAKELY, W. F.; SINE, R. C.; LEVINE, I. H. Biodosimetry exposure assessment using cytological and molecular biomarkers. **Radiation Protection Dosimetry**, v.97, p. 17-23, 2001.

BOYUM, A. - Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, 21 (suppl.), p. 97-105, 1968.

BUSHONG, S. C.; **Radiologic science for technologists: physics, biology and protection**. 6 ed. Texas, 1997.

BUSTIN, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, p. 169-193. 2000.

BUSTIN, S.A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR) by RT-PCR: trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 29, p. 23-39. 2002.

CAMARGO, A, A; COSTA, F. F. In: BRENTANI, M. M.; COELHO, F. R. G.; KOWALSKI, L. P. **Bases da Oncologia**. São Paulo: Ed Marina, 2003. 470 p.

CAVALCANTI, M. B. **Utilização da citometria de fluxo para avaliação dos níveis de expressão da proteína p53 em linfócitos do sangue periférico humano irradiado in vitro**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Energéticas e Nucleares). Universidade Federal de Pernambuco, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/DF. Orientador: Ademir de Jesus Amaral, 2005.

CHISSOE, S. L.; BODENTEICH, A.; WANG, Y. F. Sequence and analysis of the human gene, the BCR gene and regions involved in the Philadelphia chromosomal translocation. **Genomic**, 27, n. 1, p. 67-82, 1995.

CHOPIN, D. et al.: Bases fondamentales da la carcinogenèse urothéliale. **Progrès en Urologie**. v. 5, p. 877-923, 2001.

CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 162, p. 156-159.1987.

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR, CNEN. **Diretrizes básicas de radioproteção**. Norma 3.01, publicada no Diário Oficial da União. Brasília: 06 de janeiro de 2005.

DAINIYAK, N. Hematologic consequences of exposure to ionizing radiation. **Experimental Hematology**. v. 30:513-528, 2002.

DHEDA, K.; HUGGETT, J. F.; BUSTIN, S. A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. **BioTechniques**, v. 37, p. 112-119. 2004.

DÍAZ, L. D. L.; CALA, O. L. O.; LIZCANO, A. I. G. et al. Med UNAB. **El ciclo celular**. v. 6, n. 16, p. 21-29, 2003.

DORAK, M. T. **Real Time PCR**: Ed. Tevfik Dorak, Taylor & Francis, 329 p, 2006.

DOWN, T. B.; TILSON, F. E. **Practical radiation protection and applied radiobiology**, 2 ed, Philadelphia: W. B Saunders Company, 1999.

EARLY, P. J.; LANDA, E. R. Use of therapeutic radionuclides in medicine. **Health physics**, v. 69, n. 5, p. 677-694, 1995.

EISENSTEIN, B, I.; The polymerase chain reaction – a new method of using molecular genetics for medical diagnosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 322, n. 3, 1990.

FAILLACE, R. **Hemograma: manual de interpretação**. 3. ed. Porto Alegre: Ed Artes Médicas, 1995. 198p.

FISCUS, S. A.; CHAKRABORTY, C.; SHEPARD, R. Comparison of blood collected in acid-citrate-dextrose and EDTA for use in human immunodeficiency virus peripheral blood mononuclear cell culture. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 858-860. 2000.

FOEHRENBACH, H.; CORDOLIANI, Y. S. Effets biologiques des rayonnements ionisants. **Feuilles de Radiologie**. v. 42, n<sup>o</sup> 6, 517-523, 2002.

GARCIA, E. A. C. **Biofísica**. São Paulo: Ed. Sarvier, 1998. 378 p.

GERMAIN, J. St. Radiation monitoring with reference to the medical environment. **Health Physics**, v. 69, n. 5, p. 728-749, 1995.

GRACE, M. B.; Mc LELAND, C. B.; BLAKELY, W. F. Real-time quantitative RT-PCR assay of *GADD45* gene expression changes as a biomarker for radiation biodosimetry. **International Journal Radiation Biololy**, v. 78, p. 1011-21, 2002.

GRACE, M. B.; SALTER, C. A.; BULLARD, J. R. Gene-expression biomarkers for application to high-throughput radiation biodosimetry. In “**NATO Medical Surveillance and Response, Research and Technology Opportunities and Options**”, North Atlantic Treaty Organization, 2005.

GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, v. 30, p. 503-512, 2002.

GOODHEAD, S.T., THACKER, J., COX, R. Effects of radiations of different qualities on cells: molecular mechanisms of damage and repair. **International Journal Radiation Biology**, v. 63, p.543-56, 1993.

HENDEE, W. R. History, currents status, and trends of radiation protection standards. **Medical Physics**, v. 20, p.1303-4, 1993.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, v. 11, p. 1026-1030. 1993.

INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIATION UNITS AND MEASUREMENTS. (ICRU). **Linear energy transfer**, ICRU. Report 16 Washington, DC, 1970.

INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION (ICRP) **Recommendations of the International Commission on Radiological Protection**, Report 41, Elmsford, NY.: Pergamon Press, ICRP Publication, 1984.

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

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

JUNG, R.; SOONDRUM, K.; NEUMAIER, M. Quantitative PCR. **Clinical Chemistry and Laboratory Medical**, v. 38, n, 9, p. 833-836. 2000.

KANG, C. M; PARK, K. P.; SONG, J. E . Possible biomarkers for ionizing radiation exposure in human peripheral blood lymphocytes. **Radiation Research**, v. 159, p. 312-319. 2003.

KWAN, E; NORRIS, M D; ZHU, Let al. Simultaneous detection and quantification of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukaemia using real-time polymerase chain reaction. **British Journal Haematology**, v 109, p. 430-434, 2000.

LANEUVILLE, P. Tyrosine protein kinase. **Seminars in Immunology**, v.7, p. 255-266, 1995.

LEE, M. G.; NURSE, P. Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene cdc2. **Nature**, v. 327, 31-35, 1987.

LEE, L. G.; CONELL, C. R.; BLOCH, W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. **Nucleic Acids Research**, v. 21, n. 61, p.3761-66, 1993.

LEHNINGER. **Understand Biochemistry**. Lehninger principles of biochemistry. 3 ed version. Copyright 2000. The Mona Group LLC. CD.ROM.

LEMOS, J. A. R.: OLIVEIRA, C. M.; SCERNI, A. C. C. et al. Differential molecular response of the transcripts b2a2 and b3a2 to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. **Genetics and Molecular Research**, v. 4, p. 803-811, 2005.

LEVINE, D. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division, **Cell**, v. 88, p.323-331, 1997.

LION, T. & KIDD, V. Appropriate controls for RT-PCR. **Leukemia**, v 12, p. 1983-93. 1998.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LONG, X. H.; ZHAO, Z. Q.; HE, X. P.; *et al.* Dose-dependent expression changes of early response genes to ionizing radiation in human lymphoblastoid cells. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 19, p. 607-615, 2007.

LOZZIO, C. B.; LOZZIO, B. B. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive philadelphia chromosome. **Blood**, v. 3. p321-334, 1975.



MAFFEI, F.; ANGELINI, S.; FORTI, G. C. Spectrum of chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of hospital workers occupationally exposed to low doses of ionizing radiation. **Mutation Research**, v. 547, p. 91–99, 2004.

MAHESH, K. Introductory aspects of radiation. In: MAHESH, K., VIG, D.R. **Techniques of radiation dosimetry**, New Delhi Wiley Eastern, v.1, p.1-28, 1985.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F., SAMBROOK, J. L. **Molecular Cloning – A Laboratory Manual**, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982, 545.p

MAURER, J. JANSSEN J.W., THIEL, E. Detection of chimeric *BCR*-genes in acute lymphoblastic leukemia by the polymerase chain reaction. **Lancet**, v. 4, p. 1055-58, 1991.

MENDONÇA, C. R. L. **Boas Práticas em Laboratório Clínico**. Teresópolis, RJ: Eventos, 1998.

MILLER, A. C.; LUO, L.; CHIN, W. K. Proto-oncogene expression: a predictive assay for radiation biodosimetry applications. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 99, p. 295-302, 2002.

MORI, M; BENOTMANE, M. A.; TIRONE, I. Transcriptional response to ionizing radiation in lymphocytes subsets. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62. p.1489-01, 2005.

MULLIS, K.; FALOONA, F. A.; SCHARF, S. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology**, v. 51, p.263-273, 1986.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. 1. ed. Canoas: Ed Ulbra, 2003. 335p.

SAGLIO, G.; CILLONI, D. :The prototype of oncogenic fusion protein. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, 2897-11, 2004.

SCAFF, L. A. M. **Física da radioterapia**. São Paulo: Ed. Savier, 1997. 351 p.

SNUSTAD, P; SIMMONS, M. J. **Fundamentos de genética**. 2 ed. Rio de Janeiro: ed. Guanabara, 2001. 756 p.

TAUHATA, L.; SALATI, I. P. A.; PRINZIO, R. Di. **Radioproteção e dosimetria: fundamentos**. 5ª revisão agosto/2003. Rio de Janeiro – IRD/CNEN 241 p.

TAN, X.; WANG, J. Y. J. The caspase – RB connection in cell death. **Cell Biology**, v. 8, p.116-120, 1998.

THELLIN, O.; ZORZI, W; LAKAYE, B. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. **Journal of Biotechnology**, v.75, p. 291-295, 1999.

TOUIL, N., ELHAJOUJI, A., THIERENS, H. Analysis of chromosome loss and chromosome segregation in cytokinesis-blocked human lymphocytes: non disjunction is the prevalent mistake in chromosome segregation produced by low dose exposure to ionizing radiation. **Mutagenesis**, v.15, p.1-7, 2000.

VANDESOMPELE, J.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Elimination of primer-dimer artifacts and genomic coamplification using a two-step Sybr-green I real-time RT-PCR. **Analytical Biochemistry**, v. 303, p. 95-98, 2002.

VOISIN, P.; BARQUINERO, F.; BLAKELY, B. Towards a standardization of biological dosimetry by cytogenetics. **Cellular and Molecular Biology**, v. 48, p. 501-504, 2002.

WANG, J. Y.L. Regulation of cell death by the tyrosine kinase. **Oncogene**, v. 19, 5643-50, 2000.

WEISSER, M.; HAFERLACH, T.; SCHOCH, C. et al. The use of housekeeping genes for real-time PCR-based quantification of fusion gene transcripts in acute myeloide leukemia. **Leukemia**, p. 1-3, 2004.

WELCH, P. J.; WANG, J. Y. A C-terminal protein-binding domain in the retinoblastoma protein regulates nuclear c- tyrosine kinase in the cell cycle. **Cell**, v. 4, p.779-90, 1993.

WILHELM, J.; PINGOUD, A.: Real time polymerase chain reaction. **ChemBioChem**, v. 4, p1121-1128, 2003.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e prática**. São Paulo: Ed Aheneu, 2005. 1081 p.

## APÊNDICES

### APÊNDICE I – Termo de consentimento livre e esclarecido

**Título da pesquisa:** Protocolo para avaliação da expressão do gene *ABL* sob estresse radioativo.

Eu, \_\_\_\_\_, abaixo-assinado, dou meu consentimento livre e esclarecido para participar como voluntário (a) do projeto de pesquisa supracitado sob a responsabilidade da mestranda Fárida Coeli de Barros Correia Melo. A pesquisa está sob orientação do Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral do Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco.

Assinando este Termo de Consentimento, estou ciente que:

1. O objetivo desta pesquisa é avaliar a expressão do gene como potencial biomarcador de exposição à radiação ionizante que poderá ser utilizado como técnica para a pesquisa científica com benefício à radioproteção;
2. Obtive todas as informações necessárias para poder decidir conscientemente sobre a minha participação na pesquisa e, darei uma pequena amostra de meu sangue (60 mL) que não oferece risco, exceto, a possibilidade de aparecimento de manchas devido à punção venosa;
3. Todas as medidas serão tomadas para assegurar a confiabilidade e a privacidade de meus dados pessoais, e os resultados gerais obtidos através da pesquisa serão utilizados apenas para alcançar os objetivos do trabalho, expostos acima, incluída sua publicação na literatura científica especializada e apresentação em eventos científicos;
4. Estou livre para interromper a qualquer momento a minha participação na pesquisa;

Recife, \_\_\_\_\_

Nome do voluntário: \_\_\_\_\_

RG do voluntário: \_\_\_\_\_

Pesquisador: \_\_\_\_\_

**APÊNDICE II – Questionário do doador voluntário**

**Título da Pesquisa:** Protocolo para avaliação da expressão do gene *ABL* sob estresse radioativo.

Pesquisadores: Dra. Fárida Coeli de Barros Correia Melo, Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral, Prof. Dr. Raul Antônio Morais Melo.

**Identificação do voluntário:**

Nome: \_\_\_\_\_ Data da coleta: \_\_\_\_\_

Código: \_\_\_\_\_ Data de nascimento: \_\_\_\_\_ Sexo:  Feminino  Masculino

**Questionário:**

1. Algum tratamento radioterápico anterior:

Sim

Não Data: \_\_\_\_\_

2. Algum tratamento quimioterápico anterior:

Sim

Não Data: \_\_\_\_\_

3. Contato direto com agrotóxicos e/ou veneno:

Sim

Não Data: \_\_\_\_\_

4. Fumante:

Sim

Não Data: \_\_\_\_\_

5. Uso de medicamentos nos últimos meses:

Sim

Não Data: \_\_\_\_\_

Quais: \_\_\_\_\_

6. Alterações genéticas conhecidas:

Sim

Não

Data: \_\_\_\_\_

Comentários:

---

---

---

---

---

---

Responsável pelo questionário: \_\_\_\_\_

## APÊNDICE III – Parecer de Ética em Pesquisa



### Comitê de Ética em Pesquisa

#### 1 - DADOS SOBRE O PROJETO

PARECER Nº 048/06

**Título do Projeto:** Avaliação dos Níveis de Expressão do gene. ABL por PCR em Tempo Real após Irradiação Celular *in vitro*  
**Instituição Solicitante:** UFPE  
**Local de Desenvolvimento do Projeto:** Fundação HEMOPE  
**Responsável:** Fárida Coeli de Barros Correia Melo  
**Identidade:** 12.233.642 SSP-PE  
**CPF:** 143.515.604-87  
**Endereço:** Rua José Carvalheira, 203/701 – Recife – PE – CEP52052-060  
**Telefone:** 81 – 3441-3976  
**Finalidade:** Dissertação de Mestrado


#### 2 – PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hemope (CEP), em cumprimento aos dispositivos da Resolução 196/96 e complementares, após acatar as considerações do relator, membro deste Comitê, relativamente às exigências apontadas no Parecer nº 048/06, considera **APROVADO** o protocolo de pesquisa supracitado, uma vez que este não colide, aparentemente com os princípios básicos da bioética – a não maleficência, a beneficência, a autonomia e a justiça, além do sigilo.

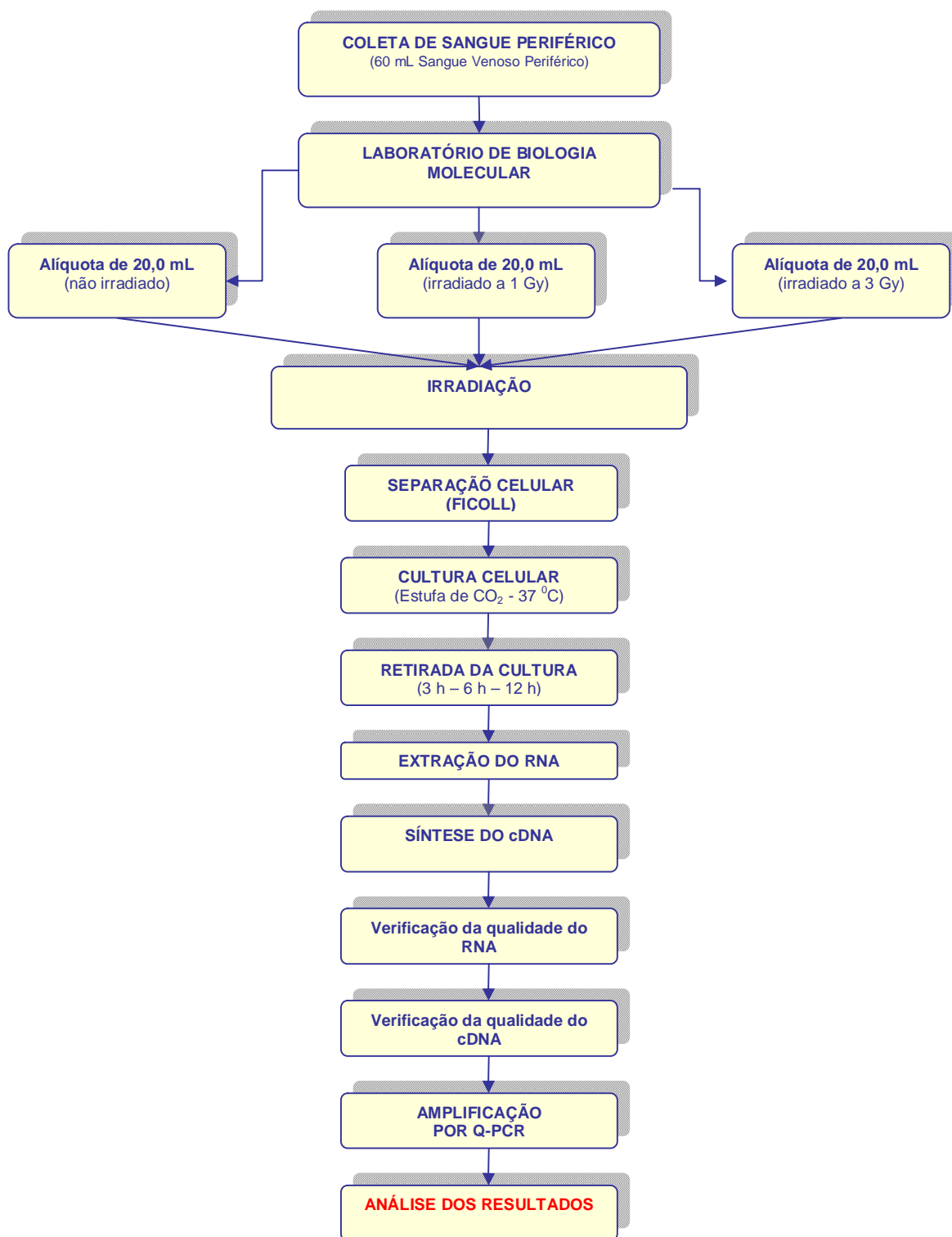
#### 4 - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem prejuízo ao 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 delimitada 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 regime 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 o 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.**

Homologado na Reunião do CEP de 22/8/2007

  
 Maria Emilia dos Santos  
 Coordenadora do CEP

## APÊNDICE IV – Fluxograma das etapas metodológicas



**APÊNDICE V** – Resultados da expressão do gene *ABL*.

**Tabela 8** – Valores do cycle threshold (Ct) e do cálculo de expressão (Ce) do gene *ABL* das amostras não irradiadas, em duplicata, segundo o tempo.

Voluntário	3 horas		6 horas		12 horas	
	Ct	Ce	Ct	Ce	Ct	Ce
A	28.24	3.154	30.23	0.794	26.79	8.618
	28.09	3.500	29.54	1.281	26.58	9.968
B	28.12	3.428	30.40	0.706	29.55	1.272
	27.91	3.965	30.14	0.845	29.18	3.288
C	37.84	0.004	31.41	0.350	34.28	0.048
	37.59	0.005	31.27	0.386	34.26	0.049
D	32.27	0.193	36.59	0.010	35.91	0.015
	31.63	0.301	36.62	0.009	35.58	0.019
E	28.30	3.026	29.50	1.317	27.66	4.715
	28.33	2.964	27.42	5.568	28.50	2.634

**Tabela 9** – Valores do cycle threshold (Ct) e do cálculo de expressão (Ce) do gene *ABL* das amostras irradiadas a 1 Gy, em duplicata, segundo o tempo.

Voluntário	3 horas		6 horas		12 horas	
	Ct	Ce	Ct	Ce	Ct	Ce
A	29.17	1.656	28.98	1.889	27.24	6.309
	29.16	1.667	28.57	2.509	27.19	6.531
B	30.94	0.485	29.87	1.019	30.14	0.845
	31.49	0.332	29.31	1.502	30.15	0.839
C	31.40	0.353	35.74	0.017	38.82	0.002
	32.99	0.117	35.27	0.024	34.39	0.008
D	29.51	1.308	28.10	3.476	29.90	0.998
	30.21	0.805	27.28	6.136	30.47	0.672
E	28.41	2.803	26.77	8.738	26.71	9.109
	29.97	0.950	26.56	10.107	25.90	15.970



**Tabela 10** – Valores do cycle threshold (Ct) e do cálculo de expressão (Ce) do gene *ABL* das amostras irradiadas a 3 Gy, em duplicata, segundo o tempo.

Voluntário	3 horas		6 horas		12 horas	
	Ct	Ce	Ct	Ce	Ct	Ce
A	29.85	1.033	30.50	0.659	28.97	1.902
	28.64	1.195	29.82	1.055	28.50	2.634
B	30.52	0.649	33.27	0.097	32.25	0.196
	30.29	0.8762	33.21	0.101	31.97	0.238
C	35.28	0.024	31.76	0.275	36.43	0.011
	35.71	0.018	30.90	0.499	35.71	0.018
D	29.38	1.431	32.82	0.132	29.54	1.281
	29.17	1.656	32.46	0.169	29.47	1.345
E	27.90	3.993	27.86	4.105	28.07	3.548
	28.59	2.475	27.30	6.052	27.88	4.048

## ANEXOS

### ANEXO 1 – Grandezas em dosimetria (ICRP 60 , 1990).

#### 1 Dose absorvida

A dose absorvida é utilizada para descrever a quantidade de energia média por unidade de massa em um meio irradiado. Ela é a grandeza física fundamental na avaliação dos efeitos biológicos resultantes de uma exposição à radiação.

A relação que define a dose absorvida é expressa pela Equação 1.

$$D = \frac{dE}{dm} \quad (1)$$

Onde:

$dE$  = é a energia média depositada pela radiação ionizante.

$dm$  = é a unidade de massa considerada.

No Sistema Internacional (SI) a unidade utilizada é o joule (J) por quilograma (kg) e recebe nome de gray (Gy).

#### 2 Dose equivalente ( $H_T$ )

A dose equivalente foi introduzida para refletir os diferentes efeitos biológicos de uma mesma dose em função da natureza da radiação. A dose equivalente é a medida da dose de radiação em um tecido biológico como mostra a Equação 2.

$$H_T = \sum_R w_R \cdot D_{T,R} \quad (2)$$

Onde:

$D_{T,R}$  = é a dose média absorvida no tecido ou órgão (T), como resultado da exposição à radiação ionizante;

$W_R$  = é o fator de ponderação da radiação.

A unidade da dose equivalente no Sistema Internacional é o joule (J) por quilograma (kg) com a denominação especial de sievert (Sv).

A **Tabela 11** mostra os fatores de ponderação da radiação ( $W_R$ ) em relação aos tipos de radiação existentes com suas faixas de energia. Os valores de  $W_R$  se relacionam com a radiação incidente no corpo pela radiação externa ou pela radiação proveniente de fontes internas, segundo a ICRP 60 (1990).

**Tabela 11** – Tipos, faixas e fatores de ponderação da radiação –  $W_R$  (ICRP 60, 1990).

<b>Tipo de Radiação</b>	<b>Faixa de Energia</b>	<b><math>W_R</math></b>
Fótons	Todas as energias	1
Elétrons	Todas as energias	1
Nêutrons	< 10 keV	5
Nêutrons	10 keV a 100 keV	10
Nêutrons	>100 keV a 2 MeV	20
Nêutrons	> 2 MeV a 20 MeV	10
Nêutrons	> 20 MeV	5
Nêutrons	Desconhecida	
Prótons, com exceção de prótons de recuo.	> 2 MeV	5
Partícula alfa, fragmentos de fissão e íons pesados.	1500	20

### 3 Dose efetiva ( $E$ )

Uma vez que os tecidos e órgãos possuem diferentes sensibilidades à radiação a ICRP, 1990 introduziram uma nova categoria de medida, a dose efetiva, definida como a soma das doses equivalentes ponderadas nos diversos órgãos e tecidos, demonstrada na Equação 3.

$$E = \sum w_T \cdot H_T \quad (3)$$

Onde:

$H_T$  = é a dose equivalente média no tecido ou órgão T;

$w_T$  = é o fator de ponderação para o tecido ou órgão T.

A unidade da dose efetiva continua sendo joule por quilograma (J/kg) denominado sievert (Sv), segundo a ICRP 60, 1990.

A **Tabela 12** apresenta os valores de fatores de ponderação ( $w_T$ ) para tecidos e órgãos, estabelecidos através de estudo com população de referência com indivíduos de ambos os sexos de várias idades (ICRP 60, 1990).

**Tabela 12** – Fatores de ponderação para tecidos ou órgãos -  $w_T$ .

Tecido ou Órgão	$w_T$ <sup>1</sup>
Gônadas	0,20
Medula óssea	0,12
Cólon	0,12
Pulmão	0,12
Estômago	0,12
Bexiga	0,05
Mama	0,05
Fígado	0,05
Esôfago	0,05
Tireóide	0,05
Pele	0,01
Superfície óssea	0,01
Restante <sup>2</sup>	0,05
TOTAL	1,00

<sup>1</sup> – Baseado em um risco de ocorrência de efeitos estocásticos de  $1,65 \times 10^{-2} \text{ Sy}^{-1}$ .

<sup>2</sup> – Para fins de cálculo “restante” refere-se a qualquer dos órgãos listados a seguir os quais poden irradiados seletivamente: adrenais, cérebro, intestino grosso superior, intestino delgado, rins, mÚs pÚncreas, vesÍcula, timo e útero.

(ICRP 60, 1990)

# 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](#)