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

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

PROTEÍNA p53 COMO BIOINDICADOR DA RADIOSSENSIBILIDADE INDIVIDUAL

MARIANA BRAYNER CAVALCANTI

RECIFE-PERNAMBUCO-BRASIL
DEZEMBRO - 2009

PROTEÍNA p53 COMO BIOINDICADOR DA RADIOSSENSIBILIDADE INDIVIDUAL

MARIANA BRAYNER CAVALCANTI

PROTEÍNA p53 COMO BIOINDICADOR DA RADIOSSENSIBILIDADE INDIVIDUAL

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, do Departamento de Energia Nuclear, da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Dosimetria e Instrumentação Nuclear.

ORIENTADOR: PROF. DR. ADEMIR DE JESUS AMARAL
- DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR / UFPE

CO-ORIENTADORA: DRA. ANA PAULA GALVÃO da SILVA
- PRECLINICAL DEVELOPMENT, TOCAGEN INC. / SAN DIEGO / CA / EUA

RECIFE-PERNAMBUCO-BRASIL
DEZEMBRO – 2009

C376p **Cavalcanti, Mariana Brayner**

Proteína p53 como bioindicador da radiossensibilidade individual / Mariana Brayner Cavalcanti. – Recife: O Autor, 2009.

xvii, 100 f.; il., gráfs., tabs.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, 2009.

Inclui Referências Bibliográficas e Apêndices.

1. Energia Nuclear. 2. Proteína p53. 3. Radiossensibilidade. 4. Citometria de Fluxo. 5. Viabilidade Celular. I. Título.

UFPE

612.01448 CDD (22. ed.) **BCTG/2010-122**

PROTEÍNA p53 COMO BIOINDICADOR DA RADIOSSENSIBILIDADE INDIVIDUAL

Mariana Brayner Cavalcanti

APROVADA EM: 18.12.2009

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral
CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Ana Paula Galvão da Silva

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral – DEN/UFPE

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho – LIKA/UFPE

Prof. Dr. Waldeciro Colaço – DEN/UFPE

Profa. Dra. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo – DBR/UFPE

Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso – DAC/UFMG

Visto e permitida a impressão

Coordenador do PROTEN/DEN/UFPE

"Conquistas sem riscos são sonhos sem méritos.

Ninguém é digno dos sonhos se não usar suas

derrotas para cultivá-los."

Augusto Cury

À minha família, dedico!

AGRADECIMENTOS

Ao meu **Deus,** por me dar saúde, força, sabedoria, coragem, determinação para começar e finalizar este trabalho.

Ao meu marido, **Delano**, pelo seu amor, carinho, respeito, companheirismo, amizade e compreensão. Pela paciência e por entender os momentos em que não pude esta ao seu lado. Pelo apoio e afeto concedido durante toda minha vida acadêmica e científica. Por esta ao meu lado, mesmo estando distante. Muito obrigada por tudo que você fez e faz por mim, serei eternamente grata! Amo você!

À **Mainha** e **Painho** pelo amor, educação e incentivos recebidos. Por estarem sempre ao meu lado, ensinando-me a ser humilde e correta diante do que a vida nos impõe. Por me mostrarem o quanto é bom e gratificante lutar e conquistar nossos sonhos.

Aos meus irmãos, **Bruno** e **Maria**, pelo apoio e presença constante na minha vida.

As minhas lindas sobrinhas, **Maria Júlia** e **Alice**, por me fazerem mais feliz nos momentos de cansaço e desânimo. Amo muito vocês!

Aos meus **Familiares** que sempre me incentivaram e apoiaram durante minha formação acadêmica.

Ao meu querido orientador e amigo, **Ademir Amaral**, pela orientação recebida durante esses 6 anos de convívio e pelo ensinamento prático do significado das palavras ética e profissionalismo. Pelas boas discussões científicas, conversas, conselhos recebidos e por sua amizade. Por mais uma vez, depositar em mim a confiança no desenvolvimento de um trabalho científico. Muito obrigada por tudo!

À minha querida e amiga co-orientadora, **Ana Paula**, que foi uma das primeiras pessoas que me apresentou ao Mundo da Pesquisa. Foi minha orientadora no meu trabalho de graduação e que, agora, mesmo distante, participou ativamente desta pesquisa. Por sua amizade, carinho, dedicação e grandes contribuições científicas. Muito obrigada!

Aos meus queridos **Amigos do GERAR**, pela amizade, carinho, discussões e ensinamentos. Em especial a **Rafael Freitas**, pela dedicação para a conclusão deste trabalho, pelo respeito e confiança depositados em mim. Obrigada a **Thaísa,** pela ajuda na contagem da viabilidade celular. À **Nany**, pelas contribuições na leitura e formatação do texto. À **Marcela**, que, por várias vezes, doou o seu sangue para esta pesquisa. À **Suelen** e **Maria Helena** pelo apoio recebido. Tentarei colocar em prática as coisas boas que aprendi e adquiri no GERAR.

Ao meu amigo-irmão, **Thiago Salazar**, pela amizade, carinho, discussões científicas, conselhos e pelas boas conversas durante os cafezinhos e almoços. Pelo apoio científico e pessoal durante esta etapa da minha formação acadêmica.

As minhas amigas, **Laélia** e **Edvane** pela amizade, confiança, conselhos e pelos bons momentos que convivemos juntas.

Aos **Amigos do DEN,** em especial a **José Araújo, Cleomácio e Jairo Dias,** por me proporcionarem uma agradável convivência durante minha permanência no DEN/UFPE.

Aos **Amigos do "cafezinho"**, pelas conversas descontraídas que muitas vezes se tornaram discussões científicas maravilhosas.

Aos meus Anjos da Guarda, **Amélia Neves**, **Virginia Lorena**, **Valéria Pereira** e **Marina** pelo apoio, dedicação e pela grande ajuda recebida durante toda a parte experimental desta pesquisa. Minha eterna gratidão!

A **Todos os Voluntários**, que aceitaram e contribuíram doando sangue para a elaboração deste trabalho.

Aos membros da banca de acompanhamento **Profa. Dra. Valéria Pereira, Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho e Profa. Dra. Edvane Borges da Silva** pelas discussões e sugestões para melhoria desta pesquisa.

Aos Professores membros das bancas: **Porfa Dra. Ana Maria de Mendonça Melo, Profa. Dra. Elizabeth Chaves, Profa. Dra.Valéria Pareira, Profa. Dra. Patrícia Maria Albuquerque de Farias, Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, Prof. Dr. Waldeciro Colaço, Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso** pela cuidadosa leitura do texto, sugestões e críticas científicas que contribuíram significativamente para a melhoria deste trabalho.

À todos os **Professores do PROTEN**, em especial ao **Prof. Carlos Alberto Brayner**, **Prof. André Maciel** e ao **Prof. Elmo Araújo**, pelo apoio e ensinamentos transmitidos.

Aos **Funcionários do DEN,** em especial ao **Sr. Edvaldo, Sr. Antônio, Magali, Lia, Nilvânia e Alene** pelo apoio e disponibilidade em ajudar.

À **Fundação HEMOPE** pelos insumos cedidos para realização desta pesquisa.

Ao **Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães** (CPqAM/FioCruz) por disponibilizar equipamentos para realização desta pesquisa.

Ao **Centro de Radioterapia de Pernambuco** (CERAPE), em especial ao **Dr. Jonathan Melo e Alexandre Parísio**, por ceder o equipamento para a irradiação das amostras.

Ao **Laboratório de Proteção Radiológica** (LPR/DEN/UFPE), pelo apoio às nossas pesquisas.

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

A todos, muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS ..... *xii*

LISTA DE TABELAS ..... *xiii*

LISTA DE ABRIVIATURAS ..... *xiv*

RESUMO ..... *xvi*

SUMMARY ..... *xvii*

1 Introdução *1*

2 Revisão da Literatura *3*

2.1 Radiossensibilidade **3**

2.2 Ciclo celular **9**

2.3 Gene supressor de tumor *TP53* **13**

2.4 Descobrimento e estrutura da proteína p53 ..... **15**

2.4.1 Regulação da proteína p53 17

2.5 Sistemas de checagem do ciclo celular **19**

2.5.1 Ponto de checagem na fase G1 19

2.5.2 Ponto de Checagem na fase S 21

2.5.3 Ponto de Checagem na fase G2 21

2.6 Apoptose **22**

3. MATERIAL E MÉTODOS *28*

3.1 Perfil do estudo **28**

3.2 Aspectos éticos **28**

3.3 Critérios de inclusão e exclusão **28**

3.4 Coleta e registro do material biológico **29**

3.5 Estudo preliminar para definição de parâmetros de análise **29**

3.6 Especificações das condições de irradiação **33**

3.7 Viabilidade celular **34**

3.8 Citometria de Fluxo **35**

3.9 Análise estatística **36**

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO ***37***

4.1 Definição da concentração de mitógenos e dos tempos de cultivo celular **37**

4.2 Comportamento da proliferação de células irradiadas **42**

4.3 Níveis de expressão da proteína p53 ..... **46**

4.4 Viabilidade celular **51**

4.5 Níveis individuais de expressão da proteína p53 ..... **55**

5. CONCLUSÕES ***64***

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ***65***

APÊNDICE I ***75***

APÊNDICE II ***76***

APÊNDICE III ***79***

APÊNDICE IV ***80***

APÊNDICE V ***81***

APÊNDICE VI ***82***

APÊNDICE VII ***83***

APÊNDICE VIII ***85***

APÊNDICE IX ***86***

APÊNDICE X ***87***

APÊNDICE XI ***88***

APÊNDICE XII ***89***

APÊNDICE XIII ***90***

APÊNDICE XIV ***92***

APÊNDICE XV ***93***

APÊNDICE XVI ***94***

ANEXO I ***96***

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Curva dose *versus* dano biológico em tratamentos radioterápicos 5
Figura 2 – Fases do ciclo celular: G1, S e G2 11
Figura 3 – Fases do ciclo celular 12
Figura 4 – Localização do gene Tp53 no cromossomo 17 14
Figura 5 – Localização dos quatros domínios da proteína p53 15
Figura 6 – Proteína p53 ligada a uma molécula de DNA 17
Figura 7 – Progressão e parada do ciclo celular 20
Figura 8 – Mecanismo de apoptose e necrose celular 24
Figura 9 – Procedimento para obtenção da PBMCs 31
Figura 10 – Set-up da irradiação 34
Figura 11 – Proliferação celular de PBMCs não irradiadas e cultivadas em diferentes concentrações de fitohemaglutinina em distintos intervalos de cultivo celular 38
Figura 12 – Proliferação de PBMCs do indivíduo B, não irradiadas, estimuladas com diferentes concentrações de fitohemalgutinina e distintos intervalos de cultivo celular 40
Figura 13 – Proliferação de PBMCs, não irradiadas e estimuladas com diferentes concentrações de pokeweed durante distintos intervalos de cultivo celular 41
Figura 14 – Proliferação de células não irradiadas e irradiadas com 0,5; 1; 2 e 4 Gy, não estimuladas e estimuladas com 10 μg/mL de PHA após 72 horas de cultivo 43
Figura 15 – Proliferação de células não e irradiadas com 0,5; 1; 2 e 4 Gy, não estimuladas e estimuladas com 5 μg/mL de PKW após 72 horas de cultivo. 45
Figura 16 – Níveis de expressão da proteína p53 em células cultivadas por 72 horas 49
Figura 17 – Viabilidae celular 52
Figura 18 – Viabilidade de células irradiadas versus níveis de expressão da proteína p53 54
Figura 19 – Dispersão dos níveis individuais de expressão da proteína p53 em cultura celular de 72 horas em duas situações: sem irradiação (A) e após irradiação com 2 Gy (B) 56
Figura 20 – Níveis de expressão da proteína p53 do indivíduo XXII 61
Figura 21 – Níveis de expressão da proteína p53 do indivíduo XXIII 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferentes características entre a morte celular por apoptose e necrose ***23***

Tabela 2. Perfil dos doadores que participaram da pesquisa..... ***46***

Tabela 3. Níveis de expressão da proteína p53 das amostras do indivíduos XXII e XIII cultivadas por 72 horas..... ***59***

Tabela 4. Estudo da proliferação celular em amostras do indivíduo A..... ***79***

Tabela 5. Estudo da proliferação celular em amostras do indivíduo B..... ***82***

Tabela 6. Estudo da proliferação celular em amostras irradiadas do indivíduo A após 72 horas de cultivo celular..... ***86***

Tabela 7. Estudo da proliferação celular em amostras irradiadas do indivíduo B após 72 horas de cultivo celular..... ***88***

Tabela 8. Níveis de expressão da proteína p53 das amostras dos 21 indivíduos cultivadas por 72 horas..... ***94***

LISTA DE ABREVIATURAS

µm	Micrometro
ABIs	Aberrações Cromossômicas Instáveis
ANOVA	Análise da Variância
ASTRO	American Society for Radiation Oncology
ATM	Ataxia Telangiectasia-Mutated
ATP	Adenosina Trifosfato
CdC	Ciclinas
CdK	Ciclina Dependentes de Kinases
CERAPE	Centro de Radioterapia de Pernambuco
cGy	Centigray
CLT	Linfócitos Citotóxicos
COM	Contagem por Minuto
DBS	Double Strand Breaks – Quebra da dupla fita
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
Gy	Gray
HEMOPE	Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco
kb	Quilobases
kDa	Quilodalton
keV	quiloelétron volt
kg	Quilograma
kGy	Quilogray
LET	Transferência Linear de Energia
M	Mitose
Mdm2	Mouse double minute 2
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PBS	Tampão Fosfato Salina
PE	Ficoeritrina
PHA	Phaseolus Vulgaris – Fitohemaglutinina
PKW	Phytolacca americana – Pokeweed
RB	Ritinoblastoma
RI	Radiação Ionizante
RMPI	Roswell Park Memorial Institute Medium

RNAm	Ácido Ribonucléico mensageiro
RT	Radioterapia
SE	Sem Estímulo
SI	Sistema Internacional
TGF-β	Fator Transformante de Crescimento-beta
UV	Ultravioleta

PROTEÍNA p53 COMO BIOINDICADOR DA RADIOSSENSIBILIDADE INDIVIDUAL

Autora: Mariana Brayner Cavalcanti
Orientador: Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral – DEN / UFPE
C**o-orientadora: Dra. Ana Paula Galvão da Silva –** Tocagen Inc. / EUA

RESUMO

A radiossensibilidade celular está diretamente relacionada às falhas no mecanismo de reparo dos danos causados ao DNA. Nesse mecanismo, a molécula considerada como chave é a proteína p53. Neste contexto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a correlação entre os níveis de expressão da proteína p53 com a radiossensibilidade individual. Para tanto, amostras de sangue periférico de 23 indivíduos sadios foram divididas em alíquotas e, separadamente, irradiadas com doses de 0,5; 1; 2 e 4 Gy. Em seguida, células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram obtidas e cultivadas durante 72 horas, tanto na presença quanto na ausência de mitógenos (Fitohemaglutinina – PHA e Pokeweed – PKW). Em paralelo, a viabilidade celular foi determinada utilizando o corante azul de trypan (0,4%). Os resultados obtidos demonstraram que a expressão da proteína p53 em PBMCs aumenta com a dose absorvida sendo inversamente proporcional à viabilidade celular. O maior índice da expressão de p53 foi observado em culturas estimuladas com PHA durante 72 horas. O aumento na expressão da p53, em resposta à radiação, foi significativamente diferente entre os indivíduos estudados, o que pode ser relacionado a variabilidade na radiossensibilidade individual. Os resultados desse trabalho sugerem estudos adicionais no sentido de correlacionar os níveis de expressão de p53 com efeitos adversos graves em pacientes submetidos à radioterapia.

Palavras chaves: Proteína p53, radiossensibilidade, citometria de fluxo, viabilidade celular

P53 PROTEIN AS BIOINCADOR OF INDIVIDUAL RADIOSENSITIVITY

Author: Mariana Brayner Cavalcanti
Adviser: Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral - DEN/UFPE
Co-Adviser: Dra. Ana Paula Galvão da Silva – Tocagen Inc. / USA

SUMMARY

Cellular radiosensitivity is directly correlated with the mechanism of DNA repair, in which p53 protein plays a major role. In this context, this research was designed to investigate the relationship between p53 protein expression levels with the individual radiosensitivity. For this, peripheral blood samples were collected from 23 healthy subjects. Each sample was divided in aliquots and, separately, irradiated with doses of 0,5; 1; 2 and 4 Gy. After this, peripheral blood of mononuclear cells (PBMCs) were isolated and cultivated during 72 hours, in the presence of phytohemaglutinin – PHA, pokeweed – PKW, and without mitogenes. In parallel, cell viability was evaluated using trypan blue dye (0.4%). For all irradiated samples, the results showed an increase of p53 levels in PBMCs with the absorbed dose. This increase was inversely proportional to the number of viable cells. The highest expression level of this protein was observed for PHA-stimulated 72h-cultures. The comparison between subjects pointed out differences statistically significant in p53 expression levels, which may be associated to the variability in individual radiosensitivity. The results of this research suggest further studies in order to compare p53 expression levels with harmful effects of radiotherapy.

Key words: p53 protein, radiosensitivity, flow cytometry, cell viability

1 Introdução

Diversos estudos propõem que o espectro de reações adversas que ocorrem no tecido normal, após a exposição às radiações ionizantes (RIs), é função da radiossensibilidade individual. Turesson e colaboradores (1989; 1990) realizaram avaliações clínicas em 400 pacientes submetidos à radioterapia (RT) e demonstraram que aproximadamente 80 % dos diferentes tipos de reações dos tecidos normais foram oriundos das diferenças na radiossensibilidade individual, evidenciando a importância deste parâmetro na eficácia do tratamento com radiações (BURNET et al., 1992; 1996).

Diante da variabilidade interindividual na radiossensibilidade, é de grande importância o desenvolvimento de métodos que possam ser usados na identificação de características individuais de sensibilidade à radiação, objetivando otimizar o planejamento dosimétrico e, consequentemente, melhorar a eficácia terapêutica.

No que diz respeito à resposta celular após a irradiação, a radiossensibilidade está diretamente relacionada com falhas no sistema de reparo do ácido desoxirribonucléico (DNA), molécula vital das células. Assim, o emprego de técnicas que permitam avaliar o processo de reparo do material genético ou a morte celular pode ser de grande importância na determinação dos níveis da radiossensibilidade individual (BENOTMANE, 2004).

A molécula considerada como chave nos processos de reparo do DNA, que ocorrem nos pontos de checagem do ciclo celular, é a proteína p53. Pesquisas envolvendo a padronização da metodologia da citometria de fluxo para a investigação dos níveis de expressão da p53 constataram variações significativas desta proteína em células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs) irradiadas *in vitro*, sugerindo o emprego da quantificação da p53 como bioindicador de exposição à radiação ionizante (CAVALCANTI et al., 2008).

Neste contexto, esta pesquisa teve como objetivo geral avaliar os níveis de expressão da proteína p53 de linfócitos do sangue periférico humano com a radiossensibilidade individual.

E como objetivos específicos:

- Definir a concentração das lectinas provenientes da Phaseolus vulgarise (fitohemaglutinina - PHA) e Phytolacca americana (pokeweed - PKW) a ser utilizada nas culturas *in vitro* de células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs), não irradiado.

- Determinar o intervalo de tempo de cultivo celular para lectinas PHA e PKW.

- Analisar a viabilidade das PBMCs irradiadas e não irradiadas.

- Definir por citometria de fluxo nos níveis de expressão da proteína p53 em PBMCs irradiadas e não irradiadas.

- Correlacionar a viabilidade celular com os níveis de expressão da proteína p53 em linfócitos do sangue periférico humano.

- Correlacionar os níveis de expressão da proteína p53 com a radiossensibilidade individual.

2 Revisão da Literatura

2.1 Radiossensibilidade

O conceito de radiossensibilidade pode ser descrito como uma característica intrínseca ao a qual é associada com o surgimento dos efeitos adversos da radiação ionizante sobre o corpo humano (TWARDELLA; CHANG-CLAUDE, 2002).

Os trabalhos de Bergonié e Tribondeau sobre os efeitos biológicos das radiações ionizantes em tecidos representam um marco nos estudos da radiossensibilidade. Esses autores afirmaram que a sensibilidade é uma função do estado metabólico do tecido, além da diferenciação e proliferação céulas que estão sendo irradiadas (ARENA, 1971 *apud* STELL, 1996). Este conceito tornou-se conhecido como a "Lei de Bergonié e Tribondeau", e estabelece que a radiossensibilidade dos tecidos vivos pode variar da seguinte maneira:

- Quanto mais diferenciada for a célula, maior é sua resistência à radiação;
- Quanto mais jovem for o tecido ou órgão, mais radiossensível ele será;
- Quanto maior a atividade metabólica, maior a radiossensibilidade;
- Quando a taxa de proliferação celular e a taxa de crescimento tecidual aumentam, a radiossensibilidade também aumenta.

Uma exceção desta Lei são os linfócitos, que são células diferenciadas, no entanto são sensíveis à radiação ionizante (IAEA, 2001).

Até a década de 80, poucos radiobiologistas achavam que a radiossensibilidade de células tumorais humanas tinha importância prática para a radioterapia[*] (STELL, 1996). Em 1975 Withers listou as quatro letras **R** da radioterapia: **R**edistribuição do ciclo celular; **R**eoxigenação das células hipóxias; **R**eparo do dano sub-letal; **R**epopulação (STELL, 1996). É possível observar que a radiossensibilidade não foi levada em consideração.

Todavia, neste mesmo ano, foi relatado o primeiro caso de radiossensibilidade individual excessiva, onde o paciente, portador da síndrome genética Ataxia Telangiectasia, apresentou graves reações após ser submetido à radioterapia. Em análise de cultura celular, os fibroblastos desse paciente apresentaram-se três vezes mais sensíveis à radiação quando comparados com fibroblastos de indivíduos sadios (TAYLOR et al., 1975 *aupd* BARNETT et al., 2009; STELL, 1996).

Nos anos seguintes, demonstrou-se que pacientes portadores de outras síndromes (e.g., Xeroderma pigmentoso, síndrome de Werner, síndrome de Cockayne, síndrome Breakage Nijmegen, síndrome Blomm e anemia de Fanconi), caracterizadas pela alta susceptibilidade do DNA a agentes tóxicos, também exibem uma hipersensibilidade às RIs (FERNET et al., 2004; POPANDA et al., 2008).

No entanto, outros indivíduos, mesmo não apresentando desordens genéticas aparentes, desencadeiam reações graves após a irradiação que podem aparecer dentro de poucos dias, semanas ou anos após a exposição. Esses efeitos se apresentam de forma não homogênea entre pacientes e a gravidade das reações varia de acordo com uma escala estabelecida pela Sociedade Americana de Radiobiologia Terapêutica e Oncologia (Astro), que vai de zero, quando não há efeito adverso, a 5, quando o efeito da radiação leva o indivíduo ao óbito (COX et al., 1995; FERNET et al., 2004).

Dentre os efeitos adversos apresentados na radioterapia, a tolerância à irradiação das células dos tecidos saudáveis circunvizinhos ao tumor é um dos principais fatores limitantes da dose prescrita para o tumor. Cerca de 10 % dos pacientes submetidos ao tratamento radioterápico apresentam efeitos adversos graves manifestados principalmente

[*] A radioterapia é um tipo de tratamento que tem como finalidade erradicar tumores malignos por meio da distribuição de uma dose uniforme de radiação ionizante à massa tumoral, induzindo a morte das células malignas com danos mínimos ao tecido normal adjacente.

nos tecidos sadios o que pode levar a uma diminuição na qualidade de vida e limitar o controle do tumor por causa da dose de radiação administrada (BARNETT et al., 2009; POPANDA et al., 2008; STEWART, 2003). Isso poderia ser minimizado se a radiossensibilidade individual fosse previamente identificada, com o auxílio de métodos que permitissem, por exemplo, determinar fatores de correção em protocolos pré-estabelecidos. Assim os fatores de correção seriam responsáveis pela transformação de um protocolo dosimétrico geral em um protocolo específico para cada paciente (TWARDELLA; CHANG-CLAUDE, 2002).

A Figura 1 compara, qualitativamente, a probabilidade de ocorrência de dano biológico, com o aumento da dose de radiação, no controle do tumor e no tecido normal adjacente. É possível identificar que, com o aumento da dose de radiação eleva-se a probabilidade de cura do tumor, mas também o aparecimento de efeitos indesejáveis nos tecidos normais irradiados.

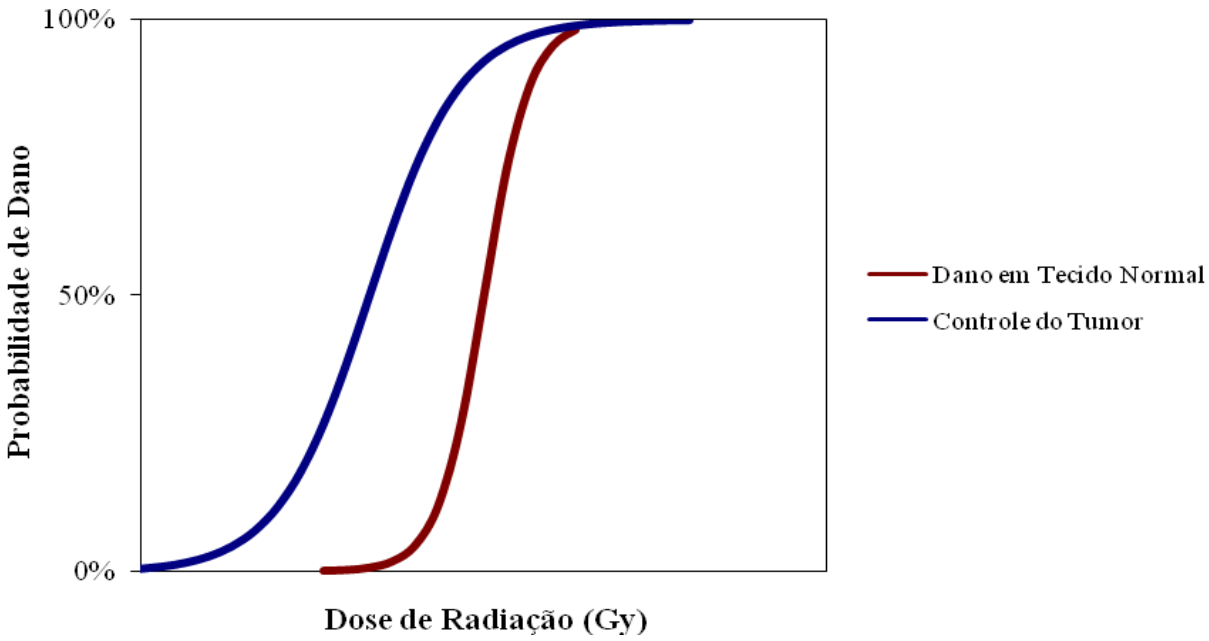


Figura 1 – Curva dose *versus* dano biológico em tratamentos radioterápicos
(Adaptada de: BARNETT et al., 2009)

Além dos parâmetros físicos, como a transferência linear de energia (LET), a taxa de dose (dose absorvida por unidade de tempo), volume irradiado, dose absorvida total e o fracionamento da dose; a variabilidade dos efeitos biológicos, entre os pacientes, resultantes da radioterapia dependem também de informações adicionais tais como: idade, hábito de fumar, estado imunológico, uso concomitante de quimioterapia, nível de oxigenação no tumor e tecidos circunvizinhos, taxa de proliferação celular, concentração de anti-oxidantes no meio irradiado (e.g. vitamina C), teor hídrico, dentre outros (HALL; GIACCIA, 2006; TUCKER et al., 1996, TURESSON et al., 1996).

Embora todos esses fatores possam influenciar na gravidade das reações à RT com relação à sensibilidade, estima-se que 80 % das variações das reações dos tecidos normais não podem ser explicadas pelos fatores citados (TURESSON et al., 1996). Portanto, provavelmente, essas variações são devido à fatores genéticos intrínsecos que determinam a resposta celular ao dano produzido pelas RIs (HALL et al., 2005; FERNET et al., 2004).

Os estudos iniciais sobre o comportamento dos tecidos normais após a exposição às RIs foram realizados utilizando biópsias de pele e cultura de fibroblastos. Atualmente, outros tipos celulares também têm sido empregados na investigação, como os linfócitos. Estas pesquisas consistem na tentativa de desenvolver testes *in vitro* baseados em processos celulares para predizer a radiossensibilidade individual (BURNET et al., 1992; TWARDELLA; CHANG-CLAUDE, 2002).

A base genética da radiossensibilidade envolve muitos fatores e, consequentemente, inviabiliza atualmente sua determinação direta. As diferentes funções celulares, como a sobrevivência da célula, capacidade de reparo, formação de aberrações de cromossômicas e a apoptose, influenciam a radiossensibilidade individual (TWARDELLA; CHANG-CLAUDE, 2002; BORGMANN et al., 2008).

Dessa forma, a avaliação *in vitro* da capacidade de sobrevivência, replicação ou reparo celular após a exposição às RIs, a análise citogenética de células irradiadas e a avaliação dos níveis de citocinas pro-fibróticas e inflamatórias como o fator transformador

de crescimento-beta (TGFβ) no plasma sanguíneo são alguns dos testes propostos para predizer a radiossensibilidade individual (BENTZEN, 2006; BORGMANN et al., 2008).

Oppitz e colaboradores (2002) propuseram o teste do cometa para prever a radiossensibilidade. Neste estudo, eles compararam, *in vitro*, a radiossensibilidade de linfócitos crio-preservados de pacientes com câncer de mama com a ocorrência de reações clínicas agudas tendo encontrado uma boa correlação entre os achados clínicos e laboratoriais.

Entretanto, Popanda e colaboradores (2003) utilizando o teste do cometa com linfócitos, não encontraram uma boa correlação entre a redução da capacidade de reparo do DNA e os efeitos agudos da radiação. No entanto, alguns dos indivíduos analisados apresentaram sensibilidade clínica elevada à radiação, o que limita o poder de detecção do teste do cometa para prever a radiossensibilidade clínica.

Borgmann e colaboradores (2008) propuseram a quantificação das aberrações cromossômicas instáveis (ABIs), até então amplamente utilizadas em avaliações da dose de radiação (dosimetria citogenética), como teste de radiossensibilidade individual. Para tanto, foram utilizadas culturas de linfócitos de pacientes com diferentes tipos de câncer, irradiados com doses de 3 e 6 Gy. Nesse estudo, a quantificação das aberrações cromossômicas mostrou-se adequada para prever o risco de efeitos indesejáveis que podem ocorrer após a radioterapia. Entretanto, estes parâmetros só foram suficientes para prever a radiossensibilidade individual para dose de 6 Gy. Esses autores sugerem a realização de pesquisas complementares utilizando as ABIs a partir de doses absorvidas, suficientemente altas, para se ter um grau de confiança significativo na distinção entre pacientes “sensíveis”, “normais” e “resistentes”.

Recentemente, Greve e colaboradores (2009) propuseram a avaliação da apoptose (morte celular programada) e necrose como um teste para prever a radiossensibilidade individual. Eles avaliaram os níveis de fosfatidilserina localizadas na parte externa da membrana plasmática de linfócitos utilizando anexina V, e correlacionaram os valores com a morte celular radioinduzida. No entanto, não foi observada uma correlação entre a morte

celular radioinduzida, *in vitro*, com o aumento da radiossensibilidade clínica. Diante disso, os autores sugeriram a comparação de diferentes metodologias para avaliar apoptose (e.g. Anexina-V, Tunel, conteúdo do DNA, caspases 3, etc.) no mesmo tipo de célula, já que cada teste irá avaliar diferentes estágios e vias do processo apoptótico.

Atualmente, nenhum dos testes clínicos existentes é empregado para prognosticar conseqüências clínicas à radioterapia de sorte a possibilitar um protocolo de radioterapia paciente-específico que considere a radiossensibilidade dos tecidos normais. Certamente, o desenvolvimento de testes que possam caracterizar a radiossensibilidade individual antes do início do tratamento radioterápico contribuirá de forma excepcional para uma maior eficácia da radioterapia, com uma significativa diminuição dos efeitos adversos da radiação.

No Brasil, por exemplo, a quantificação da hemoglobina no sangue periférico é o único exame solicitado pelo médico radioterapêuta antes do início do tratamento de pacientes com câncer, sendo, portanto, utilizada como parâmetro prévio para avaliar uma possível diminuição da eficácia do tratamento. Indivíduos que apresentam um taxa de hemoglobina baixa, ou seja, pouca oxigenação tecidual, tendem a ser mais resistentes ao tratamento. Entretanto, outros aspectos que podem influenciar na gravidade do dano das células normais e cancerígenas após a exposição às RIs, ainda não são bem avaliados, a exemplo da determinação da eficácia do sistema de reparo celular.

Um bom exemplo desta relação é a *Deinococcus radiodurans*. Esta bactéria exibe uma grande resistência letal e mutagênica aos efeitos da radiação ionizante e ultravioleta e de diversos outros agentes tóxicos ao DNA. Após a exposição à doses elevadas (15 kGy) de RI, a *D. radiodurans* pode reparar 100 % das quebras da dupla fita de DNA (DSB – Double Strand Breaks) provocadas pela RI por cromossomo, sem que haja a morte celular ou mutação, demonstrando a relação entre a radioresistência e o reparo eficiente da molécula de DNA (BENOTMANE, 2004).

Logo, o estudo da correlação entre a radiossensibilidade individual e a capacidade de reparo do DNA é de fundamental importância no controle dos efeitos adversos das RIs .

O estudo dos mecanismos de reparo do ciclo celular funciona como base para entendimento dessa correlação.

2.2 Ciclo celular

O ciclo celular divide-se em interfase e mitose. A interfase é divida em quatro sub-fases: G0, G1, S, G2; já a mitose é sub-divida em: prófase, metáfase, anáfase, telófase e citocinese (GARREETT, 2001; ALBERTS et al., 2002).

As células em G1 podem deter sua progressão no ciclo celular e entrar em um estado de repouso especial chamado G0, no qual podem permanecer durante dias, semanas ou anos (DÍAZ et al., 2003).

A fase G0 difere de todos os estados que existem no ciclo celular devido a 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 G1. Por exemplo, a maioria dos linfócitos se encontra nesta fase do ciclo celular e só entra na fase G1 quando ativados pelo reconhecimento do antígeno e presença de sinais coestimuladores (DÍAZ et al., 2003).

Em G1, a célula possui uma atividade bioquímica intensa. Portanto, a célula aumenta seu material enzimático, suas organelas se replicam, e outras moléculas e estruturas citoplasmáticas também aumentam em número. Conseqüentemente, o tamanho celular aumenta (SNUSTAD; SIMMONS, 2001).

Os eventos que comumente ocorrem na fase G1 são a indução das ciclinas D e E, que formam complexos ativos essenciais para que as células prosseguiam para fase S (SHACKELFORD et al., 1999). As ciclinas são proteínas fase específicas do ciclo celular e recebem esse nome porque controlam a ativação e desativação dos complexos formados entre estas proteínas e quinases que dependem delas (cyclin-dependent kinase – CdK) de maneira cíclica nos diferentes estágios do ciclo (SHACKELFORD et al., 1999).

As ciclinas do tipo D e E normalmente se associam com CdK4, CdK6 e CdK2. Os complexos ciclina D/CdK4-CdK6 e ciclina E/CdK2 têm a função de fosforilar a proteína retinoblastoma (Rb). Esta proteína é encontrada na célula em sua forma hipofosforilada e neste estado, a Rb tende a se ligar ao fator de transcrição de células eucarióticas E2F, tornando-o inativo (SHACKELFORD et al., 1999). O E2F tem sítios de ligações em diferentes promotores de vários genes celulares cujos produtos estão envolvidos nos processos de proliferação celular, especialmente na síntese de DNA (SHACKELFORD et al., 1999).

Os complexos ciclina D/CdK4-CdK6 e ciclina E/CdK2 irão fosforilar a Rb e com isso ativar o fator de transcrição E2F. Uma vez ativado, o E2F irá produzir proteínas que atuam na ativação de genes essenciais para que a célula prossiga de G1 para S (SHACKELFORD et al., 1999).

Na fase S (síntese) a célula adquire fatores como tamanho adequado, proteínas importantes para a replicação do DNA nuclear e energia proveniente de moléculas de ATP (adenosina trifosfato) necessários para o início do processo de divisão celular que ocorrerá na fase seguinte (DÍAZ et al., 2003). Ainda nesta fase, ocorre um aumento dos níveis de ciclina-A que tem como função auxiliar na progressão da transição do ciclo celular. Esta ciclina se associa a CdK2 e CdKl (ou Cdc2) formando complexos serina-treonina quinases que fosforilam uma série de proteínas importantes na replicação de DNA. A atividade do complexo ciclina A/CdK2 é requerida para a progressão da fase de S para G2 (SHACKELFORD, et al., 1999).

Na fase G2 ocorre a preparação para a mitose; todas as organelas e as maquinarias essenciais para a divisão da célula progenitora em duas células filhas idênticas, embora de tamanho menor. Após esta fase, a célula inicia o processo de mitose (M). A progressão da fase G2 para a fase M é controlada pelo complexo ciclina B/Cdk1, também conhecido como fator promotor da mitose. Os níveis de ciclina B oscilam através do ciclo celular: seu aparecimento ocorre na fase de S, aumenta em G2 e decai na anáfase (fase da mitose) (DÍAZ et al., 2003).

A Figura 2 apresenta de forma esquematizada as fases do ciclo celular G0, G1, S, G2 e suas respectivas ciclinas e Cdks envolvidas. Na fase G1 a célula necessita da formação dos complexos entre as ciclinas D e E e as Cdk2, Cdk4, Cdk6 para prosseguir para fase S. Nesta fase, a célula irá duplicar seu material genético e prosseguir para fase G2, para isto a célula necessita da formação de um complexo entre a ciclinas A e as Cdk2 ou Cdk1. Uma vez na fase G2, a célula se prepara para entrar em mitose, num processo que requer o complexo entre a ciclina B e Cdk1. Após a mitose, a célula pode iniciar outro processo mitótico ou entrar em estado de latência (fase G0).

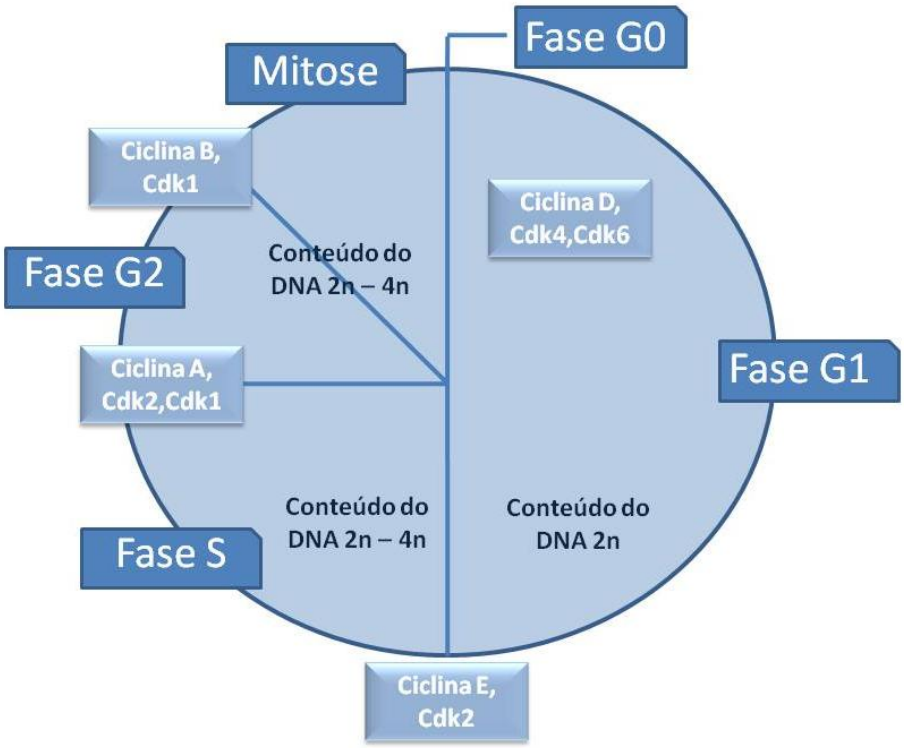


Figura 2 – Fases do ciclo celular: G1, S e G2
(Adaptado de: SCHAFER, 1998)

Na primeira fase da mitose, ou seja, na prófase, ocorre a ruptura da membrana nuclear e cada cromossomo é formado por duas cromátides distintas conectadas por um centrômero. Já na metáfase, os pares das cromátides se movem dentro do fuso e se localizam no plano equatorial da célula. É nesta fase que os cromossomos adquirem o

maior nível de condensação. Na anáfase, as cromátides irmãs se separam e são conduzidas para os pólos opostos da célula. Ao iniciar a telófase, os cromossomos alcançam os pólos opostos, o fuso começa a desaparecer e a membrana nuclear volta a se formar ao redor do conjunto de cromossomos (CASTRILLO, 1995; ALBERTS et al., 2002).

A citocinese consiste na divisão do citoplasma mediante um processo denominado segmentação, o qual é normalmente dirigido por um fuso mitótico formado pela reorganização dos microtúbulos do citoesqueleto (CASTRILLO, 1995; ALBERTS et al., 2002). A Figura 3 apresenta, de forma esquemática, as fases do ciclo celular: interfase e mitose.

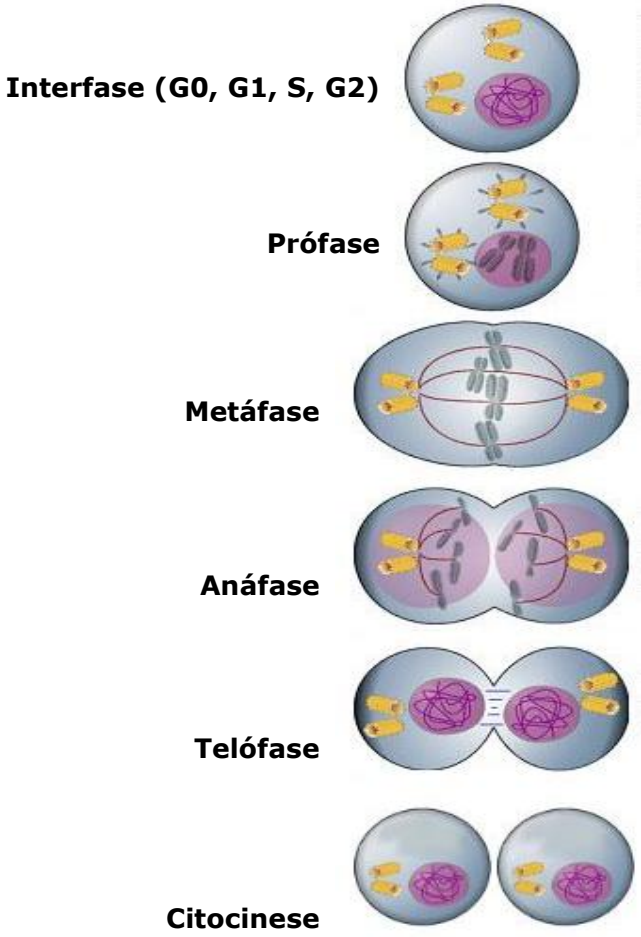


Figura 3 – Fases do ciclo celular

(Adaptada de: http://www.natuurinformatie.nl/sites/nnm.dossiers/contents/i004640/mitose+tekst%20voor%20aanpassing2.jpg)

Em 1960, estudos com células mitóticas demonstraram grandes variações na radiossensibilidade durante todo o ciclo celular após a exposição às radiações ionizantes. Assim, a fase S foi confirmada como a fase do ciclo celular mais resistente e, a mitose e a fase G2, como as mais radiossensíveis (PAWLIK; KHANDAN 2004; WILSON, 2004; TAMULEVICIUS et al., 2007).

A irradiação de uma célula durante a fase G1 do ciclo celular atrasa a progressão até à fase S e, de modo semelhante, células irradiadas durante a fase S atrasam a continuação da síntese do DNA, e células irradiadas durante G2 atrasam a entrada em mitose (PAWLIK; KHANDAN 2004; WILSON, 2004; TAMULEVICIUS et al., 2007).

De modo a executar as diferentes etapas do ciclo celular numa ordem correta, as células possuem pontos de checagem (*checkpoints*) que monitoram o estado dos acontecimentos ao longo do ciclo celular. Estes *checkpoints* são controlados por genes que regulam e controlam o ciclo celular, determinando o momento certo para a célula se dividir ou interromper a divisão (PAWLIK; KHANDAN 2004).

Os *checkpoints* mais bem elucidados são aqueles que ocorrem durante as fases G1 e G2, onde o atraso em G1 impede a replicação de DNA danificado e uma parada na fase G2 evita que a célula segregue cromossomos defeituosos (PAWLIK; KHANDAN 2004).

2.3 Gene supressor de tumor *TP53*

Dentre os genes supressores tumorais, o gene *TP53* está diretamente implicado em deter o desenvolvimento de células neoplásicas, possuindo um papel fundamental nas respostas celulares aos agentes agressores. Este gene é o mais freqüentemente alterado em casos de câncer em humanos: mais de 50 % dos tumores humanos primários possuem mutações no gene *TP53* (ROTTER; PROKOCIMER, 1991; CAVALCANTI JÚNIOR et al., 2002).

O gene *TP53* foi descoberto em 1979, identificado inicialmente como oncogene em 1985 por Jenkins, e posteriormente classificado como gene supressor de tumor em 1989, por Baker e colaboradores. (BAST, 1983; CAVALCANTI JÚNIOR et al., 2002).

Utilizando um clone de cDNA para análise de células híbridas murinas e humanas o gene *TP53* humano foi mapeado no cromossomo 17, sendo o seu loco identificado na porção telomérica do braço curto do cromossomo 17 (região 17p13.1) (LAMB et al., 1986).

A Figura 4 apresenta um cariótipo* humano normal, com 22 pares de cromossomos autossômicos, de um indivíduo do sexo masculino (XY). A seta vermelha indica a posição do gene *TP53* no cromossomo 17 (McBRIDE et al., 1986; LAMB et al., 1986).

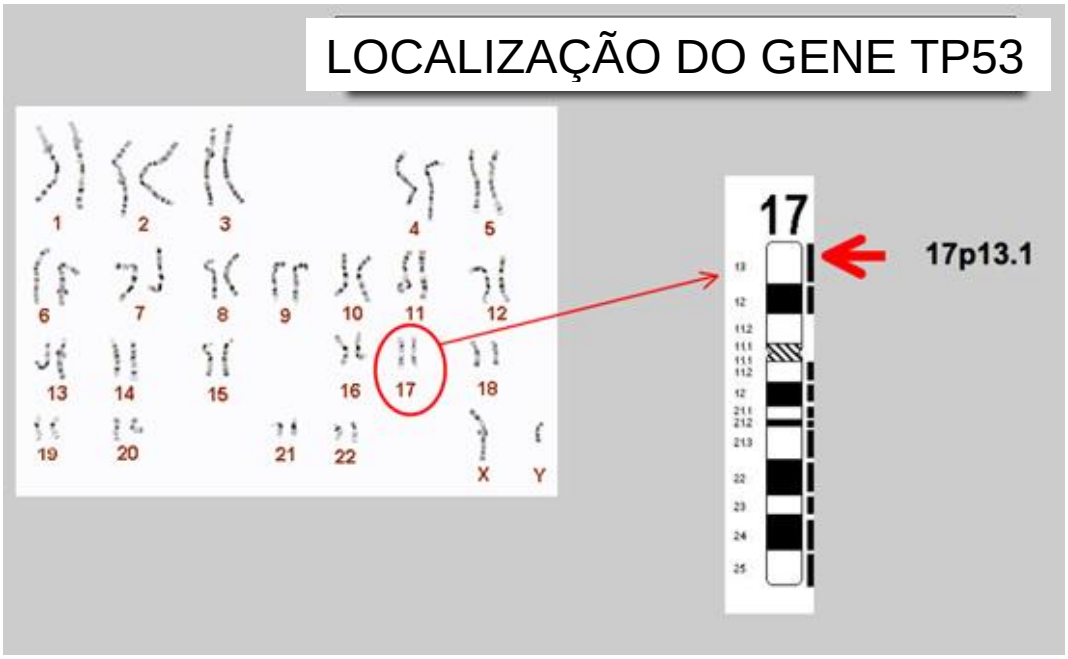


Figura 4 – Localização do gene Tp53 no cromossomo 17
(modificado de: http://p53.free.fr/p53_info/image_info/p53_gene2.jpg)

A estrutura do *TP53* foi caracterizada por meio do sequenciamento de clones de cosmídios e fagos lambda, sendo composto por 20 quilobases (kb)* do DNA genômico e

* Cariótipo: é o conjunto cromossômico ou a constante cromossômica diplóide (2n) de uma espécie. Representa o número total de cromossomos de uma célula somática (do corpo).

contem 11 exons, que variam de 22 a 1.268 pares de bases. Este gene codifica uma fosfoproteína nuclear denominada p53 (LAMB et al., 1986).

2.4 Descobrimento e estrutura da proteína p53

Em 1979, o resultado de duas pesquisas resultou na descoberta de uma proteína com um peso molecular de 53 kDa[†], sendo portanto denominada de proteína p53 (LÁZARO et al., 2004). A proteína p53 é um monômero constituído de 393 aminoácidos dispostos em 4 domínios e três regiões: amino-terminal (N-Ter), a central e a carboxi-terminal (C-Ter) (MILLAU et al., 2009). A Figura 5 ilustra, de forma esquemática, a estrutura da proteína p53 onde é possível verificar seus 393 aminoácidos dispostos em seus 4 domínios, sendo um básico e os outros para: de transativação, ligação ao DNA e oligomerização.

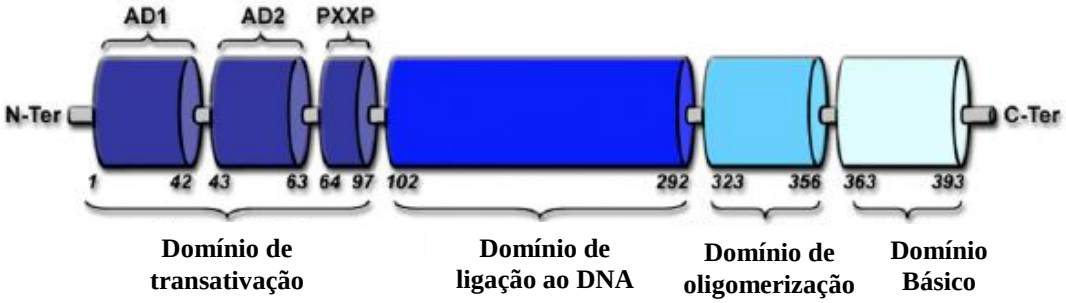


Figura 5 – Localização dos quatros domínios da proteína p53
(Modificada de: MILLAU J.F et al., 2009)

- **Região amino-terminal**: nesta região está localizado o domínio transativação, sendo dividido em 3 seções: AD1 (resíduos 1-42), AD-2 (resíduos 43-63) e domínio rico em prolina (resíduos de 64-73). AD1 e AD2 são responsáveis pela regulação da p53, visto que regulam proteína como a *Mouse Double Minute 2* (Mdm2 ou Hdm2 em humanos).

---

[*] Quilobase: unidade usual de comprimento de fragmentos de DNA; equivale a 1000 nucleotídeos.
[†] Dalton: É a unidade de massa atômica, usada na biologia molecular, equivalente a 1/12 da massa do carbono-12. 1 kDa= 1000 Da

O domínio rico em prolina contém 5 cópias de PXXP, possuindo uma elevada similaridade às proteínas que se ligam a SH3, as quais são necessárias para a apoptose e a interação com outras proteínas celulares (MILLAU et al., 2009).

- **Região central**: é onde ocorre a união da proteína p53 com o DNA, sendo, portanto, resistente à ação de enzimas proteolíticas e outras interações. Neste domínio se localizam quatro regiões, altamente conservadas entre diferentes espécies, e que servem de reconhecimento e ligação ao DNA. Os aminoácidos 248 e 276 são os que se unem diretamente ao DNA e identificados como os que sofrem maior número de mutação em amostras tumorais (MILLAU et al., 2009).

- **Região carboxi-terminal:** possui três diferentes funções: nela localiza-se o domínio responsável em dar o sinal de localização nuclear da proteína, é nesta região onde ocorre a tetramerização, onde 4 proteínas p53 se ligam para a oligomerização da molécula, tornando-se ativas, de forma que a região funciona como fonte de fosforilação para as Cdks. Este domínio intervém ainda na promoção da apoptose e na regulação da transcrição, embora de forma não tão importante como o domínio amino-terminal. A região carboxi-terminal também atua no reconhecimento do dano da dupla cadeia de DNA (MILLAU et al., 2009).

Aproximadamente 90 % das mutações na proteína p53 se localizam na região onde ocorre sua união com o DNA: são os “pontos quentes” de mutações, que podem causar tanto a perda da função supressora de tumor como o ganho da função oncogênica (LANE, 1992). A Figura 6 apresenta, esquematicamente, a ligação entre a proteína p53 e o DNA.

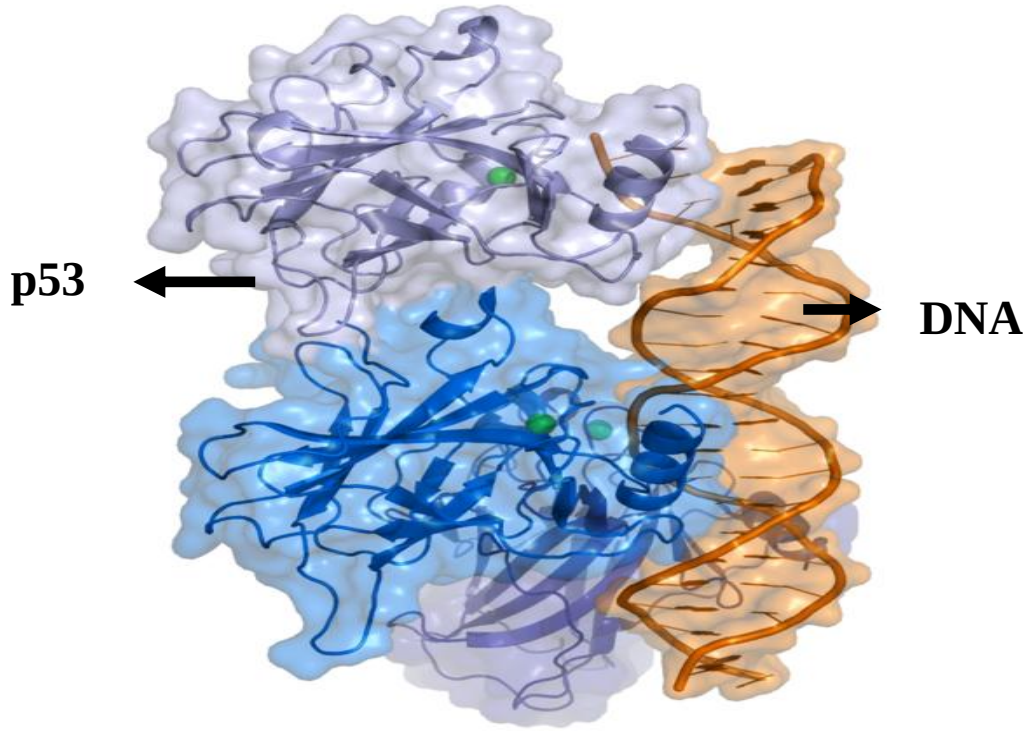


Figura 6 – Proteína p53 ligada a uma molécula de DNA
(http://pt.wikipedia.org/wiki/Imagem:P53.png#file)

2.4.1 Regulação da proteína p53

A proteína p53 inativa (selvagem ou *wild type*) se localiza no citoplasma em baixas concentrações e tem uma vida média relativamente curta na célula, cerca de 20 a 30 minutos. Ao receber sinais, a proteína deverá sofrer modificações para que seja convertida na sua forma ativa e passe a atuar no núcleo da célula. A duração e a cinética do aumento dos níveis de proteína diferem segundo o fator que provocou sua ativação e os genes que tenham sido regulados pela proteína a nível de transcrição (AGARWAL et al., 1998).

Os fatores que conduzem a ativação de p53 estão principalmente associados a situações de estresse celular (e.g. danos radioinduzidos no DNA). Estes estímulos provocam um rápido aumento dos níveis da proteína na célula, tanto por um aumento da sua estabilidade como por sua ativação bioquímica através de fosforilações e acetilações, permitindo que a proteína atue como fator de transcrição, una-se em determinadas regiões

do DNA por seqüências de bases específicas localizadas em regiões promotoras e regule a expressão de genes (HUTCHINSON, 1985).

A estabilidade da p53 é regulada pela ligação com a proteína Mdm2, de forma que qualquer evento que venha a interferir nesta ligação pode aumentar a estabilidade da proteína p53 (FEI; EL-DEIRY, 2003). A p53 pode ativar a expressão da Mdm2 que, por sua vez, conduz a repressão da p53 por três mecanismos diferentes: No primeiro, a Mdm2 se liga a região amino-terminal da p53, interferindo na atividade de transcrição da mesma, inativando-a; o segundo está relacionado à ida da p53 para dentro do núcleo; no terceiro, a Mdm2 age como uma E3 ubiquitina ligase, induzindo a degradação da p53 (VASSILEV et al., 2004).

Entretanto, um dano radioinduzido em uma das cadeias da molécula do DNA é suficiente para que ocorra o aumento da indução da proteína p53. No entanto, o mecanismo pelo qual a radiação estimula a expressão de p53 ainda não está bem esclarecido. O aumento dos níveis de expressão da p53 após a exposição às RIs parece ser resultado de uma combinação entre o aumento da sua vida média e o aumento da transcrição de seu RNA mensageiro (LEVINE, 1997).

Estudos relatam que células expostas às RIs induzem a fosforilação da serina 15 e esta modificação que ocorre apos a tradução do RNA mensageiro é diminuída depois da interação da RIs com as células deficientes em ATM (Ataxia Telagiectasia-Mutated). O gene ATM é capaz de fosforilar a p53 na serina 15 *in vitro*, e sua atividade é aumentada depois da interação com as RIs. Esses resultados sugerem que o gene ATM fosforila diretamente a proteína p53 em seu sitio de resposta às RIs (CANMAN et al., 1998).

O gene ATM também tem sido implicado em um novo evento desfosforilativo induzido pela RI. As radiações ionizantes causam a perda de um dos grupos de fosfato da serina na posição 376 na extremidade carboxila de p53 de uma forma dependente do gene ATM. Esta desfosforilação gera um sítio de união para proteínas e aumenta a seqüência de união específica do DNA (CASTAÑEDA et al., 2007).

Szkanderová e colaboradores (2003) avaliaram a fosforilação da proteína p53 em células MOLT-4 após exposição à radiação gama. Eles observaram que os danos no DNA ocasionados pela dose de 7,5 Gy induziam altos níveis de expressão da proteína p53 e este foram ocasionados pela fosforilação da proteína p53 a nível da serina-392 e da serina-15 (SZKANDEROVÁ et al., 2003).

Na sua forma ativa, a proteína p53 está implicada no controle do ciclo celular, na proliferação celular, na reparação e síntese de DNA e na morte celular programada (apoptose) (HARRIS, 2006).

2.5 Sistemas de checagem do ciclo celular

Os sistemas de checagem do ciclo celular servem para detectar defeitos durante o processo de divisão celular. Como conseqüência, a célula interrompe temporariamente a progressão do ciclo celular, notadamente nas fases G1, S e G2.

2.5.1 Ponto de checagem na fase G1

Quando expostas a agentes genotóxicos, as células podem atrasar a proliferação celular ainda na fase G1, no seu ponto de checagem. A parada do ciclo celular em resposta aos danos do DNA está associada ao aumento da expressão da proteína p53 (BRISTOW et al., 1996).

Uma vez ativada, a p53 pode funcionar como um fator regulatório de transcrição, ligando às seqüências regulatórias de vários genes, incluindo GADD45, Mdm2 e p21 (FEI et al., 2002). Sabe-se que p21, uma proteína inibidora da quinase dependente de ciclina 1A (Cdk1A), se liga diretamente aos complexos de ciclina/Cdk e age como um inibidor de Cdk. Desta forma, a p21 pode inibir a atividade quinase dos complexos ciclina E/Cdk2, ciclina D1/Cdk4, cilcina A/Cdk2, ciclina B/Cdc2 e com isso interrompe o ciclo celular na fase G1 (SHACKELFORD et al., 1999).

Outro regulador importante para transição de G1 para S é a família das proteínas INK4, especialmente a p16. Esta proteína inibe o complexo ciclina D Cdk4/Cdk6 e, consequentemente, a fosforilação da Rb. A proteína Rb hipofosforilada irá permanecer ligada ao fator de transcrição E2F, tornando-o inativo. Com isso, o E2F não irá produzir enzimas necessárias para síntese do DNA na fase S e a célula pára a sua divisão em G1 (SERRANO et al., 1993; LUKAS et al., 1995).

A Figura 7 apresenta de forma esquemática a progressão (quadro em azul) e parada do ciclo celular (quadro amarelo). É possível verificar que o ciclo celular progride da fase G1 para S mediante a ativação do complexo cdk2/ciclina E e do fator de transcrição E2F, que irão ativar a transcrição de genes que codificam para a produção de enzimas essenciais para síntese do DNA. Por outro lado, a parada do ciclo celular ocorre quando há danos na molécula de DNA e, consequentemente, a ativação da proteína p53. Uma vez ativada, esta proteína irá ativar a proteína p21, que se agrega ao complexo Cdk2/ciclina E inativando-o. Desta forma, não há a progressão do ciclo celular e a célula pára para que o dano seja reparado.

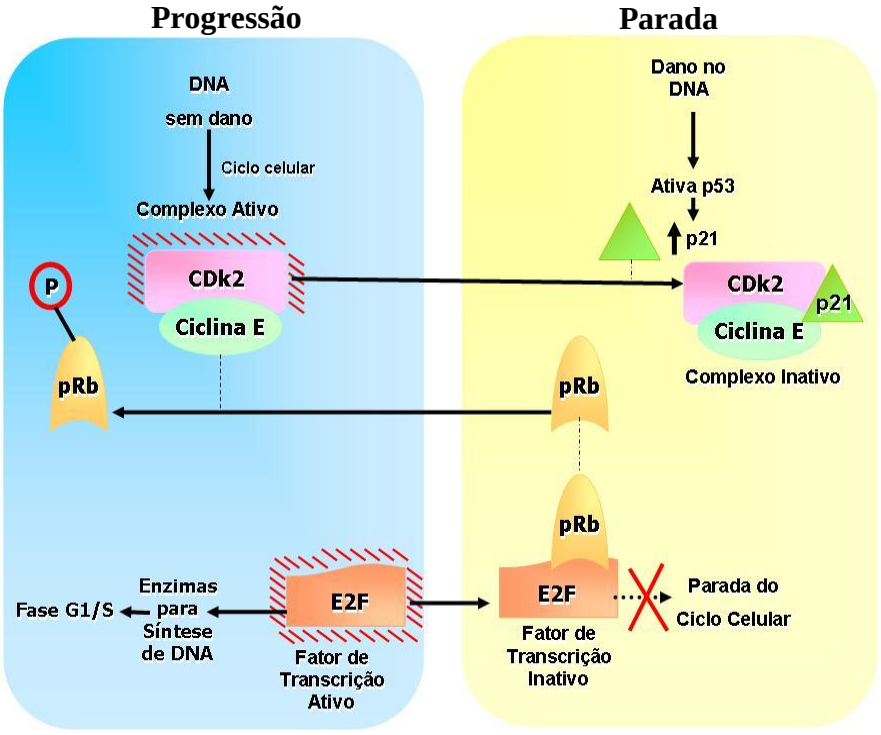


Figura 7 – Progressão e parada do ciclo celular

2.5.2 Ponto de Checagem na fase S

Os mecanismos envolvidos na progressão da divisão celular ao longo da fase S e desta para fase G2 ainda não são bem esclarecidos. Sabe-se que após a exposição a agentes mutagênicos, tais como as RIs, as células de mamíferos exibem uma redução dose-dependente na síntese de DNA dentro de alguns minutos (SHACKELFORD et al., 1999).

Este processo provavelmente envolve o complexo ciclinaA/Cdk2, que mostra importante função imediatamente antes da síntese de DNA através fosforilação de proteínas específicas envolvidas na replicação do DNA (mais precisamente na sua deselicoidização) (SHACKELFORD et al., 1999).

2.5.3 Ponto de Checagem na fase G2

A exposição de células em G2 às RIs e à outros agentes genotóxicos provoca o acúmulo de moléculas que resulta na inibição da atividade quinase de proteína e inativação do complexo ciclina B/Cdc2, necessário para que a célula prossiga para a mitose (SHACKELFORD et al., 1999).

Mediante uma exposição à RI, a ciclina B fica retida no citoplasma da célula. Assim, sua localização pode esclarecer alguns aspectos da função do ponto de verificação G2, uma vez que, para que a célula possa prosseguir para a mitose, é preciso que o complexo ciclina B/Cdc2 esteja localizado no núcleo (SHACKELFORD et al., 1999).

No entanto, quando há falhas no mecanismo de reparo, a célula irá prosseguir a divisão celular com DNA danificado, o que poderá ocasionar uma neoplasia ou morte celular; neste segundo caso, a célula tende a ser eliminada por apoptose (SHACKELFORD et al., 1999).

2.6 Apoptose

A morte celular pode ocorrer por dois mecanismos distintos: necrose e apoptose. A necrose, também chamada de morte celular patológica ou acidental, ocorre quando as células são expostas a uma variação extrema de suas condições fisiológicas (como hipertermia e hipoxia), danificando a membrana plasmática e conseqüentemente levando à morte celular (SIEGEL et al., 1999).

Por outro lado, a apoptose celular pode ser induzida por estímulos como inanição, fatores de crescimento, DNA danificado, infecção viral, molécula liberadas por linfócitos citotóxicos (CLT), drogas anti-câncer, irradiação, fatores letais, privação de fatores de sobrevivência e ligações de indutores químicos a determinados receptores de morte presentes na superfície celular (OLIVE; DURAND, 1997).

Os primeiros estudos sobre a apoptose foram realizados por Kerr (1971) que, ao induzir a atrofia no fígado de ratos pela ligação de vasos portais, observou a morte dos hepatócitos. Tal falecimento era caracterizado por alterações morfológicas peculiares como a diminuição do volume celular, ondulação das membranas plasmáticas, condensação da cromatina e, eventualmente, uma fragmentação em vesículas contendo organelas intactas. Esse fenômeno foi inicialmente chamado de necrose por encolhimento, e um ano mais tarde esse nome foi alterado para apoptose (KERR, 1972 *apud* OLIVE; DURAND, 1997), palavra grega para ‘perda das folhas das árvores’ (VAN CRUCHTEN; VAN DEN BROECK, 2002).

Esse processo de morte celular possui um papel essencial na manutenção da homeostase tecidual e é importante em certas condições patológicas, incluindo o câncer. Como o processo apoptótico possui um importante significado biológico, disfunções nos mecanismos de controle do sistema (apoptose deficiente ou excessiva) resultam numa variedade de condições patológicas, tais como imunodeficiência, doença auto-imune, doença degenerativa (doença de Alzheimer, doença de Parkinson), câncer e (OLIVE; DURAND, 1997).

Seguindo as alterações morfológicas já citadas acima, a célula é fragmentada em compactas estruturas membranosas que são posteriormente fagocitadas por macrófagos e então removidas do tecido sem gerar uma resposta inflamatória (OLIVE; DURAND, 1997).

Na Tabela 1 são listadas as principais diferenças entre os processos de necrose e apoptose no que diz respeito às características morfológicas, bioquímicas e significâncias fisiológicas.

Tabela 1. Diferentes características entre a morte celular por apoptose e necrose

APOPTOSE	NECROSE
MORFOLÓGICAS	
Estrangulamento da membrana sem perda da integridade	Perda da integridade da membrana
Agregação da cromatina à membrana celular	Floculação da cromatina
Condensação celular (encolhimento celular)	Inchaço da célula seguido de lise
Formação de vesículas com membrana (corpos apoptóticos)	Lise completa sem formação de vesículas
Sem desintegração das organelas	Desintegração das organelas
BIOQUÍMICAS	
Processo envolvendo ativação e passos enzimáticos	Perda da regulação iônica homeostática
Processo ativo	Processo passivo
Fragmentação de DNA definida (não randômica)	Digestão randômica de DNA
Pré-fragmentação de DNA	Pós-fragmentação de DNA
FISIOLÓGICAS	
Morte de células individuais induzida por estímulos fisiológicos	Morte de grupos celulares evocado por distúrbios não fisiológicos
Fagocitose por células adjacentes ou macrófagos	Fagocitose por macrófago
Resposta não inflamatória	Significante resposta inflamatória

A Figura 8 apresenta de forma esquemática as etapas do mecanismo de apoptose e necrose celular. É possível observar que, no processo apoptótico, a célula permanece com a

membrana plasmática integra, mas há presença de mudanças nucleares e uma fragmentação da célula com possibilidade de ocorrer necroses secundárias. Já no processo de necrose, não há a desfragmentação do núcleo, mas a célula perde a integridade da membrana devido a turgescência (OLIVE; DURAND 1997).

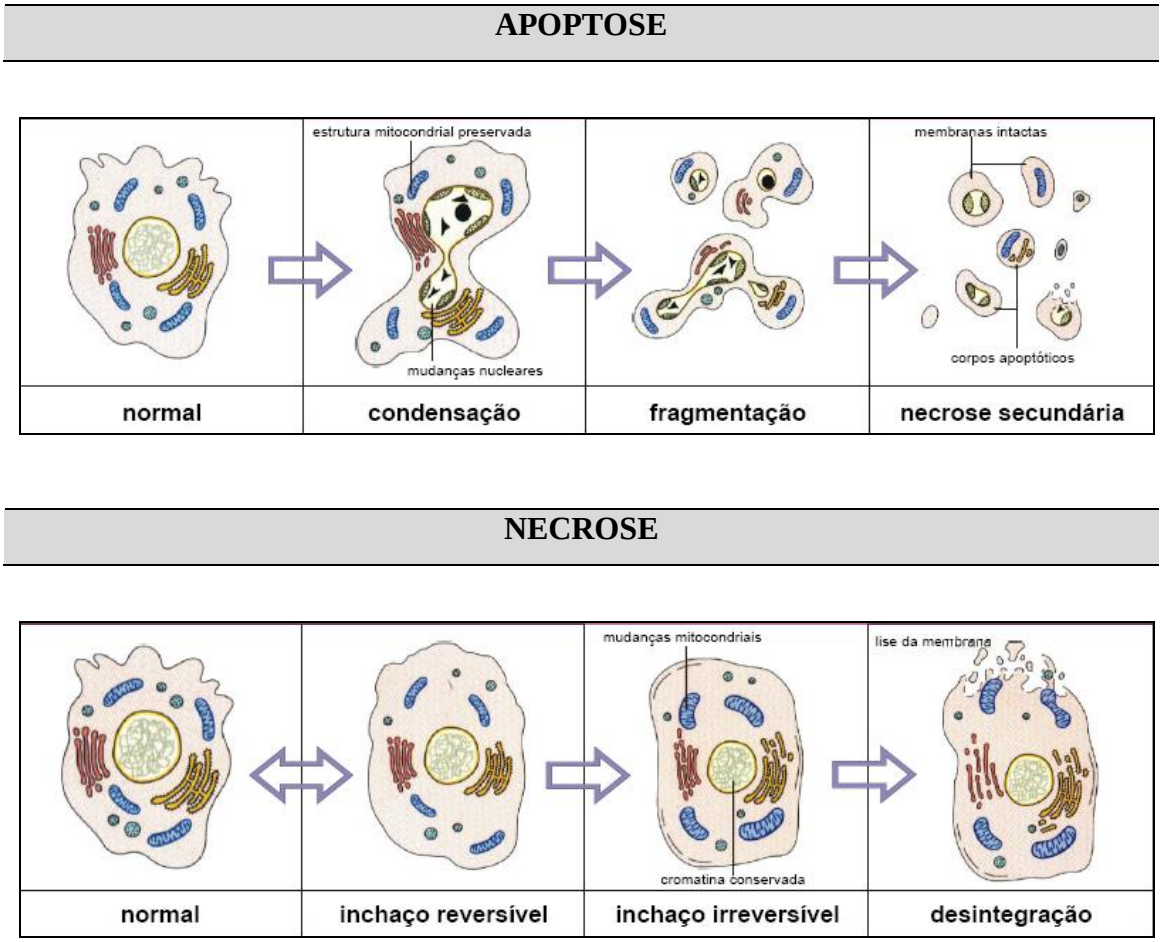


Figura 8 – Mecanismo de apoptose e necrose celular
(http://www.bioagency.com.br/catalogos/09_apoptose_2004.pdf)

Com relação à exposição a RIs, existem células que entram em apoptose imediatamente após uma irradiação, a exemplo dos timócitos, esplenócitos, progenitores hematopoiéticos, células do folículo capilar e células da parede do intestino delgado. Este mecanismo de apoptose, assim como para resposta a outros agentes, é controlado por expressões genéticas que podem ocorrer em diferentes compartimentos celulares, como o

núcleo, elementos citoplasmáticos e membrana plasmática (GUDKOV; KOMAROVA, 2003).

Diversos estudos têm apresentado o envolvimento da proteína p53 no mecanismo de apoptose radioinduzida. Diferentes mecanismos de resposta ao estresse genotóxico podem ser ativados por diferentes vias, e a p53 atua como molécula-chave, que participa de grande parte dessas vias. Em estudos realizados com células do timo, por exemplo, foi verificado que as que não expressavam p53 não morreram por apoptose, já as que expressavam a p53 em sua forma selvagem eram extremamente radiossensíveis, sendo eliminadas por apoptose após serem irradiadas com doses inferiores a 1 Gy.

A participação da p53 se inicia quando os danos no DNA induzidos pela radiação ionizante ativam uma série de proteínas quinases, que, por sua vez, fosforilam, ativam e acumulam a p53. Atualmente, três modelos são aceitos como hipóteses para explicar a função da p53 (GUDKOV; KOMAROVA, 2003):

- O primeiro indica que a decisão entre a célula entrar em apoptose ou interromper o ciclo celular para reparar os danos no DNA depende da quantidade de p53 ativada e do tempo de duração dessa ativação. Quanto mais forte e mais longa for a ativação da p53, maiores as chances de ocorrer apoptose e não a interrupção do ciclo celular (GUDKOV; KOMAROVA, 2003).

- O segundo diz que as células já possuem uma pré-disposição para apoptose ou para parada do ciclo celular. A decisão é feita de acordo com o conteúdo da cromatina ativa em cada tipo celular, ou seja, devido aos genes passíveis de serem ativados pela p53. Por exemplo, quando expostas à RI, células hematopoiéticas e embrionárias quase sempre respondem com apoptose. Por outro lado, os fibroblastos, mesmo quando as doses de radiação são muito altas, quase sempre respondem com a interrupção do ciclo celular (GUDKOV; KOMAROVA, 2003).

- O terceiro diz que a decisão depende da disponibilidade de co-fatores necessários para a ligação da p53 a genes específicos (GUDKOV; KOMAROVA, 2003).

Nas últimas décadas, o papel da apoptose mediada pela p53 foi muito discutido e estudado por pesquisadores no mundo todo. Como a apoptose mediada pela p53 é um importante fator na determinação da sensibilidade dos tecidos à RI, e como os tumores geralmente são sensíveis à radioterapia, acreditava-se na relação entre expressão de p53 e sensibilidade do tumor à radiação (OLIVE; DURAND, 1997).

Estudos mostraram que células induzidas a serem cancerosas que expressavam p53 ativa responderam aos danos do DNA com apoptose mediada pela p53, enquanto que tumores que apresentavam p53 inativa geralmente tornavam-se mais resistentes ao tratamento. Dados clínicos confirmam essa idéia e apontam que a presença da p53 (selvagem) no tumor geralmente está associada ao bom prognóstico do paciente. No entanto, novos estudos apontavam para outra direção. Pesquisadores identificaram que células tumorais tratadas com quimioterapia e radioterapia entravam em apoptose mediada pela p53 apenas quando as células dos tecidos de origem normalmente já eram susceptíveis à esse tipo de apoptose, como é o caso de tecidos hematopoiéticos e tecidos reprodutivos (GUDKOV; KOMAROVA, 2003).

A p53 passou a ser importante na determinação da susceptibilidade do tumor ao tratamento somente para os tumores que mantinham a forma nativa da p53 no tecido cancerígeno. Contudo, a p53 é inativada por mutações em mais da metade dos tumores malignos humanos, e não é funcional em muitos outros devido a alterações em outros componentes da sua via metabólica (OLIVE; DURAND, 1997; GUDKOV; KOMAROVA, 2003).

O papel da p53 na resposta celular à radiação é de grande importância. No entanto, na maioria das células tumorais, a via da p53 é geralmente inativada, e seu papel na morte celular fica limitado a um pequeno grupo de células cancerosas. Todavia, o papel da p53 em células dos tecidos normais poderá ser um fator importante para determinar a radiossensibilidade individual quando co-relacionados com a eficiência do mecanismo de reparo e com a viabilidade celular, já que nestas células a p53 poderá ser ativada (GUDKOV**:** KOMAROVA, 2003).

Com base nestes dados, pode-se inferir que, em células normais, há um aumento da expressão da proteína p53 em resposta a um agente genotóxico, especialmente em células de tecidos que apresentam alta sensibilidade à radiação, como é o caso das células hematopoiéticas, principalmente os linfócitos.

Neste contexto, o objetivo desta pesquisa foi a avaliar a correlação entre os níveis de expressão da proteína p53 em linfócitos do sangue periférico humano e a radiosensiblidade individual.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Perfil do estudo

O estudo foi do tipo experimental ou ensaio clínico não-randomizado. Este ensaio consiste na comparação entre um grupo de amostras, de sangue periférico humano, expostas à radiação ionizante e outro formado por amostras não expostas, denominado controle. Ambos foram escolhidos a partir de critérios de disponibilidade ou conveniência (ROUQUAYROL; ALMEIDA FILHO, 2003).

3.2 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (Hemope) sob o processo de número 046/06. Todos os indivíduos envolvidos nesta pesquisa foram orientados sobre a proposta do estudo de forma clara e, em caso de concordância com os procedimentos a serem realizados, assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice I), autorizando sua inclusão no estudo e facultando o uso dos dados cadastrais e do material biológico coletado como informação para publicação e divulgação científica.

3.3 Critérios de inclusão e exclusão

Para aplicar os critérios de inclusão e exclusão, um questionário foi elaborado (Apêndice II) e entregue ao indivíduo antes da coleta do material biológico.

3.3.1 Critério de Inclusão:

- Os indivíduos incluídos nesta pesquisa foram de ambos os sexos e saudáveis.

3.3.2 Critério de Exclusão

- Caso de recusa do indivíduo quanto à participação nesta pesquisa.
- Indivíduos que tenham sido submetidos a tratamento radioterápico e/ou quimioterápico nos últimos dois anos.
- Circunstâncias materiais ou logísticas que tornem impossível o desenrolar normal da investigação.

3.4 Coleta e registro do material biológico

A assepsia do local da punção venosa foi realizada com álcool a 70 % e com as devidas precauções de biossegurança que envolvem tal procedimento, foram coletados 50 mL de sangue periférico humano utilizando sistema à vácuo em tubos contendo heparina sódica (Labor Vacuum).

Para preservar a identidade dos indivíduos, todas as amostras foram codificadas com as iniciais dos nomes e anotadas em livro de registro com o dia da coleta.

3.5 Estudo preliminar para definição de parâmetros de análise

Inicialmente foram coletadas amostras de sangue periférico de 2 indivíduos (um do sexo masculino e o outro do sexo feminino) para avaliar a concentração mais adequada dos mitogénos e o melhor tempo de cultura para estimular a proliferação de linfócitos do sangue periférico humano não irradiados.

A melhor concentração de mitógeno para a indução da resposta proliferativa de linfócitos foi utilizada para estimular células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) não-irradiadas e irradiadas com doses de 0,5; 1; 2 e 4 Gy.

3.5.1 Obtenção das células mononucleares

As amsotras de sangue periférico foram colocadas sobre um gradiente de densidade, Ficoll Paque-Plus, (GE Healthcare, Bio-Sciences AB) na proporção 1:2. Os tubos foram centrifugados a 400 x g durante 35 minutos para obtenção das PBMC.

As PBMCs foram transferidas para um tubo de fundo cônico de 15 mL para os procedimentos de lavagens. A estas células, foi adicionado PBS (solução salina tamponada com fosfato pH 7,2-7,4) na proporção 1:2. Os tubos foram centrifugados a 100 x g durante 10 minutos. Este procedimento foi realizado por 2 vezes.

Após a centrifugação foram retirados os sobrenadantes e, aos pellets de células, foi adicionado 1 mL de meio de cultura RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) contendo 1 0% de soro fetal bovino, 300 mg/mL de L-glutamina, 50 mg/L de sulfato de gentamicina e 2 mg/L de anfotericina B (Cultilab, Brasil).

A Figura 9 apresenta, esquematicamente, todas as etapas para obtenção da camada de células mononucleares (PBMC), desde a adição do sangue periférico sobre o gradiente de densidade (Ficoll-Paque Plus), centrifugação, obtenção do anel do PBMC e do pellet celular.

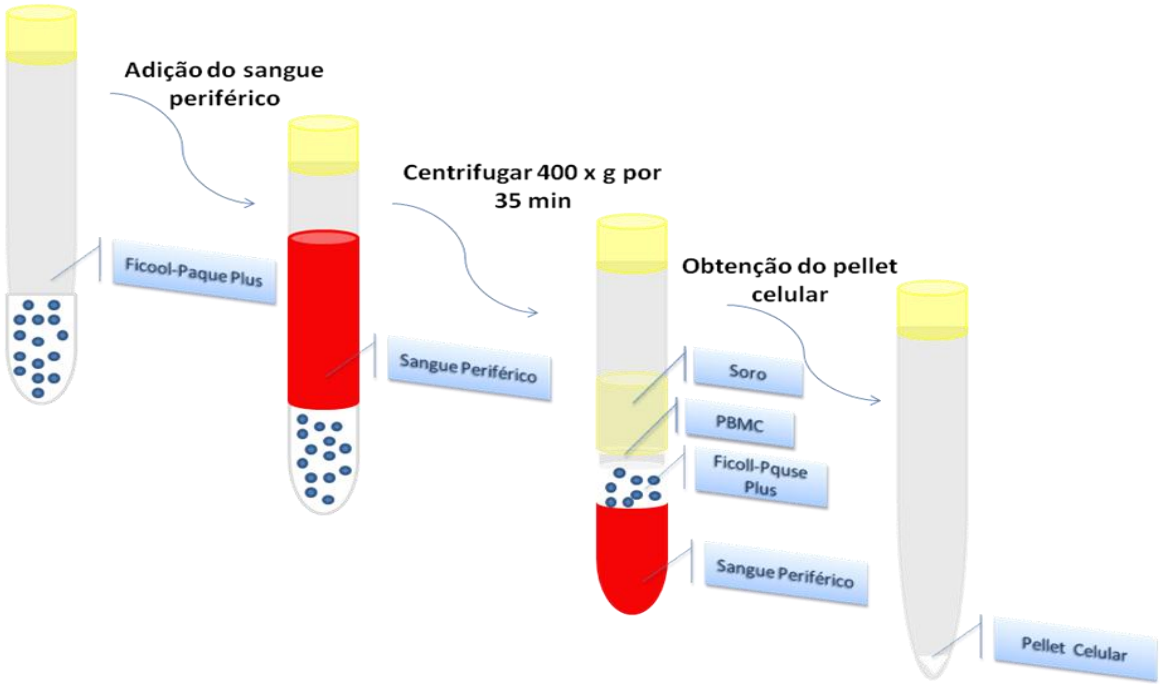


Figura 9 – Procedimento para obtenção da PBMCs

3.5.2 Ajuste da concentração celular

A realização do ajuste da concentração celular foi realizada utilizando-se a câmera de neubauer e microscopia óptica convencional, sendo a concentração ajustada para 2 x 10^6 células/mL de meio RMPI 1640 suplementado com 10 % de soro fetal bovino.

3.5.3 Ajuste das concentrações dos mitógenos

Para esta pesquisa, foram avaliados dois tipos de mitógenos:

- Fitohemaglutininia – Lectina retidada do Phaseolus vulgaris – PHA (Cultilab, Brasil) em uma concentração estoque de 5570 µg/mL. Este mitógeno estimula a proliferação da sub-população linfocitária T;

- Pokeweed – Lectina retirada do Phytolacca americana – PKW (Sigma-Aldrich, USA) em uma concentração estoque de 1000 µg/mL. Este estimula a proliferação das sub-populações linfocitárias T e B.

As concentrações dos mitógenos foram ajustadas em dobro de modo que, em 100 µL de cada mitógeno/poço, as concentrações finais chegassem a 2,5 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL na cultura celular. Para cada concentração e tipo de mitógeno, foram realizadas culturas celulares em triplicata em placa de 96 poços.

3.5.4 Cultura Celular

Foram utilizadas placas de cultura de 96 poços de fundo chato (TPP, Suíça). Em cada poço foram adicionados 2 x 10^5 células, ou seja, 100 µL da suspensão celular obtida no item 3.5.2 e 100 µL de cada concentração de mitógeno ajustadas no item 3.5.3. As células foram incubadas a 37 ºC em 5 % de CO_2 durante 6, 24, 48 e 72 horas.

Foram adicionados 20 µL (equivalente a 1 µCi) de timidina triciada ([methyl-3H] thymidine – Amersham Biosciences, Reino Unido) ao meio da cultura celular 6 horas antes do término de cada período de incubação. A proliferação celular foi avaliada por meio da quantificação da incorporação de timidina triciada ao DNA de PBMCs.

3.5.5 Quantificação da timidina triciada em PBMC

Após cada período de cultura, as células foram coletadas automaticamente por um coletor múltiplo (Skatron Isntruments Cell Harvester, UK) em papéis de filtro (cat. nº. 11731, Skatron, UK). Nos discos de papel de filtro contendo a radioatividade incorporada ao DNA celular foram adicionados 1,8 mL de líquido de cintilação EcoLumeTM (ICN) e a radiação incorporada foi determinada em contador de cintilação líquida (Liquid Scintillation Couter, 1209 Rackbeta, Pharmacia) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. O índice de proliferação celular foi dado em contagem por minuto (CPM).

Após o estabelecimento dos melhores tempos de cultura e da melhor concentração dos mitógenos, procedeu-se com a metodologia da citometria de fluxo para avaliar os níveis de expressão da proteína p53 em linfócitos de amostras de sangue periférico não irradiadas e irradiadas *in vitro*.

3.6 Especificações das condições de irradiação

As amostras foram irradiadas no Centro de Radioterapia de Pernambuco (CERAPE) numa fonte de cobalto-60 (Theratron 780 – Atomic Energy of Canadá Limited) onde a taxa de dose para irradiação das amostras no início da pesquisa era de 196,67 cGy/min.

Seringas contendo alíquotas de 10 mL de sangue periférico foram colocadas dentro de um bloco de Mix D ($\rho = 0,99$ g/cm^3), com campo de irradiação das amostras de 15 cm x 15 cm e 2,5 cm de profundidade.

A fonte irradiadora foi posicionada no centro do campo, de forma que o eixo passasse pelo centro da seringa, e a uma distância de 80 cm do bloco, para garantir, em conjunto com as dimensões do bloco, a homogeneidade da irradiação da amostra. As amostras foram submetidas a doses de 0,5; 1; 2 e 4 Gy. A Figura 10 apresenta o *set-up* do processo de irradiação das amostras.

As doses utilizadas nesta pesquisa foram baseadas nos valores típicos de dose empregados no planejamento dosimétrico, seja para o fracionamento de doses, seja para corpo inteiro (2 Gy) (HALL; GIACCIA, 2006).

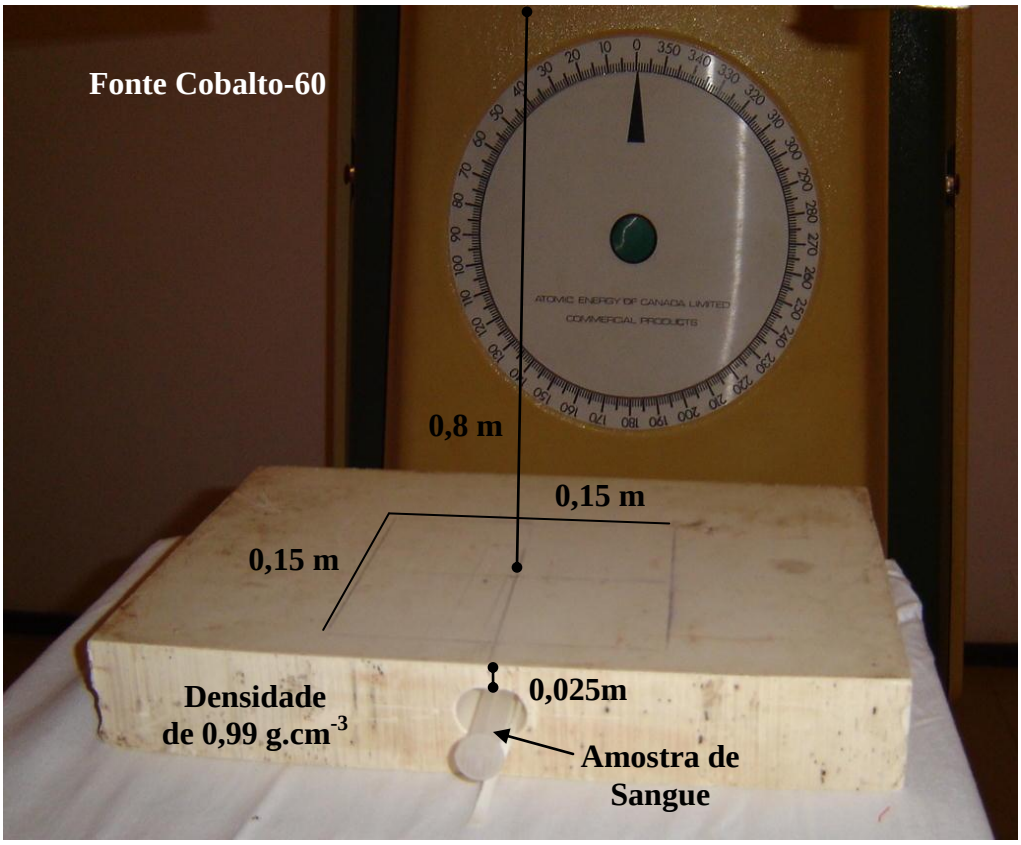


Figura 10 – Set-up da irradiação

Após a irradiação, as PBMCs foram obtidas e cultivadas de acordo com o procedimento descrito dos itens 3.5.1 a 3.5.4. As células irradiadas e não irradiadas foram incubadas em placas de culturas e para cada amostra foram feitas culturas em triplicatas.

3.7 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada no início das culturas e após 72 horas de cultivo. Para tal, foi utilizado o corante azul de trypan 0,4 % (Sigma-Aldrich, USA) na diluição de 1:10 (1 parte de células: 9 partes do corante). O número de células viáveis e não viáveis foi determinado pelo microscópio óptico utilizando-se uma câmera de neubauer. Foram consideradas viáveis as células não coradas, ou seja, as que excluíram o corante.

A viabilidade foi calculada utilizando-se o seguinte cálculo: (%) Viabilidade celular = número total de células viáveis (não coradas) X 100 / células totais (células viáveis e não viáveis). As analises foram realizadas em triplicata.

3.8 Citometria de Fluxo

A escolha da técnica para avaliação dos níveis de expressão da proteína p53 é de grande importância no que diz respeito a sua sensibilidade, reprodutibilidade, tempo de execução e análise de dados. Esta pesquisa baseou-se no trabalho de Cavalcanti Júnior e colaboradores (2003), onde os níveis de expressão da proteína p53 foram avaliados a partir de células leucemias utilizando três metodologias e, dentre elas, a citometria de fluxo se mostrou a mais adequada apesar do western blot ser classicamente referido como padrão ouro na pesquisa da p53. De acordo com estes autores, o westen blot e a imunocitoquímica são métodos qualitativos, de baixa sensibilidade e suas aplicabilidades na rotina laboratorial devem ser discutidas em função do longo tempo para obtenção dos resultados quando comparadas a citometria de fluxo.

Foram avaliadas 690 amostras de sangue periférico de 23 indivíduos sadios sendo, 11 do sexo feminino, com idade entre 19 e 42 anos, e 12 do sexo masculino, com idade entre 22 e 36 anos.

As amostras que foram irradiadas seguiram o mesmo protocolo descrito nos itens 3.6 e 3.6.1 e as PBMCs foram obtidas, cultivadas e incubadas de acordo com o procedimento descrito dos itens 3.5.1 a 3.5.4.

Para cada amostra foram cultivados poços em triplicatas. Os níveis de expressão da proteína p53 foram avaliados nas culturas celulares na presença e ausência de mitógeno após 6 e 72 horas de cultivo.

A cada 3 poços da placa de cultura (96 poços) foi realizado um pool de células, que foram colocadas em tubos específicos do citômetro de fluxo. Os tubos foram centrifugados a 300 x g durante 5 minutos, descartando-se o sobrenadante e procedendo-se com a

lavagem das células para retirar os resíduos da cultura celular. Para tal, foram adicionados 2 mL de meio RPMI 1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil).

Após o período de incubação, as amostras foram lavadas duas vezes em PBS 0,5 % de Tween-20 a 400 x g durante 5 min. Após o descarte do sobrenadante, as células foram fixadas com 500 μL de paraformaldeído a 1 % em PBS.

As leituras e análises foram realizadas em citômetro de fluxo FACScalibur, do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, com laser de 488 nm. O software utilizado para o tratamento dos dados foi o *Cell Quest pro* (Becton Dickinson immunocytometry systems, USA). Após o ajuste dos detectores do citômetro, a intensidade fluorescente de 50.000 eventos de cada amostra foi adquirida.

3.9 Análise estatística

Nesta pesquisa foi realizada a estatística descritiva utilizando a média, erro padrão, e análise da variância (ANOVA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Definição da concentração de mitógenos e dos tempos de cultivo celular

A princípio, foram avaliadas amostras de sangue de 2 indivíduos não fumantes, sendo 1 do sexo masculino (23 anos) e outro do sexo feminino (25 anos), identificados como indivíduo A e B, respectivamente, no intuito de estabelecer a concentração ideal de cada mitógeno (fitohemaglutinina e pokeweed), bem como o tempo de cultivo celular a serem utilizados.

Na Figura 11, os gráficos I e II ilustram as médias das respostas proliferativas em cpm (contagem por minuto) das PBMCs dos indivíduos A e B, respectivamente, não irradiadas e cultivadas na presença da fitohemaglutinina (PHA), nas concentrações de 2,5; 5 e 10 μg/mL, durante 6, 24, 48 e 72 horas de cultivo celular.

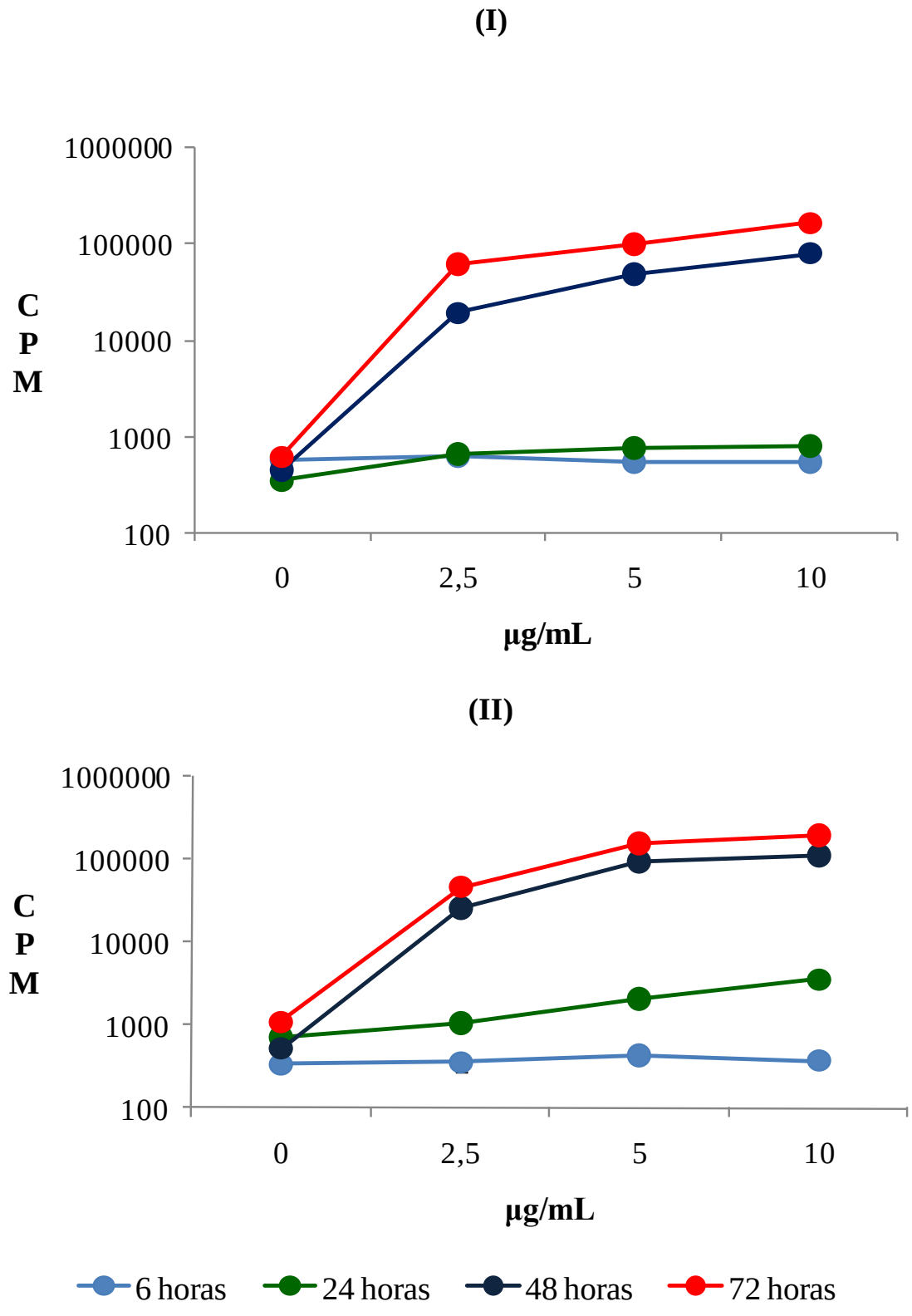


Figura 11 – Proliferação celular de PBMCs não irradiadas e cultivadas em diferentes concentrações de fitohemaglutinina em distintos intervalos de cultivo celular

A aplicação da análise da variância (ANOVA) nas concentrações de fitohemaglutinina constatou diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) para os diferentes intervalos de tempo de cultivo celular. Para todas as concentrações avaliadas de fitohemaglutinina, verificou-se que as culturas celulares de 72 horas proporcionaram maiores índices de proliferação celular. Já o índice de incorporação da [^{3}H] timidina pelo DNA obteve seu valor mínimo para o tempo de cultivo de 6 horas para as amostras dos indivíduos A e B (Apêndices III, IV, VI e VII).

Apesar do mecanismo de ação da fitohemaglutinina ainda não ser bem estabelecido, esses resultados estão de acordo com so dados da literatura que afirma que a PHA é um mitógeno que possui a capacidade de estimular os linfócitos T a entrarem em mitose entre 48 e 72 horas de cultivo celular (PEAKMAN; VERGANI, 1999; RICHMAN D. P., 1980).

Neste sentido, Vilasová e colaboradores (2008) avaliaram a proliferação celular de PBMCs irradiadas quando na presença e na ausência da fitohemaglutinina, tendo observado que 0,7 % das PBMCs, quando não estimuladas, encontravam-se na fase do ciclo celular S. Portanto, estas células não expressavam o antígeno de ativação, o CD25. No entanto, ao serem estimuladas com 10 μg/mL da PHA, após 72 horas de cultivo celular, os linfócitos-T foram ativados ocorrendo uma indução de CD25 na maioria das células. O conteúdo de DNA analisado revelou um aumento na percentagem de células na fase S, com no máximo 48 horas após o início da estimulação, onde 12,2 % das células estavam na fase S (VILASOVÁ et. al., 2008).

Em se tratando da concentração da PHA mais adequada, os índices de proliferação celulares mais elevados foram alcançados na concentração de 10 μg/mL, em todos os tempos de cultivo, exceto em 6 horas. Por outro lado, devido ao comportamento ascendente da curva de proliferação celular, para concentração de 10 μg/mL da PHA, surgiu a necessidade de avaliar se esta tendência continuaria para concentrações superiores deste mitógeno. Neste sentido, analisou-se a proliferação celular em culturas com duas concentrações de PHA: 20 e 40 μg/mL.

Na Figura 12, curvas reproduzem a evolução das médias obtidas da proliferação celular a partir de amostras do indivíduo B, utilizando-se a PHA nas concentrações de 2,5;

5; 10, mais os resultados com culturas contendo 20 e 40 µg/mL, após os tempos de cultura 6; 24; 48 e 72 horas.

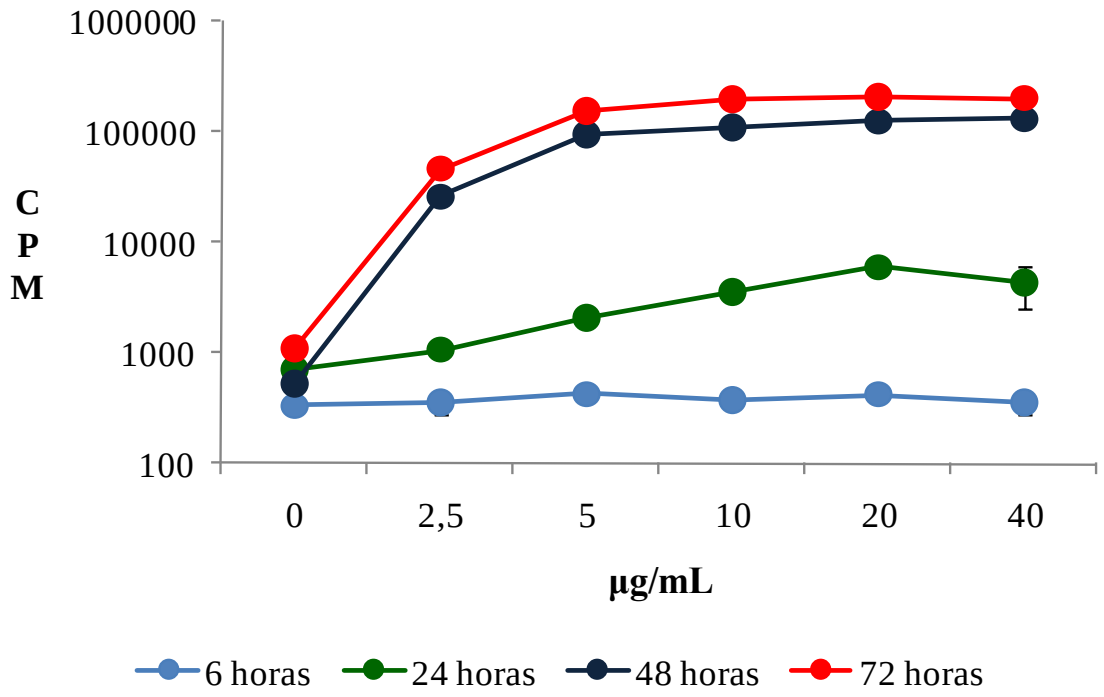


Figura 12 – Proliferação de PBMCs do indivíduo B, não irradiadas, estimuladas com diferentes concentrações de fitohemalgutinina e distintos intervalos de cultivo celular

Analisando as curvas obtidas do gráfico acima, observa-se que não houve um aumento estatisticamente significativo da proliferação celular com concentrações de PHA superior a 10 µg/mL ($p < 0,05$). Em alguns casos, como nas culturas estimuladas com 40 µg/mL, houve uma diminuição da proliferação celular. Isso provavelmente ocorreu devido a uma saturação da ativação celular (Apêndice IV e V). Esses resultados consolidaram a opção pela utilização da concentração de 10 µg/mL de PHA, no sentido de se obter um elevado índice de proliferação celular (Apêndices VI e VII). A Figura 13 apresenta os gráficos I e II onde é possível verificar os valores médios da proliferação celular dos indivíduos A e B, respectivamente, não irradiadas e cultivadas na presença do mitógeno pokeweed (PKW) em diferentes concentrações (2,5; 5 e 10 µg/mL) durante 6, 24, 48 e 72 horas.

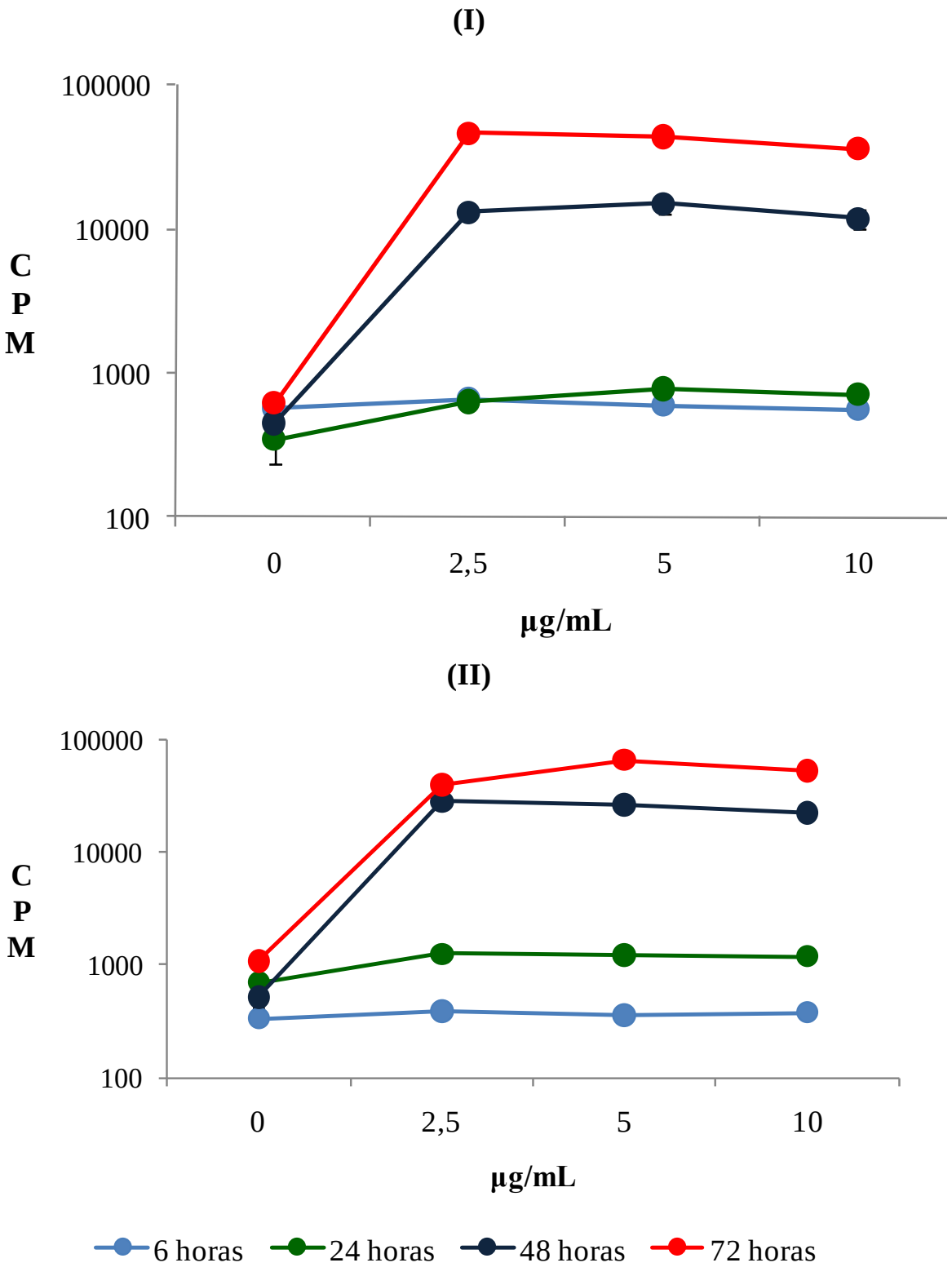


Figura 13 – Proliferação de PBMCs, não irradiadas e estimuladas com diferentes concentrações de pokeweed durante distintos intervalos de cultivo celular

A partir dos gráficos da Figura 13, é possível inferir que o tempo de cultura onde se obteve o maior índice de proliferação celular foi o de 72 horas para todas as concentrações de PKW avaliadas. Por outro lado, o tempo de cultivo onde se obteve o menor índice de proliferação celular foi de 6 horas (Apêndices III, V, VI e VIII).

Em se tratando da concentração do PKW mais adequada, ou seja, a que proporcionou um maior índice de proliferação celular, é possível verificar um aumento da incorporação da [^{3}H] timidina ao DNA utilizando-se a concentração de 5 μg/mL, para o indivíduo A nos tempo de cultura de 24 e 48 horas. Já nos tempos de 6 e 72 horas a proliferação celular teve uma pequena queda quando comparada com a concentração de 2,5 μg/mL. Para o indivíduo B, a concentração de 5 μg/mL proporcionou um aumento da proliferação celular no tempo de 72 horas. Nos tempos de 6, 24 e 48 horas ocorreu uma diminuição, porém não estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Com a concentração de 10 μg/mL, para ambos os indivíduos, ocorreu uma saturação. Logo, a concentração do PKW escolhida foi a de 5 μg/mL.

Diante dos resultados acima, optou-se em se trabalhar com o tempo de cultura que forneceu o maior índice de proliferação celular, ou seja, o tempo de cultivo celular de 72 horas. Já as concentrações dos mitógenos escolhidas foram baseadas nas que proporcionaram um resultado adequado de forma a garantir uma boa proliferação celular sem causar toxicidade para as células. Sendo assim, as concentrações escolhidas foram a de 10 μg/mL para PHA e a de 5 μg/mL para PKW.

Uma vez estabelecidos esses parâmetros, procedeu-se com a avaliação dos mesmos em células irradiadas, no intuito de se averiguar o comportamento da proliferação celular em células dos mesmos indivíduos (A e B) quando irradiadas.

4.2 Comportamento da proliferação de células irradiadas

Na Figura 14, os gráficos I e II, apresentam os resultados das médias da proliferação celular dos indivíduos A e B, respectivamente. Para tal, foram utilizadas

células irradiadas e não irradiadas cultivadas na ausência e na presença de 10 µg/mL da fitohemaglutinina (PHA10) durante o intervalo de tempo de 72 horas.

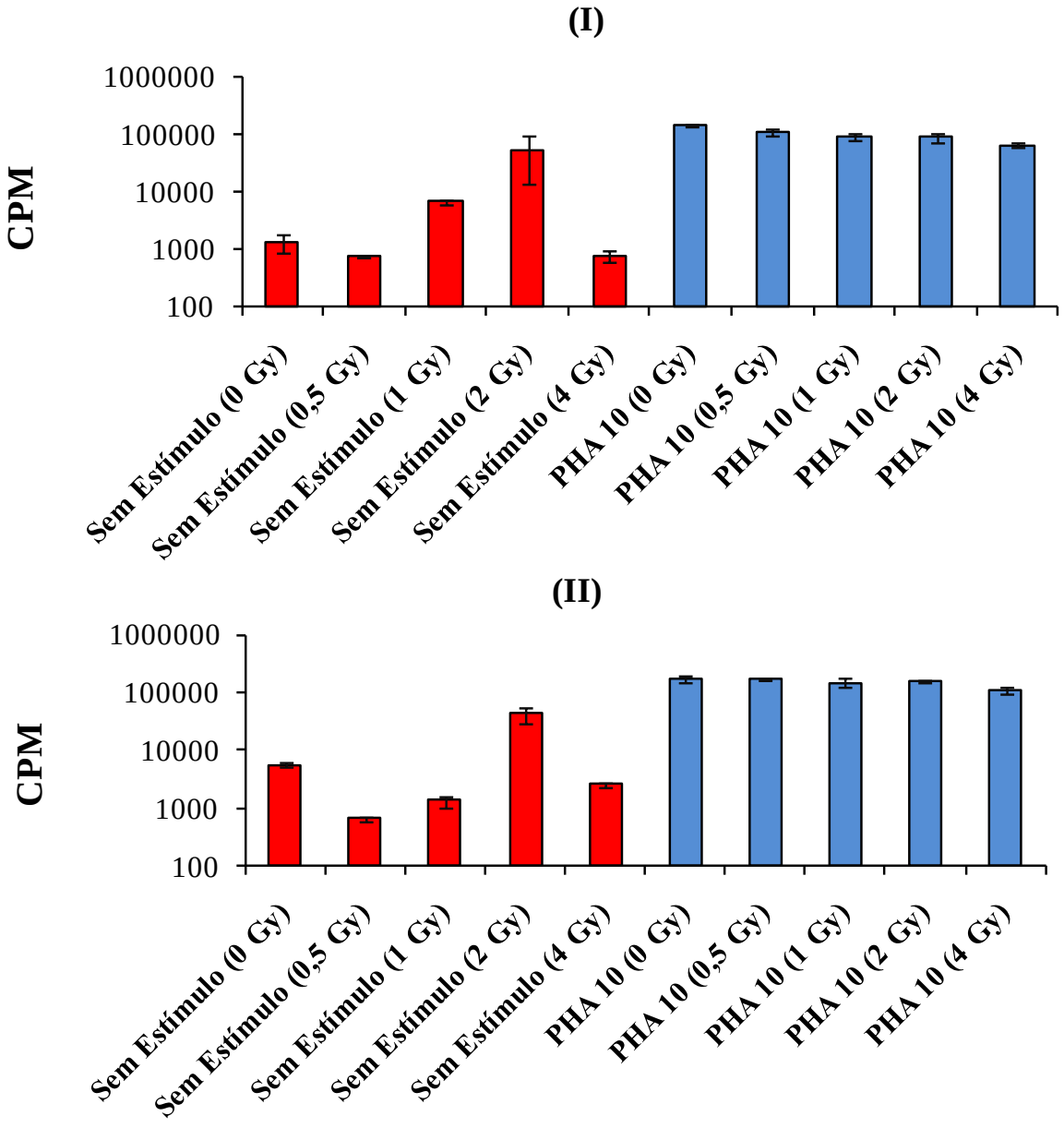


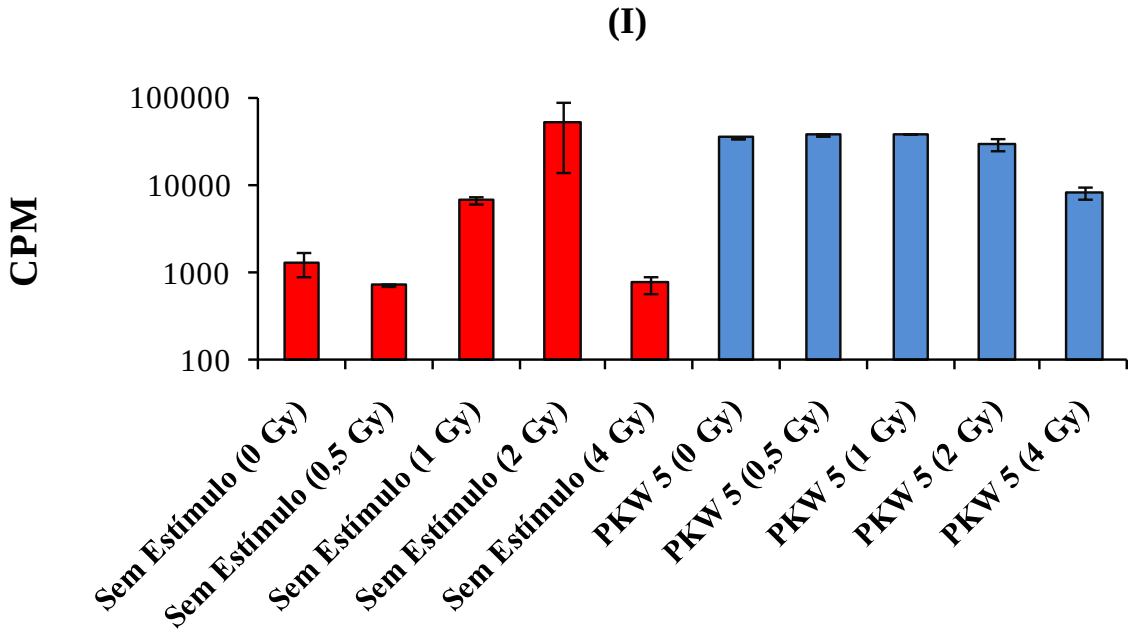
Figura 14 – Proliferação de células não irradiadas e irradiadas com 0,5; 1; 2 e 4 Gy, não estimuladas e estimuladas com 10 µg/mL de PHA após 72 horas de cultivo

Nos gráficos na Figura 14 é possível verificar uma correlação entre proliferação celular, dose de radiação e presença da fitohemaglutinina. Neste caso, observa-se um

aumento da proliferação celular nas células estimuladas com a PHA, quando se compara com as células não estimuladas. No entanto, nas amostras estimuladas, de ambos os indivíduos, nota-se uma diminuição da proliferação celular a partir da dose de 1 Gy nas culturas de 72 horas de cultivo (Apêndices IX, X, XI e XII).

Segundo Waselenko e colaboradores (2004) a síndrome hematopoiética poderá ser observada em indivíduos que tiveram exposições com dose acima de 1 Gy. No entanto, para esta dose, os indivíduos raramente irão apresentar manifestações clínicas relevantes. A atividade mitótica dos progenitores hematopoiéticos torna-se limitada após uma dose de radiação de corpo inteiro, maior que 2 a 3 Gy (WESELENKO et. al., 2004). A linfopenia comumente ocorre antes do início de outras citopenias. Um declínio de 50 % da contagem absoluta dos linfócitos ocorre dentro das primeiras 24 horas após a exposição, seguido por um declínio mais acentuado dentro de 48 horas, caracterizada por uma exposição letal, ou seja, dose acima de 7 Gy (WASELENKO, et al., 2004).

Figura 15, os gráficos I e II apresentam os resultados das médias das proliferações das PBMCs (em CPM) obtidas de amostras de sangue periférico dos indivíduos A e B, respectivamente. As amostras não irradiadas (0 Gy) e irradiadas (0,5; 1; 2 e 4 Gy), cultivadas na ausência e presença de pokeweed (PKW - 5 μg/mL) durante 72 horas.



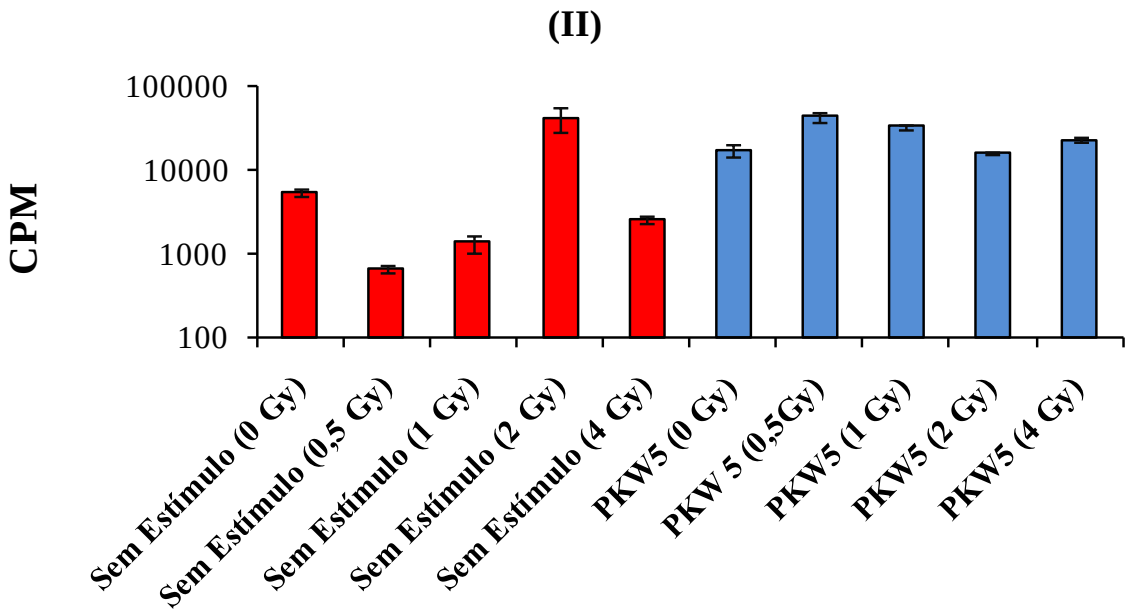


Figura 15 – Proliferação de células não e irradiadas com 0,5; 1; 2 e 4 Gy, não estimuladas e estimuladas com 5 μg/mL de PKW após 72 horas de cultivo.

Nos gráficos da Figura acima, observa-se um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) entre as médias da proliferação celular na presença de PKW e das sem estímulos. Percebe-se que as células de ambos os indivíduos, A e B, quando irradiadas com a dose de 2 Gy e incubadas por 72 horas sem estímulos obtiveram um aumento da proliferação celular estatisticamente significativo ($p < 0,05$) quanto comparado as amostras não irradiadas (Apêndices IX, X, XI e XII).

Estudos demonstraram a indução deste fenômeno em células do sistema imunológico humano (PREKEGES, 2003). Hashimoto e colaboradores (1999) observaram um aumento de linfócitos em células tumorais, de ratos, após a irradiação com dose de 2 Gy. Portanto, a dose de 2 Gy, mesmo não sendo considerada dose baixa, pode ter induzido a proliferação das PBMCs como uma resposta adaptativa (HASHIMOTO et al., 1999).

No entanto, se faz necessário a realização de um estudo, com um número maior de amostras, no intuito se averiguar a influência da radiação na resposta da proliferação de PBMCs cultivadas sem presença de estímulo mitótico.

Após a obtenção desses resultados procedeu-se com a avaliação dos níveis de expressão da proteína p53 após a exposição, *in vitro*, a diferentes doses de radiação e em diferentes protocolos de estimulação celular.

4.3 Níveis de expressão da proteína p53

Os resultados individuais, bem como aos valores médios e o erros padrões, dos níveis de expressão da proteína p53 das PBMCs cultivadas durante 6 horas estão dipostos no Apêndice XIII. Por outro lado, os níveis de p53 das PBMCs cultivadas durante 72 horas serão apresentados a seguir.

A Tabela 2 apresenta os dados de 23 indivíduos, de diferentes sexos, raça e idades, obtidas a partir do questionário empregado antes da realização da coleta do sangue periférico para a quantificação dos níveis de expressão da proteína p53.

Tabela 2. Perfil dos doadores que participaram da pesquisa

Indivíduos	Sexo	Idade	Raça	Consumo de bebida alcoólica	Fumante	Apresenta algum tipo de doença	Tratamento ou Medicação
I	M	22	B	N	N	N	N
II	M	29	B	S	N	N	N
III	M	26	P	N	N	N	N
IV	M	23	B	N	N	N	N
V	M	28	B	S	S	N	N
VI	M	36	B	S	S	N	N
VII	M	24	B	N	N	N	N
VIII	M	33	P	S	N	N	N
IX	M	36	B	N	N	N	N
X	M	27	B	N	N	N	N
XI	M	25	B	N	N	N	S
XII	F	27	P	N	N	N	N
XIII	F	29	B	N	N	N	N

XIV	F	19	B	N	N	N	S
XV	F	25	B	N	N	N	N
XVI	F	26	P	N	N	N	N
XVII	F	33	B	N	N	N	N
XVIII	F	34	B	N	N	N	N
XIX	F	23	B	N	N	N	S
XX	F	42	P	N	N	N	S
XXI	F	25	B	N	N	N	N
XXII	M	29	B	S	S	N	N
XXIII	F	21	B	N	N	N	N

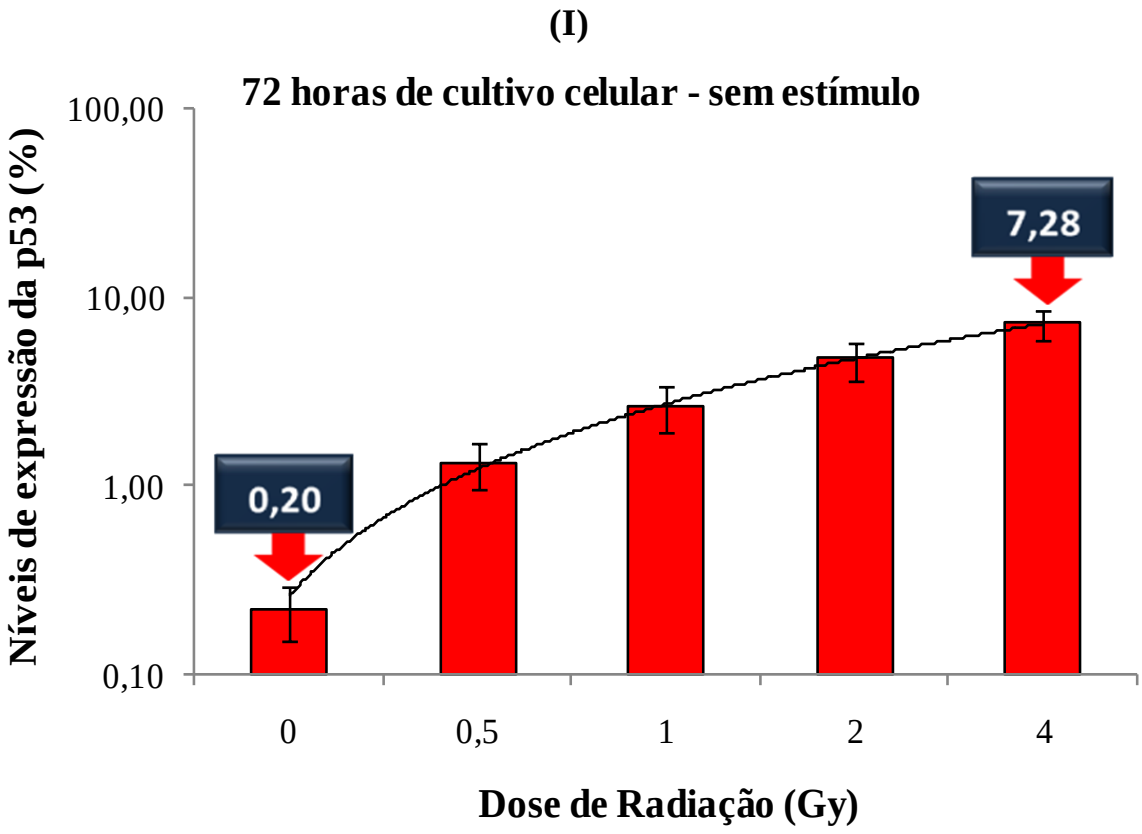
F = Feminino
M = Masculino
B = Branco
P = Pardo
S = Sim
N = Não

Conforme apresentado na tabela 2, foram avaliadas amostras de 11 indivíduos do sexo feminino (idades entre 19 – 42 anos) e 12 do sexo masculino (idades entre 22 – 36 anos), sendo 18 considerados branco e 5 pardos, estando os mesmos, aparentemente, saudáveis. Apenas um indivíduo (indivíduo XX) estava fazendo tratamento (Auto imunoterapia) no momento da coleta. Enquanto que, dois (indivíduos XI, XVI) já tiveram contato com algum tipo de agrotóxico, dois (indivíduos XIV e XIX) estavam fazendo uso diário de anticoncepcional e um estava utilizando finastenida (indivíduo XI), cinco (indivíduos II, V, VI, VIII e XXII) consumiram bebida alcoólica até 4 dias antes da coleta e três (indivíduos V, VI e XXII) eram fumantes.

Alguns trabalhos relatam que os níveis de expressão da proteína p53 podem ser modificados quando a célula é exposta a algum tipo de agente genotóxico (KOMAROVA et al., 2000;. CASTAÑEDA et al., 2007). Todavia, Franceschi e colaboradores (2006) concluíram em seu trabalho que não há uma associação entre alterações dos níveis de expressão da proteína p53 e o tabagismo ou o consumo de álcool. Além disto, Schneider e colaboradores (1999) já haviam verificado a não existência de correlação entre níveis de p53 com o hábito de fumar ou com a idade.

Seguido ao relato dos dados correspondentes a cada indivíduo estudado, serão apresentados os resultados dos níveis médios de expressão da proteína p53 nas amostras dos 21 indivíduos (I a XXI). Posteriormente, são apresentados os resultados dos indivíduos XXII e XXIII, uma vez que estes apresentaram níveis de expressão da proteína p53 considerados como *outlier*[*].

A Figura 16 apresenta gráficos os resultados das médias relativas aos níveis de expressão da proteína p53 obtidas de amostras de sangue periférico de 21 indivíduos, cultivadas durante 72 horas após a irradiação com doses de 0,5, 1, 2 e 4 Gy. No gráfico I são apresentadas as médias dos níveis de expressão da p53 a partir de células cultivadas sem mitógeno, enquanto os gráficos II e III agrupam os resultados das células cultivadas com fitohemaglutinina e pokeweed, respectivamente. Para todos os casos, o valor 0 (zero) corresponde ao grupo controle, ou seja, células não irradiadas.



[*] *Outliers* podem ser definidos como valores anômalos, quando comparado com os valores experimentalmente esperados em termos de normalidade.

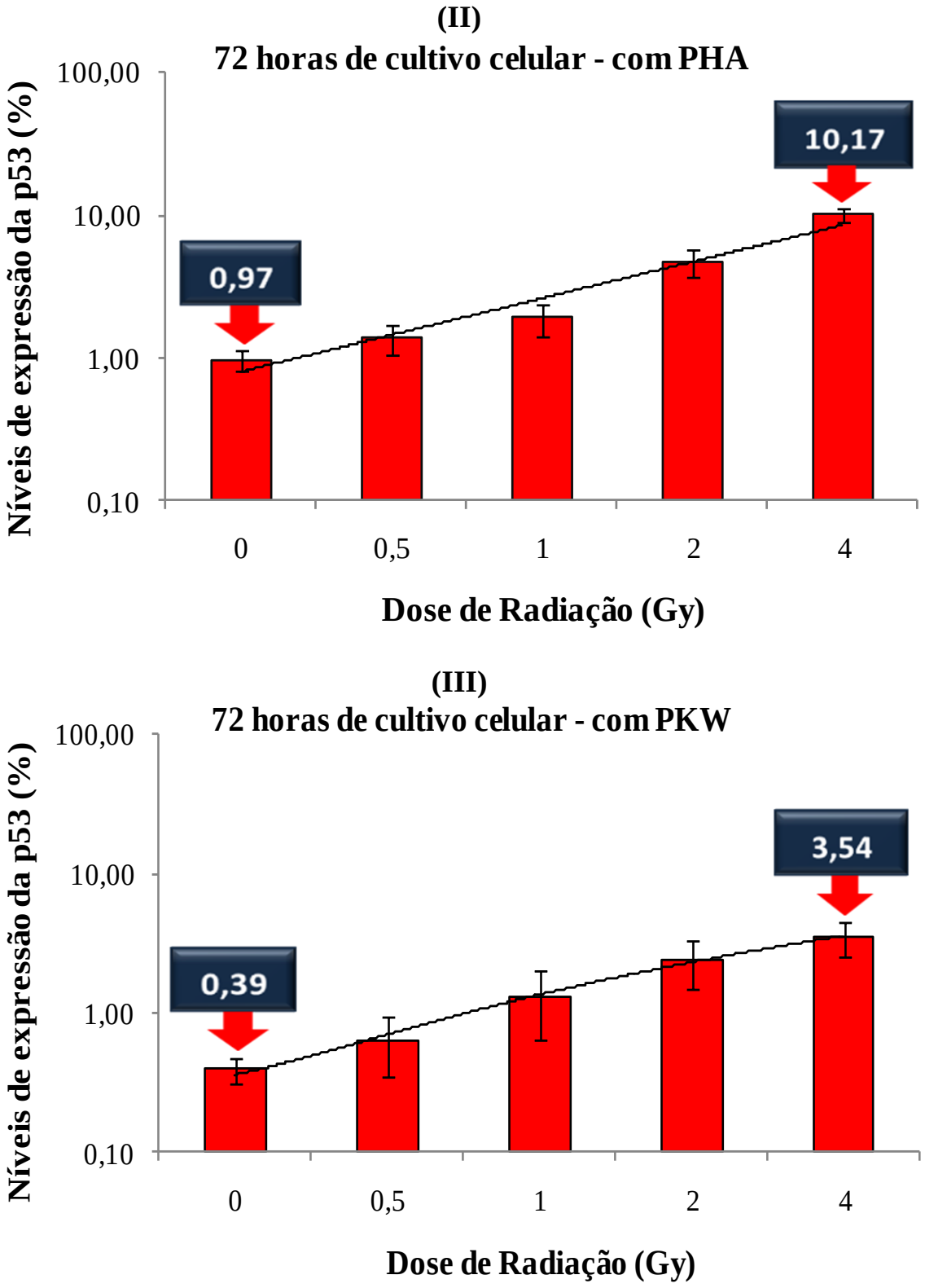


Figura 16 – Níveis de expressão da proteína p53 em células cultivadas por 72 horas

Esses resultados estão de acordo com o trabalho de Levine (1997), o qual afirma que diferentes tipos de danos na molécula do DNA podem ativar a proteína p53, incluindo a quebra da dupla fita do DNA ocasionada pela exposição da célula às RIs, conduzindo a um aumento dos níveis de expressão da proteína p53. Esta variação é proporcional a extensão do dano do DNA, que está diretamente associado à dose absorvida pelo meio.

A aplicação da análise da variância (ANOVA) na comparação dos níveis de expressão da proteína p53, para as doses empregadas nesta pesquisa, constatou diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$), em células cultivadas durante 72 horas tanto na presença quanto na ausência de mitógenos (Apêndice IX).

Trabalhos de Rössner e colaboradores (2004) estudaram alterações nos níveis expressão da proteína p53 em amostras de plasma e linfócitos sanguíneos de trabalhadores de usinas nucleares, comparando-as com amostras de indivíduos não expostos (grupo controle), constatando aumento de níveis de expressão da p53 apenas em linfócitos do grupo de trabalhadores ocupacionalmente expostos às radiações.

Investigando o comportamento da p53 em casos de exposição individual às RIs, Cavalcanti e colaboradores (2008) e Vilasová e colaboradores (2008) avaliaram os níveis de expressão desta proteína em células mononucleares humanas irradiadas in vitro, para diferentes doses, e observaram um aumento dos níveis de expressão protéica com a dose absorvida, sugerindo a quantificação da p53 como bioindicador de exposição à irradiação.

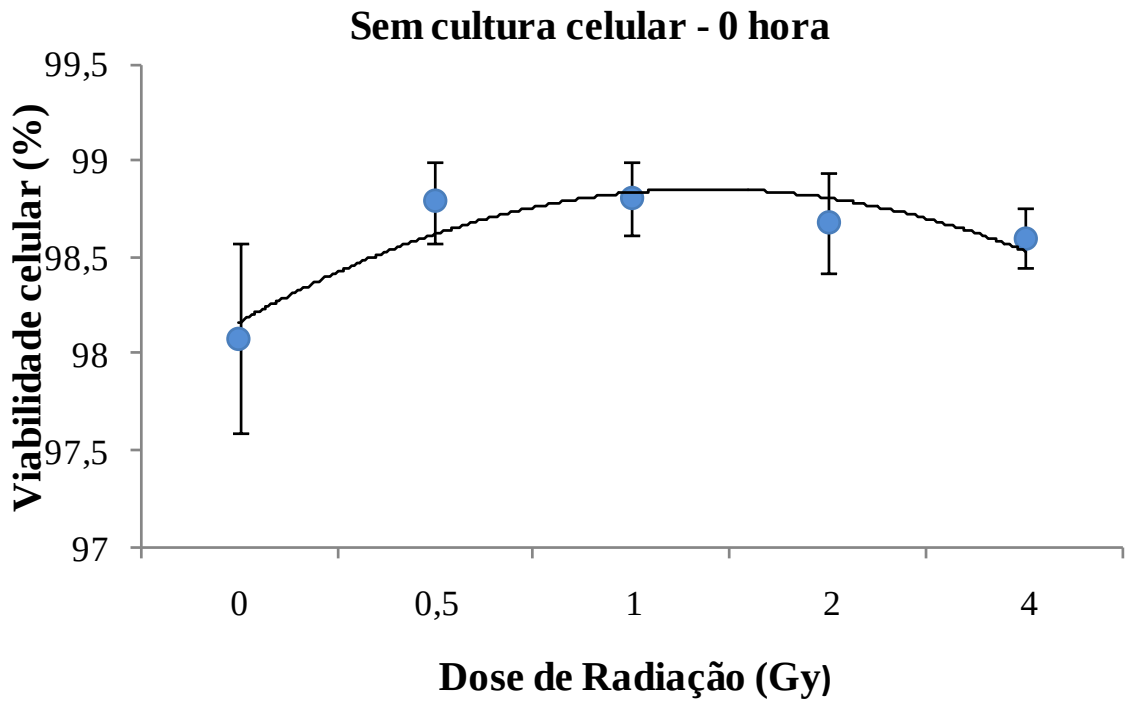
Por outro lado, os gráficos apresentados nas figuras 16 evidenciam que os níveis de respostas da expressão da proteína p53 variam de acordo com a presença e tipo de mitógeno empregado. Os resultados sintetizados nestes gráficos permitem notar um aumento dos níveis de expressão da p53 nas células irradiadas, independentemente da presença ou ausência de mitógenos. Todavia, as médias dos níveis de expressão da proteína p53 foram maiores para as células cultivadas com a fitohemaglutinina. A influência da PHA nos níveis de expressão da p53 foi avaliada recentemente por Vilasová e colaboradores (2008), utilizando a técnica de western blot, verificando um aumento desses níveis em cultura de PBMCs, contendo concentrações de 10 μg/mL de PHA, quando comparado cultura sem estímulo.

O aumento dos níveis de expressão da p53 após 72 horas de cultivo celular pode resultar no mecanismo de morte celular através da via apoptótica. Esta hipótese é corroborada pelo trabalho de Herteveldt e colaboradores (1997), que relata que a morte de linfócitos expostos, in vitro, à radiação gama ocorre preferencialmente por esta via, uma vez que esta proteína pode ativar genes importantes para ativação da apoptose (HALL; GIACCIA, 2006; BASSU:HALDAR, 1998).

No intuito de correlacionar os níveis de expressão da p53 nas amostras cultivadas por 72 h com a morte celular, optou-se por avaliar a viabilidade celular dessas amostras, tendo como controle a viabilidade das células sem cultivo.

4.4 Viabilidade celular

A Figura 17 apresenta os resultados das médias da viabilidade de células irradiadas com doses de 0,5; 1; 2 e 4 Gy sem cultivo celular (0 hora), e cultivadas durante 72 horas a 37 ^{0}C e 5 % de CO_2 na ausência de mitógenos. Para todos os casos, o valor de dose igual a zero representa amostras não irradiadas.



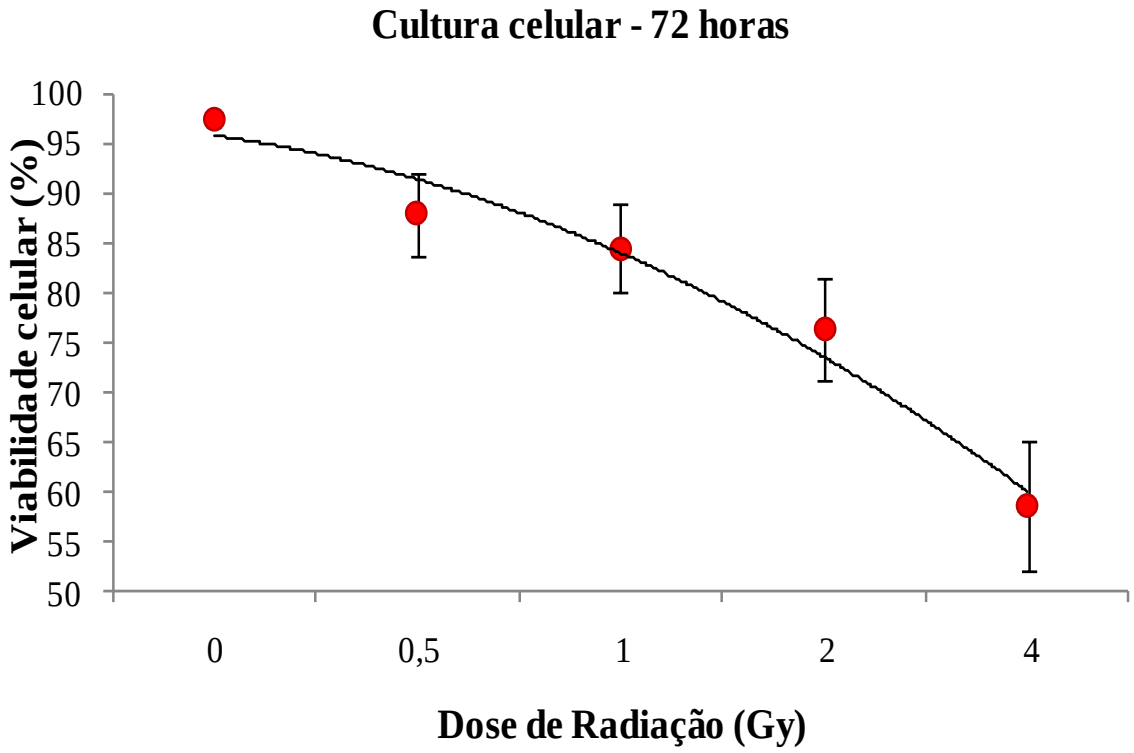


Figura 17 – Viabilidae celular

A aplicação da análise da variância (ANOVA) na comparação da viabilidade de células com o aumento da dose absorvida, para as doses empregadas nesta pesquisa, não constatou diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$), em amostras sem cultivo (0 hora) o que sugere que a morte celular não ocorre imediatamente após a exposição à radiação gama. Por outro lado, na comparação da viabilidade de células com o aumento da dose absorvida, constatou-se diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), em células cultivadas por 72 horas (Apêndice XV).

Estes resultados estão de acordo com Favaudon (2007) onde é afirmado que apoptose radioinduzida ocorre entre 6 e 72 horas após a exposição às RIs. Boreham e colaboradores (1996) reforçam esta hipótese e citam que a radiação ionizante induz apoptose nos linfócitos, e esta aumenta com o tempo até 72 horas após a exposição. Portanto, o declínio da média da viabilidade celular após a irradiação observada no gráfico II da Figura 18 ocorreu devido a morte celular, provavelmente, pela via apoptótica, já que esta é a modalidade de morte dominante dos linfócitos humanos irradiados (SEKI et al., 1995; SCHNARR e al., 2007).

O método utilizado para avaliar a viabilidade celular nesta pesquisa (azul de trypan), marca apenas as células que já estão mortas (necrose/apoptose). Com isso, além de não diferenciar células apoptóticas de necróticas, este método não é capaz de identificar as células que ainda estão em processos precoces induzida pela ativação (apopotse) (FISCHER et al., 2000).

Para confirmar se há células no processo de apoptose tardia é necessária a realização de outros métodos mais específicos como, por exemplo, a utilização do corante 7-amino-actinomicina (7-AAD) que se intercala entre a fita dupla dos ácidos nucléicos. O 7-AAD é excluído pelas células viáveis, porém, ele penetra a membrana das células mortas ou em apoptose, as quais podem ser diferenciadas por meio da citometria de fluxo de acordo com o tamanho celular. Outro marcador importante de apoptose é a anexina-V, uma proteína celular que se liga a moléculas de fosfatidilserina expressa na membrana de células na fase precoce de morte celular (SCHMID, et al., 1992; BERTHO et al., 2000). Embora esses marcadores não tenham sido objeto de estudo nesta pesquisa, sua importância motivou trabalhos, ora em andamento, no LAMBDA-UFPE no sentido de se avaliar a contribuição percentual desses dois tipos de morte celular em células irradiadas.

Estudos correlacionaram a resposta apoptótica da célula com a quantidade de p53 que a mesma pode acumular como conseqüência do dano radioinduzido, altos níveis de p53 mRNA podem ser detectados em células apoptóticas (ALSBEIH et al., 2004; GUDKOV et al., 2007; MURRAY- SMIJEWJKI et al., 2003). Portanto, serão expostos os resultados da viabilidade celular e dos níveis de expressão da proteína p53 obtidos de amostras irradiadas e cultivadas nas mesmas condições.

A Figura 18 apresenta os resultados das médias das viabilidades celulares e das médias dos níveis de expressão da proteína p53 das amostras irradiadas com doses de 0,5; 1; 2 e 4 Gy obtidas a partir de cultivos celulares de 72 horas sem a presença de mitógeno. Novamente, dose nula corresponde a amostras de células não irradiadas.

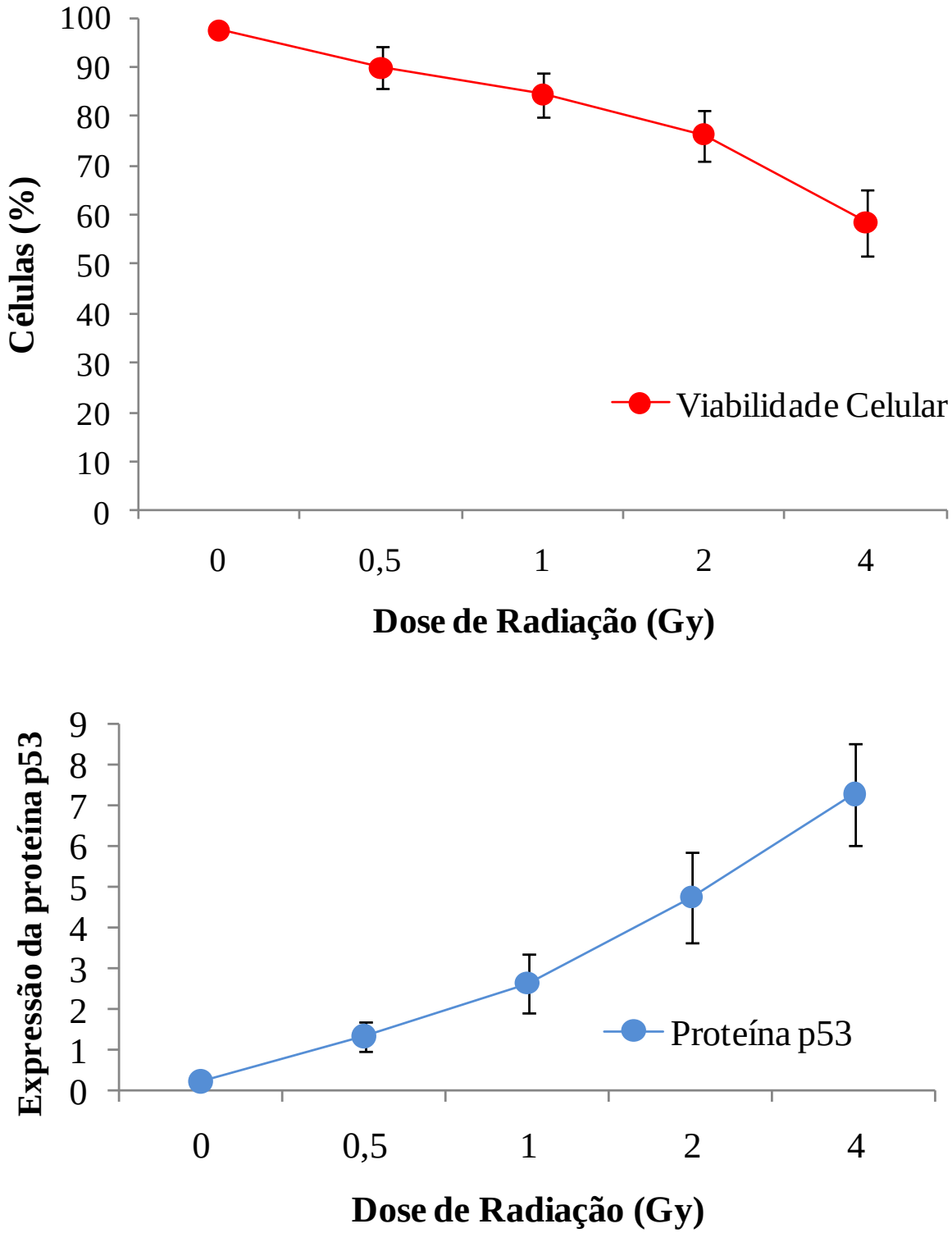


Figura 18 – Viabilidade de células irradiadas versus níveis de expressão da proteína p53

No gráfico da Figura 18 é possível verificar uma relação inversamente proporcional entre as médias da viabilidade celular com as médias dos níveis de expressão da proteína

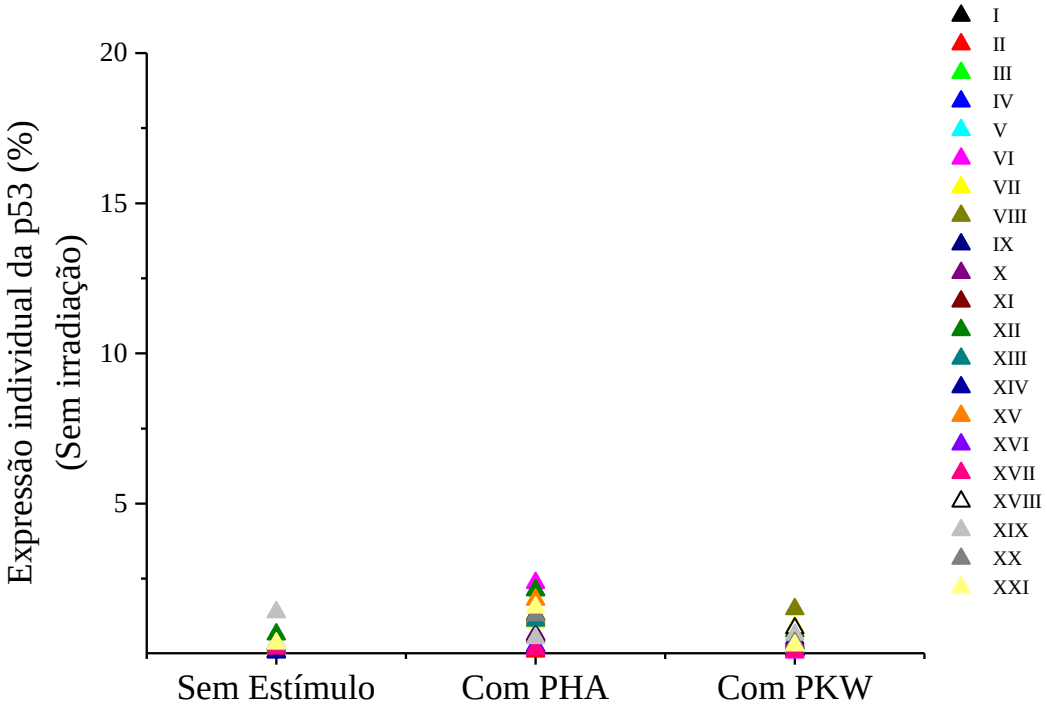
p53. Percebe-se que a média da viabilidade celular diminui a partir da dose de 0,5 Gy, enquanto que, para mesma dose de radiação, as médias dos níveis de expressão da proteína p53 aumentam.

Segundo Guerquin e colaboradores (2009), células irradiadas ativam uma rede de sinalizações complexa que conduz a parada do ciclo celular permitindo que as lesões sejam reparadas. No entanto, quando o dano é extenso, com baixa probabilidade de reparo, a apoptose é induzida pela célula, lembrando que a escolha entre a ativação da apoptose e o mecanismo de reparo do DNA é dada pela proteína p53. No entanto, a ausência da p53 tipo selvagem (*wild-type*) na célula pode retardar ou prevenir apoptose, sendo possível o aumento da sobrevivência celular. Entretanto, se isto ocorrer, aumenta o risco de mutação e instabilidade genética na célula (OLIVE; DURAND, 1997).

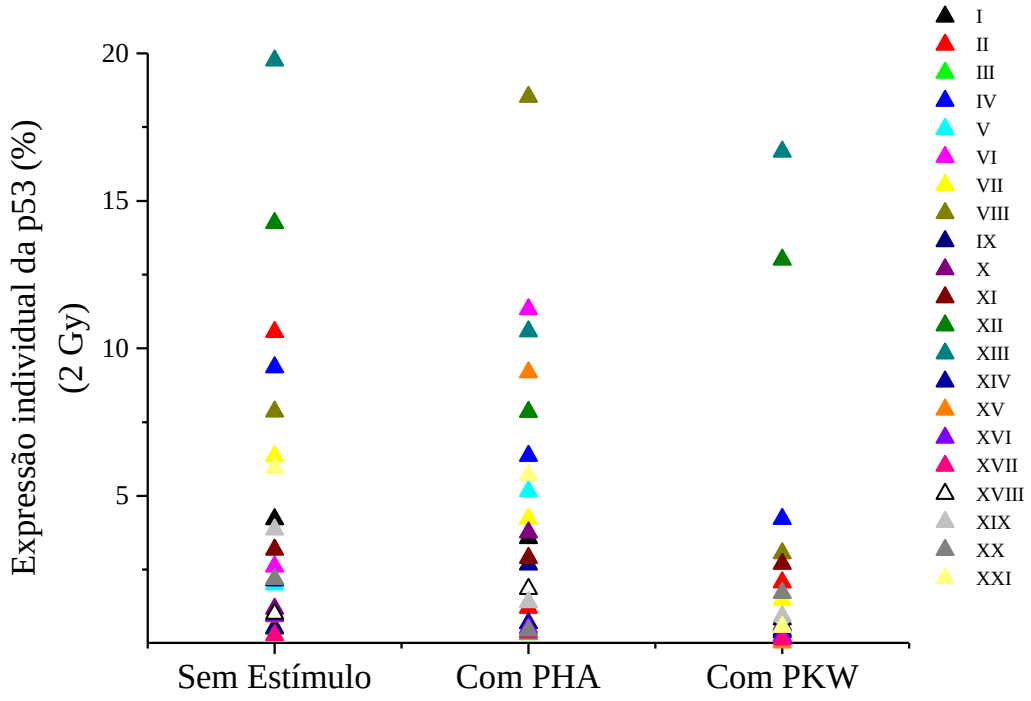
Estudos correlacionam o mecanismo da apoptose com a radiossensibilidade e a proteína p53 (OLIVE; DURAND, 1997; ROSS, 1999; PRISE et al., 2005) . De acordo com os estudos de Dainiak (2002), a proteína p53 é encontrada em altos níveis em tecidos radiossensíveis, como por exemplo, o tecido hematopoiético. Este fato também foi observado por MacCallum e colaboradores (1996), onde, ao estudarem a distribuição da proteína p53 em tecidos de rato, observaram que os tecidos radiossensíveis (baço, timo, medula óssea e intestino) expressavam altos níveis da proteína p53, enquanto que os tecidos radioresistentes (músculo esquelético e cérebro) apresentaram baixos níveis de expressão. Nesta pesquisa, as amostras dos indivíduos analisados apresentaram diferentes níveis de expressão da proteína p53, portanto, apresentaram diferentes comportamentos de respostas às radiação ionizante, provavelmente, devido aos diferentes graus de radiossensibilidade.

4.5 Níveis individuais de expressão da proteína p53

A Figura 19 apresenta os gráficos de A e B onde é possível verificar os resultados, representativos, dos níveis de expressão da proteína p53 em amostras de 21 indivíduos, não irradiadas e irradiadas com dose de 2 Gy, cultivadas por 72 horas na presença ou ausência de mitógenos.



(A)



(B)

Figura 19 – Dispersão dos níveis individuais de expressão da proteína p53 em cultura celular de 72 horas em duas situações: sem irradiação (A) e após irradiação com 2 Gy (B)

A partir dos gráficos da Figura 19 observa-se que, para a maioria dos indivíduos, os níveis de expressão da proteína p53 aumentam nas células irradiadas, apresentando grande variabilidade entre as amostras dos indivíduos avaliados. Este comportamento foi também observado nas células irradiadas com as doses de 0,5, 1 e 4 Gy (Apêndice XVI). A escolha da dose de 2 Gy para exemplificar a dispersão do resultados foi feita por ser esta dose de radiação um valor típico empregado em radioterapia com fracionamento dosimétrico (HALL; GIACCIA, 2006).

A variabilidade interindividual dos níveis de expressão da proteína p53 está relacionada aos fatores intrínsecos individuais, associados à radiossensibilidade. A influência da radiossensibilidade celular tem sido particularmente estudada para células tumorais, com objetivo de aperfeiçoar os tratamentos com radiação ionizante. Nestes casos, tem-se demonstrado que o aumento dos níveis de expressão da p53 está associado ao aumento da sensibilidade do tecido tumoral à irradiação (LOWE et. al., 1993; MCCURRACH e al., 1997; ALSNER et al., 2001; MOHIUDDIN et al., 2002).

Em estudos com animais, evidências da relação entre os níveis de expressão da p53 e a radiossensibilidade foram relatadas em trabalhos realizados por Lindsay e colaboradores (2007), onde foram observadas diferenças na expressão desta proteína em células intestinais de ratos irradiados, sendo constatado um prolongamento da atividade da proteína p53 e, consequentemente, um aumento dos níveis de expressão da p53 nos animais mais susceptíveis quando comparado com os mais resistentes à radiação (LINDSAY et al., 2007).

Nas pesquisas com diferentes linhagens de células tumorais humanas, Siles e colaboradores (1996) utilizaram a técnica de western blot para avaliar a presença da proteína p53 antes e após a exposição à radiação ionizante, constatando uma diferença entre os níveis desta proteína nas células irradiadas, além de sugerir a avaliação da p53 como teste de radiossensibilidade para alguns tipos de células tumorais.

De um modo geral, os trabalhos envolvendo avaliação da expressão da proteína p53 estão focalizadas na investigação de células cancerígenas. Entretanto, a característica invasiva dessas células e os tratamentos radioterapêuticos empregados evidenciam a

importância de se investigar a radiossensibilidade individual no sentido de se caracterizar a sensibilidade dos tecidos normais (sadios) para uma melhor definição dos planejamentos dosimétrico, objetivando, inclusive, a personalização da radioterapia.

Nesta pesquisa, a quantificação dos níveis de expressão da p53 foram avaliados em linfócitos de 23 indivíduos sadios, destes 2 indivíduos (XXII e XXIII) obtiveram níveis de expressão da proteína p53 muito elevados após irradiação, sendo portanto analisados separadamente.

A Tabela 3 apresenta os resultados dos níveis de expressão da proteína p53 dos indivíduos XXII e XXII quantificados a partir de células irradiadas com doses (0,5; 1; 2 e 4 Gy) cultivadas durante 72 horas na presença e na ausência de mitógeno.

Tabela 3. Níveis de expressão da proteína p53 das amostras dos indivíduos XXII e XIII cultivadas por 72 horas

	Níveis de expressão da p53 (%)														
	Dose de radiação (Gy)														
	0			0,5			1			2			4		
	SE	**PHA**	**PKW**	**SE**	**PHA**	**PKW**	**SE**	**PHA**	**PKW**	**SE**	**PHA**	**PKW**	**SE**	**PHA**	**PKW**
XXII	0,00	1,00	0,10	14,18	48,57	0,48	7,67	37,72	0,26	3,09	40,95	0,17	10,23	52,18	0,70
XXIII	0,00	0,41	0,40	1,52	4,56	7,20	6,50	48,49	14,25	7,85	22,73	9,04	23,40	60,87	15,66
Média dos níveis da p53 (%) – 21 indivíduos	**0,22**	**0,98**	**0,40**	**1,33**	**1,37**	**0,64**	**2,64**	**1,91**	**1,32**	**4,74**	**4,69**	**2,42**	**7,28**	**10,17**	**3,55**
Erro Padrão	**0,07**	**0,16**	**0,08**	**0,36**	**0,33**	**0,30**	**0,74**	**0,47**	**0,68**	**1,10**	**1,00**	**0,93**	**1,25**	**1,25**	**0,95**

SE = Cultivo celular em estímulo

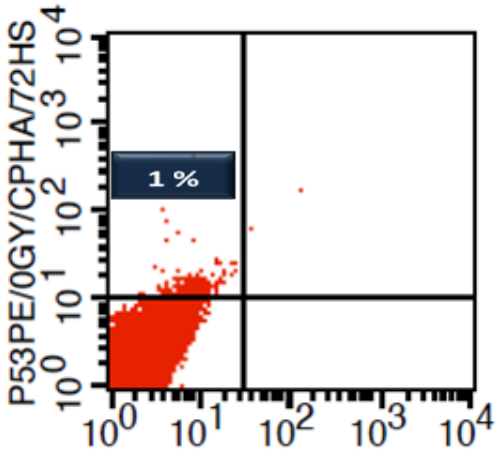
PHA = Cultivo celular com fitohemaglutinina

PKW = Cultivo celular com pokeweed

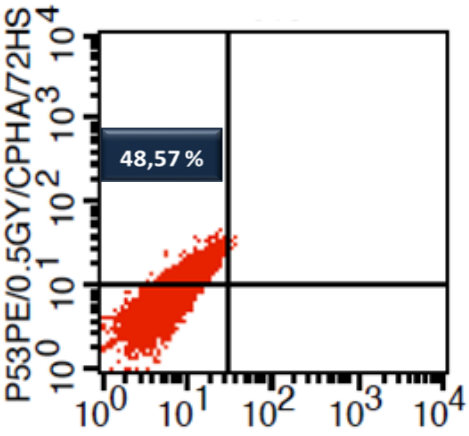
Diante dos resultados apresentados na tabela 3, é possível observar que as amostras irradiadas dos indivíduos XXII e XXIII apresentaram altos níveis de expressão da proteína p53, estando bem acima das médias dos níveis de expressão encontrados nas amostras dos 21 indivíduos inicialmente apresentado.

Por exemplo, as amostras irradiadas com 4 Gy, dos indivíduos XXII e XXIII, cultivadas por 72 horas na presença da fitohemagluitinina obtiverem valores dos níveis de p53 cerca de 5 vezes maiores do que a média dos níveis dos indivíduos anteriormente analisados. Estes resultados ressaltam ainda mais a existência de diferenças interindividuais nas respostas às RIs e, portanto, a importância de sua determinação antes do início do tratamento radioterápico.

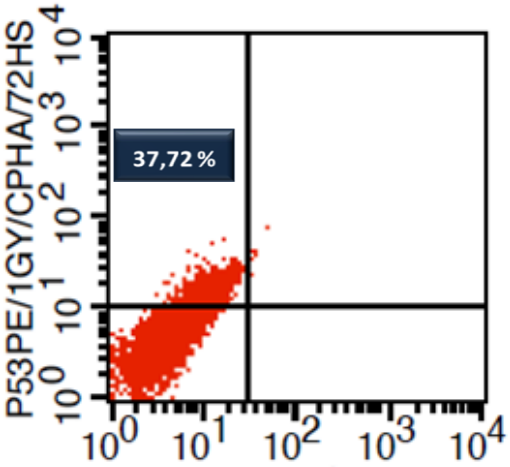
As Figuras 20 e 21 apresentam os gráficos padrões de citometria de fluxo (dot-plots) obtidos a partir das análises dos níveis de expressão da proteína p53 das amostras irradiadas e não irradiadas, cultivadas durante 72 horas na presença da fitohemaglutinina dos indivíduos XXII e XXIII, respectivamente. Os dot-plots são divididos em 4 quadrantes, no superior a esquerda estão localizadas as células positivamente marcadas para proteína p53 enquanto que o quadrante inferior do lado esquerdo estão localizadas as células negativas. As abscissas (X e Y) dos dot-plots correspondem a intensidade de fluorescência captada pelos detectores do equipamento. Para esta pesquisa só será levado em consideração o eixo Y, onde são apresentados os índices da fluorescência do fluorocromo utilizado. No caso das referidas figuras, esses dot-plots estão dispostos segundo as doses de radiação empregadas (0; 0,5; 1; 2 e 5 Gy).



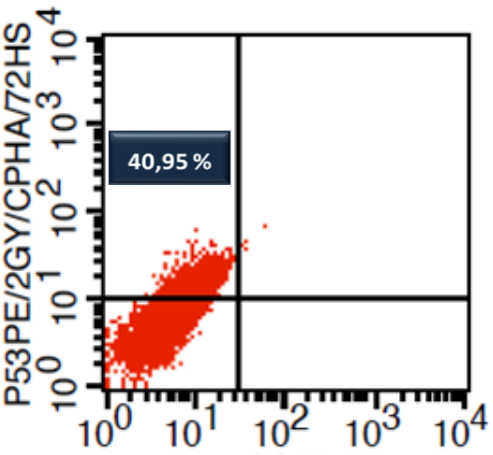
(0 Gy)



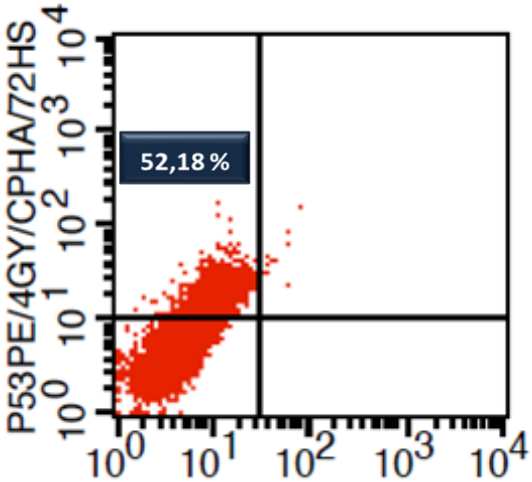
(0,5 Gy)



(1 Gy)

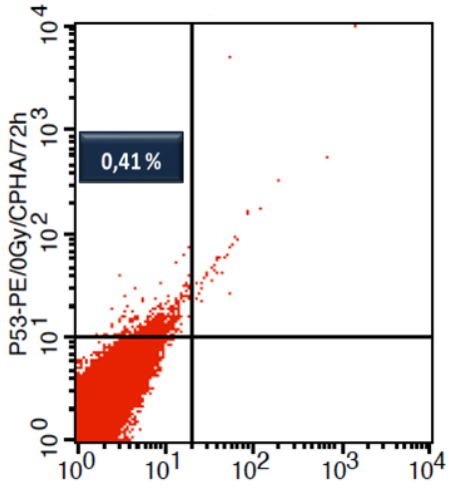


(2 Gy)

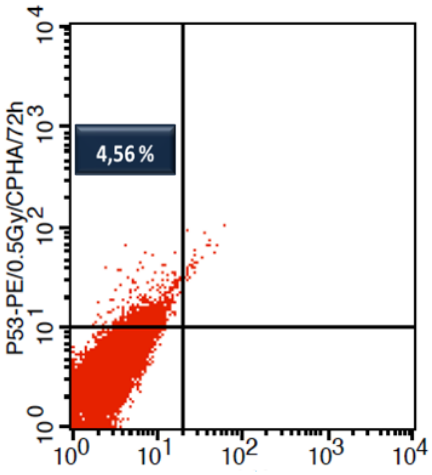


(4 Gy)

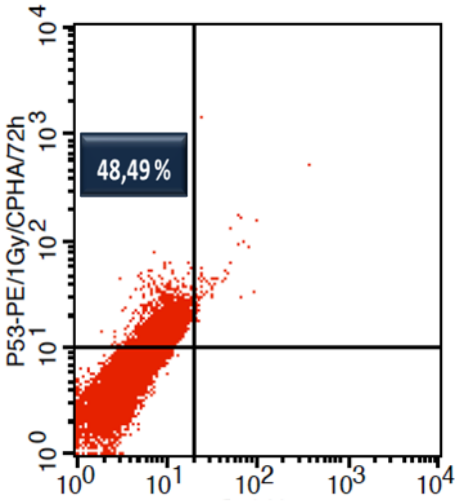
Figura 20 – Níveis de expressão da proteína p53 do indivíduo XXII



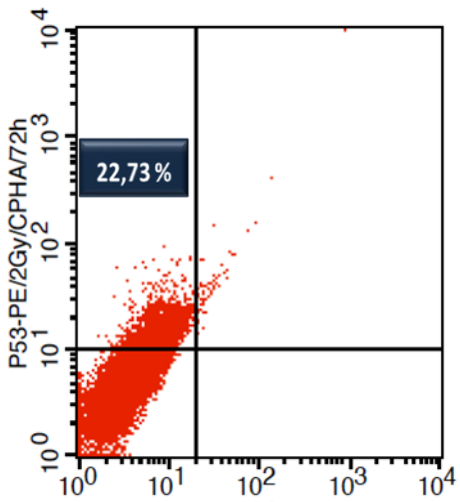
(0 Gy)



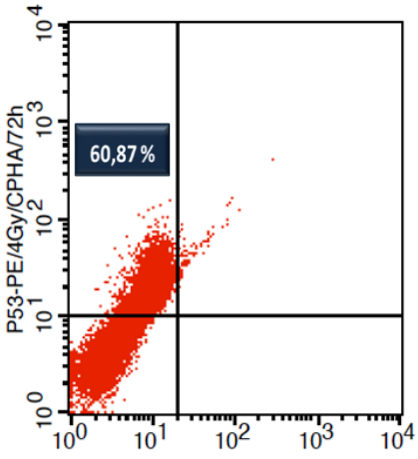
(0,5 Gy)



(1 Gy)



(2 Gy)



(4 Gy)

Figura 21 – Níveis de expressão da proteína p53 do indivíduo XXIII

Os níveis de expressão da p53 apresentados pelos indivíduos XXII e XXIII podem refletir a sensibilidade destes indivíduos às RIs, podendo estes apresentarem possíveis efeitos adversos em caso de uma irradiação. Ou seja, espera-se que a alteração dos níveis de expressão da proteína p53, relativa à radiossensibilidade dos linfócitos destes indivíduos, reflita a radiossensibilidade das demais células do indivíduo.

A escolha do tecido a ser empregado como representativo da radiossensibilidade individual é fundamental. Estudos sugerem que a radiossensibilidade de um tipo de célula é similar ao de outra célula proveniente do mesmo indivíduo, significando assim a existência de uma radiossensibilidade comum (GUIRADO et al., 2003; RAMSAY et al., 1995; OZSAHIN et al., 1997; NÚÑEZ et al., 1998 WEST et al., 1998). Com base nesta suposição, e nos resultados desta pesquisa, as variações entre os níveis de expressão da p53 nos linfócitos irradiados, estão associadas às diferentes sensibilidades de cada individuo às RIs.

Para verificação e conseqüente aplicação clínica desses resultados em protocolos futuros de radioterapia, estudos adicionais são necessários no sentido de correlacionar os níveis de expressão da proteína p53 e os efeitos adversos identificados em pacientes submetidos a tratamentos com radiações ionizantes, sem avaliação prévia da radiossensibilidade individual.

5. CONCLUSÕES

- A cultura de células, de sangue periférico, estimuladas com fitohemaglutinina, na concentração de 10 μg/ml durante 72 horas é a metodologia adequada para avaliação dos níveis de expressão da proteína p53 pela técnica de citometria de fluxo.

- Com base na correlação entre a viabilidade celular e os níveis de expressão desta proteína, a quantificação da p53 é um indicador da radiossensibilidade celular.

- As diferenças interindividuais encontradas para os níveis de expressão da proteína p53, a partir das células irradiadas *in vitro*, sugerem o emprego desta metodologia na caracterização da radiossensibilidade individual.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, M. L.; TAYLOR, W. R.; CHERNOV, M. V.; CHERNOVA, O. B.; STARK, G. R. The p53 network. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 1, p. 1–4, 1998.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; PETER, W. **Molecular biology of the cell**. 4 ed. New York: Garland Science; 2002.

ALSBEIH, G.; SEBAIE, M.; AL-RAJHI, N.; ALLAM, A.; AL-BUHAIRI, M.; AL-HARBI, N.; KHAFAGA, Y.; ALSUBAEL, M.; AL-SHABANAH, M. Relationship between radiosensitivity and normal tissue. Complications in saudi cancer patients treated with radiotherapy. **Journal of the Egyptian Nat. Cancer Inst.**, v. 16, n. 4, p. 216-223, 2004.

ALSNER, J.; SORENSEN, S. B.; OVERGAARD, J. TP53 mutation is related to poor prognosis after radiotherapy, but not surgery, in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Radiother. Oncol.,** v. 59, p. 179–185, 2001.

ARENA, V. **Ionizing radiation and life**, United States of America. Saint Louis, 1971.

BARNETT, G. C.; WEST, C. M. L.; DUNNING, A. M.; ELLIOTT, R. M.; COLES, C. E.; PHAROAH, P. D. P.; BURNET, N. G. Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype. **Nature**, v. 9, p. 134-142, 2009.

BASSU, A.; HALDAR, S. The relationship betweeen blc2; bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. **Molecular Human Reproduction**, v. 4, n. 12, p. 1099-1109, 1998.

BAST, R. C. **New England Journal Medical**, v. 309, p. 883-887, 1983.

BENOTMANE, M. A. Molecular aspects of individual radiosensitivity. **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents**, p. 357-362, 2004.

BENTZEN, S. M. Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology. **Nature**, v. 6, p. 702-713, 2006.

BOREHAM, D. R.; GALE, K. L.; MAVES, S. R.; WALKER, J. A.; MORRISON, D. P. Radiation induced apoptosis in human lymphocytes: potential as a biological dosimeter. **Health Phys.**, v. 71, p. 685–691, 1996.

BORGMANN, K.; HOELLER, U.; NOWACK, S.; BERNHARD, M.; RÖPER, B.; BRACKROCK, S.; PETERSEN, C.; SZYMCZAK, S.; ZIEGLER, A.; FEYER, P.;

ALBERTI, W.; DIKOMEY, E. Individual radiosensitivity measured with lymphocytes may predict the risk of acute reaction after radiotherapy**. Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys**., v.71, p. 256-264, 2008.

BERTHO, A. L.; SANTIAGO, M. A.; COUTINHO S. G. Flow cytometry in the ctudy of cell death. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95(3). p. 429-433, 2000.

BRISTOW, R. G.; BENCHIMOL, S.; HILL, R. P. The 53 gene as a modifier of intrinsic radiosensitivity: implications for radiotherapy. **Radiotherapy and Oncology**, v. 40, p. 197-223, 1996.

BURNET, N. G.; NYMAN, J.; TURESSON, I.; WURTN, R.; YAMOLD, J. R.; PEACOCK, J. H. Prediction of normal-tissue tolerance to radiotherapy from in-vitro cellular radiation sensitivity. **Lancet**, v. 339, p. 1570–1571, 1992.

BURNET, N. G.; WURM, R.; NYMAN, J.; PEACOCK, J. H. Normal tissue radiosensitivity - how important is it? **Clinical Oncology**, v. 8, p. 25-34, 1996.

CANMAN, C. E.; LIM, D. S.; CIMPRICH, K. A.; TAYA, Y.; TAMAI, K.; SAKAGUCHI, K.; APPELLA, E.; KASTAN, M. B.; SILICIANO, J. D. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. **Science**, v. 281, 1998.

CASTAÑEDA, D. B.; GONZALEZ, P. A.; ORTEGA, M. R. R.; TORRES, H. I. Proteína p53: sinais e o papel no processo de carcinogênese. **Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-fac**., v. 7, n. 2, p. 37-54, 2007.

CASTRILLO, J. L. Factores de transcripción específicos de tejido. **Investig. Ciência**, v. 186, p. 160-169, 1995.

CAVALCANTI, M. B.; AMARAL, A. J.; FERNANDES, T. S.; MELO, J. A.; MACHADO, C. G. F. p53 protein expression levels as bioindicator of individual exposure to ionizing radiation by flow cytometry. **Mol. Cell. Biochem**., v. 308, p. 127-131, 2008.

CAVALCANTI JÚNIOR, G. B; SCHEINER, M. A. M.; OLIVEIRA, J. G. P.; VASCONCELOS, F. C.; FERREIRA, A. C. S.; MAIA, R. C.Citometria de fluxo, imunocitoquímica e western blot na detecção da expressão da proteína p53 em células tumorais: uma análise comparativa. **Revista Brasileira de Analises Clínicas**, v. 35 (3): p. 125-142, 2003.

CAVALCANTI JÚNIOR, G. B.; KLUMB, C. E.; MAIA, R. p53 e as hemopatias malignas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 3, p. 419-427, 2002.

COX, J. D.; STETZ, J.; PAJAK, T. F. Toxicity criteria of the radiation therapy oncology Gropu (RTOG) and europan organization for research and treatment os cancer (EORTC). **Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys**., v. 31, n. 5, p. 1341-1346, 1995.

DAINIAK, N. Hematologic consequences of exposure to ionizing radiation. **Exp. Hematol**., v. 30, p. 513–528, 2002.

DÍAZ, L. D. L.; CALA, O. L. O.; LIZCANO, A. I. G.; CORNEJO, V. M. M. El ciclo cellular. **MedUNAB**, v. 6, n.16, p. 21-29, 2003.

Diferenças entre apoptose e necrose celular. Disponível em: < http://www.bioagency.com.br/catalogos/09_apoptose_2004.pdf> Acesso em: 28/10/2009.

EL-DEIRY, W. S.; HARPER, J. W.; O'CONNOR, P. M.; VELCULESCU, V. E.; CANMAN, C. E.; JACKMAN, J.; PIETENPOL, J. A.; BURRELL, M.; HILL, D. E.; WANG Y.; WIMAN, K. G.; MERCER W. E.; KASTAN, M. B.; KOHN K. W.; ELLEDGE, S. J.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. **Cancer Res.,** v. 54, p. 1169-1174, 1994.

Fases o ciclo celular. Disponível em <http://www.natuurinformatie.nl/sites/nnm.dossiers/contents/i004640/mitose+tekst%20voor%20aanpassing2.jpg>. Acesso em: 28/10/2009.

FAVAUDON, V. Effets cellulaires des rayonnements ionisants. **Radiosensibilité, cycle cellulaire et mort cellulaire in "Radiobiologie"**, Tubiana M, Hermann, Paris, p. 186-236, 2007, (ISBN 2 7056 6530 7).

FEI, P.; BERNHARD, E. J.; EL-DEIRY, W. S. Tissue-specific induction of p53 targets in vivo. **Cancer Res.**, v. 62, p. 7316–7327, 2002.

FEI, P.; EL-DEIRY, W. P53 and radiation responses. **Oncogene**, v. 22, p. 5774-5783, 2003.

FERNET, M.; HALL, J. Genetic biomarkers of therapeutic radiation sensitivity. **DNA Repair**, v. 3, p. 1237-1243, 2004.

FISCHER, S.; MACLEAN, A. A.; LIU, M.; CARDELLA, A. J.; SLATSKY, A. S.; SUGA, M.; MOREIRA, J. F. M.; KESHAVJEE, S. Dynamic changes in apoptotic and necrotic cell death correlate with severity of ischemia–reperfusion injury in lung transplantation. **Am. J. Respir. Crit. Care. Med**., v. 162, p. 1932–1939, 2000.

FRANCESCHI, S.; GLOGHINI, A.; MAESTRO, R.; BARZAN, L.; BIDOLI, E.; TALAMINI, R.; VUKOSAVLJEVIC, T.; CARBONE, A. ; BOIOCCHI, M. Analysis of

the p53 gene in relation to tobacco and alcohol in cancers of the upper aero-digestive tract. **International journal of cancer.** v. 60, n. 6, p. 872-876, 1995**.**

FUNK, W. D.; PAK, D. T.; KARAS, R. H.; WRIGHT, W. E.; SHAY, J. W. A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. **Mol. Cell. Biol.**, v. 12, p. 2866-2871, 1992.

GARRETT, M. D. Cell cycle control and cancer. **Current Science**, v. 81, n. 4, p. 515-522, 2001.

GREVE, B.; DREFFKE, K.; ASTRID R. D.; KÖEMANN S.; FRITZ, E.; ECKARDT-SCHUPP, F.; AMLER, S.; SAUERLAND, C.; BRASELMANN H.; SAUTER W.; ILLIG, T.; SCHMEZER, P.; GOMOLKA, M.; WILLICH, N.; BÖLLING T. Multicentric investigation of ionising radiation-induced cell death as a predictive parameter of individual radiosensitivity. **Apoptosis**, v. 14, p. 226-235, 2009.

GUDKOV, A. V.; KOMAROVA, E. A. The Role of p53 in Determining sensitivity to radiotherapy. **Nature**, v. 3, p. 117-129, 2003.

GUERQUIN, M. J.; DUQUENNE, C.; COFFIGNY, H.; ROUILLER-FABRE, V.; LAMBROT, R.; BAKALSKA ,M.; FRYDMAN, R.; HABERT, R.; LIVERA, G. Sex-specific differences in fetal germ cell apoptosis induced by ionizing radiation. **Human Reproduction**, v. 24, n. 3, p. 670–678, 2009.

GUIRADO, D.; ALMODÓVAR, J. M. R. Prediction of normal tissue response and individualization of doses in radiotherapy. **Phys. Med. Biol**., v. 48, p. 3213–3223, 2003.

HALL, E. J.; BRENNER, D. J.; WORGUL, B.; SMILENOV, L. Genetic susceptibility to radiation. **Advances in Space Research**, v. 35, p. 249–253, 2005.

HALL, E. J.; GIACCIA, A. J. **Radiobiology for the radiologist**, 6 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

HANAOKA, T.; YAMANO, Y.; KATSUNO, N.; KAGAWA, J.; ISHIZU, S.; Elavated serum levels of pantropic p53 proteins in chromium workers, Scan. **J. Work Environ. Health**, v. 23, p. 37–40, 1997.

HARRIS, C. C. Protein–protein interactions for cancer therapy. **Proceeding of the National Academy os Science of the United States of Amercian**. v. 103. n. 6, p. 1659–1660, 2006.

HARRIS, C. C. p53 at the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment. **Science**, v. 262, p. 1980-1981, 1993.

HASHIMOTO, S.; SHIRATO, H.; HOSOKAWA, M.; NISHIOKA, T.; KURAMITSU, Y.; MATUSHITA, K.; KOBAYASHI, M.; MIYASAKA, K. The suppression of metástases and the change in host immune response after low-dose total-body irradiation in tumor-bearing rats. **Radiat. Res.,** v. 151, p. 717–724, 1999.

HUTCHINSON, F. Chemical changes induced in DNA by ionizing radiation. **Prog. Nucleic Acid. Res. Mol Bio.,** v. 32, p. 115-154, 1985.

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

KASTAN, M. B.; ZHAN, Q.; EL, D. W.; CARRIER, F.; JACKS, T.; WALSH, W. V.; PLUNKETT, B. S.; VOGELSTEIN, B.; FORNACE, A. J. J. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxiatelangiectasia. **Cell**, v. 71, p. 587-597, 1992.

KERN, S. E.; KINZLER, K. W.; BRUSKIN, A.; JAROSZ, D.; FRIEDMAN, P.; PRIVES, C.; VOGELSTEIN, B. Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. **Science**, v. 252, p. 1708-1711, 1995.

KERR, J. F. R. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cell death. **Journal of Pathology**, v. 105, p. 13-20, 1971.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239-257, 1972.

KOMAROVA, E.A.; CHRISTOV, K.; FAERMAN, A.; GUDKOV A.V. Different impact of p53 and p21 on the radiation response of mouse tissues. **Oncogene**, v.19, p. 3791-3798, 2000.

LAMB, P.; CRAWFORD, L. Characterization of the human p53 gene. **Molec. Cell. Biol**., v. 6, p. 1379-85, 1986.

LANE, D. P. P53, Guardian of the genome. **Nature**, v. 358, p.15-16, 1992.

LÁZARO, M. G.; GÓMEZ, F. J. F.; JORDÁN, J. La proteína p53 en procesos neurodegenerativos en sus 25 años de historia. **Rev. Neurol**., v. 39, n. 3, p. 243-250, 2004.

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

LINDSAY, K. J.; COATES, P. J.; LORIMORE, S. A.; WRIGHT, E. G. The genetic basis of tissue responses to ionizing radiation, **Br. J. Radiol.,** v. 80, special n., p. S2–S6, 2007.

Localização do gene humano Tp53. Disponível em: http://p53.free.fr/p53_info/image_info/p53_gene2.jpg Acesso em: 28/10/2009.

LOWE, S. W.; SCHMITT, E. M.; SMITH, S. W.; OSBORNE, B. A.; JACKS, T. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. **Nature (Lond.),** v. 362, p. 847–849, 1993.

LUKAS, J.; PARRY, D.; AAGAARD, L.; MANN, D. J.; BARTKOVA, J.; STRAUSS, M.; PETERS, G.; BARTEK, J. Retinoblastomaprotein- dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. **Nature**, v. 375, p. 503-506, 1995.

MACCALLUM, D. E.; HUPP, T. R.; MIDGLEY, C. A.; STUART, D.; CAMPBELL, S. J.; HARPER, A.; WALSH, F. S.; WRIGHT, E. G.; BALMAIN, A.; LANE, D. P.; HALL, P. A. The p53 response to ionising radiation in adult and eveloping murine tissues. **Oncogene**, v. 13, p. 2575-2587, 1996.

MCBRIDE, O. W.; MERRY, D.; GIVOL, D. The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13*).* **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 83, p. 130-134, 1986.

MCCURRACH, M. E.; CONNOR, T. M.; KNUDSON, C. M.; KORSMEYER, S. J.; LOWE, S. W. bax-deficiency promotes drug resistance and oncogenic transformation by attenuating p53-dependent apoptosis. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 94, p. 2345–2349, 1997.

MILLAU, J. F.; BASTIEN, N.; DROUIN, R. P53 transcriptional activities: A general overview and some thoughts, **Mutat. Res.**, v. 681, p. 118–133, 2009.

MOHIUDDIN, M.; CHENDIL, D.; DEY, S.; ALCOCK, R.; A.; REGINE, W.; AHMED, M. M. Influence of p53 status on radiation and 5-fluorouracil synergy in pancreatic câncer cells. **Anticancer Res.,** v. 22, p. 825–830, 2002.

MURRAY-ZMIJEWSKI, F.; LANE, D. P.; BOURDON, J. C. p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoform stoharmon is e cell differentiation and response to stress. **Cell Death Differ.**, v. 13, p. 962–972, 2003.

NÚÑEZ, M. I.; GUERRERO, R.; LÓPEZ, E.; MORAL, M. R.; DEL, VALENZUELA, M. T.; SILES, E.; VILLA LOBOS, M.; PEDRAZA, V.; PEACOCK, J. H.; ALMODÓVAR, R. J. M. DNA damage and prediction of radiation response in lymphocytes and epidermal skin human cells. **Int. J. Cancer**, v. 76, p. 354–361, 1998.

OLIVE, P. L.; DURAND R. E. Apoptosis: an indicator of radiosensitivity *in vitro*? **Int. J. Radiat. Biol**., v. 71, n. 6. p. 695-707, 1997.

OPPITZ, U.; SCHULTE, S.; STOPPER, H.; BAIER, K.; MÜLLER, M.; WULF, J.; SCHAKOWSKI, R.; FLENTJE, M. In vitro radiosensitivity measured in lymphocytes and fibroblasts by colony formation and comet assay: comparison with clinical acute reactions to radiotherapy in breast cancer patients. **Int. J. Radiat. Biol.**, v. 78, n. 7, p. 611–616, 2002.

OZSAHIN, M.; OZSAHIN, H.; SHI, Y.; LARSSON, B.; WURGLER, F. E.; CROMPTON, N. E. Rapid assay of intrinsic radiosensitivity based on apoptosis in human CD4 and CD8T-lymphocytes. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.,** v. 38. p. 429-40, 1997.

PAWLIK, T. M.; KHANDAN, K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. **Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys**., v. 59, n. 4, p. 928–942, 2004.

PEAKMAN, M.; VERGANI, D. **Imunologia Básica e Clínica**, 1 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1999.

POPANDA, O.; EBBELER, R.; TWARDELLA, D.; HELMBOLD, I.; GOTZES, F.; SCHMEZER, P.; THIELMANN, H. W.; VON FOURNIER, D.; HAASE, W.; SAUTTER-BIHL, M. L.; WENZ, F.; BARTSCH, H.; CHANG-CLAUDE J. Radiation-induced DNA damage and repair in lymphocytes from breast cancer patients and their correlation with acute skin reactions to radiotherapy. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v. 55, p. 1216-1225, 2003.

POPANDA, O.; MARQUARDTA, J. U.; CHANG-CLAUD, E. B.; SCHMEZERA, J. P. Genetic variation in normal tissue toxicity induced by ionizing radiation. **Mutat. Res.: Fundam. Mol. Mech. Mutagen.**, v. 667, p. 58-69, 2008.

PRISE K.M.; SCHETTINO G; FOLKARD M.; HELD K.D. New insights on cell death from radiation exposure. **Lancet Oncol**. v.6, p 520–528, 2005.

PREKEGES, J. L. Radiation hormesis, or, could all that radiation be good for us? **J. Nucl. Med. Technol.,** v. 31, p. 11-17, 2003.

Proteína p53. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Imagem:P53.png#file> Acesso em: 28/10/2009.

RAGIMOV, N.; KRAUSKOPF, A.; NAVOT, N.; ROTTER, V.; OREN, M.; ALONI, Y. Wild-type but not mutant p53 can repress transcription initiation in vitro by interfering with the binding of basal transcription factors to the TATA motif. **Oncogene,** v. 8, p. 1183-1193, 1993.

RAMSAY, J.; BIRRELL, G.; Normal tissue radiosensitivity in breast cancer patients **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v. 31, p. 339–44, 1995.

RICHMAN, D. P. Lymphocyte cell-cylce analysis by flow cytometry. **J. Cell Biology**, v. 85, p. 459-465, 1980.

RÖSSNER, P. J.; CHVATALOVA, I.; SCHMUCZEROVA, J.; MILCOVA, A.; RÖSSNER, P.; SRAM, R. Comparasion of p53 levels in lymphocytes and in blood plasma os nuclear power plant workers. **Mutatuion research**, v. 556, p. 55-63, 2004.

ROSS, G.M. Induction of cell death by radiotherapy. **Endocrine-Related Cancer**, v. 6, p. 41-44, 1999.

ROTTER, V.; PROKOCIMER, M. p53 and human malignancies. **Adv. Cancer Res**., v. 53, p. 257-272, 1991.

ROUQUAYROL, M. Z.; ALMEIDA FILHO, N. Elementos de epidemiologia epidemiológica. In:_____. Epidemiologia & Saúde. 6a ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2003, p. 149-177.

SCHMID I., KRALL W.J.; UITTENBOGAART C.H.; BRAUN J.; GIORGI J.V. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. **Cytometry**, v. 13(2), p: 204-8, 1992.

SCHNARR, K.; DAYES, I.; SCHANR, J. S.; BOREHAM, D. Individual radiosensitivity and its relevance to health physics. **Dose-Response**, v. 5, p. 333-348, 2007.

SEKI, H.; IWAI, K.; KANEGANE, H.; KONNO, A.; OHTA, K.; OHTA, K.; YACHIE, A.; TANIGUCHI, N.; MIYAWAKI, T. Differential protective action of cytokines on radiation-induced apoptosis of peripheral lymphocytes subpopulations. **Cellular Immunology**, v. 163, p. 30-36, 1995.

SERRANO, M.; HANNON, G. J.; BEACH, D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin-D/CdK4. **Nature**, v. 366, p. 704-707, 1993.

SHACKELFORD, R. E.; KAUFMANN, W. K.; PAULES, R. S. Cell cycle control, checkpoints and genotoxic stress. **Environmental Health Perspectives**, v. 107, Suplemento 1, n. 10, 1999.

SCHNEIDER, J.; PRESEK, P.; BRAUN, A.; WOITOWITZ, H. J. Serum levels of pantropic p53 protein and EGF-receptor, and detection of anti-p53 antibodies in former uranium miners (SDAGWismut), **Am. J. Ind. Med**., v. 36, p. 602–609, 1999.

SIEGEL, R.M.; FLEISHER, T.A. The role of Fas and related death receptors in autoimmune and other disease states. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 103, p. 729-38, 1999.

SILES, E.; VILLALOBOS, M.; VALENZUELA, M. T.; NUIINEZ, M. I.; GORDON, A.; MCMILLAN, T. J.; PEDRAZAL, V.; RUIZ DE ALMODOVAR, J.M. Relationship between p53 status and radiosensitivity in human tumour cell lines. **British Journal of Cancer**, v. 73, p. 581-588, 1996.

SNUSTAD : SIMMONS. **Fundamentos de genética**, 2 ed. Rio de Janeiro: ed. Guanabara, 664 págs., 2001.
STEEL, G. G. From targets to genes: a brief history of radiosensitivity. **Phys. Med. Biol.**, v.41, p. 205-222, 1996.

STEWART, B. W., KLEIHUES, P. Radiotherapy, In: (Eds.), **World Cancer Report**, IARC, Press, International Agency for Research on Cancer (IARC), World Health Organisation (WHO), Lyon, p. 277-280, 2003.

SZKANDEROVÁ, S.; VÁVROVÁ, J.; ŘEZÁČOVÁ, M.; VOKURKOVÁ, D.; PAVLOVÁ, Š.; ŠMARDOVÁ, J.; STULÍK, J. Gamma irradiation results in phosphorylation of p53 at serine-392 in human T-lymphocyte leukaemia cell line MOLT-4. **Fol. Biol**., v. 49, p 191-196, 2003.

TAMULEVICIUS, P.; WANG, M.; ILIAKIS, G. Homology-directed repair is required for the development of radioresistance during S phase: Interplay between double-strand break repair and checkpoint response. **Radiation Research,** v. 167, p. 1–11, 2007.

TAYLOR, A. M. R.; HARNDEN, D. G.; ARLETT, C. F.; HARCOURT, S. A.; LEHMANN, A. R.; STEVENS, S.; BRIDGES, B. A. Ataxia-telangiectasia: a human mutation with abnormal radiation sensitivity. **Nature**, v. 258, p. 427–429, 1975.

TUCKER, S. L.; GEARAB, F. B.; PETERSC, L. J. How much could the radiotherapy dose be altered for individual patients based on a predictive assay of normal-tissue radiosensitivity? **Radiotherapy and Oncology**, v. 38, p. 103-I 13, 1996.

TURESSON, I. The progression rate of late radiation effects in normal tissue and its impact on dose-response relationships. **Radiother. Oncol**., v.15, n. 3, p. 217-226, 1989.

TURESSON, I. Individual variation and dose dependency in the progression rate of skin telangiectasia. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys**., v. 19, n. 6, p. 1569-1574, 1990.

TURESSON, I.; NYMAN, J.; HOLMBERG, E.; ODIN, A. Prognostic factors for acute and late skin reactions in radiotherapy patients. **Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys**., v. 36, n. 5, p. 1065-1075, 1996.

TURESSON I.; THAMES H. Repair capacity and kinetics of human skin during fractionated radiotherapy: erythema, desquamation and telangiectasia after 3 and 5 years follow-up. **Radiother. Oncol.**, v. 15, n. 2 p. 169-188, 1989.

TWARDELLA, D.; CHANG-CLAUDE, J. Studies on Radiosensitivity from an epidemiological point of view –overview of Methods and Results. **Radiotherapy and Oncology**, v. 62, p. 249-260, 2002.

VAN CRUCHTEN, S.; VAN DEN BROECK, W. Morfological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis**. Anatomia Histologia Embryologia**, v. 31, n. 4, p. 214-223, 2002.

VASSILEV, L. T.; VU, B. T.; GRAVES, B.; CARVAJAD, L; PODLASKI, F.; FILIPOVIC, Z.; KONG, N.; KAMMLOTT, U.; LUKACS, C.; KLEIN, C.; FOTOUHI, N.; LIU, E. A. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule mutagonists of MDM2. **Sciense**, v. 303, 2004.

VILASOVÁ, Z.; REZACOVÁ, M.; VAVROVÁ J.; TICHY, A.; VOKURKOVÁ, D.; ZOELZER, F.; REHAKOVÁ, Z.; OSTERREICHER J.; LUKASOVÁ E. Changes in phosphorylation of histone H2A.X and p53 in response of peripheral blood lymphocytes to gamma irradiation. **Acta Biochimica Polonica**, v. 55, p. 381-390, 2008.

WANG, G. J.; CAI, L. Induction of cell-proliferation hormesis and cell-survival adaptive response in mouse hematopoietic cells by whole-body low-dose radiation. **Toxicological Sciences**, v. 53, p. 369–376, 2000.

WASELENKO, J. K.; MACVITTIE, T. J.; WILLIAM, F. BLAKELY, W. F.; PESIK, N.; WILEY, A. L.; DICKERSON, W. E.; TSU, H.; CONFER, D. L.; COLEMAN, C. N.; SEED, T.; LOWRY, P.; ARMITAGE, J. O.; DAINIAK, N. Medical management of the acute radiation syndrome: recommendations of the strategic national stockpile radiation working group. **Annals of Internal Medicine**, v. 140, n. 12, 2004.

WEST, C. M.; DAVIDSON, S. E.; ELYAN, S. A.; SWINDELL, R.; ROBERTS, S. A.; ORTON, C. J.; COYLE, C. A.; VALENTINE, H.; WILKS, D. P.; HUNTER, R. D., HENDRY, J. H. The intrinsic radiosensitivity of normal and tumor cells. **Int. J. Radiat. Biol**., v. 73, p- 409-413, 1998.

WILSON, G. D. Radiation and the cell cycle, revisited. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 23, p. 209–225, 2004.

APÊNDICE I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: **"PROTEÍNA p53 COMO BIOINDICADOR DA RADIOSSENSIBILIDADE INDIVIDUAL"**

Eu,_____,
abaixo-assinado, dou meu consentimento livre e esclarecido para participar como voluntário do projeto de pesquisa supracitado, sob responsabilidade da pesquisadora Mariana Brayner Cavalcanti, Estudante de Doutorado do Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco.

Assinando este Termo de Consentimento, estou ciente que:

1. Objetivo desta pesquisa desta pesquisa é correlacionar os níveis de expressão da proteína p53 com a radiossensibilidade individual.

2. Obtive todas as informações necessárias para poder decidir conscientemente sobre a minha participação na referida pesquisa.

3. Estou livre para interromper a qualquer momento a minha participação na pesquisa, se assim o desejar e, por qualquer motivo, e estou ciente de que tal fato não irá alterar a qualidade nem os meus direitos quanto ao meu atendimento.

4. Todas as medidas serão tomadas para assegurar a confidencialidade 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, incluindo sua publicação na literatura científica especializada.

Recife, _____ de _____ de _____.

_____ _____

Voluntário (Assinatura e RG) (Pesquisador)

APÊNDICE II

QUESTIONÁRIO

Título da Pesquisa: **"PROTEÍNA p53 COMO BIOINDICADOR DA RADIOSSENSIBILIDADE INDIVIDUAL"**

Pesquisadora responsável: Mariana Brayner.

Identificação do Voluntário:

Nome:_____

Código:_____

Iniciais:_____

Sexo: Feminino Masculino

Data de Nascimento:_____

Raça: Branca Negra Mulata Parda Outras

Características do Voluntário:

- **Tratamento Radioterápico Anterior**

SIM NÃO Data:_____

- **Tratamento Quimioterápico Anterior**

SIM NÃO Data:_____

- **Antecedentes: (por ex: Agrotóxicos e/ou veneno):**

SIM NÃO

Observações:_____

_____

- **Fumante**

SIM NÃO

Observações: _____

- **Medicamentos concomitantes:**

SIM NÃO

Quais:_____

_____

- **Exposições à agentes biológicos (vírus, bactérias, fungos):**

SIM NÃO

Diagnóstico:_____

_____

_____

Características da Irradiação:

Data da Irradiação:_____

Hora:_____

Taxa de Dose:_____

Descrição do Equipamento:_____

_____

_____

_____

_____

OBS:_____

_____

_____

_____

Responsável pelo questionário: _____

APÊNDICE III

Tabela 4. Estudo da proliferação celular em amostras do indivíduo A

Indivíduo A							
Tempo (horas)	**Mitógenos (µg/mL)**						
	Basal	PHA 2,5	PHA 5	PHA 10	PKW 2,5	PKW 5	PKW 10
6	587	598	530	525	561	706	587
	562	634	561	485	616	554	538
	586	631	545	647	816	546	553
	µ =578,33	**µ =621**	**µ =545,33**	**µ =552,33**	**µ =664,33**	**µ =602**	**µ =559,33**
	σ =14,15	**σ =19,97**	**σ =15,50**	**σ =84,38**	**σ =109,56**	**σ =90,15**	**σ =25,10**
24	259	653	676	538	576	836	723
	475	658	826	983	643	722	684
	310	666	764	843	667	788	726
	µ =348	**µ =659**	**µ =755,33**	**µ =788**	**µ =628,66**	**µ =782**	**µ =711**
	σ =112,90	**σ =6,55**	**σ =75,374**	**σ =227,54**	**σ =38,50**	**σ =57,23**	**σ =23,43**
48	431	18696	48778	75361	12807	17378	9954
	434	18871	47451	84275	14445	13866	11837
	477	20087	50612	78115	12044	13766	13643
	µ =447,33	**µ =19218**	**µ =48947**	**µ =79250,33**	**µ =13098,66**	**µ =15003,33**	**µ =11811,33**
	σ =25,73	**σ =757,64**	**σ =1587,26**	**σ =4564,16**	**σ =1001,66**	**σ =2057,12**	**σ =1844,63**
72	597	69425	102367	165582	46962	45420	34725
	725	57531	99637	164842	47515	44220	36943
	537	55835	95705	160645	45281	43344	37622
	µ =619,66	**µ =60930,33**	**µ =99236,33**	**µ =163689,66**	**µ =46586**	**µ =44328**	**µ =36430**
	σ =96,02	**σ =7405,31**	**σ =3349,02**	**σ =2662,59**	**σ =949,98**	**σ =1042,20**	**σ =1515,10**

APÊNDICE IV

Análise da variância (ANOVA) do índice de proliferação celular utilizado a fitohemaglutinina (PHA) – Indivíduo A

Sem estímulo

Tempo (Hora)	Média	Variância	N
6	578,33333	200,33333	3
24	348	12747	3
48	447,33333	662,33333	3
72	619,66667	9221,33333	3

F = 8,11579
p = 0,00824

Ao nível de 0,05, as médias são significativamente diferentes.

5 µg/mL de PHA

Tempo (Hora)	Média	Variância	N
6	545,33333	240,33333	3
24	755,33333	5681,33333	3
48	48947	2,5194E6	3
72	99236,33333	1,1216E7	3

F = 1938,14785
p = 8,76599E-12

Ao nível de 0,05, as médias são significativamente diferentes.

2,5 µg/mL de PHA

Tempo (Hora)	Média	Variância	N
6	621	399	3
24	659	43	3
48	19218	574027	3
72	69930,33333	5,27195E8	3

F = 24,37492
p = 2,2335E-4

Ao nível de 0,05, as médias são significativamente diferentes.

10 µg/mL de PHA

Tempo (Hora)	Média	Variância	N
6	552,33333	7121,33333	3
24	788	51775	3
48	79250,33333	2,08316E7	3
72	163689,66667	7,0894E6	3

F = 2595,81232
p = 2,72848E-12

Ao nível de 0,05, as médias são significativamente diferente

APÊNDICE V

Análise da variância (ANOVA) do índice de proliferação celular utilizado a pokeweed (PKW) – Indivíduo A

Sem estímulo

Tempo (Hora)	Média	Variância	N
6	578,33333	200,33333	3
24	348	12747	3
48	447,33333	662,33333	3
72	619,66667	9221,33333	3

F = 8,11579
p = 0,00824

Ao nível de 0,05, as médias são significativamente diferentes.

2,5 µg/mL de PKW

Tempo (Hora)	Média	Variância	N
6	664,33333	18008,33333	3
24	628,66667	2224,33333	3
48	13098,66667	1,505E6	3
72	46586	1,35372E6	3

F = 1963,34792
p = 8,32512E-12

Ao nível de 0,05, as médias são significativamente diferentes.

5 µg/mL de PKW

Data	Mean	Variance	N
6	602	8128	3
24	782	3276	3
48	15003,33333	4,23178E6	3
72	44328	1,08619E6	3

F = 952,79994
p = 1,49152E-10

Ao nível de 0,05, as médias são significativamente diferentes.

10 µg/mL de PKW

Tempo (Hora)	Média	Variância	N
6	559,33333	630,33333	3
24	711	549	3
48	11811,33333	3,40267E6	3
72	36430	2,29553E6	3

F = 599,798
p = 9,42929E-10

Ao nível de 0,05, as médias são significativamente diferentes.

APÊNDICE VI

Tabela 5. Estudo da proliferação celular em amostras do indivíduo B

Indivíduo B									
Tempo (horas)	**Mitógenos (µg/mL)**								
	Basal	PHA 2,5	PHA 5	PHA 10	PHA 20	PHA 40	PKW 2,5	PKW 5	PKW 10
6	371	272	411	379	403	323	376	331	429
	320	384	459	363	440	303	372	385	368
	313	415	413	376	429	435	415	357	343
	µ =334,66	**µ =357**	**µ =427,66**	**µ =372,66**	**µ =424**	**µ =353,66**	**µ =387,66**	**µ =357,66**	**µ =380**
	σ =31,65	**σ =75,22**	**σ =27,15**	**σ =8,50**	**σ =19**	**σ =71,14**	**σ =19,39**	**σ =27,00**	**σ =44,23**
24	719	1254	2147	3655	5521	5504	1094	1278	1145
	689	1053	2076	3242	5978	2321	1194	1267	1178
	696	896	2034	3763	6513	5137	1468	1143	1267
	µ =701,33	**µ =1067,67**	**µ =2085,67**	**µ =3553,33**	**µ =6004**	**µ =4320,67**	**µ =1252**	**µ =1229,33**	**µ =1196,67**
	σ =15,69	**σ =179,45**	**σ =57,11**	**σ =274,97**	**σ =496,51**	**σ =1741,46**	**σ =158,09**	**σ =74,96**	**σ =63,10**
48	506	29769	93571	105278	110593	133003	24990	28570	23003
	622	23036	95762	115509	134329	134889	30254	25141	23653
	437	25692	99195	109846	130519	124940	29614	26382	20472
	µ =521,66	**µ =26165,70**	**µ =96176**	**µ =110211**	**µ =125147**	**µ =130944**	**µ =28286**	**µ =26697,70**	**µ =22376**
	σ =93,48	**σ =3391,40**	**σ =2834,76**	**σ =5125,26**	**σ =12747,30**	**σ =5284,44**	**σ =2345,22**	**σ =1736,16**	**σ =1680,64**
72	973	48176	155239	201605	209064	203656	40596	72365	53747
	920	48354	143214	195676	202066	209726	40670	63461	47267
	1382	43032	170009	192651	217528	194317	38455	64793	60818
	µ =1091,67	**µ =46520,7**	**µ =156154**	**µ =196644**	**µ =209553**	**µ =202566**	**µ =39907**	**µ =66873**	**µ =53944**
	σ =252,82	**σ =3022,58**	**σ =13420,9**	**σ =4554,81**	**σ =7742,57**	**σ =7762,08**	**σ =1027,16**	**σ =4802,61**	**σ =6777,65**

APÊNDICE VII

Análise da variância (ANOVA) do índice de proliferação celular utilizado a fitohemaglutinina (PHA) – Indivíduo B

Sem estímulo

Tempo (Hora)	Média	Variância	N
6	334,66667	1002,33333	3
24	792,33333	23633,33333	3
48	521,66667	8740,33333	3
72	1091,66667	63922,33333	3

F = 13,4148
p = 0,00173

Ao nível de 0,05, as médias são significativamente diferentes.

5 µg/mL de PHA

Tempo (Hora)	Média	Variância	N
6	427,66667	737,33333	3
24	2085,66667	3262,33333	3
48	96176	8,03589E6	3
72	156154	1,80121E8	3

F = 369,94199
p = 6,43749E-9

Ao nível de 0,05, as médias são significativamente diferentes.

2,5 µg/mL de PHA

Tempo (Hora)	Média	Variância	N
6	357	5659	3
24	1067,66667	32202,33333	3
48	26165,66667	1,15016E7	3
72	46520,66667	9,13602E6	3

F = 285,74378
p = 1,79192E-8

Ao nível de 0,05, as médias são significativamente diferentes.

10 µg/mL de PHA

Tempo (Hora)	Média	Variância	N
6	372,66667	72,33333	3
24	3553,33333	75612,33333	3
48	110211	2,62683E7	3
72	196644	2,07463E7	3

F = 2266,4471
p = 4,69191E-12

Ao nível de 0,05, as médias são significativamente diferentes.

20 µg/mL de PHA

Tempo (Hora)	Média	Variância	N
6	424	361	3
24	6004	246523	3
48	125147	1,62493E8	3
72	209552,66667	5,99475E7	3

F = 548,18148
p = 1,34898E-9

Ao nível de 0,05, as médias são significativamente diferentes.

40 µg/mL de PHA

Tempo (Hora)	Média	Variância	N
6	353,66667	5061,33333	3
24	4320,66667	3,03267E6	3
48	130944	2,79253E7	3
72	202566,33333	6,02499E7	3

F = 1298,32708
p = 4,34028E-11

Ao nível de 0,05, as médias são significativamente diferentes.

APÊNDICE VIII

Análise da variância (ANOVA) do índice de proliferação celular utilizado a pokeweed (PKW) – Indivíduo B

Sem estímulo

Tempo (Hora)	Média	Variância	N
6	334,66667	1002,33333	3
24	792,33333	23633,33333	3
48	521,66667	8740,33333	3
72	1091,66667	63922,33333	3

F = 13,4148
p = 0,00173

Ao nível de 0,05, as médias são significativamente diferentes.

5 µg/mL de PKW

Tempo (Hora)	Média	Variância	N
6	357,66667	729,33333	3
24	1229,33333	5620,33333	3
48	26697,66667	3,01424E6	3
72	66873	2,30651E7	3

F = 448,16241
p = 3,00537E-9

Ao nível de 0,05, as médias são significativamente diferentes.

2,5 µg/mL de PKW

Tempo (Hora)	Média	Variância	N
6	387,66667	564,33333	3
24	1252	37492	3
48	28286	8,25011E6	3
72	39907	1,5826E6	3

F = 476,24834
p = 2,36033E-9

Ao nível de 0,05, as médias são significativamente diferentes.

10 µg/mL de PKW

Tempo (Hora)	Média	Variância	N
6	380	1957	3
24	1196,66667	3982,33333	3
48	22376	2,82454E6	3
72	53944	4,59365E7	3

F = 155,45306
p = 1,97734E-7

Ao nível de 0,05, as médias são significativamente diferentes.

APÊNDICE IX

Tabela 6. Estudo da proliferação celular em amostras irradiadas do indivíduo A após 72 horas de cultivo celular

Indivíduo A – 72 horas de cultivo celular					
Motógeno (µg/mL)	**Dose de Radiação (Gy)**				
	0	**0,5**	**1**	**2**	**4**
Sem estímulo	1827	718	6381	82224	**
	1161	719	7331	26031	889
	1012	763	**	**	639
	µ =1333,33	**µ =733,33**	**µ =6856**	**µ =54127,5**	**µ =764**
	σ =433,97	**σ =25,697**	**σ =671,75**	**σ =39734,5**	**σ =176,77**
Fitohemaglutinina 10 µg/mL	148634	102764	78263	74689	61052
	138902	**	107138	98410	66450
	142049	121513	94182	106769	70898
	µ =143195	**µ =112139**	**µ =93194,3**	**µ =93289,3**	**µ =66133,3**
	σ =4966,18	**σ =13257,5**	**σ =14462,8**	**σ =16641,7**	**σ =4930,63**
Pokweed 5 µg/mL	35699	37881	40031	31281	9672
	35518	36143	39160	33204	8083
	34805	38393	39873	24656	7278
	µ =35340,67	**µ =37472,33**	**µ =39688**	**µ =29713,67**	**µ =8344,333**
	σ =472,6461	**σ =1179,356**	**σ =464,0356**	**σ =4484,359**	**σ =9672**

**- poços desconsiderados devido a contaminação

APÊNDICE X

Análise da variância (ANOVA) do índice de proliferação celular em amostras irradiadas- Indivíduo A

0 Gy

Mitógeno	Média	Variância	N
Sem estímulo	1333,33333	188330,33333	3
10 ug/mL de PHA	143195	2,46629E7	3
5 ug/mL de PKW	35340,66667	223394,33333	3

F = 1968,94664
p = 3,5211E-9

Ao nível de 0,05, as médias são significativamente diferentes.

0,5 Gy

Mitógeno	Média	Variância	N
Sem estímulo	733,33333	660,33333	3
10 ug/mL de PHA	112138,5	1,75763E8	2
5 ug/mL de PKW	37472,33333	1,39088E6	3

F = 210,14359
p = 1,49872E-5

Ao nível de 0,05, as médias são significativamente diferentes.

1 Gy

Mitógeno	Média	Variância	N
Sem estímulo	6856	451250	2
10 ug/mL de PHA	93194,33333	2,09173E8	3
5 ug/mL de PKW	39688	215329	3

F = 57,36724
p = 3,5635E-4

Ao nível de 0,05, as médias são significativamente diferentes.

2 Gy

Mitógeno	Média	Variância	N
Sem estímulo	54127,5	1,57883E9	2
10 ug/mL de PHA	93289,33333	2,76948E8	3
5 ug/mL de PKW	29713,66667	2,01095E7	3

F = 7,06918
p = 0,03489

Ao nível de 0,05, as médias são significativamente diferentes.

4 Gy

Mitógeno	Média	Variância	N
Sem estímulo	764	31250	2
10 ug/mL de PHA	66133,33333	2,43111E7	3
5 ug/mL de PKW	8344,33333	1,48403E6	3

F = 339,24631
p = 4,5771E-6

Ao nível de 0,05, as médias são significativamente diferentes.

APÊNDICE XI

Tabela 7. Estudo da proliferação celular em amostras irradiadas do indivíduo B após 72 horas de cultivo celular

Indivíduo B – 72 horas de cultivo celular					
Motógeno (µg/mL)	**Dose de Radiação (Gy)**				
	0	**0,5**	**1**	**2**	**4**
Sem estímulo	5468	746	1328	1025	9738
	6229	592	1076	33502	2408
	5140	649	1687	52107	2827
	µ =5612,33	**µ =662,33**	**µ =1363,66**	**µ =28878**	**µ =4991**
	σ =558,66	**σ =77,86**	**σ =307,05**	**σ =25853,02**	**σ =4116,35**
Fitohemaglutinina 10 µg/mL	197217	183587	175112	154465	93919
	164713	174543	145560	167247	121305
	159001	173604	126826	164114	124694
	µ =173643,66	**µ =177244,66**	**µ =149166**	**µ =161942**	**µ =113306**
	σ =20613,90	**σ =5512,65**	**σ =24344,13**	**σ =6662,06**	**σ =16874,92**
Pokweed 5 µg/mL	14897	40509	35603	16197	24550
	17950	48503	31562	15151	21200
	20440	**	33792	16008	23956
	µ =17762,33	**µ =44506**	**µ =33652,33**	**µ =15785,33**	**µ =23235,33**
	σ =2776,261	**σ =5652,612**	**σ =2024,117**	**σ =557,4176**	**σ =1787,497**

**- poços desconsiderados devido a contaminação

APÊNDICE XII

Análise da variância (ANOVA) do índice de proliferação celular em amostras irradiadas- Indivíduo B

0 Gy

Mitógeno	Média	Variância	N
Sem estímulo	5612,33333	312104,33333	3
10 ug/mL de PHA	173643,66667	4,24933E8	3
5 ug/mL de PKW	17762,33333	7,70763E6	3

F = 182,51799
p = 4,22869E-6

Ao nível de 0,05, as médias são significativamente diferentes.

1 Gy

Mitógeno	Média	Variância	N
Sem estímulo	1363,66667	94284,33333	3
10 ug/mL de PHA	149166	5,92637E8	3
5 ug/mL de PKW	33652,33333	4,09705E6	3

F = 91,06011
p = 3,2445E-5

Ao nível de 0,05, as médias são significativamente diferentes.

0,5 Gy

Mitógeno	Média	Variância	N
Sem estímulo	662,33333	6062,33333	3
10 ug/mL de PHA	177244,66667	3,03893E7	3
5 ug/mL de PKW	44506	3,1952E7	2

F = 1340,6797
p = 1,49456E-7

Ao nível de 0,05, as médias são significativamente diferentes.

2 Gy

Mitógeno	Média	Variância	N
Sem estímulo	28878	6,68379E8	3
10 ug/mL de PHA	161942	4,43831E7	3
5 ug/mL de PKW	15785,33333	310714,33333	3

F = 82,54256
p = 4,31337E-5

Ao nível de 0,05, as médias são significativamente diferentes.

4 Gy

Mitógeno	Média	Variância	N
Sem estímulo	4991	1,69444E7	3
10 ug/mL de PHA	113306	2,84763E8	3
5 ug/mL de PKW	23235,33333	3,19515E6	3

F = 99,26636
p = 2,52444E-5

Ao nível de 0,05, as médias são significativamente diferentes.

APÊNDICE XIII

Níveis de expressão da proteína p53 das amostras dos 21 indivíduos cultivadas durante 6 horas

	Níveis de expressão da proteína p53 (%)														
	Dose de radiação (Gy)														
	0			0,5			1			2			4		
	SE	**PHA**	**PKW**	**SE**	**PHA**	**PKW**	**SE**	**PHA**	**PKW**	**SE**	**PHA**	**PKW**	**SE**	**PHA**	**PKW**
I	0,00	0,64	0,13	0,58	0,59	0,00	1,94	0,62	0,33	4,21	3,75	0,57	7,22	6,26	1,49
II	0,34	0,08	0,12	2,41	0,00	0,05	4,22	0,27	0,31	10,55	1,21	2,07	20,11	3,61	2,11
III	0,06	0,00	0,21	0,21	0,00	0,13	0,39	0,00	0,2	0,48	0,31	0,46	1,23	6,03	0,93
IV	0,20	1,29	0,5	3,20	2,59	1,30	4,69	2,78	1,81	9,35	6,35	4,22	14,07	13,39	7,12
V	0,10	2,14	0,31	0,47	1,22	0,19	1,09	1,97	0,49	2,00	5,15	0,64	4,35	8,94	1,57
VI	0,07	2,36	0,04	0,67	2,95	0,04	1,45	5,27	0,13	2,61	11,32	0,21	5,19	12,12	0,30
VII	0,14	1,05	0,88	1,74	0,00	0,87	2,78	0,00	0,98	6,34	4,23	1,47	13,59	14,19	5,46
VIII	0,30	1,19	1,49	1,01	1,36	0,00	1,47	3,07	0,22	7,86	18,52	3,05	4,86	9,41	4,65
IX	0,00	0,22	0,35	0,10	0,66	0,28	0,33	0,99	0,27	0,52	2,62	0,38	0,93	6,73	0,89
X	0,19	0,62	0,42	0,59	0,53	0,57	0,68	1,77	0,57	1,17	3,76	0,63	4,67	19,37	2,41

XI	0,06	1,31	0,38	1,21	1,9	0,2	1,57	2,02	1,32	3,18	2,90	2,7	12,95	15,58	5,46
XII	0,65	2,11	0,75	7,27	3,71	1,34	9,63	4,22	3,85	14,25	7,84	13	19,61	16,81	12,17
XIII	0,22	1,11	0	3,71	3,72	6,36	14,47	8,71	14,49	19,75	10,57	16,66	9,52	12,37	18,00
XIV	0,04	0,26	0,13	0,5	0,12	0,13	1,89	1,06	0,16	2,14	0,68	0,43	3,57	1,21	1,22
XV	0	1,8	0,25	0,48	5,5	0,51	0,75	4,24	0,25	0,91	9,19	0,03	1,57	12,85	0,22
XVI	0	0,25	0,13	0,31	0,9	0,19	0,66	0,25	0,334	0,94	0,52	0,26	2,43	5,17	0,45
XVII	0,18	0,15	0,09	0	0	0,07	0,31	0,15	0	0,28	0,37	0,14	0,71	2,85	0,40
XVIII	0	0,56	0,85	0,73	1,53	1,17	1,48	1,3	1,17	1,01	1,85	0,81	3,02	21,92	3,55
XIX	1,39	0,52	0,64	1,06	0,05	0,01	1,9	0,28	0,36	3,86	1,40	0,92	6,34	4,4	1,43
XX	0,32	1,28	0,36	0,33	0	0	2,18	0,46	0,28	2,18	0,44	1,71	8,88	5,25	3,17
XXI	0,34	1,54	0,28	1,34	1,42	0,11	1,57	0,6	0,25	5,94	5,71	0,56	8,18	15,13	1,50
Média	**0,22**	**0,98**	**0,40**	**1,33**	**1,37**	**0,64**	**2,64**	**1,91**	**1,32**	**4,74**	**4,69**	**2,42**	**7,28**	**10,17**	**3,55**
Erro Padrão	**0,07**	**0,16**	**0,08**	**0,36**	**0,33**	**0,30**	**0,74**	**0,47**	**0,68**	**1,10**	**1,00**	**0,93**	**1,25**	**1,25**	**0,95**

APÊNDICE XIV

Análise da variância (ANOVA) dos níveis de expressão da proteína p53 (%) – 72 horas de cultivo celular

Sem estímulo

Dose (Gy)	Média	Variância	N
0	0,21905	0,09854	21
0.5	1,32952	2,83012	21
1	2,64048	11,66618	21
2	4,73952	26,2472	21
4	7,28095	33,75877	21

F = 11,15907
p = 1,59145E-7

Ao nível de 0,05, as médias são significativamente diferentes.

Com fitohemaglutinina

Dose (Gy)	Média	Variância	N
0	0,97524	0,52974	21
0.5	1,36905	2,35499	21
1	1,90619	4,81758	21
2	4,69381	21,69915	21
4	10,17095	33,43821	21

F = 24,58782
p = 3,4639E-14

Ao nível de 0,05, as médias são significativamente diferentes.

Com Pokeweed

Dose (Gy)	Média	Variância	N
0	0,39571	0,12898	21
0.5	0,64381	1,90936	21
1	1,32286	9,84019	21
2	2,42238	18,5333	21
4	3,54762	19,26446	21

F = 3,64021
p = 0,00822

Ao nível de 0,05, as médias são significativamente diferentes.

APÊNDICE XV

Análise da variância (ANOVA) da viabilidade celular

Dose (Gy)	Média	Variância	N
0	98,08083	2,91366	12
0.5	98,79583	0,56234	12
1	98,8075	0,47722	12
2	98,68833	0,85298	12
4	98,60167	0,30032	12

F = 1,0534
p = 0,38835

Ao nível de 0,05, as médias não são significativamente diferentes.

Dose (Gy)	Média	Variância	N
0	97,41667	1,17424	12
0.5	87,90333	52,37232	12
1	84,45	58,08236	12
2	76,28583	79,31323	12
4	58,54083	128,35659	12

F = 40,19764
p = 9,99201E-16

Ao nível de 0,05, as médias são significativamente diferentes.

APÊNDICE XVI

Tabela 8. Níveis de expressão da proteína p53 das amostras dos 21 indivíduos cultivadas por 72 horas

	Níveis de expressão da proteína p53 (%)														
	Dose de radiação (Gy)														
	0			0,5			1			2			4		
	SE	**PHA**	**PKW**	**SE**	**PHA**	**PKW**	**SE**	**PHA**	**PKW**	**SE**	**PHA**	**PKW**	**SE**	**PHA**	**PKW**
I	0,00	0,64	0,13	0,58	0,59	0,00	1,94	0,62	0,33	4,21	3,75	0,57	7,22	6,26	1,49
II	0,34	0,08	0,12	2,41	0,00	0,05	4,22	0,27	0,31	10,55	1,21	2,07	20,11	3,61	2,11
III	0,06	0,00	0,21	0,21	0,00	0,13	0,39	0,00	0,2	0,48	0,31	0,46	1,23	6,03	0,93
IV	0,20	1,29	0,5	3,20	2,59	1,30	4,69	2,78	1,81	9,35	6,35	4,22	14,07	13,39	7,12
V	0,10	2,14	0,31	0,47	1,22	0,19	1,09	1,97	0,49	2,00	5,15	0,64	4,35	8,94	1,57
VI	0,07	2,36	0,04	0,67	2,95	0,04	1,45	5,27	0,13	2,61	11,32	0,21	5,19	12,12	0,30
VII	0,14	1,05	0,88	1,74	0,00	0,87	2,78	0,00	0,98	6,34	4,23	1,47	13,59	14,19	5,46
VIII	0,30	1,19	1,49	1,01	1,36	0,00	1,47	3,07	0,22	7,86	18,52	3,05	4,86	9,41	4,65
IX	0,00	0,22	0,35	0,10	0,66	0,28	0,33	0,99	0,27	0,52	2,62	0,38	0,93	6,73	0,89
X	0,19	0,62	0,42	0,59	0,53	0,57	0,68	1,77	0,57	1,17	3,76	0,63	4,67	19,37	2,41

XI	0,06	1,31	0,38	1,21	1,9	0,2	1,57	2,02	1,32	3,18	2,90	2,7	12,95	15,58	5,46
XII	0,65	2,11	0,75	7,27	3,71	1,34	9,63	4,22	3,85	14,25	7,84	13	19,61	16,81	12,17
XIII	0,22	1,11	0	3,71	3,72	6,36	14,47	8,71	14,49	19,75	10,57	16,66	9,52	12,37	18,00
XIV	0,04	0,26	0,13	0,5	0,12	0,13	1,89	1,06	0,16	2,14	0,68	0,43	3,57	1,21	1,22
XV	0	1,8	0,25	0,48	5,5	0,51	0,75	4,24	0,25	0,91	9,19	0,03	1,57	12,85	0,22
XVI	0	0,25	0,13	0,31	0,9	0,19	0,66	0,25	0,334	0,94	0,52	0,26	2,43	5,17	0,45
XVII	0,18	0,15	0,09	0	0	0,07	0,31	0,15	0	0,28	0,37	0,14	0,71	2,85	0,40
XVIII	0	0,56	0,85	0,73	1,53	1,17	1,48	1,3	1,17	1,01	1,85	0,81	3,02	21,92	3,55
XIX	1,39	0,52	0,64	1,06	0,05	0,01	1,9	0,28	0,36	3,86	1,40	0,92	6,34	4,4	1,43
XX	0,32	1,28	0,36	0,33	0	0	2,18	0,46	0,28	2,18	0,44	1,71	8,88	5,25	3,17
XXI	0,34	1,54	0,28	1,34	1,42	0,11	1,57	0,6	0,25	5,94	5,71	0,56	8,18	15,13	1,50
Média	**0,22**	**0,98**	**0,40**	**1,33**	**1,37**	**0,64**	**2,64**	**1,91**	**1,32**	**4,74**	**4,69**	**2,42**	**7,28**	**10,17**	**3,55**
Erro Padrão	**0,07**	**0,16**	**0,08**	**0,36**	**0,33**	**0,30**	**0,74**	**0,47**	**0,68**	**1,10**	**1,00**	**0,93**	**1,25**	**1,25**	**0,95**

ANEXO I

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Mol Cell Biochem (2008) 308:127–131
DOI 10.1007/s11010-007-9620-5

p53 protein expression levels as bioindicator of individual exposure to ionizing radiation by flow cytometry

Mariana Brayner Cavalcanti · Ademir de Jesus Amaral · Thiago de Salazar e Fernandes · Jonathan Azevedo Melo · Cintia Gonsalves de Faria Machado

Received: 26 June 2007 / Accepted: 3 October 2007 / Published online: 24 October 2007
© Springer Science+Business Media, LLC. 2007

Abstract Ionizing radiation (IR) can cause various lesions in DNA, which induce the increase of p53 expression levels in order to repair radiation induced damage. Thus, the correlation between the increase of p53 expression and an irradiation may constitute a fast and powerful method of individual monitoring in cases of accidental or suspected exposures to IR. In this context, the aim of this research was to evaluate changes in lymphocyte p53 expression levels, based on flow cytometry, after in vitro irradiation of peripheral blood samples. For the measurement of such expression levels of p53 protein, an investigation was carried out in order to establish a methodology of analysis based on flow cytometry. Hence, relationships among levels of expression of p53 protein with the absorbed dose have been verified. The results presented in this report emphasized flow cytometry as an important tool for the fast evaluation of p53 protein expression levels as bioindicator of individual exposure to acute ionizing radiation.

M. B. Cavalcanti (✉) · A. de Jesus Amaral · T. de Salazar e Fernandes · J. A. Melo · C. G. de Faria Machado
Grupo de Estudos em Radioproteção e Radioecologia (GERAR), Departamento de Energia Nuclear, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Luiz Freire, 1000, Cidade Universitária, PE 50740-540, Brazil
e-mail: maribrayner@yahoo.com.br

J. A. Melo
Centro de Radioterapia de Pernambuco (CERAPE), Avenida Cruz Cabugá, 1579, Santo Amaro, Recife, PE 50040-000, Brazil

Cintia. G. de Faria Machado
Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE), Rua Joaquim Nabuco, 171, Graças, Recife, PE 52011-000, Brazil

Keywords p53 protein · Flow cytometry · Bioindicators · Ionizing radiation · Irradiated lymphocytes

Introduction

Bioindicators of individual exposure to ionizing radiation (IR) can be defined as biological effects (organic, tissue, cellular, or molecular endpoints) induced by the interaction of IR with living tissues, such as clinical symptoms of acute radiation syndrome, erythema, chromosome aberrations, and micronuclei [1–4].

Identification and evaluation of bioindicators helps to confirm whether an individual was exposed to IR or not. Moreover, quantitative analyses of bioindicators can make possible the estimation of absorbed dose, which is defined as the average energy deposited by the radiation per unit of mass of the irradiated volume [2, 5, 6].

In investigation of suspected or accidental individual exposures to IR, when people generally are not wearing dosimeters, physical dosimetry is not straightforwardly achieved. In such situations, analyses of bioindicators are commonly used as complementary or alternative method to confirm whether the subject was exposed to IR and/or to assess the absorbed dose. Nowadays, these assays have become a reliable tool in radioprotection, and are collectively known as biodosimetry [7–9].

Peripheral blood lymphocytes are extremely sensitive to IR. Chromosomal aberrations (CA) and micronuclei (MN) in human peripheral blood lymphocytes are the most extensively studied system. Having a half-life of about 3 years, blood lymphocytes are normally found at the quiescent G_0 phase of the cell cycle, which makes analyses possible long after a real or suspected exposure [10].

The scoring of radio-induced chromosomal aberrations (stable and unstable) from blood lymphocytes are the bioindicators, most frequently used in order to assess absorbed dose in retrospective evaluation of individual exposures. However, this technique has some limitations due to the time consumption needed for cell culture and analysis, in particular when fast identification of a suspected exposure is necessary [11, 12].

Either chromosome aberrations on micronuclei are formed due to different injuries in DNA molecule caused by IR, such as single and double strand DNA breaks, DNA base damage, apyrimidinic/apurinic sites formation and DNA-protein crosslink's. Moreover, there are those injuries, which induce the expression of several proteins in order to repair such damages [13–14].

Among those proteins expressed during the DNA repair process, p53 is a transcription factor that helps to maintain the genome's integrity, and can be detected in the cytoplasm in small concentration, and with a short average lifetime. When cells suffer the action in IR, an increase of this protein's concentration occurs, along with alterations in its conformation; this is accompanied by an increase in the mean life [15–18]. Thus, the measurement of p53 expression levels may constitute a bioindicator of individual monitoring in case of accidental or suspected exposures to IR.

The advent of fluorescent techniques, particularly flow cytometry (FC), opened new possibilities in terms of detection of intracellular bioindicators. This technique can allow the measurement of multiparameter of cells, such as: size, granularity, and complexity. In the last years, FC has been applied in fast evaluations of surface antigens expression, from intracitoplasmatic and intranuclear location, in a large number of cells. Then, the use of FC to investigate parameter changes in cells exposed to IR, may constitute a fast and reliable method of individual monitoring in cases of accidental or suspected exposures to IR [19, 20].

In this context, the aim of this research was to investigate, by flow cytometry, changes in p53 expression levels from in vitro irradiated human lymphocytes.

Materials and methods

Subjects, sampling, and irradiation process

Blood was collected from four healthy donors (one woman and three men coded as **A**, **B**, **C**, and **D** at Pernambuco Hemocenter (HEMOPE Foundation—Brazil). Following previous agreement and recommendation of the Foundation's ethics committee (N° 046/06), all patients provided written informed consent before the beginning of this study. The criteria used to consider the person as healthy was the result of his/her leukogram within the range considered normal, and the absence of any disease or previous exposure to physical and chemical agents that could alter the p53 protein levels.

From each donor, samples of 50 ml of peripheral blood were divided in five aliquots of 10 ml. For each individual set of samples, one aliquot was used as control, and the remaining four aliquots were separately exposed to a ^{60}Co source (dose rate 18.47 cGy/min), in order to deliver doses respectively of 0.5, 2, 4, and 5 Gy. Then, a total of 20 aliquots have been studied, where 16 of them were exposed to gamma rays, and four were used as control.

Cell culture

After irradiation, human mononuclear cells were separated by Ficoll Paque (density 1.077 g/ml). Thus, cells were re-suspended at 1×10^6 cells/ml in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum. Cell suspension was pipetted into multi-well plates with phytohemagglutinin and incubated for 5 h in a 5% CO_2/air humidified atmosphere at 37°C.

Flow cytometry analysis

Prior to flow cytometry analysis, mononuclear cells were washed with phosphate-buffered saline (pH 7.4), re-suspended in permeabilizing solution, and again washed with Tween 20 solution. In particular, control samples (unirradiated) were employed to define the region for lymphocytes (gate) in the detection system, using CD45 antibody labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC). For all samples, the studied cells were added to the medium along with monoclonal anti-p53 antibody conjugated with phycoerythrin (PE). For the control of label, was employed control antibody IgG_1 with the same isotype conjugated with PE and FITC.

The determination of p53 protein expression levels was performed by using a Becton-Dickinson FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), equipped with a 15 mW argon-ion laser (wavelength 488 nm). The p53 expression levels were quantified by a computational analysis of cells staining positive for this protein, using Cell Quest software version 3.1 (Becton Dickinson immunocytometry systems, San Jose, CA, USA).

Forward and side light scattering and stain-induced fluorescence at two different wavelengths (530 nm, green and 640 nm, red) were simultaneously measured from each cell. The forward scatter (FSC) signal is proportional to the

cell size, whereas the side scatter (SSC) signal is proportional to cellular granularity (intracellular superstructure). Based on these two parameters, it was possible to discriminate the lymphocytes gate for acquisition.

The target region (gate) of analysis was obtained from parameters FSC and SSC in linear scale and FL2 in logarithmic scale, which detect the red fluorescence, i.e., the antigen/antibody reaction conjugated to PE, and FL1 to detect the green fluorescence, i.e., the antigen/antibody reaction conjugated to FITC. Each analysis included 10,000 events.

Results

Prior to the flow cytometry, it was verified if all blood samples had lymphocytes concentrations within the range considered normal. This procedure was performed for all aliquots after irradiation and for the control one. From Table 1, it is possible to notice the lymphocytes concentration measured in the samples from donors **A**, **B**, **C**, and **D** before and after in vitro irradiation.

Table 2 shows the values of p53 protein expression levels measured in the samples from donors **A**, **B**, **C** and **D** in correlation with the absorbed doses (0.5, 2, 4, and 5 Gy) and in the no irradiated control samples. The cutoff with the labels with control antibody IgG_1 conjugated with PE and FITC, that is the background, was for all samples <0.40%. As shown, the p53 expression level raised with the absorbed dose, except for 5 Gy for subject **A**, and surprisingly higher for subject **D**.

Table 1 Lymphocytes concentration before (control samples) and after in vitro irradiation

Doses (Gy)	Lymphocytes/mm^3 of peripheral blood			
	A	B	C	D
Control	2,400	1,600	1,300	1,500
0.5	2,000	2,000	1,400	1,600
2	1,900	1,600	1,800	1,700
4	2,000	1,500	1,600	1,700
5	2,100	1,500	1,400	1,600

Table 2 p53 Protein expression levels in all samples analyzed with correlated absorbed doses

Samples of Individual	Dose radiation (Gy)				
	Control	0.5	2	4	5
	Expression levels (%)				
A	0.05	0.27	1.19	3.05	2.26
B	0.23	1.05	2.45	2.69	4.95
C	0.16	1.97	4.82	5.36	5.98
D	0.74	8.23	18.22	26.17	29.06

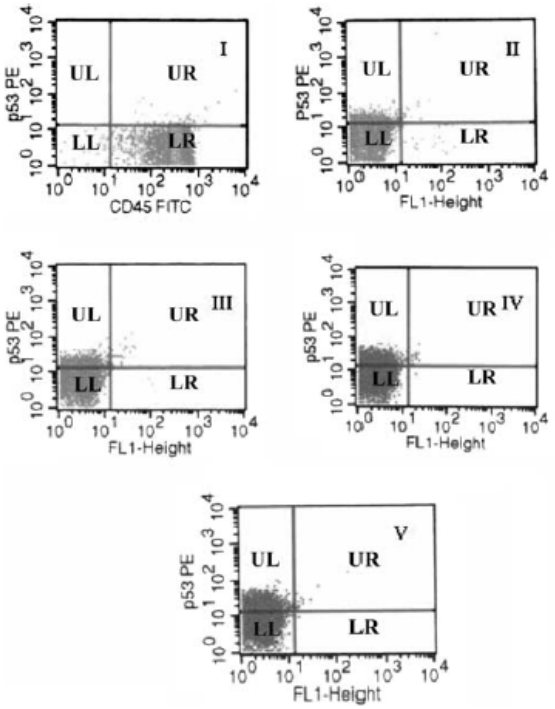


Fig. 1 Dot-plot from sample of the subject **D**

Figure 1 presents results of sample analyses from subject **D** by flow cytometry exposed to different doses: I (Control); II (0.5 Gy); III (2 Gy); IV (4 Gy); V (5 Gy). In the graphic provided by the software (Dot-Plot), it is possible to localize the cells of interest into four regions: (a) UL (Up Left); (b) UR (Up Right); (c) LL (Low Left); (d) LR (Low Right). In dot-plot I (control sample) is observed in region LR cells positively marked for CD45 and in dot-pot II, III, IV, and V is observed in region UL cells positively marked for p53.

Discussion

Table 1 shows that there is no significant difference in the concentrations of lymphocytes before and after irradiation, for all samples and all absorbed doses (0.5, 2, 4, and 5 Gy), indicating no interference due to sex and age, presenting values from 1,300 to 2,400 lymphocytes/mm^3. According to the International Atomic Energy Agency, the concentrations considered normal ranges from 1,300 to 4,800 lymphocytes/mm^3. This result was interesting because according to Bushong (1997), it was expected to

observe a reduction of the levels of lymphocytes from doses of 2 Gy [1, 21].

On the basis of the results obtained in the questionnaire filled by the donors, all of them have told that they do not have knowledge of previous exposures to chemical or physical agents, and none of them have had any disease that could cause changes in the hematological exams [22].

In Table 2, it is possible to verify that the p53 expression levels in samples of subject, **B**, **C**, and **D** have increased for all absorbed doses, but slightly less for 5 Gy in the case of subject **A**, compared to the previous dose (4 Gy). This result was expected according to Levine (1997), who claim that the increase in p53 protein expression levels raises with the extent of DNA damage, thus, the bigger the absorbed dose to the cell, the greater the cellular damage [15]. In other words, the increase of p53-positive cells correlates with increased absorbed dose. One small exception is a slight reduction for subject **A**, for the dose of 5 Gy. This fact could be related to the apparent suppression of p53 expression in the cells of this donor for doses higher than 4 Gy.

Figure 1 presents Dot-plot from subject **D** blood sample. In dot plot I (LR) confirmed the presence of lymphocytes population as the antigen CD45 is present in all the leukocytes. On the other hand, in dot-plots II, III, IV, and V, the region LL contains the population of negative cells, while the cells positively marked for p53 are found in UL (*y*-axis) as a result of wavelength associated to fluorochrome used. However, the software (CellQuest) shows FL1-height as *x*-axis, by default, even this is not employed in such analyses.

The subject **D** blood samples who provided the highest values of p53 expression for the control and for all absorbed doses. This particularity may reflect individual differences in radiosensitivity. However, further studies are necessary to examine such biological variability in p53 expression among individual of a normal population [23].

Even with higher values of p53 expression, samples from subject **D** also showed the same behavior by in vitro irradiation observed in the others samples, that is, increasing the absorbed dose, the expression of p53 also increases. This argument shows that there is no drawback in using this methodology to confirm if subject **D** was exposed, when the individual background is previously known. Moreover, besides the information of a possible individual exposure to IR, this method can possibly predict radiosensitivity or possibly radioresistence in the normal cells, which is helpful in cases of screening before radiotherapy, for example [14, 24, 25].

The role of p53 in the cell survival after irradiation can vary depending on its function, as a factor of stopping the cell cycle or leading the cell to apoptosis. It has been observed that in many models, the increase of cell radiosensitivity is related to the loss of this protein function. Experiments carried out on rats with low p53 and on rats with inactive p53 have shown results indicating this protein as an important factor to activate the apoptotic way in tissues after exposure to IR [14].

In particular, the protocol developed in this work can be performed rapidly in about 6 h, compared with the weeks or months required by cytogenetic dosimetry [11, 12]. This may be particularly important for medical decisions of highly irradiated casualties, where early decisions (<1 week) need to be taken, such as the administration of cytokine growth factors and preparation for stem cell transplantation. For this reason, values of doses chosen for this research (0.5, 2, 4, and 5 Gy) span the dose range of acute radiation syndrome.

In the case of a large-scale incident, where many people may have been exposed, the methodology here proposed may play an important role in national emergency procedures. This suggests that the evaluation of p53 expression levels by flow cytometry may be used as medical triage, prior to conventional cytogenetic dosimetry that still needs to be carried out, in order to assess the individual absorbed dose. Hence, further studies must be carried out, based on a greater number of subjects, to evaluate its usefulness to identify individual radiatosentivity, and to estimate the absorbed dose considering interindividual differences.

Acknowledgments The authors would like to thank Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE-Brazil), Centro de Radioterapia de Pernambuco (CERAPE-Brazil) for providing laboratory facilities; Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnológico (CNPq-Brazil) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Brazil) for financial support. We warmly acknowledge the contributions of Tarciana Soares and Ana Paula Galvão da Silva.

References

1. International Atomic Energy Agency (IAEA) (2001) Cytogenetic analysis for radiation dose assessment. Technical report series, Vienna, 405
2. Lloyd D (1998) New developments in chromosomal analysis for biological dosimetry. Radiat Prot Dosimetry 77:33–36
3. Voisin P (1997) Chromosome lesions as short and medium term biological indicator of acute irradiation. In: Court L, Lallemand A (eds) L'homme blessé. Paris, France: EDF, pp 139–150
4. Voisin P, Benderitter M, Claraz V, Chambrette I, Sorokinedurm M, Delbos V, Durand A, Lpaillole N (2001) The cytogenetic dosimetry of recent accidental overexposure. Cell Mol Biol 47:557–565
5. Lloyd DC, Edwards AA (1983) Radiation-induced chromosome damage in man. New York: Alan R. Liss. Inc
6. International Commission on Radiological Protection (ICRP) (1990) Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. Elmsford, NY: Pergamon Press, ICRP Publication Report 60
7. Amundson AS, Grace MB, McLeland CB, Epperly MW, Yeager A, Zhan Q, Greenberger JS, Fornace AJ Jr (2004) Human in vivo radiation-induced biomarkers: gene expression changes in radiotherapy patients. Cancer Res 64:6368–6371

8. Amaral A (2002) Trends in biological dosimetry: an overview. Braz Arch Biol Technol 45:119–124
9. Amaral A (2005) Physical and biological dosimetry for risk perception in radioprotection. Braz Arch Biol Technol 48(1):229–234
10. Ramalho AT, Curado MP, Natarajan AT (1995) Lifespan of human lymphocytes estimated during a six year cytogenetic follow-up of individuals accidentally exposed in 1987 radiological accident in Brazil. Mutat Res 331:47–54
11. Fernandes TS, Amaral A, Brayner Cavalcanti M, Braga LRP, Melo RAM, (2006) Unstable chromosomal aberration and micronuceli analyses in the biomonitoring of workers occupationally exposed to ionising radiation. Interat J Low Radiat 3(4):299–309
12. Fernandes TS, Brayner Cavalcanti M, Netto JMF, Costa MB, Melo RAM, Amaral A (2005) Emprego da técnica de bandeamento C em dosimetria citogenética. Revista brasileira de pesquisa e desenvolvimento 6:137–142
13. Tamulevicius P, Wang M, Iliakis G (2007) Homology-directed repair is required for the development of radioresistance during S phase: interplay between double-strand break repair and checkpoint response. Radiat Res 167:1–11
14. Gudkov AV, Komarova EA (2007) The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. Nat Rev Rancer 3: 117–129
15. Levine AJ (1997) p53 the cellular gatekeeper for growth and division. Cell 88:323–331
16. Drané P, Alvarez S, Meiller A, May E (2002) L'activation de la protéine p53, un événement déterminant de la réponse cellulaire aux radiations ionisantes. Médecine nucléaire imagerie fonctionnelle et métabolique 26(3):139–147
17. Snustad PD, Simmons MJ (2001) Fundamentos de genética, 2rd edn. Wiley, New York pp 1–664
18. Fei P, El-Deiry W (2003) P53 and radiation responses. Oncogene 22:5774–5783
19. Cavalcanti Júnior GB, Scheiner MAM, Oliveira JGP, Vasconcelos FC, Ferreira ACS, Maia RC (2003) Citometria de fluxo, imunocitoquímica e western blot na detecção da expressão da proteína p53 em células tumorais: uma análise comparativa. Revista brasileira de analises clínicas 35(3):125–142
20. Cavalcanti Júnior GB, Scheiner MA, Oliveira JGP, Vasconcelos FC, Dobbin JA, Klumb CE, Maia RC (2004) Detecção da proteína p53 em células leucêmicas por citometria de fluxo e western blot. Revista brasileira de cancerologia 50(3):191–202
21. Bushong C (1997) Radiologic science for technologists: physics, biology, and protection, 6th edn. The C. V. Mosby, St Louis
22. Rössner PJ, Chvatalova I, Schmuczerova J, Milcova A, Rössner P, Sram R (2004) Comparasion of p53 levels in lymphocytes and in blood plasma of nuclear power plant workers. Mutat Res 556:55–63
23. Benotmane A (2004) Molecular aspects of individual radiosensitivity. J Biol Regul Homeost Agents 18:357–362
24. Alsbeih G, El-Sebaie M, Al-Rajhin, et al (2004) Relationship between radiosensitivity and normal tissue complications in Saudi cancer patients treated with radiotherapy. J Egyp Natl Canc Inst 16(4):216–223
25. Burnet NG, Wurm R, Nyman J, Peacock J (1996) H. Normal tissue radiosensitivity – how important is it? Oncol Clin 8:25–34