

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

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

**UTILIZAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO PARA AVALIAÇÃO
DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA p53 EM LINFÓCITOS
DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO IRRADIADOS *IN VITRO***

MARIANA BRAYNER CAVALCANTI

**RECIFE-PERNAMBUCO-BRASIL
OUTUBRO-2005**

**UTILIZAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO PARA AVALIAÇÃO
DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA p53 EM LINFÓCITOS
DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO IRRADIADOS *IN VITRO***

MARIANA BRAYNER CAVALCANTI

**UTILIZAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO PARA AVALIAÇÃO
DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA p53 EM LINFÓCITOS
DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO IRRADIADOS *IN VITRO***

Dissertação de Mestrado 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 Mestre em Ciências. Área de Concentração: Dosimetria e Instrumentação Nuclear.

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

CO-ORIENTADORA: DRA. CÍNTIA GONSALVES DE FARIA MACHADO (HEMOPE)

**RECIFE-PERNAMBUCO-BRASIL
OUTUBRO-2005**

C376u

Cavalcanti, Mariana Brayner.

Utilização da citometria de fluxo para avaliação dos níveis de expressão da proteína p53 em linfócitos do sangue periférico humano irradiados in vitro. – Recife: O Autor, 2005.

ix, 84 folhas. : il. ; fig., tabs.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Energia Nuclear, 2005.

Inclui bibliografia.

1. Dosimetria e instrumentação nuclear. 2. Biodosimetria – Proteína p53. 3. Citometria de fluxo – Proteína p53. 4. Proteína p53 – Análise – Linfócitos humano. I. Título.

572.52 CDD (22.ed.)

UFPE
BCTG/2006-72

**UTILIZAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO PARA AVALIAÇÃO
DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA p53 EM
LINFÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO
IRRADIADOS *IN VITRO***

Mariana Brayner Cavalcanti

APROVADA EM: 07.10.2005

ORIENTADOR : Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral

CO-ORIENTADORA : Dra. Cíntia Gonsalves de Faria Machado

COMISSÃO EXAMINADORA:



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

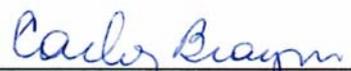


Dr. Aderson da Silva Araújo – HEMOPE



Prof. Dr. Romilton dos Santos Amaral – DEN/UFPE

Visto e permitida a impressão



Coordenador do PROTEN/DEN/UFPE

*À Mainha, Painho, Delano e vovó Lila (in memoriam),
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu querido e bom **Deus**, pela força e sabedoria para a realização deste trabalho. Sou grata pelas flores disfarçadas de espinhos e pela coragem para tocá-las. Obrigada Senhor!

Aos meus queridos Pais, **Vânia** e **Arlindo**, que mais uma vez, não limitaram esforços para que meu sonho se tornasse real; por mostrarem o quanto é bom e gratificante lutar pela realização dos nossos sonhos. Essa vitória também é de vocês.

Ao meu marido **Delano**, pelo amor, carinho, companheirismo, amizade e incentivo que sempre me foram dados. Pela compreensão, pois diversas vezes estive ausente. Pela paciência, por aperseios e estresses. Pelo apoio moral, intelectual e afetivo. Por estar sempre presente durante meu crescimento profissional. Muito obrigada!

À **vovó Lila**, “Lilú”, (*in memorian*) pelo exemplo de vida. Pelos seus ensinamentos. Por sempre mostrar que a vida deve ser bem vivida. Minha gratidão será eterna!

Aos meus **familiares** pelo apoio e incentivo durante toda minha vida acadêmica.

Ao meu orientador, **Prof. Ademir Amaral**, pela amizade, ensinamento, incentivo, dedicação, sinceridade, paciência e pela confiança que depositou em mim para a realização deste trabalho.

À minha co-orientadora, **Dra. Cíntia Machado**, pela orientação, ensinamento, amizade e por disponibilizar o laboratório do para a execução deste trabalho.

A **Thiago** e **Laélia** pela amizade, incentivo, paciência, ensinamento e discussões. Pelos bons momentos que vivemos durante os dois anos de convívio no Laboratório de Modelagem e Biodosimetria Aplicada (**LAMBDA**). Obrigada, Amigos!

À **Amélia**, “Amelinha”, pelos ensinamentos, amizade e pela total dedicação neste trabalho.

Aos **amigos do GERAR** pela amizade, apoio e incentivo.

Aos **amigos do DEN**, pela agradável amizade.

Aos **Professores do DEN** por todo o aprendizado, em especial ao coordenador do curso, **Prof. Carlos Alberto Brayner de Oliveira Lira**, pela amizade, paciência e total dedicação ao PROTEN.

Aos **Funcionários do DEN**, em especial, a **Magali, Sr. Edvaldo, Sr. Antônio e Maria (Lia)** pelas ajudas recebidas.

Aos membros das bancas examinadoras, **Dr. Aderson Araújo, Dr. Jonathan Melo, Prof. Dra. Suely Oliveira, Prof. Dr. Raul Melo, Prof. Dr. José Luiz, Prof. Dr. Romilton Amaral, Prof. Dr. Waldeciro Colaço**, pelas valiosas sugestões para a elaboração deste trabalho.

Ao laboratório de Citogenética do HEMOPE, em especial a **Dra. Júlia Netto, Dra. Márcia Costa, Dra. Graça Sotero, Ana Pedrosa e Bernadete Brito** pela amizade e por disponibilizarem o espaço para a execução dos experimentos.

A **todos do Laboratório de Imunofenotipagem** do HEMOPE em especial à **Anelita e Amélia** pelos ensinamentos, apoio, amizade e por disponibilizarem os equipamentos.

Aos **amigos do HEMOPE**, em especial à **Fárida, Washington, Catarina, Diogo, Neyliane, Camilla, Júlia, Magnus e Micheline**, pela amizade, apoio, por disponibilizarem materiais, e pelos bons momentos compartilhados juntos no HEMOPE.

A minhas amigas **Danielle Maia e Alziana Moreno** pela amizade, incentivo, ensinamento e pela doação de alguns materiais necessários para esta pesquisa.

Ao **Centro de Radioterapia de Pernambuco (CERAPE)**, em especial a **Jonathan Melo, Dr. Homero Cavalcanti e Taciana Soares**, por disponibilizarem o aparelho de Radioterapia para a irradiação das amostras.

À **Unidade de Laboratórios Especializados (UNILABE)** do HEMOPE, pelo espaço cedido para a realização deste trabalho.

À empresa **AMBRIX** pela doação do anticorpo utilizado nesta pesquisa.

À empresa **CUTILAB** pela doação de reagentes utilizados nesta pesquisa.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo apoio financeiro.

A todos, minha eterna Gratidão!

SUMÁRIO

<i>LISTA DE FIGURAS</i>	<i>iv</i>
<i>LISTA DE TABELAS</i>	<i>v</i>
<i>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</i>	<i>vi</i>
<i>RESUMO</i>	<i>viii</i>
<i>SUMMARY</i>	<i>ix</i>
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Efeitos biológicos da radiação ionizante	3
2.2 Classificação dos efeitos biológicos	8
2.2.1 Efeitos determinísticos e estocásticos.....	9
2.2.1.1 Síndrome da Radiação Aguda	9
2.2.2 Efeitos imediatos e tardios.....	10
2.2.3 Efeitos somáticos e hereditários	10
2.2.3.1 Radiosensibilidade celular	11
2.3 Grandezas dosimétricas	13
2.3.1 Dose absorvida	13
2.3.2 Dose equivalente.....	14
2.3.3 Dose efetiva	15
2.4 Métodos dosimétricos	16
2.4.1 Modelos numéricos.....	17
2.4.2 Dosimetria física.....	18
2.4.3 Dosimetria biológica.....	18
2.5 Linfócitos	20

2.6 Ciclo celular.....	22
2.6.1 Pontos de checagens do ciclo celular	25
2.7 Gene supressor de tumor <i>TP53</i>	26
2.7.1 Descobrimto da proteína p53	27
2.7.2 Estabilidade da proteína p53.....	27
2.7.3 A importância da p53 no ciclo celular em resposta à radiação ionizante.....	28
2.8 Métodos de análise da proteína p53.....	31
2.8.1 Western Blot.....	31
2.8.2 Imunocitoquímica e Imunohistoquímica	31
2.8.3 Citometria de Fluxo	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 Escolha de doadores	41
3.1.1 Critérios de inclusão e seleção de indivíduos doadores	42
3.1.2 Critérios de exclusão	42
3.2 Procedimento da coleta das amostras de sangue periférico	43
3.2.1 Escolha do anticoagulante	43
3.3 Hemograma.....	44
3.4 Controle negativo das amostras	44
3.5 Especificações das condições de irradiação.....	44
3.6 Arranjo experimental.....	45
3.7 Meio de cultura	46
3.8 Meio nutritivo	46
3.9 Mitógeno	47
3.10 Cultivo celular.....	47
3.11 Obtenção da camada de células mononucleares.....	48
3.11.1. Concentração celular	50
3.12 Incubação de cultura	51

3.13 Citometria de fluxo	52
3.13.1 Permeabilização celular	52
3.13.2 Marcação Celular	52
3.13.3 Leitura e análises	53
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1 Estudos preliminares	57
4.2 Concentrações de linfócitos das amostras estudadas	57
4.3 Níveis de expressão da proteína p53 em linfócitos não cultivados	58
4.4 Escolha do período do cultivo celular	60
4.5 Níveis de expressão da proteína p53 das amostras controle	62
4.6 Irradiação das amostras com doses de: 50, 200, 400 e 500 cGy	63
4.7 Avaliação da metodologia aplicada na pesquisa	68
5 CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
ANEXO I	78
ANEXO II	80
ANEXO III	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Interação de radiações de alto e baixo LET com uma célula.	5
Figura 2. Efeito direto e indireto da radiação ionizante.	7
Figura 3. Fenômenos biológicos resultantes de uma exposição à radiação ionizante.	12
Figura 4. Esfregaço de sangue humano mostrando um linfócito.	20
Figura 5. Fases do ciclo celular.	24
Figura 6. Pontos de checagem no ciclo celular.	25
Figura 7. Direcionamento das amostras no citômetro de fluxo.	34
Figura 8. Propriedades da célula através da análise do FSC e SSC.	35
Figura 9. Diferentes populações celulares baseadas em características do FSC e do SSC.	37
Figura 10. Formação do pulso de voltagem.	38
Figura 11. Irradiação das amostras.	45
Figura 12. Obtenção da camada de células mononucleares.	49
Figura 13. Obtenção do precipitado celular.	50
Figura 14. Citômetro de fluxo.	53
Figura 15. Obtenção da população de linfócitos (<i>gate</i>).	54
Figura 16. Gráfico das regiões que permitem localização das células de interesse.	55
Figura 17. Etapas metodológicas.	56
Figura 18. <i>Dot-plots</i> do indivíduo C.	67
Figura 19. Proteína p53 ligada a uma molécula de DNA.	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sinais e sintomas clínicos da SAR.....	10
Tabela 2. Radiossensibilidade de algumas células.....	11
Tabela 3. Fatores de ponderação das RI.....	14
Tabela 4. Fatores de ponderação para órgãos ou tecidos (W_T)	15
Tabela 5. Limites primários anuais de dose equivalente	16
Tabela 6. Limites primários anuais de dose equivalente	17
Tabela 7. Comparação entre as metodologias de aberrações cromossômicas instáveis (ACI) e micronúcleos (MN)	19
Tabela 8. Análise comparativa entre a citometria de fluxo, imunocitoquímica e Western Blot.....	39
Tabela 9. Dados obtidos através do questionário apresentado aos indivíduos.....	42
Tabela 10. Comparação entre as metodologias de incubação de cultura	47
Tabela 11. Concentração de linfócitos das amostras de sangue periférico	57
Tabela 12. Níveis de expressão da proteína p53 em linfócitos não incubados	59
Tabela 13. Progressão dos linfócitos após a estimulação com a fitohemaglutinina.....	60
Tabela 14. Níveis de expressão da proteína p53 após diferentes períodos de incubação.....	61
Tabela 15. Níveis de expressão da proteína p53 das amostras controles	62
Tabela 16. Níveis de expressão da proteína p53 após irradiação com 50 cGy.....	63
Tabela 17. Níveis de expressão da proteína p53 após irradiação com 200 cGy.....	64
Tabela 18. Níveis de expressão da proteína p53 após irradiação com 400 cGy.....	64
Tabela 19. Níveis de expressão da proteína p53 após irradiação com 500 cGy.....	65
Tabela 20. Níveis de expressão da proteína p53 nas amostras analisadas	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACI	Aberrações Cromossômicas Instáveis
ATM	Ataxia Telangiectasia-Mutated
ATP	Adenosina Trifosfato
CdC	Ciclinas
CdK	Ciclina Dependentes de Kinases
CERAPE	Centro de Radioterapia de Pernambuco
CF	Citometria de Fluxo
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
D	Dose Absorvida
DBS	Quebra da simples e dupla cadeia do DNA
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
E	Dose Efetiva
Gy	Gray
HEMOPE	Fundação de Hematologia e Hemoterapia
H ₂ O	Molécula de água
H _T	Dose Equivalente no Tecido ou Órgão
IAEA	Agência Internacional de Energia Atômica
ICQ	Imunocitoquímica
ICRP	Comissão Internacional de Proteção Radiológica
ICRU	Comissão Internacional de Medidas e Unidades de Radiação
IH	Imunohistoquímica
J	Joule
kb	Quilobases
kDa	Quilodalton
keV	Quiloeletron volt
kg	Quilograma
LET	Transferência Linear de Energia
Mdm2	Mouse doublé minute 2
MN	Micronúcleo
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico

PE	Phycoerythrin
RB	Riboblastoma
RBE	Eficiência Biológica Relativa
RI	Radiação Ionizante
SAR	Síndrome da Radiação Aguda
SI	Sistema Internacional
Sv	Sievert
SV-40	Simians Vírus
UNILABE	Unidade de Laboratórios Especializados
UV	Ultravioleta
WB	Western Blot
W_R	Fator de ponderação da radiação
W_T	Fator de ponderação de órgãos ou tecidos
μm	Micrometro

UTILIZAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO PARA AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA p53 EM LINFÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO IRRADIADOS *IN VITRO*

Autora: Mariana Brayner Cavalcanti

Orientador: Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral (DEN-UFPE)
Co-Orientadora: Dra. Cíntia Gonsalves de Faria Machado (HEMOPE)

RESUMO

A radiação ionizante (RI) pode causar diferentes tipos de danos no DNA, induzindo o aumento da expressão de diversas proteínas fundamentais no processo de reparação celular. Dentre essas proteínas, a proteína p53 é responsável pela conservação da integridade do genoma. Os danos resultantes da interação de agentes físico-químicos com a molécula de DNA podem ocasionar o aumento da concentração e da vida média desta proteína. A correlação entre o aumento dos níveis de expressão da p53 e o nível de irradiação pode constituir um método eficaz em casos de investigações de exposições à RI. Neste sentido, esta pesquisa teve como objetivo a avaliação de um protocolo para a análise dos níveis de expressão da proteína p53 em linfócitos do sangue periférico humano, após irradiação *in vitro*, utilizando a técnica de citometria de fluxo (CF). Para a quantificação dos níveis de expressão protéica, amostras de sangue periférico de indivíduos sadios foram irradiadas *in vitro*, com doses conhecidas. Em seguida, os linfócitos foram separados e re-suspensos em meio de cultura celular, onde permaneceram em estufa por um período de 5 horas. Após este período, a quantificação das células positivamente marcadas para a proteína p53 foi realizada pela CF. A partir do protocolo estabelecido nesta pesquisa, foi possível detectar um aumento dos níveis de expressão da proteína p53 para doses acima de 0,5 Gy, sugerindo o emprego da quantificação da p53 pela citometria de fluxo, como biomarcador em casos de suspeita de exposição aguda à RI.

USE OF THE FLOW CYTOMETRY FOR EVALUATION OF THE p53 PROTEIN EXPRESSION LEVELS IN LYMPHOCYTES OF THE HUMAN PERIPHERAL BLOOD IRRADIATED *IN VITRO*

Author: Mariana Brayner Cavalcanti

Adviser: Prof. Dr. Ademir de Jesus Amaral

Co-Adviser: Dra. Cíntia Gonsalves de Faria Machado

SUMMARY

Ionizing radiation (IR) can cause different injuries in DNA, which induce the expression of several proteins in order to repair radioinduced damages. Among the different proteins expressed during the repair process, p53 has an important role in maintenance of the genome's integrity. This protein is found in the cytoplasm in small concentration and has a short average life. However, the increase in concentration and average life of the expression of p53 protein can be induced by a variety of physicochemical agents harmful to the DNA molecules. Thus, the correlation between the increasing of p53 expression and an irradiation may constitute a fast and reliable method of individual monitoring in cases of accidental or suspected exposures to IR. This research was aimed at evaluating the use of flow cytometry for detection of p53 protein expression levels in lymphocytes from the peripheral blood samples, following *in vitro* irradiation. For quantification of such expression levels of the p53 protein a protocol was defined in order to establish a methodology of analysis carried out using flow cytometry as detector system. The mononuclear cells were separated and re-suspended in RPMI medium enriched with fetal calf serum and incubated during different of time intervals. By shaping this methodology, it was possible to verify an increase of the levels of expression of the p53 protein for dose above 0.5 Gy. This research emphasizes flow cytometry as an important tool for quantifying p53 protein expression levels in lymphocytes from peripheral human blood in the investigation of possible acute radiation exposures.

1. INTRODUÇÃO

A radiação ionizante (RI), ao interagir com a célula, pode produzir vários tipos de lesões, sendo as mais importantes aquelas que estão relacionadas com a molécula de ácido desoxirribonucléico (DNA), tendo em vista sua importância no armazenamento e na transmissão das informações genéticas. Sendo assim, os mecanismos de reparo do DNA são essenciais, pois erros ocorridos no processo de reparação ocasionam mutações na própria molécula. Estas mutações podem ser transmitidas para as células filhas, levando ao câncer ou à morte celular.

No ciclo celular, existem dois pontos de checagem (*checkpoints*), a fim de que a célula mantenha a integridade do material genético que está sendo duplicado. Estas checagens ocorrem no final da fase G1 (ponto de controle G1/S) e no final da G2 (ponto de controle G2/M) do ciclo celular. A identificação de danos no DNA implicará na interrupção do processo de divisão celular para reparação dessas moléculas. A proteína p53 está diretamente relacionada com o controle do ciclo celular, proliferação celular, reparação e síntese de DNA, diferenciação celular e com o fenômeno da morte celular programada (apoptose).

A proteína p53 se encontra inativa no citoplasma em baixas concentrações e tem uma vida média inferior a 20 minutos. Entretanto, um aumento da concentração dessa proteína ocorre geralmente quando as células sofrem a ação de agentes físico-químicos que modifiquem o DNA, com possíveis alterações estruturais. Nestas condições, observa-se um aumento da sua vida média, passando a ser da ordem de 24 horas e tornando possível sua detecção por diferentes métodos laboratoriais. Dentre os métodos atualmente empregados, destaca-se a técnica de citometria de fluxo.

A correlação entre o aumento do nível de expressão da proteína p53 e a exposição à RI, pode constituir um método eficaz no monitoramento individual. Com isso, a avaliação dos níveis de expressão desta proteína pode representar um biomarcador de exposição à radiação ionizante.

Neste contexto, esta pesquisa teve como objetivo principal o estabelecimento de um protocolo metodológico, utilizando a citometria de fluxo, para a análise dos níveis de expressão da proteína p53 em linfócitos do sangue periférico humanos em casos de exposição aguda à radiação ionizante.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Efeitos biológicos da radiação ionizante

Os efeitos biológicos da radiação ionizante (RI) em seres humanos resultam das interações da radiação com átomos e moléculas que constituem o tecido vivo. Essas interações excitam e/ou ionizam os orbitais eletrônicos dos átomos, tendo como uma das conseqüências a liberação de energia ao nível celular.

Os eventos que podem ocorrer quando a RI interage com o corpo humano são (BUSHONG, 1997; OKUNO, 1988):

- ❖ Produção de alterações celulares, podendo estas serem reparadas por proteínas e/ou enzimas. Caso o reparo seja eficiente e em curto tempo, o DNA pode voltar à composição original, sem conseqüências posteriores;
- ❖ Indução à morte celular ou tornando-a incapaz de se reproduzir;
- ❖ Lesão no DNA do núcleo da célula, sem, no entanto, provocar a morte celular. Neste caso, a célula sobrevive e se reproduz na sua forma modificada, transmitindo a alteração genética a sua progênesse (célula filha) o que poderá ocasionar, somando-se a outros eventos, uma transformação neoplásica ou doenças degenerativas.

Assim, para que os efeitos biológicos radioinduzidos ocorram é necessário que as estruturas moleculares atingidas absorvam a energia da radiação, definida como dose absorvida, a qual será discutida mais adiante.

Segundo a Comissão Internacional de Medidas e Unidades de Radiação – ICRU (*International Commission on Radiation Units and Measurements*), a grandeza que relaciona a transferência de energia por unidade de comprimento, num determinado meio, é chamada de Transferência Linear de Energia [*Linear Energy Transfer* (LET)], definida na Equação 1 (ICRU 16, 1970).

$$\text{LET} = \frac{dE}{dl} \quad (1)$$

Onde: dE é a energia média depositada localmente, por unidade de percurso dl , no meio absorvedor do feixe de radiação. Em geral, o LET é expresso em keV/ μm .

LET é importante para relacionar o nível potencial de danos biológicos causados por diferentes tipos de radiação, uma vez que cada tipo de radiação ionizante transfere diferentes quantidades de energia por unidade de percurso da trajetória da radiação num determinado meio biológico. Dessa forma, as radiações são classificadas como sendo de alto ou de baixo LET (JAYARAMAN & LAWRENCE, 1996).

As radiações X e gama são normalmente consideradas radiações de baixo LET, por possuírem um alto poder de penetração, sendo responsáveis por uma baixa densidade de ionização por micrometro percorrido no meio de interação e, conseqüentemente, pela produção de poucos efeitos biológicos, quando comparadas com radiações de alto LET (DOWD & TILSON, 1999).

Por outro lado, radiações de alto LET, como as partículas alfa e beta, possuem um pequeno poder de penetração, produzem um grande número de ionizações por micrometro percorrido, resultando em maiores danos biológicos quando comparadas com radiações de baixo LET (DOWD & TILSON, 1999).

A Figura 1 compara, esquematicamente, as interações da radiação de alto e de baixo LET com a célula humana. A seta em vermelho representa uma radiação de alto LET, que possui um baixo poder de penetração na célula e uma alta densidade de ionização (representada pelos “X” em vermelho), e conseqüentemente, um maior dano celular. A seta em preto representa uma radiação de baixo LET, onde o seu poder de penetração é maior e sua densidade de ionização é menor (representada pelos “X” em preto), provocando um dano celular menor.

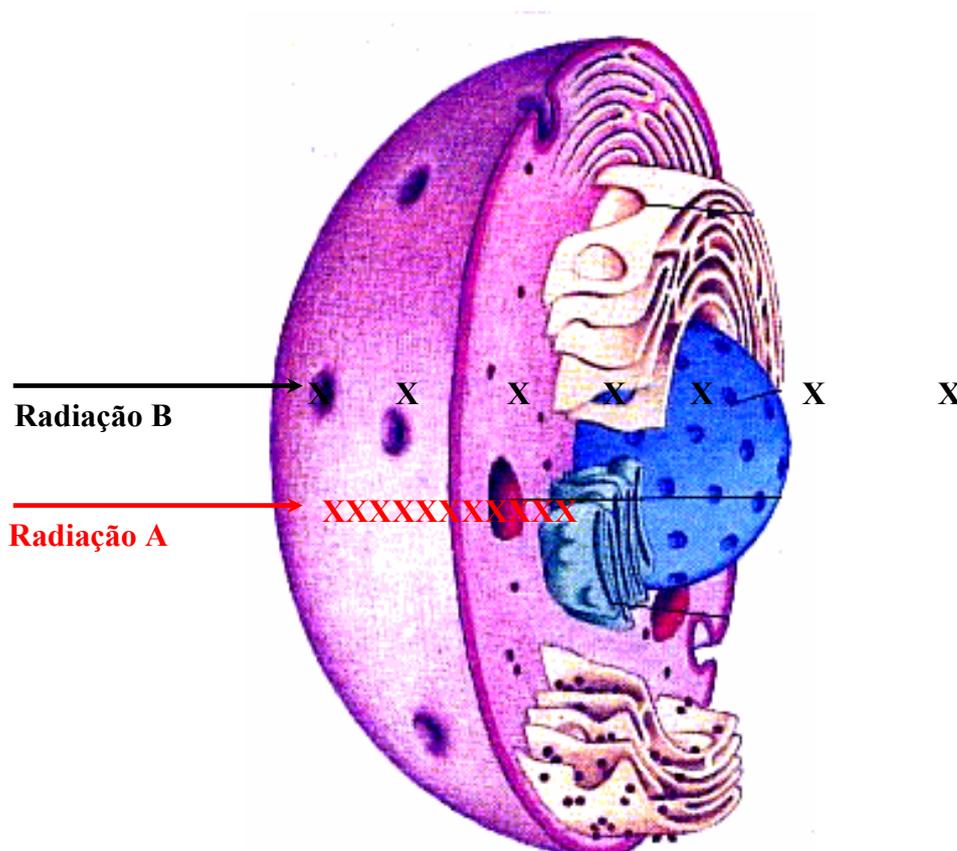


Figura 1. Interação de radiações de alto e baixo LET com uma célula.
(adaptado a partir de <http://endrino.cnice.mecd.es/~hotp0060/mariasantos/celanim.gif>)

A grandeza LET pode ser relacionada com a unidade de medidas para efeito biológico denominada Eficiência Biológica Relativa [*Relative Biologic Effectiveness* (RBE)], definida na Equação 2 (ICRU 16, 1970; ICRP 60, 1990).

$$\text{RBE} = \frac{\mathbf{D}_r}{\mathbf{D}_x} \quad (2)$$

Onde: \mathbf{D}_r é a dose da radiação de referência necessária para produzir um determinado efeito biológico; \mathbf{D}_x é a dose da radiação teste necessária para produzir o mesmo efeito biológico. RBE se refere a um fenômeno biológico específico, de tal maneira que, para uma mesma radiação, a RBE será diferente segundo o efeito biológico que se estuda (TAUHATA et al., 2003).

A relação entre LET e RBE depende do efeito biológico considerado, quando o LET da radiação aumenta, a capacidade da radiação de produzir um dano biológico também aumenta, ou seja, a RBE também aumenta. Com isso, a RBE é normalmente empregada para comparar radiações de alto e de baixo LET, em termos de efeitos biológicos (DOWD & TILSON, 1999).

RBE aumenta para um valor máximo de cerca de 100 keV/ μm e então decai com valores mais elevados de LET. Para este valor, a média de separação entre dois eventos de ionização coincide com o diâmetro da dupla hélice de DNA (cerca de 2 nm). A RBE será máxima para valores de LET onde a ionização que produz dano no alvo ocorre sem perda de energia, isto é, sem depositar mais ionização do que é preciso. Portanto, radiações com LET acima de 100 keV/ μm depositarão mais energia no alvo que necessário para produzir a quebra da dupla fita de DNA, e nestas circunstâncias, a RBE decai com o aumento do LET (HALL, 1994; IAEA, 2001).

Dos danos celulares causados pela RI, os mais importantes são os relacionados à molécula de DNA, uma vez que esta é a responsável pelo armazenamento e transporte das informações genéticas. As interações da RI com o DNA ocorrem através de dois mecanismos: o efeito direto e o indireto (BUSHONG, 1997; OKUNO, 1988). A Figura 2 ilustra esquematicamente o efeito direto e o indireto da RI quando esta interage com a matéria viva. No efeito direto, a radiação ionizante interage diretamente com as moléculas que compõem a estrutura do DNA (DOWD & TILSON, 1999). Por outro lado, o efeito indireto resulta da formação de radicais livres, geralmente originados por modificações das moléculas de água (H_2O), que constituem os meios intra e extracelulares.

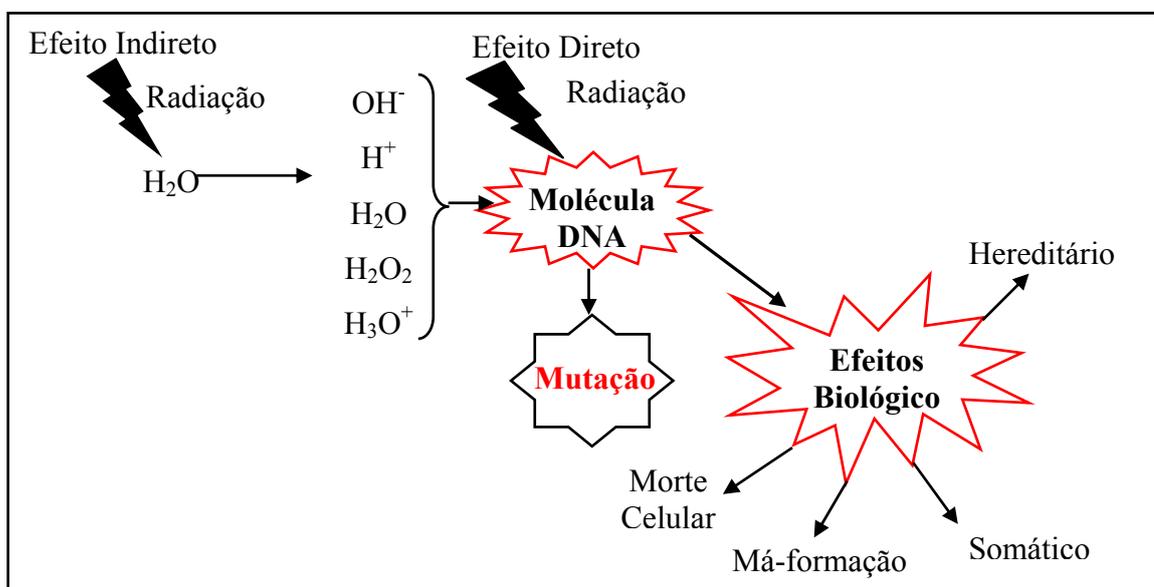


Figura 2. Efeito direto e indireto da radiação ionizante.

Cerca de 80% da célula é constituída de água, com isso a interação da radiação ionizante com a molécula de água que leva à quebra dessa molécula por irradiação (radiólise), corresponde ao principal tipo de interação da radiação ionizante com o corpo humano (BUSHONG, 1997).

Agindo sobre a molécula d'água, a RI provoca alterações na sua composição ou em seus níveis de energia. A exposição da molécula d'água à RI pode resultar na excitação da

molécula (H_2O^*) ou acarretar a formação de íons do tipo H_3O^+ , H_2O^+ e H_2O^- , os quais, por serem instáveis, acabam levando à produção de radicais livres como o H^\bullet e OH^\bullet . Os radicais livres se caracterizam por serem reativos, e em virtude da sua elevada reatividade eles podem interferir com as estruturas moleculares nas proximidades (GARCIA, 1998).

A liberação de hidrogênio reduz o pH do meio celular, alterando a cinética e o metabolismo de algumas moléculas do corpo humano. Já os íons H^+ e OH^- , podem interagir formando o peróxido de hidrogênio, o qual é bastante tóxico para a célula (GARCIA, 1998).

As lesões no DNA, causadas pelos efeitos direto e indireto da radiação, podem resultar na quebras de uma das fitas do DNA ou da dupla hélice, ligações cruzadas (entre DNA-DNA, entre DNA-proteínas), alterações nos carboidratos ou em bases nitrogenadas (substituição, deleções ou translocações), formação de dímeros, dentre outras (TAUHATA et al., 2003). Estes danos podem ser reparados ou originarem mutações que podem resultar em diferentes efeitos biológicos (morte celular, má-formação, efeitos genético e somático).

Portanto, estas lesões no DNA desempenham um papel importante entre os efeitos biológicos produzidos pela RI. Os mecanismos de reparo do DNA são essenciais, pois um reparo ineficaz no DNA alterado ou inexistente pode ocasionar descontrole da divisão celular, mutações na molécula, ou morte celular. As mutações e o descontrole da divisão celular, somando-se a outros eventos, podem, por sua vez, iniciar o processo de transformações neoplásicas nos diferentes tipos celulares.

2.2 Classificação dos efeitos biológicos

Os efeitos biológicos das RIs podem ser classificados segundo a sua probabilidade de ocorrência (determinístico ou estocástico), conforme seu tempo de aparecimento (imediate ou tardio), ou do ponto de vista biológico (somático ou hereditário).

2.2.1 Efeitos determinísticos e estocásticos

Segundo a Comissão Internacional de Proteção Radiológica (ICRP 41, 1984), os efeitos determinísticos são os que certamente ocorrerão após a exposição, sua gravidade e frequência variam com a dose absorvida e só ocorrem quando o valor da dose limiar é excedido. São exemplos dos efeitos determinísticos: a radiodermite, a catarata, a infertilidade e a Síndrome da Radiação Aguda (SAR) (ICRP 41, 1984).

Por outro lado, para os efeitos estocásticos existe uma probabilidade de ocorrência na medida que o valor da dose aumenta. Este efeito é proporcional à dose e não existe um limiar de dose para que ele venha a acontecer (ICRP 41, 1984; JAYARAMAN & LAWRENCE, 1996). As leucemias é um exemplo típico de efeito estocástico resultante de exposição à RI.

2.2.1.1 Síndrome da Radiação Aguda

A Síndrome da Radiação Aguda (SAR) é o conjunto de sinais e sintomas clínicos que um indivíduo pode vir a apresentar quando é exposto à RI. O indivíduo pode apresentar a síndrome hematológica, manifestações gastrointestinais (náuseas, vômitos, hemorragia digestiva, anorexia, diarreia) e neurológicas. Na fase latente, não há sinais clínicos e sintomas, podendo ser confundida com a recuperação do estado de saúde do indivíduo irradiado (BUSHONG, 1997).

A gravidade da SAR varia de acordo com a dose absorvida, o tipo de tecido irradiado, a presença de radiosensibilizadores e com as características biológicas que são próprias do indivíduo irradiado (GARCIA, 1998).

Na Tabela 1 é possível visualizar uma escala de valores de dose onde os aparecimentos dos sinais clínicos e sintomas estão relacionados com a dose recebida.

Tabela 1. Sinais e sintomas clínicos da SAR.

Fase	Dose (Gy)	Sinais Clínicos e Sintomas
Prodrômica	~ 1	Náusea, vômito e diarreia
Latente	1-100	Nenhum
Hematológica	2-10	Náusea, vômito, diarreia, anemia, leucopenia, hemorragia, febre, infecção
DL ₅₀ *	4-4,5	Morte de 50% dos indivíduos irradiados
Gastrointestinal	10-50	O mesmo da hematológica, mais desequilíbrio eletrolítico, letargia, fadiga e choque
Cerebral	> 50	O mesmo da gastrointestinal, mais ataxia, edema, vasculite, meningite

(BUSHONG, 1997).

* DL₅₀: corresponde uma dose letal onde 50% dos indivíduos irradiados vão a óbito.

2.2.2 Efeitos imediatos e tardios

Os efeitos biológicos são classificados como imediatos quando surgem poucos dias após a exposição à RI. Por outro lado, os efeitos tardios aparecem meses ou anos após à exposição (BUSHONG, 1997).

2.2.3 Efeitos somáticos e hereditários

Os efeitos somáticos e hereditários irão depender do tipo de célula que a radiação irá atingir. No efeito somático, a célula atingida pela RI, tem como função a manutenção do funcionamento orgânico. Já no efeito hereditário, a célula atingida pela RI, é responsável pela transmissão de informações genéticas às futuras gerações de indivíduos, ou seja, as células germinativas (RIGHI & DI POFI, 1987).

2.2.3.1 Radiosensibilidade celular

A gravidade das alterações biológicas causadas pela RI varia em função dos diferentes tipos de radiação ionizante bem como da radiosensibilidade da célula que, em geral, obedece à lei de Bergonié e Tribondeau a qual afirma: “a radiosensibilidade das células é diretamente proporcional a sua atividade reprodutiva e inversamente proporcional ao seu grau de diferenciação”. No entanto, esta lei não é válida para todos os tipos de células. Uma exceção a essa regra são os linfócitos que, apesar de terem baixa taxa de divisão (células diferenciadas), são extremamente sensíveis à radiação (ARENA, 1971).

Na Tabela 2, são apresentados resumidamente os níveis de radiosensibilidade de algumas células de mamíferos. O nível de radiosensibilidade, capacidade de divisão e de diferenciação das células estão representados pelo símbolo “+” e suas ausências pelo símbolo “-” (GARCIA, 1998).

Tabela 2. Radiosensibilidade de algumas células.

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

(GARCIA, 1998).

A Figura 3 apresenta de forma esquematizada como a radiação ionizante interage, de forma direta ou indireta, com uma molécula de DNA, quais os fenômenos biológicos que ocorrem e a cronologia desses fenômenos.

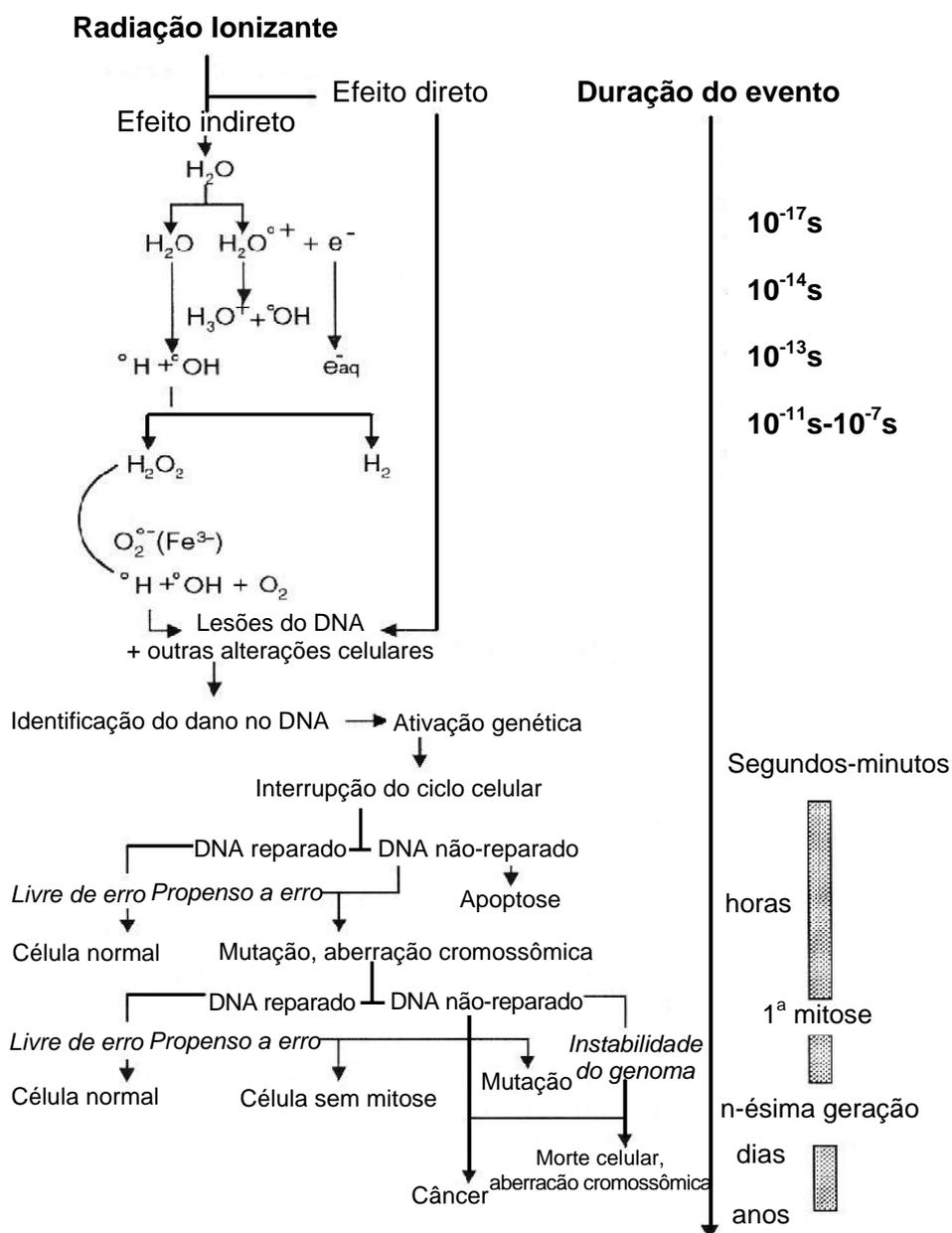


Figura 3. Fenômenos biológicos resultantes de uma exposição à radiação ionizante.
(POUGET & MATHER, 2001).

Diante dos efeitos biológicos resultantes de exposições à RI, observou-se a necessidade da definição de grandezas que possibilitassem a quantificação dos níveis de exposição individuais, objetivando correlacionar os valores dessas grandezas com os riscos biológicos associados, conseqüentemente, estabelecer regras de radioproteção a partir de valores de referência.

2.3 Grandezas dosimétricas

2.3.1 Dose absorvida

A dose absorvida (**D**) é a principal grandeza física em radioproteção. A dose absorvida é a grandeza expressa pela Equação 3:

$$\mathbf{D} = \frac{\bar{\mathbf{E}}}{\mathbf{dm}} \quad (3)$$

Onde: $\bar{\mathbf{E}}$ é a energia média depositada pela radiação em um volume elementar de matéria de massa **dm**.

A unidade de dose absorvida no SI (Sistema Internacional) é o joule (J) por quilograma (kg), que recebe o nome especial de gray (Gy) (ICRP 60, 1990).

2.3.2 Dose equivalente

A dose equivalente no tecido ou órgão (H_T) é definida pela Equação 4:

$$H_T = \sum_R W_R \cdot D_{T,R}$$

Onde: $D_{T,R}$ é a dose absorvida média, no tecido ou órgão T , devido à radiação ionizante R , e W_R é o fator de ponderação da radiação. A partir do momento que esse fator é considerado na avaliação da dose absorvida, sua unidade passa a ser o sievert (Sv), em lugar do gray (ICRP 60, 1990).

A Tabela 3 apresenta fatores de ponderação, W_R , correlacionado-os com alguns tipos de radiações existentes e suas faixas de energia. Todos os valores de W_R se relacionam com a radiação incidente no corpo pela irradiação externa ou para radiação proveniente de fontes internas (ICRP 60, 1990).

Tabela 3. Fatores de ponderação das RI.

Tipo de Radiação	Faixa de Energia	Fator de Ponderação (W_R)
Fótons	Todas as energias	1
Elétrons	Todas as energias	1
Nêutrons	< 10 keV	5
Nêutrons	10 keV a 100 keV	10
Nêutrons	>100 keV a 2 MeV	20
Nêutrons	> 2 MeV a 20 MeV	10
Nêutrons	> 20 MeV	5
Prótons, com exceção de prótons de recuo	> 2 MeV	5
Partícula alfa, fragmentos de fissão e íons pesados	Todas as energias	20

(ICRP 60, 1990).

2.3.3 Dose efetiva

A dose efetiva (**E**) é a grandeza expressa pela Equação 5:

$$E = \sum_T w_T \cdot H_T \quad (5)$$

Onde: **H_T** é a dose equivalente média no tecido ou órgão **T** e **w_T** é o fator de ponderação para o tecido ou órgão **T**. A unidade da dose efetiva continua sendo, no SI, o sievert (Sv) (ICRP 60, 1990).

Na Tabela 4 é possível verificar valores do fator de ponderação (**w_T**) para alguns órgãos ou tecidos. Estes valores foram estabelecidos através de um estudo com uma população de referência onde se tinham pessoas de ambos os sexos e de várias idades (ICRP 60, 1990).

Tabela 4. Fatores de ponderação para órgãos ou tecidos (w_T).

Tecido ou Órgão	Fatores de Ponderação para Órgãos ou Tecidos ¹
Gônadas	0,20
Medula óssea vermelha	0,12
Cólon	0,12
Pulmão	0,12
Estômago	0,12
Bexiga	0,05
Mama	0,05
Fígado	0,05
Esôfago	0,05
Tiróide	0,05
Pele	0,01
Superfície óssea	0,01
Restante ²	0,05
TOTAL	1,00

(ICRP 60, 1990).

¹ – Baseado em um risco total de ocorrência de efeitos estocásticos de $1,65 \times 10^{-2} \text{ Sv}^{-1}$

² – Para fins de cálculo, “Restante” refere-se a qualquer dos órgãos listados a seguir (os quais podem ser irradiados seletivamente): adrenais, cérebro, intestino grosso superior, intestino delgado, rins, músculo, pâncreas, vesícula, timo e útero.

Neste contexto, métodos dosimétricos foram desenvolvidos para avaliar a quantidade de energia absorvida num determinado meio de interesse.

2.4 Métodos dosimétricos

O conhecimento dos níveis de dose na proteção radiológica é uma etapa importante para a avaliação dos riscos inerentes a exposição à radiação, individual ou coletiva. Neste sentido, agências internacionais especializadas em radioproteção recomendam limites máximos de dose aos trabalhadores ocupacionalmente expostos à RI e aos membros do público (ICRP 60, 1990; AMARAL, 2002).

Os limites de dose anuais para os trabalhadores e indivíduo do público, recomendados pela Comissão Internacional de Radioproteção em sua publicação de número 60 (ICRP, 1990) são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Limites primários anuais de dose efetiva.

Indivíduo	Limites de Dose Anual para Corpo Inteiro (mSv)
Trabalhador	20
Indivíduo do Público	1

(ICRP 60, 1990).

Na Tabela 6 é possível observar os limites de dose anual adotados no Brasil pela Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) para os trabalhadores e indivíduos do público (CNEN,1988).

Tabela 6. Limites primários anuais de dose efetiva.

Indivíduo	Limites de Dose Anual para Corpo Inteiro (mSv)
Trabalhador*	50
Indivíduo do Público**	1

(CNEN-3.01, 1988).

**Trabalhador - pessoa que, em consequência do seu trabalho a serviço da instalação, possa vir a ter, por ano, doses superiores aos limites primários para o indivíduo do público, estabelecidos nesta norma.*

***Indivíduo do Público - qualquer membro da população não exposto à radiação ocupacionalmente, inclusive trabalhadores, estudantes e estagiários quando ausentes das áreas restritas da instalação.*

Comparando as tabelas 5 e 6, observa-se que enquanto a ICRP 60 recomenda o limite de dose anual de 20 mSv para o trabalhador, a CNEN, em sua norma 3.01, estabelece o limite de 50 mSv, isto considerando a dose absorvida para corpo inteiro.

A determinação da dose é realizada através de diversos métodos dosimétricos. Dentre os métodos existentes destacam-se: o emprego de modelos numéricos, a dosimetria física e dosimetria biológica (DOWD & TILSON, 1999; GERMAIN, 1995).

2.4.1 Modelos numéricos

Uma ferramenta de grande importância que auxilia na avaliação da dose interna é o método de Monte Carlo. Este método pode ser definido como uma técnica que utiliza números pseudo-aleatórios para a resolução de problemas, sendo originalmente desenvolvido no final da década de 1940 para nêutrons e transporte de fótons no interior de um dispositivo nuclear, promovendo um elo entre medidas e cálculos analítico, principalmente em situações onde é difícil, ou até mesmo impossível, obter medidas diretas da RI (MACKIE, 1990; KAHN, 1950).

Para fins de avaliação dosimétrica, o cálculo da dose pelo método de Monte Carlo requer a utilização de um modelo geométrico do órgão a ser estudado. Essa metodologia tanto pode ser usada para cálculos de dose de corpo inteiro ou de um órgão específico (macrodosimetria), quanto para avaliação da dose absorvida por tecidos e células (dosimetria de pequena escala ou microdosimetria) (FISHER, 1994).

2.4.2 Dosimetria física

Na dosimetria física, o valor da dose absorvida é avaliado com o auxílio de instrumentos sensíveis aos efeitos físicos da RI. Estes instrumentos, denominados de dosímetros, são detectores da RI capazes de quantificar a dose absorvida. Dentre os dosímetros mais utilizados na dosimetria física encontram-se: os filmes fotográficos, dosímetros termoluminescentes e os semicondutores (SCAFF, 1997; CEMBER, 1997).

Todavia, em casos de acidentes ou de suspeita de exposição à RI, a avaliação da dose absorvida não é uma tarefa simples, em geral, devido a ausência de informações das condições de irradiação, ou pelo fato dos indivíduos irradiados não portarem dosímetros físicos. Nestas situações, os indicadores biológicos (bioindicadores), investigados na dosimetria biológica, vêm sendo propostos como um método alternativo ou complementar à dosimetria física (AMARAL, 2002).

2.4.3 Dosimetria biológica

Neste tipo de dosimetria, a quantificação da dose absorvida é feita através da correlação entre bioindicadores e dose absorvida. Os bioindicadores são parâmetros biológicos resultantes da interação da RI com a matéria viva.

Dentre os bioindicadores investigados em caso de suspeita de exposição individual à RI estão: a diminuição do número de linfócitos (linfocitopenia), de hemácias, de

plaquetas e a presença de alterações citogenéticas. Dentre estes, as alterações citogenéticas constituem a resposta biológica mais amplamente estudada em biodosimetria (VOISIN, 1997; LLOYD, 1998; VOISIN et al., 2001).

As alterações citogenéticas mais estudadas na dosimetria biológica são as aberrações cromossômicas (estáveis e instáveis) e micronúcleos. Estas alterações podem ser encontradas em linfócitos do sangue periférico de indivíduos expostos à radiação ionizante. A obtenção da dose absorvida é feita com o auxílio de curvas de calibração, as quais relacionam valores de dose com o efeito biológico investigado (IAEA, 2001; AMARAL, 2002).

Para a quantificação das aberrações cromossômicas e de micronúcleos é necessário, incubar amostras de sangue periférico utilizando os mesmos princípios empregados na técnica de citogenética convencional. No entanto, o emprego desta metodologia requer tempo de cultura, tempo de análise e profissionais especializados na área.

Fernandes, em 2005, comparou duas metodologias comumente empregadas para análise de aberrações cromossômicas instáveis e micronúcleos em linfócitos do sangue periférico, objetivando o biomonitoramento de trabalhadores ocupacionalmente expostos à radiação ionizante. O tempo de incubação e de contagem das células foi um dos parâmetros avaliados na pesquisa, cujos resultados estão resumidos na Tabela 7 (FERNANDES, 2005).

Tabela 7. Comparação entre as metodologias de aberrações cromossômicas instáveis (ACI) e micronúcleos (MN).

Metodologia	Tempo de Incubação de Cultura (horas)	Tempo de Contagem Celular (horas)	Tempo Total para Análise (horas)
ACI	48	40	88
MN	72	4	76

(FERNANDES, 2005).

Na Tabela anterior, é possível verificar que em casos de suspeita de exposição à RI, onde se deseja saber, em poucas horas (menos de 6 horas), se houve ou não a exposição, a dosimetria citogenética constitui uma importante ferramenta, embora o tempo para cultura celular e análise seja limitado. O tempo total de análise é relativamente longo, a depender do nível de exposição e, conseqüentemente, das medidas a serem tomadas.

2.5 Linfócitos

Os linfócitos constituem aproximadamente 25 a 35% do total das células brancas presentes no sangue periférico. Eles são divididos em três subtipos: linfócitos B, linfócitos T e linfócitos NK (PEAKMAN & VERGANI, 1999; ZAGO et al., 2001). Estes desempenham funções distintas e, embora sejam indistinguíveis ao microscópio óptico, apresentam diferenças ao microscópio eletrônico. A Figura 4 mostra um esfregaço de sangue humano onde a seta indica um linfócito.

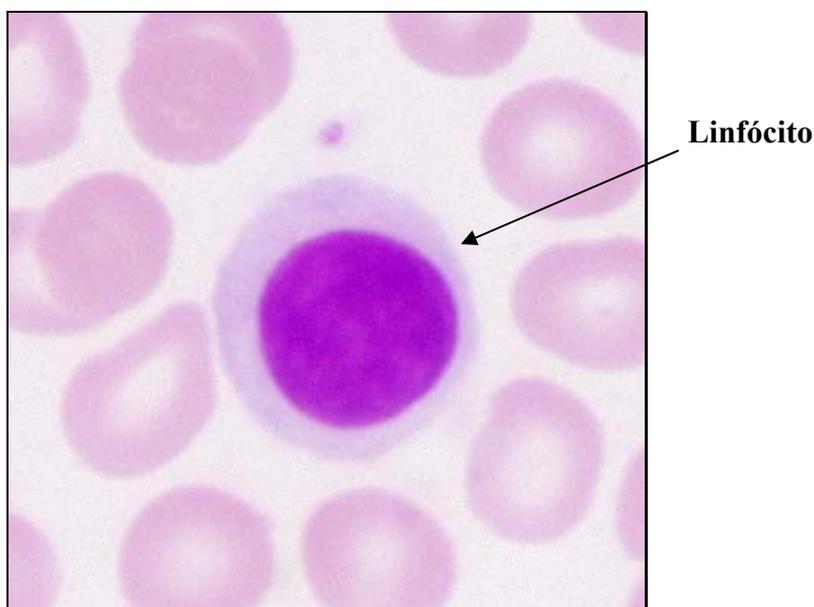


Figura 4. Esfregaço de sangue humano mostrando um linfócito.
(<http://nbiol29.unife.it/furio/Citologia/Nucleo/linfocito100.jpg>)

Os linfócitos B originam-se de um precursor na medula óssea onde, em mamíferos, dá início ao processo de maturação. A sua característica fundamental é a de possuir moléculas de imunoglobulina inseridas na membrana plasmática que são produzidas endogenamente e que funcionam como receptores para antígenos específicos. Por outro lado, os linfócitos T originam-se de um precursor na medula óssea que posteriormente migra para o timo, onde a maturação destas células se completa. Eles são subdivididos em linfócitos T8 ou citotóxicos (T8 por expressarem o antígeno CD8 na membrana) e T4 ou auxiliares (T4 por expressarem o antígeno CD4). Estes últimos são por sua vez subdivididos em T auxiliar 1 (Th1 – “T helper 1”) e T auxiliar 2 (Th2 – “T helper 2”), por secretarem diferentes citosinas em resposta à estimulação por IL-2 (interleucina 2) e IFN- γ (interferon γ) ou IL-4 (ZAGO et al., 2001).

Os linfócitos NK são minoria entre as células linfóides em circulação e originam-se, como as demais, de um precursor linfóide na medula óssea. O seu processo de maturação ainda é pouco conhecido. Quanto à sua fisiologia, distingue-se das demais por destruir a célula-alvo sem a participação da molécula do complexo de histocompatibilidade principal (MHC – “major histocompatibility complex”), agindo sobre células tumorais e células infectadas por vírus. Sua morfologia é diversa quando comparada com os linfócitos T e B, o que os distingue como grandes linfócitos granulares (ZAGO et al., 2001).

O número total de linfócitos é cerca de 1300 a 4800/mm³ em um indivíduo adulto sadio, dos quais 0,1% são renovados diariamente. Entretanto, em casos de irradiação de corpo inteiro com altas doses de radiação, uma das reações determinísticas imediatas é uma rápida queda da contagem de linfócitos do sangue periférico. Isto deve ser levado em consideração quando há um curto período entre a exposição e a análise das amostras para biodosimetria. (IAEA, 2001; PEAKMAN & VERGANI, 1999; RIGHI & DI POFI, 1987).

Em caso de irradiação parcial do corpo, os danos biológicos produzidos pela exposição à RI estarão eventualmente presentes nos linfócitos do sangue periférico. Este fato é possível uma vez que os linfócitos possuem uma característica de recirculação

(“*turnover*”) entre o sangue, tecidos e órgãos linfóides. O tempo de turnover varia de célula para célula, mas, em média, o linfócito completa um ciclo em 30 min (IAEA, 2001).

Os linfócitos podem ser divididos em dois grupos quanto ao seu tempo de vida: os de vida curta são aqueles que possuem uma vida média de 2 semanas e os de vida longa são aqueles que possuem uma vida média maior que 2 semanas (ZAGO et al., 2001).

Estas células são diferenciadas, altamente sensíveis à RI, possuem uma vida-média longa, são de fácil manipulação e obtenção. Além disso, os linfócitos constituem a população de células que predominantemente se encontra no estágio de pré-síntese de DNA (fase G0 do ciclo celular) podendo, com isso, armazenar os danos biológicos causados pela RI por um determinado período de tempo (IAEA, 2001).

Diante dessas características, os linfócitos são usados em alguns ramos da dosimetria biológica para o estudo de biomarcadores. No entanto, esses biomarcadores são identificados em algumas fases do ciclo celular. Com isso, os linfócitos precisam de estímulos externos (mitógenos) para dar início a divisão celular, por serem comumente encontrados na fase de latência do ciclo celular (G0).

2.6 Ciclo celular

O ciclo celular é o processo pelo qual as células crescem, duplicam seu DNA e se dividem para gerar duas células filhas, sendo composto por duas fases: a interfase e a mitose. A interfase se divide em quatro sub-fases: G0, G1, S, G2; já a mitose se sub-divide em: prófase, prometáfase, metáfase, anáfase, telófase e citocinese (GARRETT, 2001; ALBERTS et al., 1996).

Na interfase, a fase G1 é onde ocorre uma atividade bioquímica intensa, a célula aumenta seu material enzimático, suas organelas se replicam, assim como outras moléculas e estruturas citoplasmáticas também aumentam em número, e conseqüentemente,

aumentando o tamanho da célula. Em uma célula de mamífero esta fase pode durar cerca de 10 horas (COOPER, 1999; SNUSTAD & SIMMONS, 2001).

É na fase G1 onde os sinais extracelulares, positivos e negativos, são integrados no regulamento da progressão do ciclo celular. 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. A fase G0 difere de todos os estados que existem no ciclo celular. Nesta fase, há uma ausência de fatores de crescimento apropriados, o que leva as células a um estado de latência no ciclo celular, no qual o sistema de controle não avança para G1, ou porque é incapaz ou porque não é necessário. Caso a célula consiga passar para a fase G1, esta irá prosseguir para a fase S do ciclo celular (DÍAZ et al., 2003).

A fase S (síntese) se caracteriza pela replicação do DNA nuclear. Quando a célula adquire fatores necessários como: tamanho, proteínas importantes para a replicação e o ATP (adenosina trifosfato), dá-se início ao processo de replicação celular (DÍAZ et al., 2003).

Na fase G2 ocorre a preparação para a mitose; todas as organelas e as maquinarias essenciais para a divisão da célula progenitoras em duas células filhas idênticas, embora de tamanho menor, são adquiridas nesta fase. Após esta fase, a célula inicia o processo de mitose (DÍAZ et al., 2003).

A mitose se inicia com a prófase, onde ocorre ruptura da membrana nuclear. Nesta fase, cada cromossomo será formado por duas cromátides distintas conectadas por um centrômero.

Durante a 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 e o fuso começa a desaparecer e a membrana nuclear volta a se formar ao redor do conjunto de cromossomos (CASTRILLO, 1995; ALBERTS et al., 1996).

A citocinese é a divisão do citoplasma, mediante um processo denominado de segmentação, o qual é normalmente dirigido por um fuso mitótico, formado pela reorganização dos microtúbulos do citoesqueleto, (CASTRILLO, 1995; ALBERTS et al., 1996). A Figura 5 ilustra todas as etapas do ciclo celular.

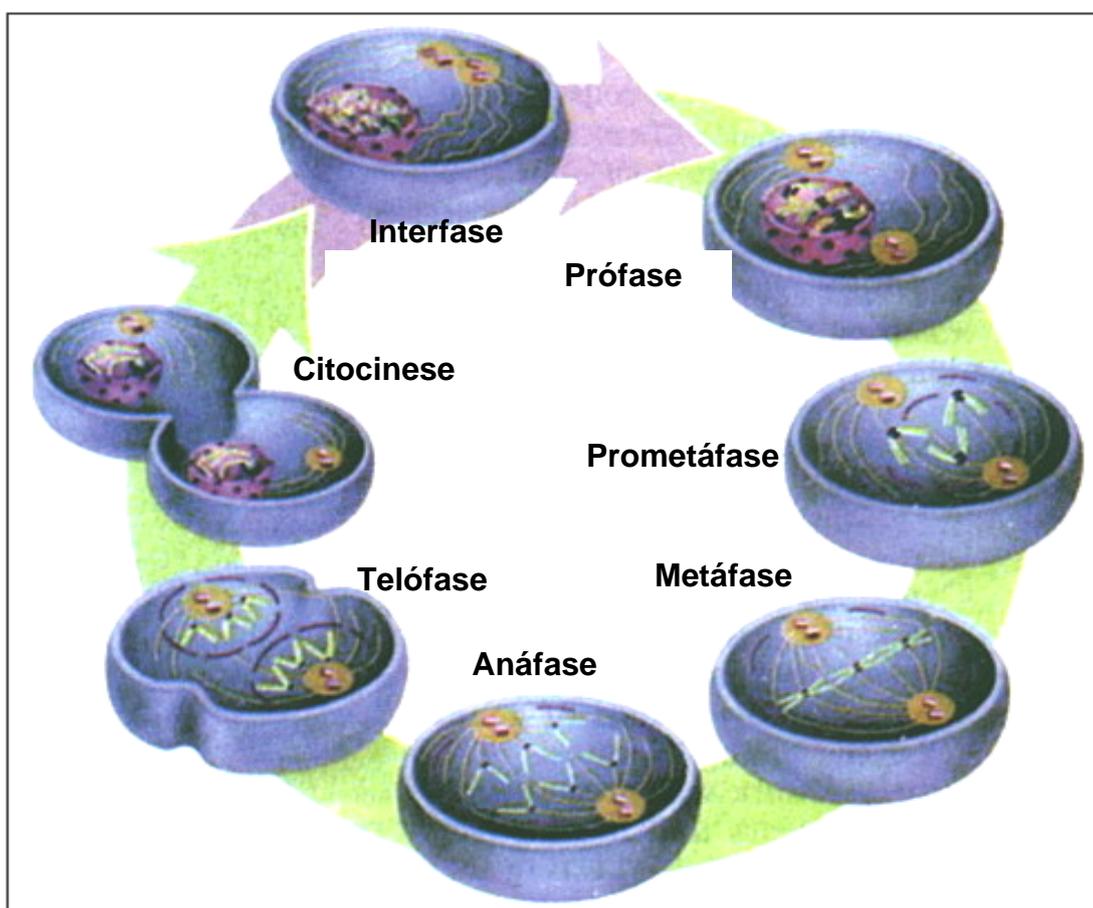


Figura 5. Fases do ciclo celular.
(www.tcb.cl/1535/articles-61145_celula2.jpeg)

2.6.1 Pontos de checagens do ciclo celular

O ponto de checagem é um mecanismo que bloqueia a progressão do ciclo celular até que um processo crítico, tal como síntese de DNA, seja completada, ou até que o DNA danificado seja reparado (SNUSTAD & SIMMONS, 2001).

De vital importância no ciclo celular são os dois pontos de checagem (*checkpoints*), a fim de que a célula mantenha a integridade do material genético que está sendo duplicado. Estes dois pontos ocorrem no final da fase G1 (ponto de controle G1/S) e no final de G2 (ponto de controle G2/M). Na Figura 6 é possível observar os locais onde ocorrem as checagens (RIBEIRO et al., 2003).

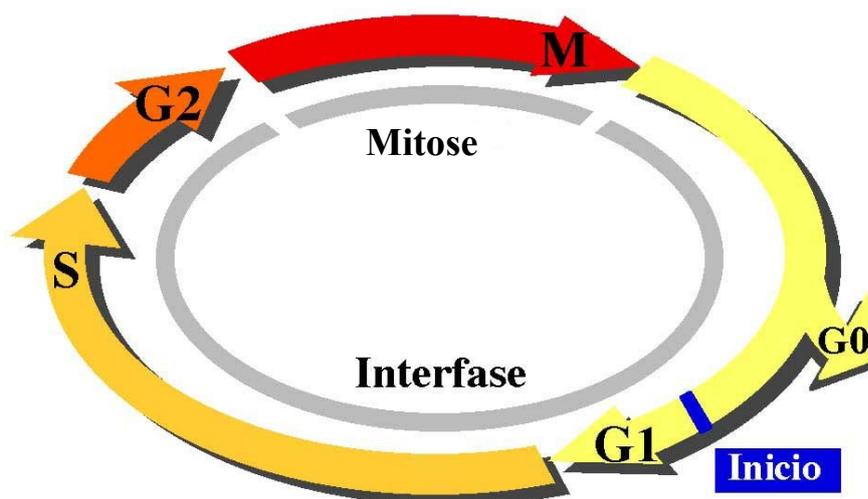


Figura 6. Pontos de checagem no ciclo celular.
(www.tcb.cl/1535/article-61145.html)

O primeiro ponto de checagem ocorre, portanto, antes da síntese de DNA. Assim, caso existam danos detectáveis no DNA, o processo de divisão não passará deste ponto até que o dano seja reparado. No caso da impossibilidade deste reparo, a célula irá abandonar o processo de mitose. O segundo ponto é menos entendido em eucariontes, mas parece ocorrer depois da duplicação do DNA e tem como função monitorar a duplicação completa e fidedigna do genoma (RIBEIRO et al., 2003).

O sistema de controle do ciclo celular é baseado em duas famílias de proteínas. A primeira é a família das proteínas ciclinas dependentes de kinases (Cdk), as quais sofrem fosforilação sobre seus aminoácidos. A segunda família é a das ciclinas (Cdc), as quais se unem às Cdks e controlam as reações de fosforilação das proteínas em cada estágio do ciclo celular. Nas células de mamíferos, diferentes Cdks são ativadas e requeridas para diferentes fases do ciclo celular (ALBERTS et al., 1996; COOPER, 1999; GARRETT, 2001).

Nos casos em que estes processos não são controlados, as células se dividem continuamente, sem mesmo reparar algum dano existente. Existe uma série de proteínas que regulam e controlam o ciclo celular, determinando o momento certo para a célula se dividir e interrompendo a divisão quando for o momento.

2.7 Gene supressor de tumor *TP53*

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

Este gene é situado no braço curto do cromossomo 17, sendo constituído por 11 éxons, que constituem regiões do DNA que codificam informação (por exemplo, proteínas) (CAVALCANTI JÚNIOR et al., 2002; DEFAVERY et al., 2000), se estendendo geralmente por 20 kb (quilobases)* do DNA genômico (LANE, 1992).

* quilobase: unidade usual de comprimento de fragmentos de DNA equivalente a 1000 nucleotídeos.

2.7.1 Descobrimto da proteína p53

O gene *TP53* foi descoberto em 1979 e foi identificado como oncogene em 1985 por Jenkins e classificado como um gene supressor de tumor em 1989 por Baker e colaboradores. Este gene codifica uma fosfoproteína nuclear denominada p53, devido ao seu peso molecular ser de 53 kDa (quilodalton)** (CAVALCANTI JÚNIOR et al., 2002; BAST, 1983; NILOFF,1985).

O descobrimento desta proteína foi resultado de dois tipos de estudos. Em um dos estudos foi utilizado o vírus oncogênico *Simian Virus 40* (SV-40), enquanto no outro se utilizou uma aproximação do tipo sorológica). Nos estudos virais, quando os cultivos celulares foram transformados com o SV-40, estudos de imunoprecipitação foram realizados com anticorpos dirigidos contra o antígeno T, identificando-se a proteína de 53 kDa (DELEO et al., 1979).

Simultaneamente a essas descobertas, e empregando análise do tipo sorológico, descobriu-se que, ao estudar a resposta imune anti-tumoral em alguns ratos onde se havia induzido tumores com carcinógenos (metilcolatreno), era possível identificar anticorpos contra a proteína de 53 kDa (DELEO et al., 1979).

Esta proteína, cuja estrutura molecular é apresentada no Anexo I, está implicada no controle do ciclo celular, na proliferação celular, na reparação e síntese de DNA, na diferenciação celular e na morte celular programada (apoptose) (HARRIS, 1993).

2.7.2 Estabilidade da proteína p53

A proteína p53 é estabilizada e ativada em resposta aos danos no DNA, sendo muito complexa a cascata dos eventos que sinalizam as lesões do DNA para a estabilização e ativação da p53 (HUTCHINSON, 1985; WARD, 1988).

**Dalton é a unidade de massa atômica, usada na biologia molecular, equivalente a 1/12 da massa do carbono-12. 1kDa= 1000 Da.

A estabilidade da p53 é regulada pela ligação com a proteína *Mouse Double Minute 2* (Mdm2), e qualquer evento que venha a interferir nesta ligação pode aumentar a estabilidade da proteína p53. A proteína Mdm2 é produto de um oncogene, cuja atividade resulta em diversos tipos de câncer. A Mdm2 se liga a p53 inativando-a e esta ligação ocorre no domínio carboxi-terminal da p53 interferindo na atividade de transcrição da mesma (FEI & EL-DEIRY, 2003).

A ativação do Ataxia Telangiectasia Mutada (ATM), ocasionada pela interação da RI com o DNA, resulta na formação de quebras simples e dupla da cadeia de DNA (DBSs), e fosforila a p53 e a Mdm2. Esta fosforilação[†] ocorre na região de interação destas proteínas, comprometendo, deste modo, a ligação entre ambas (FEI & EL-DEIRY, 2003).

2.7.3 A importância da p53 no ciclo celular em resposta à radiação ionizante

Os mecanismos de ativação da p53 dependem da natureza dos agentes agressores. Dentre estes, os mais estudados são os induzidos pela radiação ionizante, ou pela radiação ultravioleta (UV) ou por uma expressão inapropriada de um oncogene (DRANÈ et al., 2002).

A resposta ao dano no DNA é mediada por uma via de sinal de transdução desconhecida, que aumenta a transcrição do gene *TP53*. Esta via também faz com que a proteína p53 seja convertida de uma forma estável (selvagem ou *wild type*) para a forma ativa, através da fosforilação pela ATM Kinase. Uma vez ativada, a p53 estimula a transcrição de genes cujos produtos param o ciclo celular, permitindo assim que o DNA danificado seja reparado. Ou seja, a p53 atua no ciclo celular no ponto de controle G1/S. Esse processo permite também a ativação de um outro grupo de genes, cujos produtos levam a célula à morte num processo chamado apoptose (SNUSTAD & SIMMONS, 2001).

[†] Fosforilação: Adição do átomo de fósforo à uma molécula tornando-a ativa.

Um fator relevante na resposta que bloqueia o ciclo celular é a proteína p21, uma proteína codificada por um gene que é ativado pelo fator de transcrição da p53. A proteína p21 é um inibidor dos complexos ciclina-proteína Cdk. Quando a p21 é sintetizada em resposta ao estresse celular, os complexos ciclina-Cdk são inativados.

A transição da fase G₁ para a fase S requer a fosforilação da proteína RB pelo complexo ciclina-proteína Cdk. Antes da produção dessa ciclina, que é produzida em um momento específico do ciclo celular, a RB está na sua forma ativa, associada à proteína E2F[‡]. Este complexo torna o fator E2F inativo, impedindo dessa forma a progressão do ciclo celular para a fase S (SOUSSE, 2000).

Com a fosforilação da RB, o fator de transcrição E2F é liberado, ativando a transcrição de genes relacionados à síntese do DNA. Na presença de danos no DNA, ocorre a produção da proteína p53, o que leva à indução da síntese da proteína p21.

Níveis elevados de p21, por sua vez, levam à inibição da atividade da proteína quinase do complexo ciclina-Cdk2, causando uma interrupção do ciclo celular, uma vez que E2F permanece inativado pela RB.

Quando o dano é reparado, os níveis de p53 caem, levando à diminuição dos níveis de p21, o que leva à liberação da atividade da quinase ciclina-Cdk2. A RB pode então vir a ser novamente fosforilada, liberando E2F e conseqüentemente a progressão para a fase S (SNUSTAD & SIMMONS, 2001).

A p53 é responsável por ativar uma interrupção no ciclo celular, permitindo que a célula mantenha sua integridade genética, por isso o termo de “guardião do genoma” é atribuído à proteína p53 (SNUSTAD & SIMMONS, 2001).

[‡] E2F - uma família de fatores de transcrição que controlam a expressão de vários outros genes cujos produtos movem a célula em seu ciclo celular.

Existe uma grande quantidade de genes que são diretamente regulados pela p53 e cuja função está diretamente implicada com a apoptose (BATES & VOUSDEN, 1999). O mais conhecido é o Bax, que promove a apoptose celular e sua ativação é induzida pela p53. Os membros da família das proteínas de Bcl-2 agem regulando de forma repressora a apoptose, logo, uma vez ativado o Bax (uma antagonista do Bcl-2), este irá fazer com que a célula entre em apoptose (KLUCK et al., 1997; YANG et al., 1997).

As células sem a p53 funcional têm dificuldade em interromper o ciclo celular. Se estas células progredirem no ciclo celular e passam por uma subsequente divisão, podem se acumular mutações adicionais que as tornam desreguladas. A inativação mutacional da p53 é, portanto, uma etapa fundamental na via para o câncer (SNUSTAD & SIMMONS, 2001).

O principal regulador negativo do *TP53* é o Mdm2, este normalmente mantém níveis baixos de p53 dentro da célula adicionando cadeias de ubiquitina. A proteína Mdm2 se liga a p53 para inativá-la. A ligação ocorre no domínio de transativação, interferindo no mecanismo de transcrição. Além disso, a Mdm2 pode conduzir a eliminação da p53 através da degradação proteolítica (PERRY, 2004).

Normalmente em uma célula, a proteína p53 se encontra em baixas concentrações por ter uma vida média curta (em torno de 20 minutos). Além disso, em algumas células existe a p53 na sua forma latente e inativa para a transcrição. Sob estas circunstâncias, a proteína p53 deverá receber um sinal para se tornar ativa e funcionar (SNUSTAD & SIMMONS, 2001; LEVINE, 1997).

O nível de expressão da p53 aumenta porque a vida média da proteína é prolongada, em torno de 24 horas, e a taxa de transcrição da célula é realçada. Este aumento nos níveis da p53 é proporcional à extensão dos danos do DNA, sendo, por exemplo, diferente para distintas doses e tipos de radiação ionizante. A extensão e o aumento da cinética da p53 diferem para os diferentes tipos de danos causados pela radiação (LEVINE, 1997; CHEN et al., 1996).

Diversos tipos de dano no DNA podem ativar a p53, incluindo a quebra da dupla fita da cadeia do DNA causada pela radiação gama e danos no DNA causados pela radiação ultravioleta e agentes químicos. Isto resulta em um rápido aumento no nível de p53 na célula e na ativação do fator de transcrição da p53 (LEVINE, 1997).

Vários são os métodos para a avaliação, quantitativa e/ou qualitativa, da proteína p53. Estes métodos, na maioria das vezes, são utilizados no auxílio de diagnósticos para doenças.

2.8 Métodos de análise da proteína p53

2.8.1 Western Blot

A técnica de Western Blot (WB) é utilizada em metodologia analítica devido ao alto poder de resolução da eletroforese em gel de poliacrilamida e a determinação do peso molecular da proteína aliada à especificidade da imunquímica. Os componentes resultantes da separação eletroforética são transferidos do gel para uma membrana de nitrocelulose, imediatamente após a corrida eletroforética, seguida da incubação do anticorpo primário (em geral o anticorpo monoclonal) e de uma segunda incubação com um anticorpo secundário conjugado à peroxidase. O sistema revelador contém uma substância que, ao reagir com o conjugado, emitirá luz. Essa membrana, quando exposta a um filme radiográfico, revela a presença das bandas antigênicas específicas para o anticorpo em questão (TURPEINEN et al., 2002).

2.8.2 Imunocitoquímica e Imunohistoquímica

A Imunocitoquímica (ICQ) é um método de avaliação de expressão de antígenos. A técnica utiliza células em suspensão ou cortes de tecidos previamente fixados em lâminas

que são submetidos à permeabilização e em seguida, incubadas com anticorpos monoclonais. A presença da proteína é revelada por meio da adição do anticorpo secundário com especificidade contra a fração constante da imunoglobulina de camundongo, estando conjugado a um substrato revelador que pode ser peroxidase ou fosfatase alcalina (DOWELL et al., 1994; LOGULLO et al., 2000).

A técnica de imunohistoquímica (IH), muito semelhante a imunocitoquímica, consiste em avaliar a proteína através de cortes de tecido previamente fixados em lâminas. O mecanismo básico da técnica é o reconhecimento do antígeno por um anticorpo, o qual pode ser de forma direta ou indireta. Na forma direta, o anticorpo primário é diretamente marcado, geralmente por uma substância fluorescente ou enzima. Já na forma indireta, o anticorpo primário serve como antígeno para um segundo anticorpo (anticorpo secundário) de outra espécie animal marcado (Técnica de IHQ-Lab. Aticorpos, 2004).

2.8.3 Citometria de Fluxo

Comparando com as metodologias anteriores, a citometria de fluxo (CF) é um método mais recente para o estudo de células. Através desse método, múltiplas propriedades físicas e biológicas das células podem ser determinadas, tais como: o tamanho, a granulosidade, a complexidade e a intensidade de fluorescência de cada célula.

A CF vem se destacando como método de detecção de expressão de antígeno de superfície, intracitoplasmático e intranuclear. É uma técnica semi-automatizada em que se pode processar e analisar, conjuntamente, um grande número de amostras em tempo reduzido (BACAL & FAULHABER, 2003; MARK & HELLER, 1998).

Esta metodologia é composta basicamente por três diferentes sistemas físicos complementares: de fluxo, o óptico e o eletrônico.

- ❖ O sistema de fluxo utiliza um líquido isotônico que transporta as células, uma a uma, na câmara de fluxo para que estas sejam posicionadas no centro de um feixe de laser;
- ❖ O óptico consiste em um feixe de laser que ao atravessar a célula emite luz a qual é captada por um conjunto de filtros ópticos (espelhos dicróicos) para posterior detecção;
- ❖ O sistema eletrônico é responsável pela conversão dos sinais de luz detectados em sinais eletrônicos (tensão), que são processados e analisados por sistema computacional.

Nas análises empregando a CF, as células são marcadas com um anticorpo específico conjugado a um corante fluorescente (fluorocromo). Elas são, em seguida, introduzidas no citômetro por aspiração (com o auxílio de ponteira) e levadas para as câmeras de fluxo através de uma seringa, dirigida por um motor. No aparelho, as amostras são conduzidas através de um líquido isotônico até um compartimento denominado de câmara de fluxo (*flow cell*). Neste compartimento, a luz do laser irá atravessar a célula, resultando no fenômeno da dispersão, com a emissão de luz fluorescente dos fluorocromos ligados à célula (MARK & HELLER, 1998). A Figura 7 permite a visualização esquemática de como as amostras se encontram dentro do citômetro de fluxo.

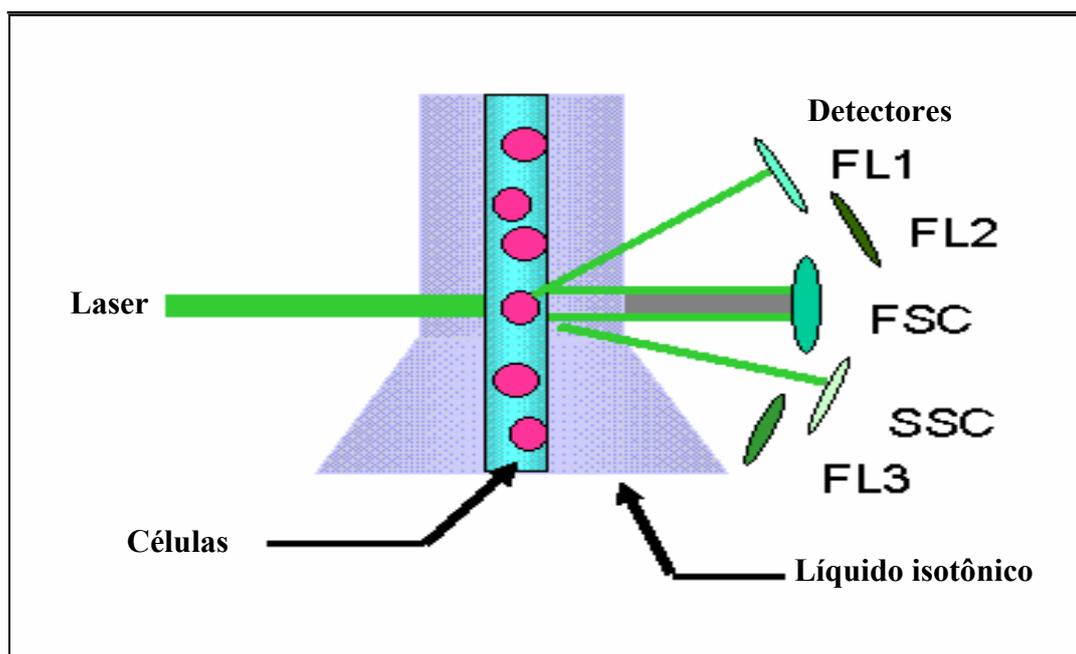


Figura 7. Direcionamento das amostras no citômetro de fluxo.
(BECTON, DICKINSON AND COMPANY, 2000).

O fenômeno de fluorescência ocorre quando um composto fluorescente absorve a energia da luz sobre uma escala de comprimentos de onda, característica para aquele composto.

A absorção de luz faz com que um elétron desse composto seja excitado para o seu nível de energia mais elevado. O elétron excitado volta rapidamente para seu estado energético estável, emitindo um fóton de luz, caracterizando assim o fenômeno de emissão de fluorescência (BECTON, DICKINSON AND COMPANY, 2000).

O tipo de laser mais comumente usado em CF é o produzido a partir do argônio, cujo comprimento de onda gerado de 488 nm (4880 Å) é ideal para excitar a maioria dos fluorocromos utilizados na CF (BACAL & FAULHABER, 2003).

O feixe de laser ao atingir uma célula ou partícula será disperso proporcionalmente ao tamanho desta célula ou partícula e captado por um detector frontal ao feixe (*Forward Scatter* ou FSC). A dispersão lateral, ocasionada também pela incidência do feixe de laser,

será captada por espelhos laterais, definindo a granulosidade e complexidade da célula (*Side Scatter* ou SSC) (MARK & HELLER, 1998).

Na Figura 8 é possível observar como ocorre a análise do tamanho e da complexidade da célula através do FSC e SSC, respectivamente (BECTON, DICKINSON AND COMPANY, 2000).

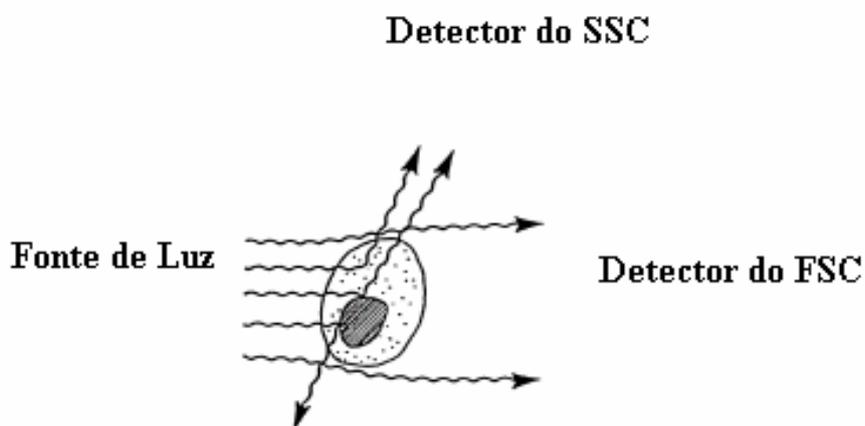


Figura 8. Propriedades da célula através da análise do FSC e SSC.
(BECTON, DICKINSON AND COMPANY, 2000).

Sinais de luz são gerados enquanto as células passam através do feixe de laser na câmara de fluxo, os quais são convertidos em sinais eletrônicos (tensão) por fotodetectores. Existem dois tipos de fotodetectores nos citômetros de fluxo fabricados pela *Becton Dickinson* (BD): fotodiodo e tubos fotomultiplicadores (PMTs). Os fotodiodos são menos sensíveis para sinais de luz quando comparado com os PMTs sendo assim, utilizado para detectar sinais fortes do FSC. Os PMTs são utilizados para detectar sinais fracos geralmente pelo SSC e fluorescências (BECTON, DICKINSON AND COMPANY, 2000; BACAL & FAULHABER, 2003)

Os detectores de dispersão lateral e os detectores de fluorescência compõem os PMTs. Um fotomultiplicador consiste em um fotocatodo, dinodo e um anodo. Quando expostos à luz, o fotocatodo emite elétrons. Os fotoelétrons são acelerados, entre o fotocatodo e o primeiro dinodo. Quando os elétrons colidem com o primeiro dinodo, este transmite mais elétrons que serão acelerados até o segundo dinodo, resultando na emissão de mais elétrons, os quais serão sucessivamente amplificados em números ao passarem por uma série de dinodos, os quais alcançarão finalmente o anodo. O potencial do diodo é maior no fim da corrente, e o potencial aplicado em todo o PMT é a voltagem do fotomultiplicador. Quanto maior a voltagem maior será a sensibilidade do PMT. A corrente gerada no PMT será convertida em pulsos de voltagem para o processamento do sinal (BECTON, DICKINSON AND COMPANY, 2000).

O maior ponto do pulso de tensão ocorre quando a célula ou partícula está no centro do feixe do laser e a dispersão da luz chega ao seu valor máximo ou a fluorescência é atingida. Como as células ou partículas passam do laser, o pulso volta a cair. O tamanho do pulso de voltagem irá depender do número de fótons detectados (BECTON, DICKINSON AND COMPANY, 2000).

Correlacionando as medidas do FSC e SSC é possível diferenciar diferentes tipos de células em uma população de células heterogênea. Na Figura 9 são apresentadas diferentes populações celulares (hemácias, mieloblastos, linfócitos e precursores) onde, o eixo X do gráfico representa o tamanho da célula (FSC) e o eixo Y representa a granulosidade e complexidade da célula (SSC). Nesta figura, os círculos verde, roxo, azul e vermelho representam as diferentes populações de células (BECTON, DICKINSON AND COMPANY, 2000).

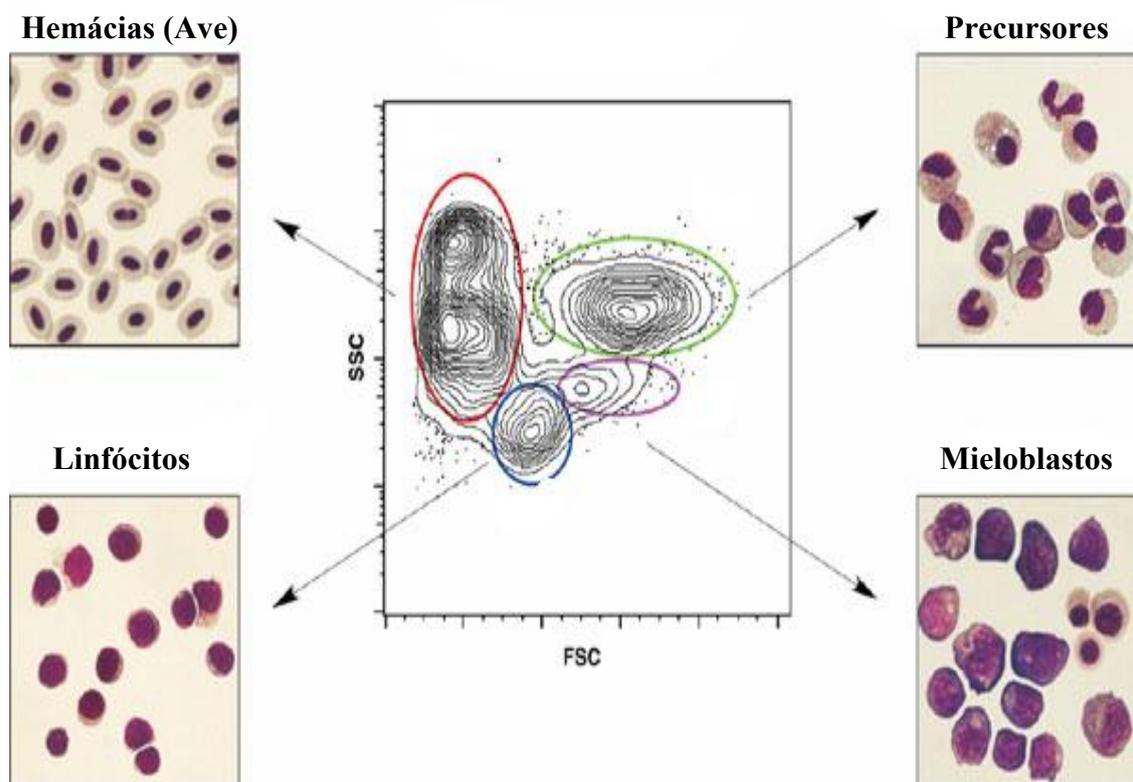


Figura 9. Diferentes populações celulares baseadas em características do FSC e do SSC. (BECTON, DICKINSON AND COMPANY, 2000).

A Figura 10 mostra a formação do pulso de voltagem. O círculo em preto representa uma célula passando pela câmara de fluxo, e esta irá passar através do laser e quando ela está localizada no centro do laser o pico do pulso de voltagem torna-se máximo e quando a célula passa através do laser começa a decair.

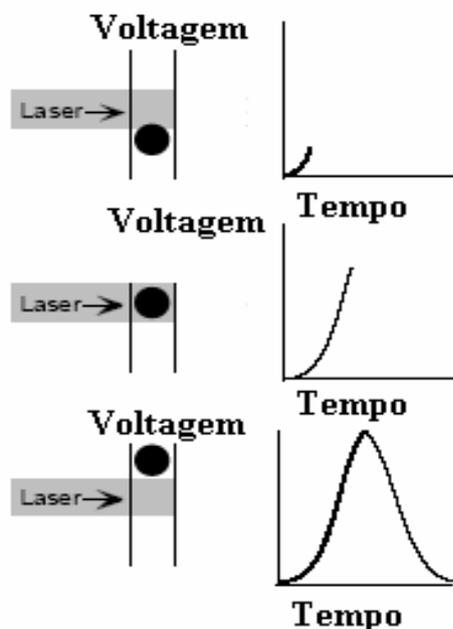


Figura 10. Formação do pulso de voltagem.
(BECTON, DICKINSON AND COMPANY, 2000).

Cada detector produz dois tipos de sinais: logarítmico e linear. O sinal logarítmico é freqüentemente utilizado para separar sinais negativos de sinais fracamente positivos. Por sua vez, o sinal linear é usado para amplificar a dispersão e os parâmetros da fluorescência (BECTON, DICKINSON AND COMPANY, 2000).

Ao pulso de tensão é atribuído um valor digital pelo conversor Analógico/Digital (ADC). O ADC converte um pulso em número digital, sendo este número transferido ao computador.

Um limiar eletrônico pode ser utilizado para limitar o número de eventos que o citômetro de fluxo adquire. O limiar é ajustado como um parâmetro. Quando o valor do limiar é definido apenas sinais com intensidade maior ou igual ao limiar de escolha podem ser processados e emitidos para o computador (BECTON, DICKINSON AND COMPANY, 2000).

O sistema de aquisição das imagens do CF compreende o computador e os cartões eletrônicos para controle dos sinais processados e para a coleta e análise de dados. Os resultados podem ser armazenados no disco rígido do computador do equipamento (BACAL & FAULHABER, 2003).

A CF é utilizada em laboratórios clínicos e de pesquisa, sendo empregada na investigação da célula como um todo, assim como seus constituintes celulares (organelas, núcleo, DNA, RNA, cromossomo, hormônios e conteúdos protéicos) (BACAL & FAULHABER, 2003).

A Tabela 8 apresenta uma análise comparativa entre as metodologias da citometria de fluxo, imunocitoquímica e Western Blot, mostrando as vantagens e desvantagens de importantes parâmetros.

Tabela 8. Análise comparativa entre a citometria de fluxo, imunocitoquímica e Western Blot.

Parâmetros	Citometria de Fluxo	Imunocitoquímica	Western Blot
Nº de células Avaliadas	10^5 - 10^6	10^2 - 10^3	10^5 - 10^6
Tempo de Realização	Minutos	Horas	Dias
Precisão	Objetividade	Subjetividade	Objetividade
Análises de dados	Multiparamétrica	Positivo / Negativo	Positivo / Negativo
Reprodutibilidade	Alta	Baixa	Baixa
Técnica	Semi-automatizada	Trabalhosa (manual)	Trabalhosa (manual)
Método	Padrão	Alternativo / complementar	Padrão
Sensibilidade	Alta	Baixa	Baixa
Reação imunológica	Direto	Direto	Indireto

(CAVALCANTI JÚNIOR et al., 2003).

Diante das características apresentadas, a CF tem se destacado como método de detecção da expressão de antígenos celulares quando comparada com outras metodologias. Isto se deve ao fato desta técnica ser semi-automatizada, possibilitando a análise de um grande número de amostras em um tempo curto. A citometria de fluxo apresenta ainda como vantagem a possibilidade de analisar de forma multiparamétrica, permitindo a detecção de co-expressão de vários antígenos simultaneamente, bem como, a quantificação antigênica (OLIVEIRA, 1993; ORMEROD, 1999).

Neste contexto, esta pesquisa teve como objetivo o estabelecimento de um protocolo metodológico, utilizando a citometria de fluxo, para a análise dos níveis de expressão da proteína p53 em linfócitos do sangue periférico humanos em casos de exposição acidental à RI ou suspeita de irradiação aguda.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Objetivando a implementação de um protocolo para a quantificação dos níveis de expressão da proteína p53 em linfócitos, estudos envolvendo sangue periférico de indivíduos sadios irradiados *in vitro* foram realizados. Nesta etapa da pesquisa, as amostras foram coletadas e submetidas à irradiação com doses conhecidas. Uma vez irradiadas, as amostras foram processadas utilizando diferentes protocolos de incubação e períodos distintos para a cultura celular. A partir daí, foi estabelecido um protocolo de cultivo celular para a realização de análises objetivando quantificar os níveis de expressão da proteína p53 com base na técnica de citometria de fluxo.

3.1 Escolha de doadores

Cada doador forneceu informações de seu estado de saúde, de acordo com seus próprios conhecimentos, e assinou um termo de consentimento livre e esclarecido, conforme apresentado nos anexos II e III. Na Tabela 9 estão os dados obtidos através do questionário apresentado aos indivíduos antes da realização das coletas das amostras.

Tabela 9. Dados obtidos através do questionário apresentado aos indivíduos.

Indivíduos	Sexo	Idade	Fumante	Exposição à agentes físicos ou químicos*
A	F	26	Não	Não
B	M	43	Não	Não
C	M	26	Não	Não
D	M	26	Não	Não

* *Agentes que possam causar algum dano à molécula do DNA.*

3.1.1 Critérios de inclusão e seleção de indivíduos doadores

- ❖ O indivíduo voluntário que assine termo de consentimento livre e esclarecido para doação do sangue a ser posteriormente irradiado.
- ❖ Indivíduos saudáveis, ou seja, isentos de algum tipo de patologia que possa alterar o nível de expressão da proteína p53.
- ❖ Indivíduos que não tenham conhecimento de terem sido submetidos a nenhum tipo de agente químico, físico ou biológico que possam danificar a molécula de DNA.

3.1.2 Critérios de exclusão

- ❖ Recusa do indivíduo quanto à participação nesta pesquisa.
- ❖ Circunstâncias materiais ou logísticas que tornem impossível o desenrolar normal da investigação. Esses casos serão, contudo, relatados.
- ❖ Indivíduos que apresentem algum tipo de patologia que altere os níveis de expressão da proteína p53.

- ❖ Indivíduos que tenham o conhecimento de terem sido expostos a algum tipo de agente químico, biológico ou físico que possam resultar em danos à molécula de DNA.

3.2 Procedimento da coleta das amostras de sangue periférico

Foram estudadas 28 amostras de sangue periférico de indivíduos sadios de ambos os sexos (1 feminino e 3 masculinos), das quais 23 foram irradiadas com doses previamente conhecidas, enquanto 5 amostras não irradiadas foram empregadas como amostras controles.

3.2.1 Escolha do anticoagulante

As amostras de sangue periférico destinadas ao cultivo celular devem ser coletadas utilizando anticoagulante que podem ser a heparina ou o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Constatado que o EDTA não proporciona um crescimento celular eficaz, a heparina foi escolhida, pois além de proporcionar um bom crescimento celular, este anticoagulante reduz o fenômeno de hemólise celular (IAEA, 1986).

As coletas das amostras de sangue periférico foram realizadas por meio de punção venosa, com seringa estéril previamente heparinizada (5.000 U/mL), logo após a assepsia do local com álcool a 70%, com as devidas precauções que envolvem tal procedimento. Todas as coletas foram realizadas na Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE).

De cada doador, foram coletados 10 mL de sangue venoso periférico em seringas. As amostras foram identificadas e acondicionadas em recipiente térmico, para manutenção da temperatura durante o transporte, e em seguida foram encaminhadas ao Centro de Radioterapia de Pernambuco (CERAPE), onde foram irradiadas.

3.3 Hemograma

Para avaliar o número de linfócitos das amostras, foram realizados hemogramas antes e depois da irradiação. Para tanto, uma alíquota da amostra foi encaminhada para o Laboratório de Citologia da Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE). As amostras foram analisadas com do equipamento de hematologia (coulter) cerca de 2 horas após a irradiação.

3.4 Controle negativo das amostras

Para cada amostra analisada foi realizado um controle negativo. Para tanto, uma alíquota do sangue periférico foi encaminhada diretamente para a Unidade de Laboratórios Especializados (UNILABE) do HEMOPE, onde foram realizadas todas as etapas de análise necessárias para a avaliação da expressão da proteína p53.

As alíquotas de sangue periférico para o controle negativo não foram expostas a nenhum tipo de agente agressor à molécula de DNA, possibilitando, com isso, avaliar a expressão da proteína p53 antes da amostra ser submetida à RI.

3.5 Especificações das condições de irradiação

A irradiação das amostras foi realizada utilizando a radiação do tipo gama, a partir de uma bomba de Cobalto 60 (^{60}Co) (*THERATRON 780 – Atomic Energy of Canada Limited*) com uma taxa de exposição de $18,47 \text{ cGy} \cdot \text{min}^{-1}$.

Previamente, foi realizada a dosimetria do equipamento, para a qual foi usada uma câmara de ionização (modelo - PTW 983/N23333) acoplada ao eletrômetro 614 Keithley número 428642/64.

3.6 Arranjo experimental

Seringas contendo 10 mL de sangue foram colocadas dentro de um bloco de Mix D[§] ($\rho = 0,99 \text{ g/cm}^3$) construído especialmente para esses experimentos, conforme ilustrado na Figura 11.

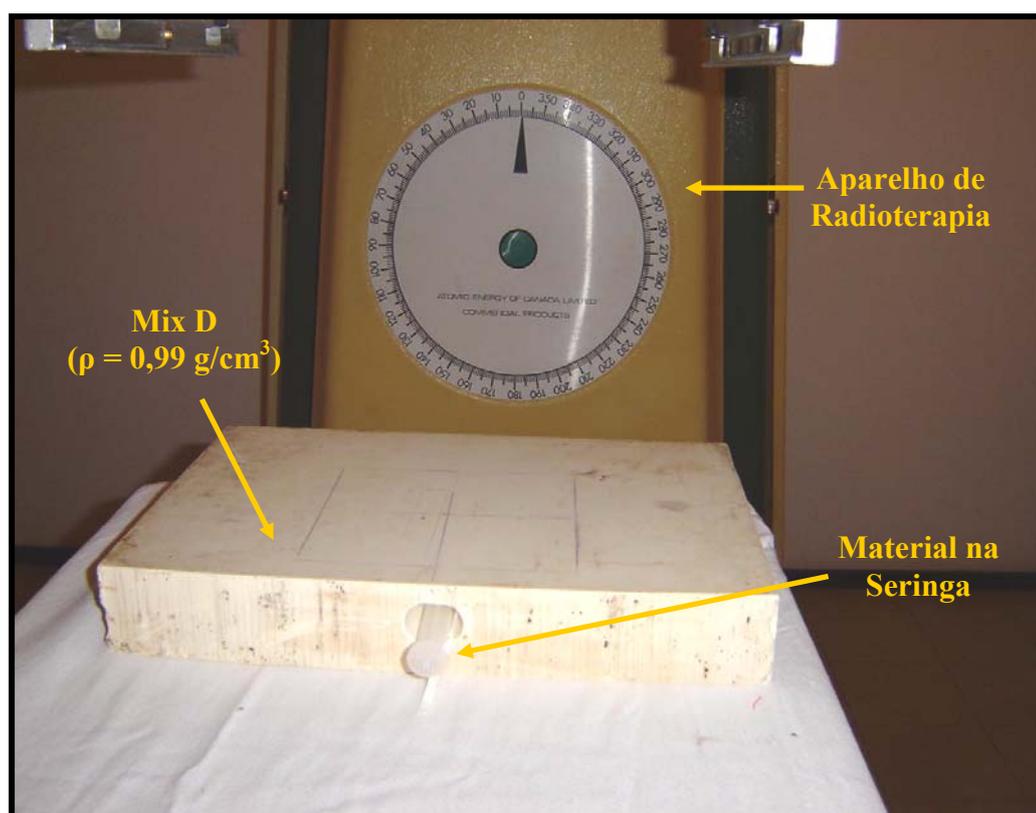


Figura 11. Irradiação das amostras.
(Centro de Radioterapia de Pernambuco)

O campo para a irradiação das amostras foi de 15 cm x 15 cm. A fonte irradiadora foi posicionada no centro do campo, ou seja, no eixo passando pelo centro da seringa, a uma distância de 80 cm do bloco, de sorte a garantir, em conjunto com as dimensões do bloco, a homogeneidade da irradiação da amostra.

[§] Mix D - Material equivalente ao tecido humano. Composição química: Hidrogênio (13,4%), Carbono (77,8%), Titânio (1,4%), Oxigênio (3,5%), Magnésio (3%). Forma física: sólido, quebradiço, esbranquiçado.

Para a definição do protocolo a ser empregado, doses de 5, 10, 100 e 150 cGy foram administradas nas amostras obtidas do indivíduo **A**. Uma vez estabelecido o protocolo a ser utilizado nesta pesquisa, doses de 50, 200, 400 e 500 cGy foram administradas nas amostras obtidas dos indivíduos **A**, **B**, **C** e **D**, no sentido de avaliar os níveis de expressão da proteína p53.

Após a irradiação, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Citogenética do HEMOPE, onde todas as etapas necessárias para a realização das análises por citometria de fluxo foram implementadas.

3.7 Meio de cultura

Para o cultivo de linfócitos, os meios de cultura que podem ser utilizados são: *Minimal Essential Medium* (MEM), o *Mc coy's AS*, o *Ham's* e o *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640).

O meio de cultura escolhido para esta pesquisa foi o RPMI-1640. Este meio de cultura é destinado ao cultivo de células humanas e outros animais sendo sua utilização recomendada por ser capaz de proporcionar uma sincronização da divisão celular. Este meio é composto por uma mistura de sais enriquecida com aminoácidos e vitaminas, componentes essenciais para o crescimento celular (CULTILAB).

3.8 Meio nutritivo

Como aditivo nutricional durante o cultivo celular, optou-se pela utilização do soro fetal bovino (CULTILAB), composto por proteínas totais, albumina, globulinas, glicose, uréia, creatinina, hemoglobina em suas devidas concentrações.

3.9 Mitógeno

O mitógeno de escolha foi a fitohemaglutinina. Este reagente é retirado de uma variedade de *Phaseolus Vulgares* (feijão), podendo ser utilizado na estimulação do crescimento de linfócitos T *in vitro* tanto em primatas, como em espécies de células (CULTILAB).

3.10 Cultivo celular

A Tabela 10 mostra uma comparação entre duas metodologias de cultivos celulares já bastante estabelecidas: a metodologia da citogenética clássica que utiliza para o cultivo o sangue periférico total e cultivo celular que utiliza as células mononucleares do sangue periférico (*Peripheral Blood Mononuclear Cells* - PBMC) (BEIGUEMAN, 1982; CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, 1996). Observando essa tabela, é possível verificar que ambas as metodologias utilizam os mesmos tipos de insumos e possuem um período de manuseio das amostras dentro de uma mesma faixa de tempo (minutos). Diante disto, a metodologia para o cultivo celular foi baseada no custo operacional.

Tabela 10. Comparação entre as metodologias de incubação de cultura.

Parâmetros Metodológicos	Citogenética clássica	Cultura de PBMC
Volume de amostra coletada	mL	mL
Amostra incubada	Sangue periférico total	Células mononucleares
Volume de meio RPMI	mL	μL
Percentual de soro fetal bovino	20%	10%
Volume de fitohemaglutinina	~100 mL	~6 mL
Tempo de manuseio das amostras	min.	min.
Concentração celular	Não ajustável	Ajustável

A metodologia de cultivo celular para PBMC utiliza menos insumos quando comparado com a da citogenética clássica, sendo com isso a metodologia de menor custo. Além disso, esta técnica permite realizar cultivos celulares com concentrações de células já ajustadas, ou seja, com o número de células conhecido.

De um modo geral, nas aplicações da técnica de citometria de fluxo (CF), para que a reação antígeno-anticorpo ocorra adequadamente é necessário o ajuste prévio da concentração celular da amostra a ser analisada. A concentração celular escolhida irá depender do anticorpo utilizado. Para este estudo, a concentração de células ideal é de 1×10^6 células/mL, conforme descrito pelo fabricante do anticorpo (BD *Biosciences Pharmingen*TM *Technical Data Sheet*, USA). Diante disto, a metodologia de cultivo celular escolhida foi a que utiliza as células mononucleares.

3.11 Obtenção da camada de células mononucleares

Para a obtenção dos linfócitos, foi necessário obter a camada de células mononucleares. Para isto, as amostras de sangue periférico foram adicionados à um gradiente de densidade na proporção de 1:2 (*Ficoll-Hypaque*, SIGMA-1077). As amostras foram centrifugadas para a obtenção da camada de células mononucleares a 400 x g durante 20 minutos.

A Figura 12 ilustra o procedimento de obtenção e retirada da camada de células mononucleares. O sangue periférico foi adicionado sob um gradiente de densidade e em seguida as amostras foram centrifugadas para a obtenção da camada de células mononucleares.

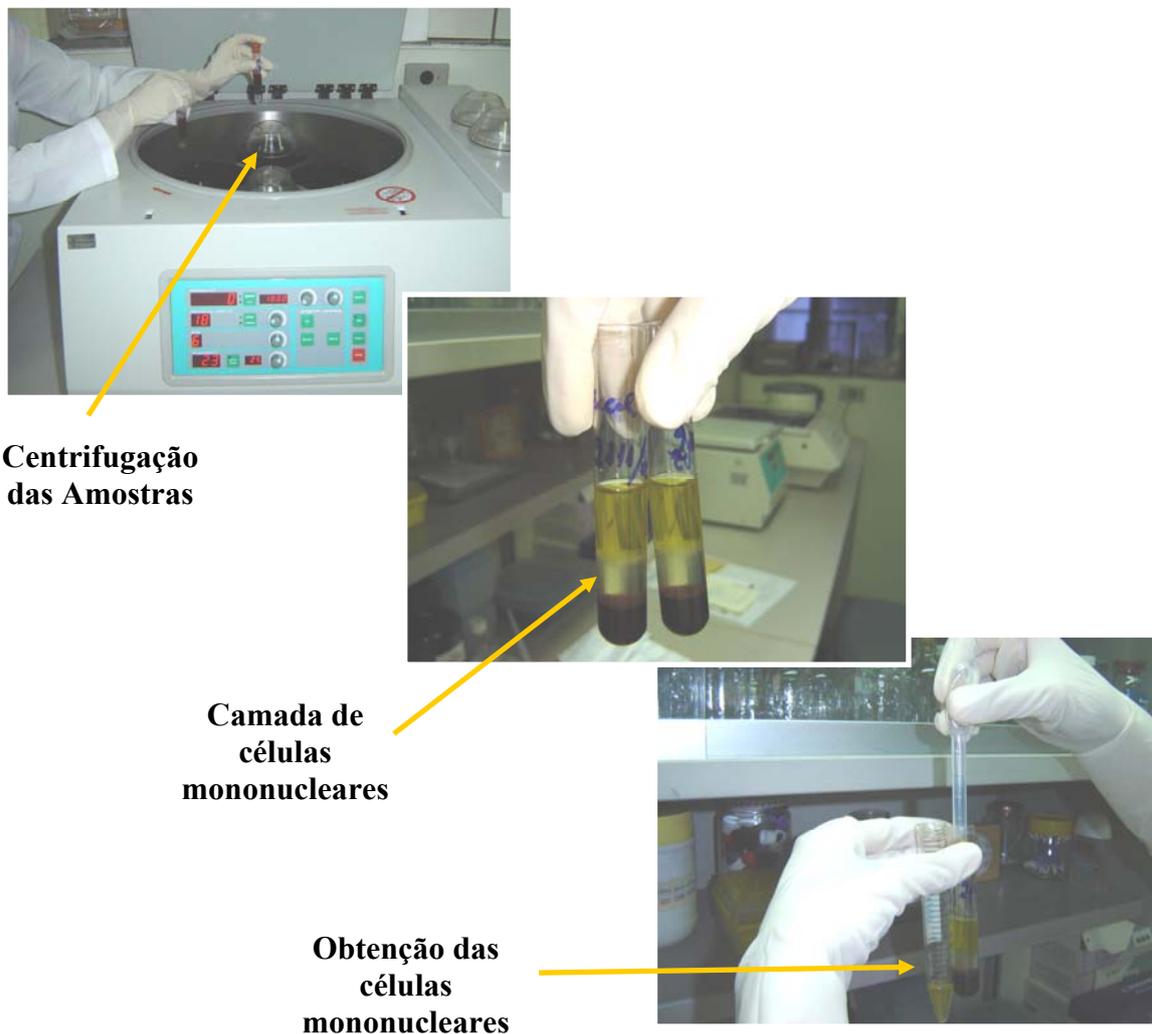


Figura 12. Obtenção da camada de células mononucleares.

Após a obtenção da camada, as células passaram por uma lavagem, objetivando a remoção de resíduos. Para este procedimento, foi adicionada a solução salina tamponada com fosfatos (PBS, pH 7,4) nas células na proporção de 1:2. As amostras foram centrifugadas a 300 x g durante 10 min. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante obtendo-se o precipitado celular, conforme mostra a Figura 13.

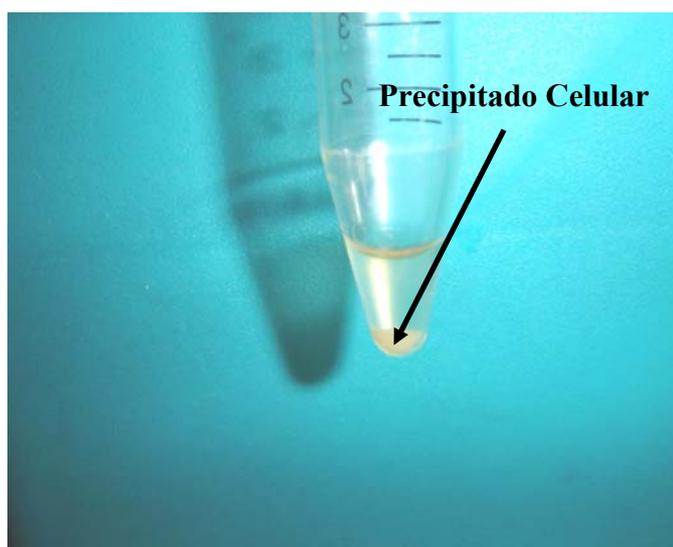


Figura 13. Obtenção do precipitado celular.

Ressuspendeu-se cada “botão” (precipitado) celular em 1 mL do meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, Brasil) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Cultilab, Campinas, Brasil). Após a ressuspensão celular, procurou-se estabelecer o ajuste da concentração celular (1×10^6 cels/mL), recomendado pelo fabricante do anticorpo anti-p53 para a análise dos níveis de expressão da proteína p53 para avaliação por CF.

3.11.1. Concentração celular

Para o ajuste da concentração de linfócitos, foram retirados aproximadamente 10 μ L da re-suspensão celular e adicionados a uma solução de lise para hemácias**, na proporção de 1:20 (fator de diluição). Desta mistura, foram retirados, aproximadamente, 10 μ L, que foram introduzidos na câmara de Neubauer para a contagem do número de linfócitos, sendo em seguida analisado ao microscópio óptico para a contagem dos linfócitos.

** Solução de lise para hemácias: 250 mL de cloreto de amônia para 25 mL de bicarbonato de amônio.

Nesta etapa, considera-se o número de linfócitos dos quatros quadrantes da câmara. O ajuste da concentração é calculado com o auxílio da Equação 6, a seguir:

$$\frac{\mathbf{NC} \times \mathbf{FD}}{\mathbf{A} \times \mathbf{EC}} \quad (6)$$

Onde: **NC** representa o número de linfócitos contados na câmara; **FD** representa o fator de diluição utilizado (1:20); **A** corresponde a área dos quatros quadrantes da câmara ($4 \times 1 \text{ mm}^2$) = 4 mm^2 ; **EC** representa a espessura da câmara de Neubauer (0,01 mm).

3.12 Incubação de cultura

Para incubação das culturas celulares, foram utilizadas placas de cultura com 12, 24 e 48 poços, escolhidas em função do número de poços necessários para a incubação. Após o ajuste da concentração celular, as amostras foram colocadas nos poços da placa de cultura. Cada poço recebeu a quantidade suficiente da amostra correspondendo a concentração final de 1×10^6 células/mL. Na cultura celular foram adicionados 6 μL do mitógeno fitohemaglutinina (Cultilab, Campinas, SP) a fim de se obter os linfócitos na fase G1 do ciclo celular (fase onde a proteína p53 se expressa), em estufa à 37 °C em 5% de CO_2 onde permaneceu por períodos distintos.

Nesta etapa foi avaliado o intervalo de tempo adequado para o período de incubação, que proporcionaria melhor expressão da proteína p53.

Após a realização da cultura, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Imunofenotipagem do HEMOPE e submetidas à análise por citometria de fluxo.

3.13 Citometria de fluxo

A aplicação da técnica da citometria de fluxo para a avaliação da proteína p53 foi baseada na metodologia para análise de antígeno intranuclear, descrito por Geraldo Cavalcanti Júnior e colaboradores em 2003 e 2004. Essa metodologia se divide em três etapas: permeabilização celular; marcação das células e análise propriamente dita com o citômetro de fluxo.

3.13.1 Permeabilização celular

Para este procedimento, as células mononucleares foram ressuspensas em 2 mL da solução de lise celular (*Becton Dickinson's FACS lysing solution*, San-Jose, CA, USA) previamente diluída a 10% em água destilada. As amostras permaneceram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente, seguindo de uma centrifugação a 500 x g durante 2 minutos.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas duas vezes utilizando-se 2 mL de PBS-Tween-20. Repetiu-se o procedimento de centrifugação, e, outra vez, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 200 µL da solução PBS-Tween-20.

3.13.2 Marcação Celular

Nas amostras foram adicionados 10 µL do anticorpo monoclonal anti-p53 conjugado a phycoerythrin (PE) cujo clone é: G59-12 (BD *Biosciences Pharmingen*TM *Technical Data Sheet*, USA). Em seguida, procedeu-se com a incubação das amostras por 20 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Como controle de marcação inespecífica, foi utilizado para cada amostra um tubo controle de marcação inespecífica, empregando-se para tal, imunoglobulina inespecífica conjugada a PE.

Após o período de incubação, foram adicionados 2 mL de PBS-Tween-20 nas amostras, as quais foram em seguida centrifugadas a 500 x g durante 2 min. Após o descarte do sobrenadante, foi adicionado 1 mL de paraformaldeído a 1% aos sedimentos finais, no intuito de garantir a preservação celular até o momento da análise.

3.13.3 Leitura e análises

As leituras e análises foram realizadas em um citômetro de fluxo FACScalibur (*Becton Dickinson*, San-Jose, Ca, USA). A Figura 14 a seguir mostra a foto do citômetro de fluxo FACScalibur (*Becton Dickinson*, San-Jose, Ca, USA) utilizado nesta pesquisa acoplado a um computador.

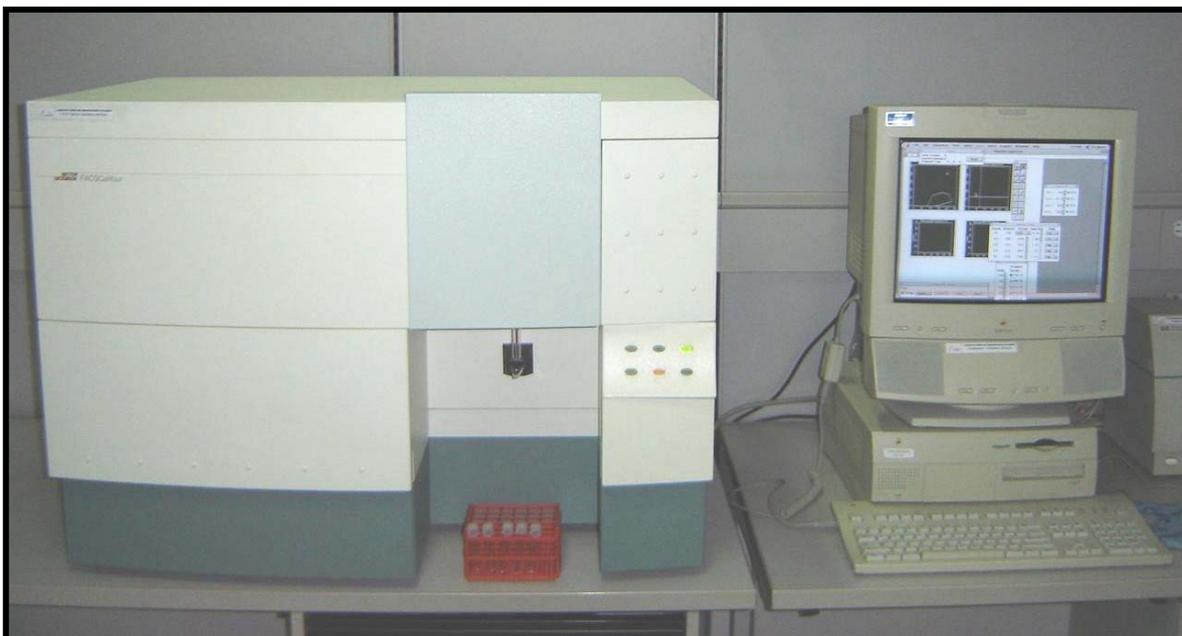


Figura 14. Citômetro de fluxo.
(Laboratório de Imunofenotipagem-HEMOPE)

O software utilizado para o tratamento dos dados foi o *Cell Quest*, versão 3.1 (*Cell QuestTM Software, Becton Dickinson immunocytometry systems, San Jose, CA, USA*). As análises foram realizadas com aquisição de 10 000 eventos, utilizando-se uma região de análise (“gate”) a partir dos parâmetros FSC e SSC em escala linear e FL2, em escala logarítmica, que detecta a fluorescência vermelha, ou seja, a reação antígeno/anticorpo conjugado ao PE.

A Figura 15 apresenta um exemplo no qual pode-se observar a região (*gate*) correspondente aos linfócitos. O eixo SSC fornece a complexidade celular, enquanto que o eixo FSC o tamanho da célula. Através destes parâmetros a população de linfócitos é delimitada (região vermelha no gráfico).

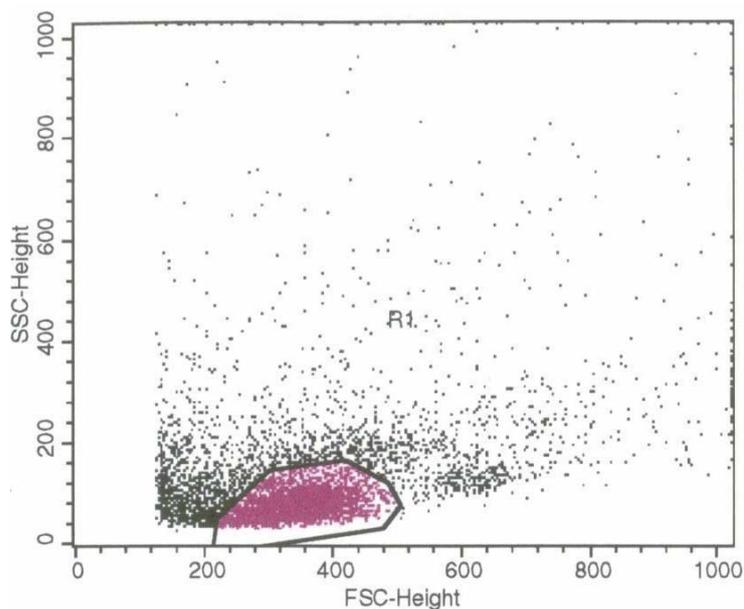


Figura 15. Obtenção da população de linfócitos (*gate*).

A Figura 16 ilustra gráfico que permite a localização de células de interesse, também denominado de *Dot-Plot*. Nesses tipos de gráficos, nota-se quatro regiões: a) UL (*Up Left*) localizada na parte superior do lado esquerdo; b) UR (*Up Right*) localizada na região superior do lado direito; c) LL (*Low Left*), posicionada na parte inferior do lado esquerdo; d) LR (*Low Right*) localizada na região inferior do lado direito.

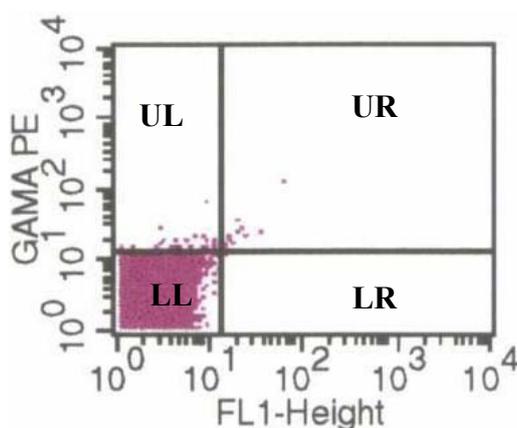


Figura 16. Gráfico das regiões que permitem localização das células de interesse.

A região LL conterá a população de células negativas, enquanto nas regiões LR, UL poder-se-á encontrar as células que foram marcadas com anticorpos específicos, conjugados a diferentes fluorocromos. Nos casos em que as amostras analisadas contenham uma população de célula duplamente marcada para anticorpos conjugados a diferentes fluorocromos, estas estarão localizadas na região UR.

Com base nesta metodologia, as células positivamente marcadas para a p53 (cujo fluorocromo utilizado foi PE) serão encontradas expressas no quadrante UL, devido ao fluorocromo utilizado, quantificadas percentualmente. Os quadrantes LR e UR não serão analisados, já que nestes estariam células marcadas com outro tipo de fluorocromo.

A Figura 17 mostra de forma esquemática todas as etapas metodológicas para a avaliação dos níveis de expressão da proteína p53 em linfócitos do sangue periférico após a exposição à RI.

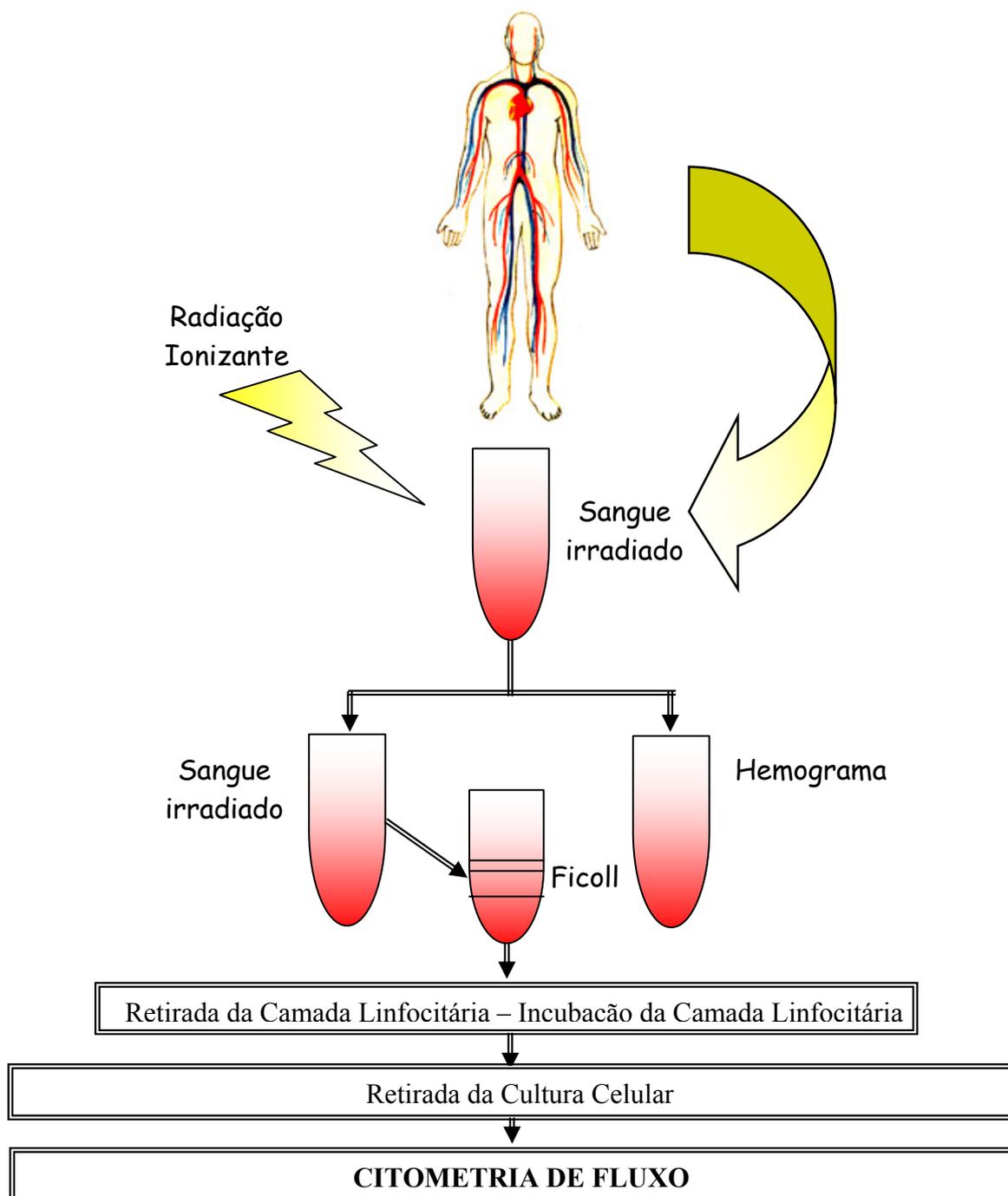


Figura 17. Etapas metodológicas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudos preliminares

Inicialmente, amostras de sangue foram irradiadas *in vitro* com doses de 5, 10 e 50 mGy. Para essas doses, não foram observadas variações nos níveis de expressão da proteína p53. A partir desses resultados, optou-se por avaliar amostras irradiadas com doses acima do limite máximo anual recomendando para indivíduos ocupacionalmente expostos à radiação ionizante, ou seja, 50 mSv, de acordo com a norma da CNEN 3.01 (CNEN, 1988). Nesses estudos, a avaliação dos níveis de expressão da p53 também foi realizada em amostras não irradiadas (amostra controle) com o intuito de verificar os níveis de expressão basal da p53 nas amostras dos indivíduos estudados.

4.2 Concentrações de linfócitos das amostras estudadas

Um dos critérios utilizados para a definição do indivíduo sadio foi o resultado do leucograma dentro da faixa considerada como normal. O leucograma foi realizado em todas as amostras. Nas amostras irradiadas, a análise das concentrações dos linfócitos foi realizada cerca de 2 horas após a exposição à radiação, seguidas dos protocolos metodológicos para a avaliação dos níveis de expressão da proteína p53 nos linfócitos através da metodologia da citometria de fluxo.

A Tabela 11 apresenta a concentração de linfócitos nas amostras de sangue periférico que foram avaliadas. Os resultados das concentrações de linfócitos estão distribuídos de acordo com a dose que foi administrada em cada amostra.

Tabela 11. Concentração de linfócitos das amostras de sangue periférico.

Dose (cGy)	Concentração de linfócitos/mm ³ de sangue periférico			
	A	B	C	D
Controle	2.400	1.600	1.500	1.300
50	2.000	2.000	1.600	1.400
200	1.900	1.600	1.700	1.800
400	2.000	1.500	1.700	1.600
500	2.100	1.500	1.600	1.400

Na tabela acima é possível verificar que todas as amostras analisadas de sangue periférico neste trabalho apresentaram uma concentração de linfócitos dentro do limite considerado normal pela IAEA (2001) (1300 a 4800/mm³), independentemente do sexo, idade e dose administrada. Nas informações fornecidas através do questionário preenchido pelos voluntários, todos os indivíduos relataram não ter tido conhecimento de terem sido expostos a agentes químicos ou físicos que pudessem alterar a concentração de linfócitos.

Segundo Bushong (1997), a diminuição dos níveis de linfócitos (linfopenia) ocorre a partir da dose de 200 cGy. Neste estudo, os níveis de concentração de linfócitos em todas as amostras de sangue analisadas permaneceram dentro dos valores padrões independentemente da dose de radiação administrada.

4.3 Níveis de expressão da proteína p53 em linfócitos não cultivados

A Tabela 12, a seguir, apresenta os valores obtidos para os níveis de expressão da proteína p53, avaliados por citometria de fluxo, em linfócitos de amostras do indivíduo A que não foram submetidas ao processo de cultivo celular. Nesta tabela os níveis de expressão são mostrados em função das diferentes doses absorvidas.

Tabela 12. Níveis de expressão da proteína p53 em linfócitos não incubados.

Doses (cGy)	Níveis de Expressão (%)
Controle	0,04
50	0,00
100	0,07
150	0,02
200	0,01

Observando a tabela acima, é possível verificar que os níveis de expressão da proteína p53 nas células estudadas variaram de 0 a 0,07%, independentemente dos níveis de dose de radiação.

Conforme citado anteriormente, os linfócitos se encontram, em sua maioria, na fase de latência do ciclo celular (G0). No entanto, a proteína p53 atua no ciclo celular no ponto de checagem G1/S, expressando-se, portanto, no início da fase G1 do ciclo celular (CAVALCANTI JÚNIOR et al., 2002). Assim, se faz necessário administrar estímulos externos (mitógenos) nos linfócitos para que eles iniciassem a sua divisão celular, entrassem na fase G1, na qual ocorre a expressão da proteína p53, e com isso fossem capazes de expressar a proteína p53, em situações onde, possivelmente, o DNA da célula foi danificado pela radiação ionizante.

Diante disto, decidiu-se empregar o cultivo de linfócitos como uma etapa adicional ao protocolo da citometria de fluxo, no intuito de estimular sua divisão celular. Com isso, buscou-se obter linfócitos no início da fase G1 do ciclo celular e, verificou sua influência na detecção dos níveis de expressão protéica quando da avaliação pela citometria de fluxo.

4.4 Escolha do período do cultivo celular

Com o protocolo para cultivo celular, foram avaliados diferentes períodos de incubação de cultura celular no sentido de obter aquele que proporcionasse melhores resultados. Para tanto, esta investigação baseou-se na pesquisa de Morice e colaboradores (1993), a qual destaca que, após a estimulação com a fitohemaglutinina, os linfócitos entram na fase G1 do ciclo celular entre 2 a 4 horas. Como a proteína p53 é expressa no início da fase G1, esperava-se encontrar um maior número de linfócitos positivamente marcados para esta proteína após um tempo de incubação que conduzisse a um número mais elevado de linfócitos no início da fase G1 do ciclo celular. A Tabela 13 apresenta os percentuais de células expressas em cada fase do ciclo celular após a estimulação dos linfócitos pela fitohemaglutinina.

Tabela 13. Progressão dos linfócitos após a estimulação com a fitohemaglutinina.

Período de estimulação com a fitohemaglutinina (h)	Percentual de Células		
	G0/G1	S	G2/M
0	97,7 ± 0,7	2,3 ± 0,6	0,0 ± 0,0
2	95,8 ± 2,0	2,8 ± 3,0	1,4 ± 0,0
4	94,1 ± 1,8	3,9 ± 0,00	2,0 ± 0,0
6	93,5 ± 2,9	4,2 ± 0,2	2,3 ± 1,9
8	91,3 ± 1,6	5,9 ± 0,4	2,8 ± 3,8
12	87,6 ± 1,1	9,1 ± 1,4	3,3 ± 1,9
16	79,8 ± 1,5	15,5 ± 0,5	4,7 ± 0,9
24	70,6 ± 0,2	19,8 ± 1,0	9,6 ± 1,4
36	65,2 ± 2,1	22,9 ± 3,1	11,9 ± 0,9
48	63,9 ± 1,5	26,1 ± 1,0	10,0 ± 2,6
72	60,9 ± 3,8	28,5 ± 4,2	10,6 ± 3,3

(KUO et al., 2000).

Como a proteína p53 é expressa no início da fase G1, os níveis de expressão da p53 em linfócitos do sangue periférico não foram analisados nos períodos de incubação de cultura após 6 horas, uma vez que o percentual de linfócitos diminuiu. Com o aumento do período de incubação, o percentual de linfócitos encontrados na fase entre a fase G2 e a mitose propriamente dita (G2/M) também aumenta e, com isso, menos linfócitos serão encontrados na fase G1 do ciclo celular. Este fato foi constatado na Tabela 13.

Primeiramente, procurou-se garantir que a maior parte dos linfócitos estaria no início da fase G1 do ciclo celular, onde possivelmente haveria um maior número de células positivamente expressa para a p53 (KUO et al., 2000). Tendo em vista que a fitohemaglutinina leva entre 2 e 4 horas para estimular os linfócitos, optou-se pela análise de culturas incubadas nos intervalos de tempo de 3 horas e 5 horas. A Tabela 14 apresenta os níveis de expressão da proteína p53 analisados pela citometria de fluxo nas amostras do indivíduo A irradiadas com doses de 5, 10 e 50 cGy após 3 horas e 5 horas incubação celular.

Tabela 14. Níveis de expressão da proteína p53 após diferentes períodos de incubação.

Dose (cGy)	Níveis de Expressão (%)	
	3 horas	5 horas
5	0,19	0,80
10	0,25	0,59
50	0,19	0,27

Na tabela anterior é possível verificar que pela análise da citometria de fluxo os níveis de expressão da proteína p53 em linfócitos do sangue periférico foram maiores para o período de incubação de 5 horas. Isto se deve ao fato de que, provavelmente, neste período a maioria dos linfócitos já se encontram no início da fase G1 do ciclo celular, após a estimulação com a fitohemaglutinina, e com isso há mais expressão da proteína.

Após a escolha do protocolo metodológico as amostras foram submetidas a irradiação para a avaliação dos níveis de expressão da p53.

4.5 Níveis de expressão da proteína p53 das amostras controle

A Tabela 15 apresenta os níveis de expressão desta proteína nas amostras de sangue periférico não irradiadas (amostra controle). As amostras dos indivíduos **A**, **B**, **C** e **D** foram cultivadas em meio de cultura onde permaneceram na estufa por um período de 5 horas.

Tabela 15. Níveis de expressão da proteína p53 das amostras controle.

Amostra dos Indivíduos	Níveis de expressão (%)
A	0,05
B	0,23
C	0,74
D	0,16

Observando a tabela acima, é possível verificar que os níveis de expressão da proteína p53 para as amostras de sangue periférico não irradiadas variaram de 0,05 a 0,74% no período de incubação de 5 horas.

De acordo com Rössner e colaboradores (2004) os níveis de expressão da proteína p53 em indivíduos fumantes são maiores quando comparados com aos indivíduos não fumantes. Fei e colaboradores (2003) afirmam que ao ocorrer um dano na molécula de DNA por agentes físico-químicos a célula irá ativar seu mecanismo de reparo, podendo ocasionar um aumento nos níveis de expressão da proteína p53.

Cavalcanti Júnior e colaboradores (2004) analisaram os níveis de expressão da p53 em linfócitos de doadores de sangue e observaram variações entre 0 e 4% de células positivamente marcadas para a p53. No entanto, neste trabalho não foi informado se os doadores haviam sido expostos a algum tipo de agente agressor ao DNA que pudesse vir a interferir com os níveis de expressão dessa proteína. Logo, os valores de expressão da proteína p53 que serviram como referência basal para este trabalho foram os obtidos na atual pesquisa, já que indivíduos os estudados afirmaram não terem conhecimento de terem sido expostos a agentes físico-químicos mutagênicos.

4.6 Irradiação das amostras com doses de: 50, 200, 400 e 500 cGy

A Tabela 16 apresenta os níveis de expressão da proteína p53 nas amostras dos indivíduos **A**, **B**, **C** e **D** que foram submetidas a uma dose de 50 cGy e que permaneceram em cultura por um período de incubação de 5 h.

Tabela 16. Níveis de expressão da proteína p53 após irradiação com 50 cGy.

Amostra dos Indivíduos	Níveis de Expressão (%)
A	0,27
B	1,05
C	8,23
D	1,97

Observa-se na tabela acima, que os níveis de expressão da proteína p53 variaram de 0,27 a 8,23% nas amostras dos indivíduos. Foi possível verificar um aumento dos níveis de expressão nas amostras dos todos os indivíduos para a dose de 50 cGy quando comparados com os níveis encontrados nas amostras controles.

A Tabela 17 apresenta os níveis de expressão da proteína p53 em amostras do sangue periférico dos indivíduos **A**, **B**, **C** e **D** que foram submetidas às doses de 200, 400 e 500 cGy, onde permaneceram em cultura celular por 5 h.

Tabela 17. Níveis de expressão da proteína p53 após irradiação com 200 cGy.

Amostra dos Indivíduos	Níveis de Expressão (%)
A	1,19
B	2,45
C	18,22
D	4,82

Os níveis de expressão variaram de 1,19 a 18,22% nas amostras dos indivíduos. Foi possível verificar valores de expressão superiores aos valores obtidos com amostras irradiadas com 50 cGy.

A Tabela 18 apresenta os níveis de expressão da proteína p53 nas amostras dos indivíduos **A**, **B**, **C**, **D** quando irradiadas com dose de 400 cGy, e após 5 h de incubação.

Tabela 18. Níveis de expressão da proteína p53 após irradiação com 400 cGy.

Amostra dos Indivíduos	Níveis de Expressão (%)
A	3,05
B	2,69
C	26,17
D	5,36

Observando a tabela acima é possível verificar que os níveis de expressão da proteína p53 variaram de 2,69 a 26,17% para dose de 400 cGy. Neste caso, também foi

possível verificar um aumento dos níveis de expressão da proteína quando comparado aos resultados para doses de 50 e 200 cGy.

Na Tabela 19 é possível observar os níveis de expressão da proteína p53 nas amostras dos indivíduos **A**, **B**, **C** e **D**, que foram irradiadas com dose de 500 cGy, submetidas à cultura celular por um período de 5 h.

Tabela 19. Níveis de expressão da proteína p53 após irradiação com 500 cGy.

Amostra dos Indivíduos	Níveis de Expressão (%)
A	2,26
B	4,95
C	29,06
D	5,98

Na tabela acima é possível verificar que os níveis de expressão da proteína p53 variaram de 2,26 a 29,06%. Ocorreu um aumento dos níveis de p53 em relação aos experimentos com doses inferiores, exceto para na amostra do indivíduo **A**.

A Tabela 20 apresenta um resumo dos níveis de expressão da proteína p53 encontrados nas amostras irradiadas e nas não irradiadas dos indivíduos **A**, **B**, **C** e **D**.

Tabela 20. Níveis de expressão da proteína p53 nas amostras analisadas.

Amostra dos Indivíduos	Níveis de Expressão (%)				
	Controle	50 cGy	200 cGy	400 cGy	500 cGy
A	0,05	0,27	1,19	3,05	2,26
B	0,23	1,05	2,45	2,69	4,95
C	0,74	8,23	18,22	26,17	29,06
D	0,16	1,97	4,82	5,36	5,98

É possível observar, na tabela anterior, que os níveis de expressão da proteína p53, nas amostras dos indivíduos **B**, **C** e **D** aumentaram com a dose administrada. Segundo Levine (1997), o aumento nos níveis de expressão da p53 é proporcional à extensão dos danos do DNA, logo, quanto maior for a dose administrada na célula, maior será o dano celular. Na amostra do indivíduo **A** para a dose de 500 cGy foi possível verificar uma diminuição dos níveis de expressão da proteína. Este fato pode estar relacionado com a quantidade de energia que foi depositada nas células, ou seja, com o nível do dano celular causado pela RI, o que pode ter ocasionado uma falha no processo de reparo e conseqüentemente na expressão da p53.

A Figura 18 apresenta os *Dot-plots* obtidos nas análises das amostras do indivíduo **C**. Estes estão divididos conforme a dose administrada em: I (amostra controle); II (50 cGy); III (200 cGy); IV (400 cGy); V (500 cGy). É possível observar pelos quadrantes superiores do lado esquerdo o aumento da quantidade de células positivamente marcadas para a p53 mediante o aumento da dose.

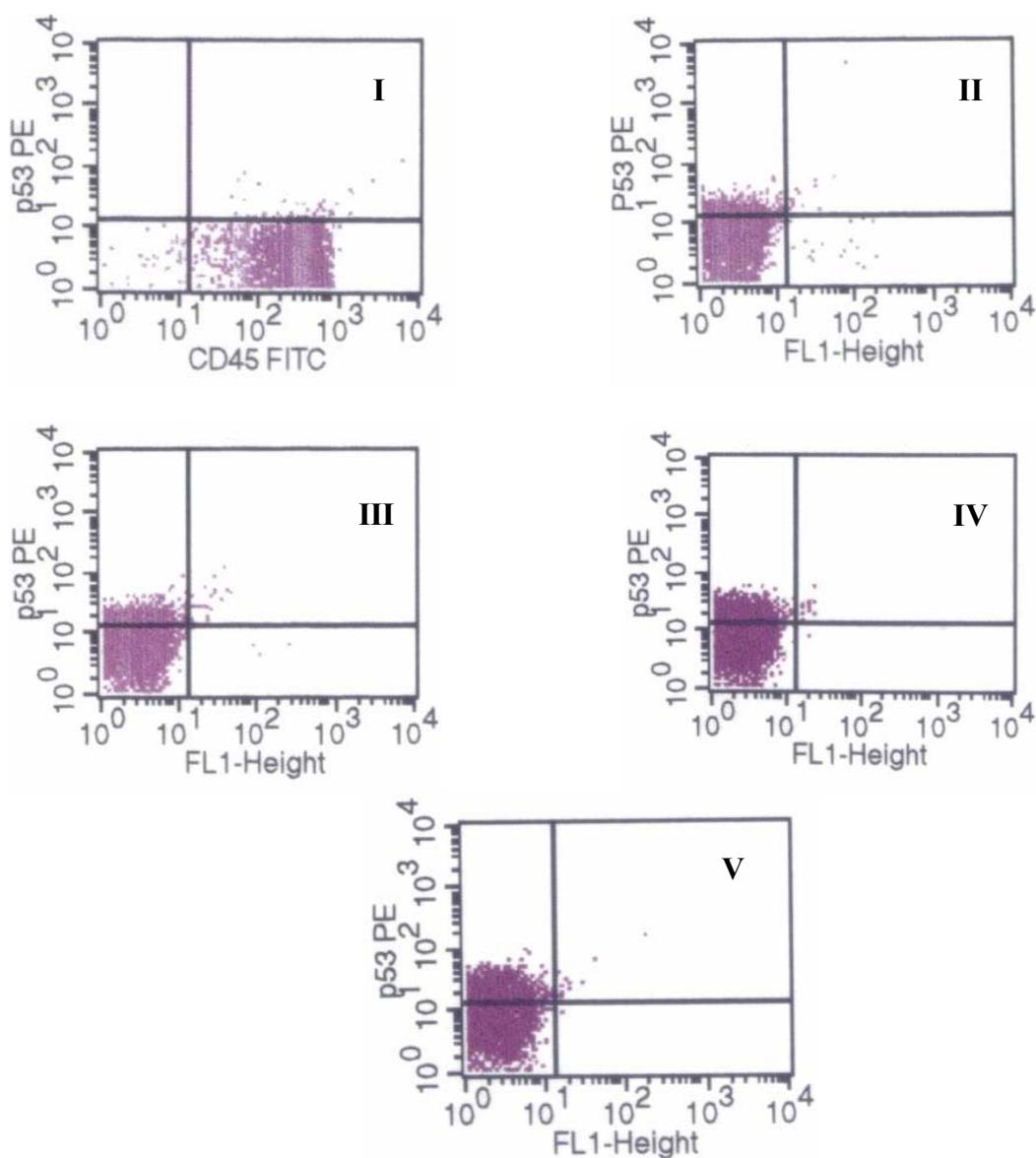


Figura 18. *Dot-plots* do indivíduo C.

Observou-se que os níveis de expressão nas amostras do indivíduo C apresentaram valores superiores aos demais após a exposição à RI. Possivelmente, este resultado está relacionado às diferenças entre radiosensibilidades individuais. Este fato sugere estudos mais detalhados com o objetivo de correlacionar o nível de expressão de proteína p53 com a radiosensibilidade individual.

4.7 Avaliação da metodologia aplicada na pesquisa

Segundo Bushong (1997), um indivíduo irradiado pode manifestar os sinais e sintomas da Síndrome da Radiação Aguda (SAR), a depender da dose absorvida. Para os valores de doses utilizados nesta pesquisa (50, 200, 400 e 500 cGy), em caso de exposição aguda, sintomas definidos pela SAR podem ser observados. Nestas situações, a dosimetria citogenética, através da análise das frequências das aberrações cromossômica (estáveis e instáveis) e na análise de micronúcleo, vem sendo proposta como um método alternativo ou complementar à dosimetria física em caso de suspeita a exposição à RI (AMARAL, 2002).

No entanto, a dosimetria citogenética possui limitações quanto ao tempo de incubação de cultura e análises, acarretando um tempo total de análise relativamente longo a depender do nível de exposição e, conseqüentemente, das medidas a serem tomadas, necessitando de um tempo médio para a cultura e análise das aberrações cromossômicas de 88 horas e para a cultura e análise de micronúcleo 76 horas, para cada indivíduo estudado (FERNANDES, 2005).

Diante disto, o presente trabalho avaliou os níveis de expressão da proteína p53 em linfócitos o sangue periférico após irradiação, *in vitro*, utilizando a metodologia da citometria de fluxo como uma possível ferramenta para a biodosimetria.

O protocolo para a quantificação dos níveis de expressão da proteína p53 foi estabelecido para amostras irradiadas com radiação gama, *in vitro*. De acordo com a Agência Internacional de Energia Atômica, os efeitos biológicos de linfócitos irradiados *in vitro* e *in vivo* são semelhantes (IAEA, 2001).

A citometria de fluxo (CF) se mostrou adequada para a avaliação dos níveis de expressão da proteína p53 apesar do Western Blot (WB) ser classicamente referido como padrão ouro na pesquisa da p53. Segundo Cavalcanti Júnior et al. (2004), o WB 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. Nesta pesquisa, a CF se mostrou uma técnica sensível, de fácil execução e rápida, podendo uma amostra ser analisada em 6 horas.

Por outro lado, aplicação deste protocolo em casos de contaminação interna por fontes que emitam outros tipos de radiação (por exemplo, beta ou alfa), dependerá do conhecimento de diversos parâmetros, tais como: via de contaminação, do tipo de emissão radioativa, e da biocinética do complexo químico ao qual está associado o radioisótopo investigado.

Com os resultados obtidos nesta pesquisa, foi possível verificar que a avaliação dos níveis da p53 pela citometria de fluxo pode ser utilizada como sendo uma metodologia de tiragem em casos de suspeita de exposição a fótons, onde em poucas horas (6 h) será possível dizer se um indivíduo foi exposto ou não à RI. Esta avaliação poderá ter uma grande aplicabilidade na radioproteção, monitoramento individual e em casos de suspeitas de acidentes onde o alerta para a equipe médica quanto ao planejamento do tratamento de vítimas de acidentes nucleares, em geral membros do público, é de extrema importância, antes mesmo da manifestação dos primeiros sintomas da SAR.

No entanto, após a aplicação desta metodologia, a dosimetria citogenética deverá ser realizada nas amostras que apresentaram níveis de expressão da p53 aumentado. Isto se faz necessário, quando se deseja estimar a dose que o indivíduo foi exposto.

5 CONCLUSÃO

- ✓ A metodologia padronizada nesta pesquisa para avaliação dos níveis de expressão da proteína p53 em linfócitos irradiados do sangue periférico, por citometria de fluxo, mostrou-se ser de fácil execução e específica, com base na natureza do anticorpo empregado, permitindo assim o processamento e análise das amostras em curto intervalo de tempo.
- ✓ As análises realizadas a partir de amostras irradiadas apresentaram um aumento dos níveis de expressão da proteína p53 com o aumento da dose absorvida no sangue periférico, sugerindo o emprego da quantificação de linfócitos positivamente marcados para proteína p53 como biomarcador de exposição à radiação ionizante.
- ✓ Em casos de suspeita de radiação aguda, o protocolo estabelecido neste trabalho poderá ser empregado como teste preliminar para caracterização da possível exposição individual.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; BRAY D.; LEWIS J.; RAFFT M. *Biología molecular de la célula*. Barcelona, Omega, 3 ed, p.596-614, 1996.

AMARAL, A. Trends in Biological Dosimetry: an Overview. *Brazilian Archives of Biology and Technology an International Journal*. Vol.45, Special n. p:119-124, Sept., 2002.

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

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

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

BATES, S.; VOUSDEN, K. H. Mechanism of p53-mediated apoptosis. *Cell. Mol. Life. Sci.*, v.55, p.28-37, 1999.

BD Pharmingen™ Technical Data Shett. Phycoerythin (PE)-conjugates p53 antibody reagent set Rev. 005 in 08/29/02 page: 1of 1.

BECTON DICKINSON AND COMPANY. *Introduction to Flow Cytometry: A learning Guide*. Manual Part Number: 11-11032-01 April, 2000.

BEIGUEMAN, B. *Citogenética humana*. Editora: Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 1982.

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

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

CAVALCANTI JÚNIOR G. B.; KLUMB, C. E.; MAIA, R. p53 e as hemopatias malignas. *Revistas Brasileiras de Cancerologia*, 48 (3): 419-427, 2002.

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 Análises Clínicas*. Vol.35 (3): 125-142, 2003.

CAVALCANTI JÚNIOR, G.B.; SCHEINER, M. A. M.; OLIVEIRA, J. G. P.; VASCONCELOS, F. C.; DOBBIN J. A.; KLUMB, C. E.; MAIA, R. C. Detecção da proteína p53 em células leucêmicas por citometria de fluxo e western blot. *Revista Brasileira de Cancerologia*. vol. 50(3). P.191-202, 2004.

CEMBER, H. *Introduction to health physics*. 3. ed. New York: The McGraw-Hill Inc, 733p, 1997.

CHECKPOINT. Disponível em: <<http://www.tcb.cl/1535/article-61145.html>>. 1022 x 686 pixels - 26k (check point).

CICLO CELULAR. Disponível em: <http://www.tcb.cl/1535/articles-61145_celula2.jpeg>, 520 x 483 pixels - 65k. Acesso em: 16/06/2005 às 14:45h.

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR, CNEN. *Diretrizes Básicas de Radioproteção*. Resolução CNEN 12/88, NE 3.01, publicada em agosto, 1988.

COOPER, GM. *The cell, a molecular approach*. Washington, ASM Dress and Sinauer Associated Inc, p. 1191-205, 1999.

CHEN, X.; KO, L. J.; JAYARAMAN, L.; PRIVES, C. p53 levels, functional domains and DNA damage determine the extend of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev.*, v.10, p24-38, 1996.

CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY. *Immunologic Studies In Human*. Supplement 19, cap.7, 1996.

CUTILAB. *Materiais para Cultivo Celular*. Disponível em : <<http://www.cutlilab.com.br>> Acessado em: 08/01/2005, 10:59h.

DELEO A. B.; JAY G.; APPELLA E.; DUBOIS G. C.; LAW L.W.; OLD L. J. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci. USA* 76: 2420-2424, 1979.

DEFAVERY, R.; LEMOS, J. A. R.; KAHIMA, S.; BERNARDES, J. E.; ECRIDELLI, A. A.; COVAS, D. T.; TONE, L. G.; Analysis of p53 gene by PCR-SSCP in ten cases of Wilms' tumor. *Revista Paulista de Medicina*, v.118 (2), p.49-52, 2000.

DÍAZ, L. D. L.; CALA, O. L. O.; LIZCANO, A. I. G.; CORNEJO, V. M. M. *MedUNAB. El ciclo celular*. 2003; 6(16): 21-29.

DOWD, T.B.; TILSON, D. E. *Practical radiation protection and applied radiobiology*. W.B Saunders Company, second edition, Philadelphia, 1999.

DOWELL, S. P.; WILSON P. P. G.; DERIAS, N. W.; et al. Clinical utility of the immunocytochemistry detection of p53 protein in cytological specimens. *Cancer Res*. V.54.p. 2914-2918, 1994.

DRANÈ, P.; ALVAREZ, S.; MEILLER, A.; MAY, E. L'activation de la protéine p53, un événement déterminant de la réponse cellulaire aux radiations ionisantes. *Médecine Nucléaire Imagerie fonctionnelle et métabolique*.v.26 n.3, 2002.

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

FERNANDES, T. de S. (2005). *Emprego das Aberrações Cromossômicas Instáveis e Micronúcleo no Biomonitoramento Individual: Estudo Comparativo*. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Energéticas Nucleares). Universidade Federal de Pernambuco, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/DF. Orientador: Ademir Amaral.

FISHER, D.R., From "micro" to "macro" internal dosimetry. In: *Internal radiation dosimetry*, Raabe, O.G. (ed.), Medical Physics publ., Madison, pp. 61-80, 1994.

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

GARRETT M. D. Cell cycle control and cancer. *Current Science*, v. 81,nº 4, 10 September, 2001.

GERMAIN, J. St. *Radiation Monitoring with reference to the medical environment*. *HealthPhysics*, v.69, n.5, p.728 – 749, 1995.

HALL, E. J. *Radiobiology for the Radiologist*. 4. ed. Philadelphia: Ed. Lippincott Company, 1994. 478 p.

HARRIS, C. C. p53 at the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment, *Science*, v.262, p1980-1981, 1993.

HUTCHINSON F. Prog. Nucleic Acid Res. Mol Bio. v. 32, p. 115-154, 1985.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA). Biological dosimetry chromosomal aberration on analysis for dose assessment. Publication v. 260, Vienna, 1986.

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

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

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

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

JAYARAMAN, S.; LAWRENCE, H. Clinical Radiotherapy Physics: Clinical Planning and Radiation Safety, v. 2. New York: Ed. CRC Press, 1996. 235p.

KAHN, H., Random sampling (Monte Carlo) techniques in neutron attenuation problems. Nucleonic, 6: 27-37, 1950.

KLUCK, R. M.; BOISSY-WETZL, E.; GREEN, D. R.; NEWMeyer, D. D. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for bcl-2 regulation of apoptosis. Science, v.275, p.1132-1136, 1997.

KUO, Y.; YANG, N.; CHOU, C.; LIN, L.; TSAI, W. Regulation of Cell Proliferation, Gene Expression, Production of Cytokines, and Cell Cycle Progression in Primary Human T Lymphocytes by Piperlactam S Isolated from Piper Kadsura. Mol. Pharmacol, 58: 1057-1066, 2000.

LA CÉLULA. 618 x 354 pixels - 81k. Disponível em: <http://www.tcb.cl/1535/article-61145.html>. Acesso em : 20/05/2005 às 10:31h.

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

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

LLOYD, D. C. New Developments in Chromosomal Analysis for Biological Dosimetry. *Radiation Protection Dosimetry*, v. 77, n. 1/2, pp. 33-36, 1998.

LOGULLO, A. F.; PEREIRA DE MOURA, R.; NONOGAKI, S.; KOWALSHI, L.P.; NAGAI, M. A; SIMPSON, A. J.G. A proposal for the integration of immunohistochemical staining and DNA-based techniques for the determination of TP53 mutations in human carcinomas. *Diag. Mol. Pathol.* v. 91. p. 35-40, 2000.

MACKIE, T.R., Applications of the Monte Carlo in Radiotherapy. In: The dosimetry of ionizing radiation Vol. III, Kase, K.R., Bjärngard, B.E. and Attix, F.H. (eds.), Academic Press, California, 1990.

MARK J. J., HELLER R. Methods in molecular biology: flow cytometry protocols. Totowa: Humana Press, v.91, 1988.

MORICE W. G.; BRUNN, G. J.; WEIDERRECHET G.; SIEKIERKA J. J.; ABRAHEM, R. T. Rapamycin-induced inhibition of p34^{cdc2} kinase activation is associated with G1/S phase growth arrest in T lymphocytes. *J. Biol. Chem*, 268:3731-3738, 1993.

NILOFF, F. M. *Am. J. Obst. Gynecol*, v.151, p.981-986, 1985.

OKUNO, E.; *Radiação: Efeitos, Riscos e Benefícios*. Editora HARBRA Ltda, São Paulo, 1988.

OLIVEIRA, M. S. P. Citometria de Fluxo em imunofenotipagem celular I. Perfil imunológico de linfócitos circulares. *Bol. Soc. Bras. Hematol Hemoterapia*. 163 915), 59-67, 1993.

ORMEROD, M. G. In: *Flow Cytometry*, 2º edição, Bios Scientific Publishers, 1999.

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

PERRY M. E. mdm2 in the Response to Radiation. *Molecular. Cancer Research*. v.2, 9-19, January, 2004.

POUGET, J.P.; MATHER, S. J. General aspects of cellular response to low dose and high LET radiation. *Eur.J. Nucl.Med.*, London, 28, 4:541-56, 2001.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. *Mutagênese Ambiental*. 1. ed. Canoas: Ed. ULBRA, 355p, 2003.

RIGHI, E.; Di POFI, M. *Medicina*. 291 p, 1987.

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*, 556: 55-63, 2004.

ROTTER, V.; PROKOCIMER, M. P53 and human malignacies. *Adv Cancer Research*, 53: 257-72, 1991.

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

SNUSTAD & SIMMONS. *Fundamentos de genética*. 2. ed. Rio de Janeiro: ed. Guanabara, 2001.664p.

SOUSSI, T. Cylce cellulaire at apoptose: lê gene supresseur de tumeur p53. *Médecine/sciences* n° 4, v.16, p.469-472, 2000.

TAUHATA, L.; SALATI, I. P. A.; PRINZIO, R. Di.; PRINZIO, M.A.R.R.Di. *Radioproteção e dosimetria: fundamentos-5* revisão agosto/2003. Rio de Janeiro-IRD/CNEN 242p.

Técnica de Imunohistoquímica-Laboratório de Anticorpos. Disponível em: http://www.anticorpos.com.br/C_ihqtec.htm. Aceso em: 28/07/2004, hora:10:15:23.

TURPEINEN, M.; SERPI, R.; RAHKOLIN, M.; VÃHÃKANGAS K. Comparasion of anti-p53 antibodies in immunoblotting. *Bioch. Boph. Res. Communications*. V.293. p.850-856, 2002.

VOISIN, P. Chromosome lesions as short and medium term biological indicator of acute irradiation. In: *L'homme blessé*. Paris, eds. L. Court and A. Lallemand, p. 139-150, 1997.

VOISIN, P.; BENDERITTER, M.; CLARAZ, V.; CHAMBRETTE, I.; SOROKINEDURM, M.; DELBOS, V.; DURAND, A. L.; PAILLOLE, N.; The cytogenetic dosimetry of recent accidental overexposure. *Cellular and Molecular Biology*, v. 47, p. 557-565, 2001.

WARD, J. F. Prog. Nucleic Acid Res. Mol Biol. v.25. p.95-125, 1988.

YANG, J.; LUI, X.; BHALLA, K.; KIM, C. N.; IBRADO, A. M. Prevision of apoptosis by bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. Science, v.275, p.1129-1332, 1997.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. Hematologia: fundamentos e prática. São Paulo: Atheneu, 1043p, 2001.

ANEXO I

ESTRUTURA DA PROTEÍNA p53

A proteína p53 é um fator de transcrição com 393 aminoácidos e pode ser dividida em diversos domínios funcionais destacando: o domínio amino-terminal, o domínio de ligação específica ao DNA denominada de parte central; e o domínio de regulação localizado na região carboxi-terminal.

- O domínio amino-terminal possui uma atividade de transativação. Este domínio interage com a enzima RNA polimerase, aumentando a atividade de transcrição da proteína p53. Neste domínio também se encontra uma região rica em prolina com elevada similaridade às proteínas que se ligam a SH3, que são necessárias para apoptose e que interagem com outras proteínas celulares.
- Na parte central é onde ocorre a união da proteína p53 com o DNA. Esta região central é resistente à ação de enzimas proteolíticas e outras interações. Neste domínio se localizam quatro regiões altamente conservadas entre diferentes espécies e serve de reconhecimento e de união ao DNA. Os aminoácidos 248 e 276 são os que se unem diretamente ao DNA e são os que sofrem maior número de mutação em amostras tumorais.
- O domínio carboxi-terminal possui três diferentes funções: o domínio é o 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, ou seja, a forma ativa da proteína e uma fonte de fosforilação para as Cdk. Este domínio intervém na promoção da apoptose e na regulação da transcrição, embora de forma não tão

importante como o domínio amino-terminal, assim como atua no reconhecimento do dano da dupla cadeia de DNA.

Aproximadamente 90% das mutações se localizam na região onde ocorre a união da proteína p53 com o DNA e onde existem “pontos quentes” de mutações, que podem causar tanto a perda da função supressora de tumor da p53, como o ganho da função oncogênica (LANE, 1992). Na Figura 19 pode-se observar a ligação entre a proteína p53 e o DNA.

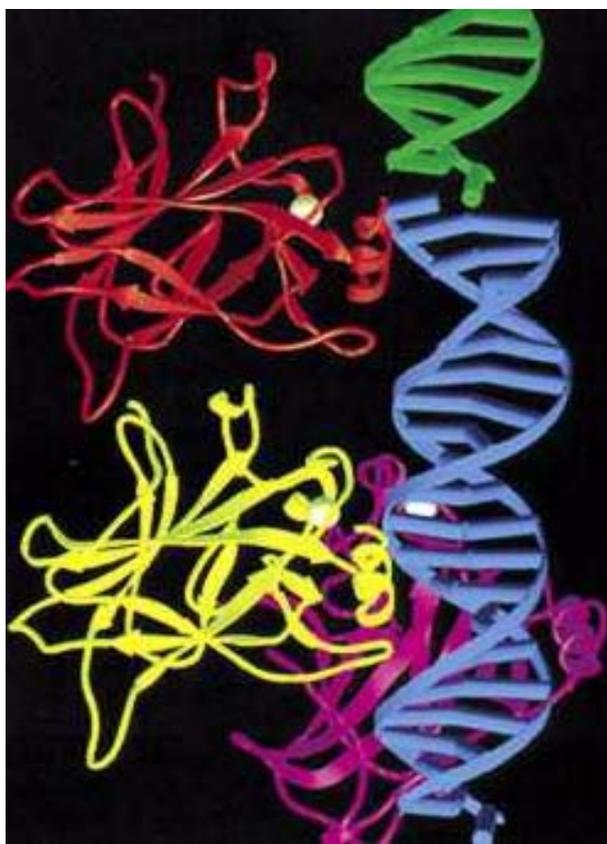


Figura 19. Proteína p53 ligada a uma molécula de DNA.
(<http://press2.nci.nih.gov/sciencebehind/cioc/survival/survival.htm>)

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: “UTILIZAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO PARA AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA p53 EM LINFÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO IRRADIADOS *IN VITRO*”.

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 Mestrado do Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco.

Assinando este Termo de Consentimento, estou ciente que:

1. Objetivo desta pesquisa é padronização da técnica de citometria de fluxo para a avaliação dos níveis de expressão da proteína p53 em linfócitos de amostra do sangue periférico após a exposição a radiação ionizante.
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, incluída sua publicação na literatura científica especializada e apresentação em eventos científicos;

Recife, _____ de _____ de _____.

Voluntário (Assinatura e RG)

Pesquisador

ANEXO III
QUESTIONÁRIO DO DOADOR

Título da Pesquisa: “UTILIZAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO PARA AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA p53 EM LINFÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO IRRADIADOS *IN VITRO*”.

Pesquisadores: Mariana Brayner, Ademir Amaral, Cíntia Gonsalves de Faria Machado.

Identificação do Voluntário:

Nome: _____

Código: _____

Iniciais: _____

Sexo: Feminino Masculino

Data de Nascimento: _____

Raça: Branca Negra Mulata 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: _____

➤ FumanteSIM 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: _____