

Instituto de Radioproteção e Dosimetria - IRD

**INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO GENÉTICO NO REPARO DE ERROS NA
MOLÉCULA DE DNA E MÉTODOS DE ANÁLISE DAS ABERRAÇÕES
CROMOSSÔMICAS RADIOINDUZIDAS**

Rio de Janeiro

2013

DIANA LOURENÇO BRANDÃO

**INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO GENÉTICO NO REPARO DE ERROS NA
MOLÉCULA DE DNA E MÉTODOS DE ANÁLISE DAS ABERRAÇÕES
CROMOSSÔMICAS RADIOINDUZIDAS**

Monografia apresenta ao Instituto de Radioproteção e Dosimetria da Comissão Nacional de Energia Nuclear como requisito parcial para obtenção do grau de especialista em Proteção Radiológica e Segurança de Fontes Radioativas.

ORIENTADORA:

Dra. Monica Stuck de Oliveira – IRD / CNEN

**Rio de Janeiro
Outubro, 2013**

539.77

S587u

Brandão, Diana Lourenço

Influência do polimorfismo genético no reparo de erros na molécula de DNA e métodos de análise das aberrações cromossômicas radioinduzidas / Diana Lourenço Brandão. – Rio de Janeiro: IRD/IAEA, 2013.

V. 1, 32 f.: il.; gr.; tab.; 29cm.

Orientadora: Monica Stuck de Oliveira

Trabalho de conclusão de curso (Especialização - Lato Sensu em Radioproteção e Segurança de Fontes Radioativas)- Instituto de Radioproteção e Dosimetria. 2013.

Referências bibliográficas: f. 20- 21

1. Polimorfismo Genético. 2. Aberrações Cromossômicas. 3. Danos Radioinduzidos. 4. Reparo de erros do DNA. I. Instituto de Radioproteção e Dosimetria. II. Título.

BRANDÃO, Diana Lourenço. **Influência do polimorfismo genético no reparo de erros na molécula de DNA e métodos de análise das aberrações cromossômicas radioinduzidas.** 2013. 42fl. Monografia (Especialização em Proteção radiológica e segurança de fontes radioativas) – Instituto de Radioproteção e Dosimetria, Comissão Nacional de Energia Nuclear, Rio de Janeiro, 2013.

BANCA EXAMINADORA

Orientador (a):

Dra. Monica Stuck de Oliveira (IRD / CNEN)

Examinador (a) 1 :

Dr. Walsan Wagner Pereira (IRD/ CNEN)

Examinador (a) 2:

MSc. Ana Cristina Murta Dovalles (IRD/ CNEN)

Aprovada em: ___/___/ 2013

INSTITUTO DE RADIOPROTEÇÃO E DOSIMETRIA – IRD

Av. Salvador Allende, s/nº – Jacarepaguá.

Rio de Janeiro – RJ - CEP: 22780-160

<http://www.ird.gov.br>

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha avó, Arossedes Vargas Lourenço (*in memoriam*), pelo amor incondicional e por ter acreditado na minha capacidade quando nem eu acreditava mais. Ela me ensinou que a vida não é justa, mas que é possível seguir em frente mesmo que pareça impossível.

AGRADECIMENTOS

A minha querida mãe, minha inspiração. Uma verdadeira vencedora, determinada, que me emociona com cada nova conquista. Que me ensinou a lutar e não desistir nunca. Uma mulher forte e com uma fé inabalável. Às minhas queridas avós, pelo amor, carinho, paciência e por nunca desistirem de mim. Agradeço também por elas sempre me conduzirem a busca intelectual.

A minha avó Arossedes, que partiu para outro plano. Sabíamos que cada dia com ela seria uma consessão, mas sempre íamos querer mais tempo.

A minha tia, Lucieni, que se orgulha de cada conquista minha como se eu fosse sua filha de sangue. Uma grande parceira que está sempre disposta a ajudar.

A Newton de Thuin, pelo carinho, incentivo e por me fazer enxergar que podemos tirar bons proveitos de situações ruins.

A minha orientadora, Monica Stuck de Oliveira, pela sensibilidade e paciência.

Aos queridíssimos amigos Leandro Luiz e Rafaela Batista, pela ajuda constante, reconhecimento, e por me motivarem e me fazerem acreditar que podemos ir além.

Diana Lourenço Brandão

Moça, olha só o que eu te escrevi:

É preciso força pra sonhar e perceber que
a estrada vai além do que se vê.

Rodrigo Amarante

RESUMO

O ser humano sempre esteve exposto a diversos tipos de radiação. Dos vários danos que a radiação pode causar nas células o mais importante é o que ocorre no DNA. As radiações ionizantes induzem quebras e alterações na molécula de DNA, resultando em reparo ou morte celular. Caso o reparo seja imperfeito as consequências biológicas resultantes se traduzem em aumento das mutações genômicas e cromossômicas que podem resultar em uma proliferação desordenada de células que resultam em tumores. A eficiência nos sistemas de reparos de erros na molécula de DNA é importante para a manutenção da integridade da molécula. O polimorfismo genético produz alterações genéticas que podem interferir no sistema de reparo de erros do DNA. O polimorfismo genético contribui significativamente para a alteração desses mecanismos de reparo. Este trabalho sugere a hipótese de que o polimorfismo genético pode alterar a sensibilidade dos indivíduos expostos às radiações ionizantes e a capacidade do organismo de reparar os danos causados por estas. Discute-se também a importância dos polimorfismos na determinação do nível basal de alterações citogenéticas. Para isto, foi feito um breve resumo sobre as técnicas utilizadas em dosimetria biológica demonstrando suas aplicações em triagem, acidentes, especificidade e precisão na estimativa de dose. A dosimetria citogenética é a técnica mais específica detecção de aberrações cromossômicas radioinduzidas.

ABSTRACT

The human always exposed to various types of radiation. The various damage that radiation can cause cells in the most important is what happens in DNA . Ionizing radiation induces changes and breaks in the DNA molecule , resulting in repair or cell death. If the imperfect repair is the biological consequences resulting translate to increased genomic and chromosomal mutations can result in a disorganized proliferation of cells resulting in tumors. The efficiency of the repair systems errors in the DNA molecule is important for maintaining the integrity of the molecule. Genetic polymorphism produces genetic changes that may interfere with system error repair DNA . Genetic polymorphism contributes significantly to the alteration of these repair mechanisms . This work suggests the hypothesis that genetic polymorphism can alter the sensitivity of individuals exposed to ionizing radiation and the body's ability to repair damage caused by them. We also discuss the importance of polymorphisms in the determination of baseline cytogenetic alterations . For this , we made a brief summary of the techniques used in biological dosimetry demonstrating their applications in screening , accidents , specificity and accuracy in estimating dose. The cytogenetic dosimetry showed the technique more specific and easy to detect radiation-induced chromosomal aberrations .

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO GERAL.....	1
3. MECANISMO GERAL DA CARCINOGENESE HUMANA.....	1
4. LESÕES NO DNA CAUSADAS POR RADIAÇÕES IONIZANTES	4
4.1. Tipos de radiação e ações no DNA.....	4
4.2. Reparo de erros no DNA.....	7
4.3. Polimorfismos genéticos e tolerância dos indivíduos aos agentes genotóxicos	9
5. MÉTODOS DE ANÁLISE DAS ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS.....	11
5.1. Análise Citogenética (Cromossômos Dicêntricos).....	11
5.2. Micronúcleos (MN)	13
5.3. Hibridização in situ fluorescente (FISH)	15
5.4. Condensação Prematura de Cromossomos (PCC).....	17
6. Conclusões.....	19
Referências	20

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: AÇÕES DIRETAS E INDIRETAS DAS RADIAÇÕES.	6
FIGURA 2: MECANISMO GERAL PARA SINALIZAÇÃO DA PRESENÇA DE DANOS NO DNA. AS SETAS INDICAM ATIVAÇÃO E AS SETAS CORTADAS INDICAM INIBIÇÃO.	98
FIGURA 3: FORMAÇÃO DE MICRÔNÚCLEOS DEVIDO A PERDA CROMOSSÔMICA E FRAGMENTOS. A FIGURA MOSTRA O BLOQUEIO COM A CITOCLASTINA B E A OBTENÇÃO DE CÉLULAS BINUCLEADAS E AS CÉLULAS FORMADAS SEM O BLOQUEIO DA CITOCLASTINA, O QUE TORNA IMPOSSÍVEL DIFERENCIAR CÉLULAS FILHAS.	14

1. INTRODUÇÃO

O ser humano sempre esteve exposto a diversos tipos de radiação, mesmo a população não tendo consciência disso; como a radiação eletromagnética (provinda de telefonia móvel, ondas de rádio, aparelhos de micro-ondas), radiação cósmica que tem natureza corpuscular e ondulatória, substâncias naturais no meio ambiente que contêm radionuclídeos, exposição ocupacional e exposições médicas. No processo de interação da radiação com a matéria ocorre uma transferência de energia que pode provocar excitação ou ionização de átomos, com a conseguinte alteração das moléculas a que eles pertencem. Se as moléculas afetadas estão em forma de célula viva, esta célula pode ser danificada. Sendo assim, quando os raios – X atravessam o corpo humano, parte de sua energia é absorvida pelo corpo, podendo levar a efeitos biológicos. Dos vários danos que a radiação pode causar nas células o mais importante é o que ocorre no DNA. As radiações ionizantes podem induzir quebras e alterações na molécula de DNA, que quando não são adequadamente reparadas, podem resultar em atraso ou paralisação da divisão celular ou na morte celular (que pode causar a necrose tecidual ou apoptose). As consequências biológicas resultantes também podem se traduzir em aumento das mutações genômicas e cromossômicas e estas, por sua vez, podem resultar em uma proliferação desordenada de células que resultam em tumores (GIL, 2008; ROHR, 2008). A eficiência nos sistemas de reparos de erros na molécula de DNA é importante para a manutenção da integridade da molécula. Através de diversos mecanismos o DNA é reparado das quebras simples, duplas, das excisões de bases e do estresse oxidativo (ALVES, 2007). Esse O polimorfismo genético caracteriza-se por alterações genéticas que podem interferir no sistema de reparo de erros do DNA - Essas alterações ocorrem em mais de 2% da população e podem causar

danos aos sítios de reconhecimento de enzimas de restrição e levar à produção de proteínas diferentes das convencionais, alterando o mecanismo de reparo de erros do DNA. (LIMA *et al*, 2006) O polimorfismo pode conferir vantagens ou desvantagens aos indivíduos frente às agressões do meio.

2. OBJETIVO GERAL

Este trabalho pretende abordar a influência do polimorfismo genético nos sistemas de reparo de erros na molécula de DNA através de revisão bibliográfica e a sua relação com os métodos de análises de aberrações cromossômicas induzidas por radiações ionizantes e.

3. MECANISMO GERAL DA CARCINOGENESE HUMANA

Células anormais podem dar origem a tumores a partir de células normais através de alterações genéticas que afetam os sistemas de controle da proliferação celular (PIETRASA & ÖSTMANB, 2010). Os agentes mutagênicos alteram a sequência de bases do DNA e podem causar mutações associadas à melhoria da adaptação da célula, ou, mais frequentemente, alterar a funcionalidade de algumas moléculas o que pode resultar em morte ou transformação celular.

Entre as alterações da funcionalidade na molécula do DNA estão aquelas que podem levar a deficiência de uma via de reparação do DNA, a conversão de um gene normal para um oncogene – que é resultado da mudança na estrutura de um gene ou na regulação da expressão de um gene que geram materiais genéticos anormais – e o mau funcionamento de um gene supressor. Esses fatores associados contribuem para o desenvolvimento de neoplasias.

Conforme a célula acumula mutações, ela pode perder o controle da divisão celular determinando o aparecimento do câncer, que se caracteriza, entre outros fatores, pela perda de controle da proliferação celular. Esta é consequência direta das alterações de genes que controlam os mecanismos de regulação do ciclo celular. Porém, o mecanismo do desenvolvimento do câncer é bem complexo e multifatorial porque conta com predisposições genéticas hereditárias, sendo influenciado por agentes físicos, químicos e biológicos.

Estudos recentes têm demonstrado que variações genéticas, como os polimorfismos, podem conferir mais sensibilidade ou resistência aos efeitos nocivos a agentes genotóxicos. Estes estudos podem proporcionar formas de prevenção de doenças, entre elas o câncer, mais individualizadas para populações específicas (FENECH, 2000) (RIBEIRO *et al*, 2003).

Ao longo da vida, o ser humano é exposto a substâncias que causam alterações no DNA, e estas substâncias podem conter agentes genotóxicos. (LOUREIRO, *et al*, 2002). Por exemplo, a etiologia das leucemias em geral, não é bem esclarecida, porém acredita-se que um ou mais determinantes ambientais atuem em um momento particular de um indivíduo suscetível resultando na produção de um clone anormal celular e conseqüentemente no surgimento da doença. Alguns fatores desencadeantes: radiação ionizante, drogas e agentes químicos (cloranfenicol, fenilbutazona ou benzeno), viroses e fatores genéticos (WILLIAMS, 1996). As aberrações cromossômicas (AC) estão relacionadas a um risco aumentado para o câncer (NORPPA H. , 2001). As causas do câncer podem ser tanto exógenas, quando se trata de exposição a substâncias nocivas e hábitos de vida, quanto endógenas, que está relacionada com a capacidade do organismo em reparar erros no DNA e da própria informação contida em um gene que indica um

fator para o câncer (RIBEIRO, *et al*, 2003).

A genética toxicológica avalia os efeitos genotóxicos potenciais, uma vez que são considerados pré-requisitos para o desenvolvimento de efeitos nocivos a saúde, como o câncer. A toxicidade genética não é uma medida de carcinogenicidade. Esta consiste em um processo de conversão de células saudáveis em células mutadas com possibilidade de gerar um tumor. Existe uma associação entre respostas positivas em teste de genotoxicidade do tipo aberrações cromossômicas, micronúcleos, e a carcinogenicidade (RIBEIRO, *et al*, 2003) (LOUREIRO, *et al*, 2002).

4. LESÕES NO DNA CAUSADAS POR RADIAÇÕES IONIZANTES

4.1. Tipos de radiação e ações no DNA

Radiação ionizante é o termo usado para descrever o transporte de energia, tanto na forma de ondas eletromagnéticas como de partículas subatômicas, capazes de causar ionização na matéria. As radiações ionizantes podem ser classificadas em diretamente ou indiretamente ionizante. Todas as partículas carregadas (próton, beta, partícula alfa, íons pesados, etc) são consideradas diretamente ionizantes, pois produzem ionização ao perderem energia na matéria biológica. As partículas neutras (raios-X, nêutrons e gama) são consideradas indiretamente ionizantes, a energia é transmitida para a matéria através das ionizações produzidas pelas partículas carregadas secundárias, geradas pela radiação primária (IRD / CNEN, 1999) Quando as doses de raios – X e gama são mais altas, também se observa efeitos diretos sobre a molécula de DNA. Diferentemente dos raios X e gama os

nêutrons interagem diretamente com o núcleo atômico, gerando partículas (HALL & GIACCIA, 2012).

A energia média liberada, normalmente em keV, por unidade de comprimento (em μm) ao longo do caminho percorrido por fótons ou partículas no meio irradiado é definida como LET (Linear Energy Transfer). As radiações eletromagnéticas X e γ possuem baixo LET, enquanto que as partículas α e β , os prótons, nêutrons e os íons possuem alto LET. Sendo assim, as radiações de baixo LET têm uma probabilidade baixa de interagir com os átomos do meio irradiado, percorrendo assim uma distância maior quando comparadas com as de alto LET de mesma energia. No processo de interação da radiação com a matéria ocorre uma transferência de energia dela para o meio (LUIZ, *et al*, 2011). Se qualquer forma de radiação – raios-X, gama, partículas carregadas ou não carregadas – for absorvida pelo material biológico existe uma possibilidade de que haja interação com as estruturas críticas das células, tal como o DNA. Os átomos dessa estrutura podem se tornar ionizados ou excitados, e dão início a uma série de eventos em cadeia que causam mudanças biológicas. A radiação pode causar efeitos diretos no organismo quebrando ligações químicas e formando espécies com elétrons não pareados, os radicais livres. Essas ligações tendem a se complementar novamente para manter a estabilidade da molécula, esse processo pode ser feito corretamente e a molécula volta a sua conformação inicial ou a molécula pode se ligar a outras estruturas perder sua funcionalidade (HALL & GIACCIA, 2012). A figura 1 mostra como o mecanismo de ação direta e indireta afeta a célula.

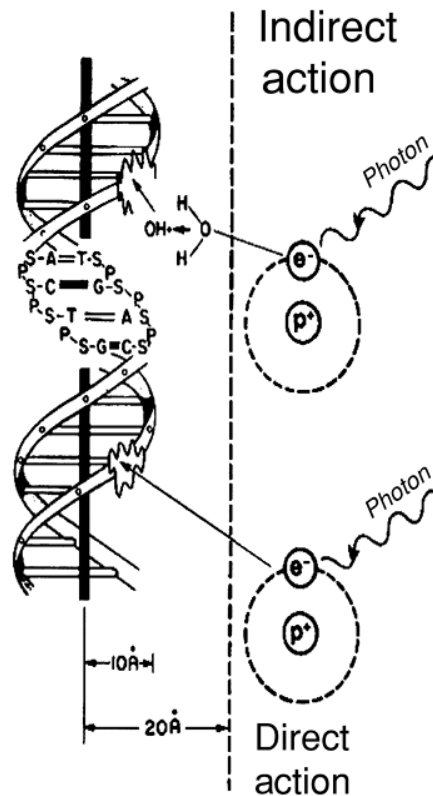


Figura 1: Ações diretas e indiretas das radiações. (HALL & GIACCIA, 2006)

A radiação também pode interagir com outras moléculas nas células, principalmente a água, formando radicais livres ou as espécies reativas de oxigênio (ROS – *reactive oxygen species*). Estes radicais livres possuem elétrons não pareados na camada mais externa do átomo que, podem ser formados a partir da clivagem de uma ligação covalente entre dois átomos quando cada átomo recebe um elétron cada ou por reações de transferência de elétrons (PÔRTO, 2001). Considerando que cerca de 80% da célula é composta de água a maioria das interações ocorre com estas moléculas que podem ficar ionizadas e reagir com outras moléculas (HALL & GIACCIA, 2012). Em condições fisiológicas normais, existe um equilíbrio entre a formação de espécies reativas de oxigênio e sua eliminação pelo sistema oxidante do próprio organismo. Quando há um desequilíbrio

entre produção e eliminação com uma tendência para predomínio de produção, diz-se que existe o estresse oxidativo (PÔRTO, 2001).

4.2. Reparo de erros no DNA

O DNA não é uma molécula estável e sofre constantes lesões de origem química, física ou biológica, endógenas e exógenas e, por conta disso, evolutivamente várias estratégias foram desenvolvidas pelo organismo para tolerar ou reparar danos causados ao DNA. Tem sido sugerido que os mecanismos de reparo de DNA, apesar das suas preferências por determinadas lesões, trabalham de uma forma bastante integrada. (BERRA, *et al*, 2006; RIBEIRO, *et al*, 2003).

Os ROS reagem com as bases do DNA provocando danos oxidativos. Estas lesões, na maioria das vezes, podem levar à formação de quebras em uma das cadeias do DNA (quebras simples - SSB “single strand break”) ou quebras duplas em posições aproximadamente simétricas nas duas cadeias da fita (quebras duplas - DSB “double strand break”). Além disso, quebras simples podem dar origem a quebras duplas durante a divisão celular.

Dentre os vários mecanismos de reparo existem aqueles que atuam de forma a executar eficientemente a excisão completa das quebras simples e duplas. Esses processos envolvem a ação de mais de 30 proteínas que atuam, resumidamente, em 5 etapas: reconhecimento da lesão; abertura da dupla hélice de DNA onde está localizada a lesão; dupla incisão distante alguns nucleotídeos dos lados 5' e 3' do sítio da lesão; síntese do novo DNA utilizando como molde a fita não danificada e ligação da porção 5' da nova fita sintetizada à cadeia pré-existente. As bases oxidadas do DNA são corrigidas pelo mecanismo de reparo por excisão de bases,

que inicia-se, primeiramente, pelo reconhecimento e excisão de bases danificadas e, depois, ocorre o preenchimento através de polimerização e ligação de novos nucleotídeos à sequência de DNA.

O reparo por excisão de nucleotídeos é um dos mais importantes processos de reparo em danos provocados por agentes exógenos que causam distorção da dupla-hélice do DNA, esse processo, dependente da ação da RNA polimerase II, é conhecido como reparo acoplado à transcrição, que assegura um rápido reparo dos genes ativos. Outro mecanismo importante na proteção da molécula de DNA é o reparo por recombinação, que pode ser a recombinação homóloga (reparo bastante preciso) e junção de pontas não homólogas (sujeito a erro). Uma das lesões que pode ser reparada por recombinação é a dupla quebra da cadeia de DNA criada por processos normais da célula ou por agentes exógenos, como a radiação ionizante (BERRA, *et al*, 2006; RIBEIRO, *et al*, 2003).

Existe também o reparo do emparelhamento errôneo de DNA que corrige pares errôneos de bases e alças desemparelhadas no DNA, eventualmente introduzidos por erros de replicação, ou lesões que interfiram com a atividade replicativa das DNA polimerases. Apesar de sistemas enzimáticos específicos para cada tipo de erro no DNA, pesquisadores vêm propondo a existência de integração nos diversos mecanismos de reparo. A figura abaixo explica resumidamente as etapas do reconhecimento do erro, reparo e possíveis consequências à célula (BERRA, *et al*, 2006).

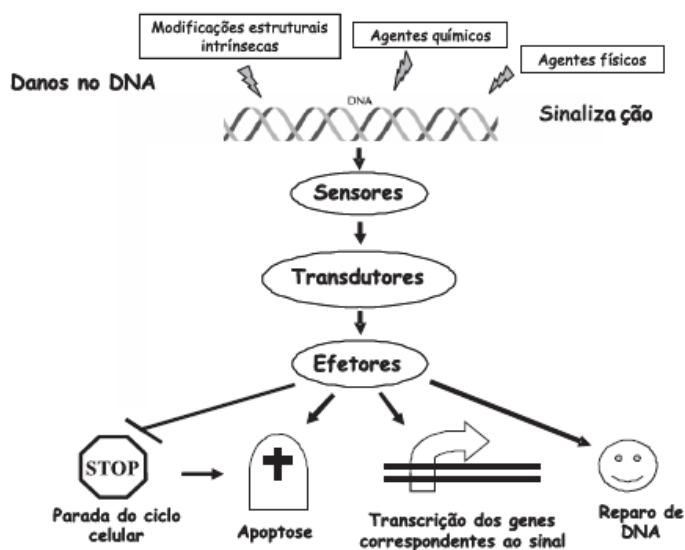


Figura 2: Mecanismo geral para sinalização da presença de danos no DNA. As setas indicam ativação e as setas cortadas indicam inibição (BERRA, MENK, & MASCIO, 2006).

4.3. Polimorfismo genético e tolerância dos indivíduos aos agentes genotóxicos

A susceptibilidade à exposição varia em função de características adquiridas e herdadas. Tem sido demonstrado que formas de polimorfismo genético podem modular a resposta ao insulto genotóxico, indicando tolerância do indivíduo às exposições genotóxicas.

A mutação cria novos alelos que se agregam ao DNA do indivíduo e quando estes alelos coexistem em um mesmo *locus* e essa variante genética alcança uma frequência de 1%, ela passa a ser denominada de polimorfismo. O polimorfismo é transmitido através das gerações.

Um novo alelo formado, produto de uma mutação, pode influenciar o nível de danos cromossômicos associados a algumas exposições genotóxicas afetando o nível basal de alterações encontradas, como consequência da melhor adaptação do

organismo às injúrias, ou; essa variação pode não interferir em mecanismos de reparo e proteção, ou ainda, podem ter efeitos deletérios. Acredita-se que o polimorfismo altera a sequência do DNA, mas pode não mudar a sequência das proteínas, ou altera a sequência das proteínas, mas não altera sua função; ou altera a expressão de proteínas que modulam o metabolismo de substâncias exógenas e os mecanismos de reparo de erros do DNA, o que altera a sensibilidade dos indivíduos aos estímulos externos (SCAPIN, 2008). Vários estudos têm sugerido que os polimorfismos genéticos afetam o nível de base de biomarcadores citogenéticos, independentemente de exposições genotóxicos específicos, influenciando a expressão de um biomarcador. Essas alterações no nível basal de danos cromossômicos são causadas geralmente pelos polimorfismos que afetam os processos celulares fundamentais responsáveis pela manutenção da integridade do genoma, tais como o metabolismo do folato ou reparação do ADN. Ou ainda por polimorfismos de enzimas responsáveis pela metabolização de substratos genotóxicos, que podem comprometer a integridade do cromossomo (NORPPA, 2004).

O polimorfismo no gene XRCC1, um dos genes mais estudados no reparo do DNA, foi associado com a redução da eficiência de reparação do DNA. O XRCC1 é um gene envolvido no reparo de quebras simples na fita do DNA e no reparo por excisão de bases de dano produzido pela radiação ionizante, alquilando agentes e espécies reativas de oxigênio. Em diversos estudos, no XRCC1 e em outros genes envolvidos no reparo de erros foram identificados vários polimorfismos. Estes polimorfismos têm sido associados a níveis elevados de AC, SCE (troca de cromátides irmãs), MN, aductos de DNA e também a diversos tipos de câncer. Porém, como existem estudos com resultados divergentes destes, é importante o

estudo do potencial impacto destes polimorfismos na reparação de lesões no DNA induzidas pela radiação ionizante. (NORPPA, 2004; GIL, 2008).

A alteração da expressão de determinadas proteínas, pode interferir em um ou mais mecanismos de identificação de erros do DNA e subsequente reparo. Assim, polimorfismos genéticos podem explicar em parte a variabilidade nas associações entre os níveis de ACs e o risco de câncer (BERRA, *et al*, 2006; NORPPA, 2001).

5. Métodos de Análise das Aberrações Cromossômicas

As aberrações cromossômicas (AC) são formadas a partir de quebras simples ou duplas na molécula do DNA. Esses marcadores, de uma forma geral, são encontrados em linfócitos do sangue periférico e observados em microscopia durante a metáfase, exceto na técnica de micronúcleos, onde as aberrações são observadas durante a citocinese. Epidemiologicamente, o aumento dessas AC predizem um risco aumentado de câncer (NORPPA H. , 2001). As técnicas serão explicadas a seguir com suas particularidades.

5.1. Análise Citogenética (Cromossomos Dicêntricos)

A análise de cromossomas dicêntricos, observados em linfócitos do sangue periférico, tornou-se mais que uma técnica útil complementar aos resultados da dosimetria externa em casos de suspeita ou confirmação da exposição às radiações ionizantes. Esta análise fornece uma informação adicional independente da informação do dosímetro pessoal, que nem sempre reflete a dose recebida ou reconstrói a situação real de exposição, para confirmar ou rejeitar a dose física. Além de ser o ensaio de escolha para exposições recentes e agudas, este ensaio é o

marcador biológico mais sensível e específico para exposição a altas doses de radiação (a partir de 100 mSv) (ROMM, *et al*, 2009).

A análise de dicêntricos satisfaz vários requisitos que o tornam um ensaio "padrão ouro" no método de biodosimetria. Esta técnica tem clara relação de dose-efeito, tipo e taxas de doses de radiação, é específico para radiações ionizantes, apresenta boa reprodutibilidade, pode ser usado na triagem, é rápido, confiável e a maioria dos reagentes utilizados são de baixo custo (ROMM, *et al*, 2009).

Para a análise de cromossomos dicêntricos, as amostras de sangue devem ser colhidas com seringa heparinizada. Do material colhido é feito uma cultura por um período de 48 horas a 37° C e os linfócitos, células de interesse para essa análise, são estimulados a entrarem em mitose pelo uso da fitohemaglutinina (PHA). Durante as três últimas horas da incubação do material em cultura, ocorre a indução do bloqueio mitótico através da adição de colchicina e logo após é feita a fixação das células nas lâminas. As lâminas podem ser coradas com Giemsa. Algumas modificações ao método foram descritas, como por exemplo acrescentar colchicina durante toda a duração da cultura ou nas últimas 24 horas permitindo mostrar uma frequência maior de cromossomos condensados – metáfases (ROMM, *et al*, 2009).

As aberrações instáveis, visualizadas por este método e caracterizadas por metáfases com cromossomos dicêntricos e fragmentos associados, são eliminadas durante proliferação celular ao longo do tempo. Ou seja, as aberrações instáveis em si, não representam um risco aumentado de desenvolver o câncer, elas servem como um indicador da dose recebida pelo indivíduo. No entanto, os cromossomos dicêntricos são induzidos com a mesma frequência que as translocações simétricas

e essas sim, podem ser transmitidas para as células-filhas e podem representar um risco potencial de induzir câncer (ROMM, *et al*, 2009).

Uma das vantagens da utilização dos linfócitos para avaliar aberrações cromossômicas induzidas pela radiação ionizante é que como as células coletadas estão no em diferentes fases do ciclo celular e logo após são induzidas a entrar em divisão, sua visualização ao microscópio se torna possível ao atingirem a fase de metáfase. Este fato faz com que a quantificação das alterações se torne possível. Para o cálculo das incertezas dos resultados, utilizam-se alguns modelos matemáticos como a aplicação da fórmula que traduz a expressão da curva dose X efeito na forma linear quadrático e distribuição de Poisson, além de conhecimento prévio do *background* para reconstrução da dose (ROMM, *et al*, 2009).

5.2. Micronúcleos (MN)

Evidências na literatura sugerem que as aberrações cromossômicas são uma consequência direta da manifestação de dano ao nível do DNA - quebras cromossômicas não reparadas e rearranjos cromossômicos também podem resultar em erros de reparos das estruturas do DNA. Um método alternativo e mais rápido proposto para avaliar os danos cromossômicos foi o método de análise de micronúcleos (MNI). Este método – também conhecido pelos hematologistas como corpúsculos de Howell-Jolly, é capaz de detectar quebras cromossômicas em populações de células em divisão, como de medula óssea e células do sangue periférico. Quando as células entram em divisão e contêm quebras cromossômicas ou outros danos causados por agentes físicos ou químicos, os cromossomos não migram para os pólos do fuso durante a mitose. Na telófase, um envelope nuclear é formado em torno dos cromossomos que não migraram e dos fragmentos, em

seguida eles tendem a assumir o formato de um pequeno núcleo. Cromossomos inteiros que não foram incluídos nos núcleos-filhos durante a divisão celular também podem resultar em micronúcleos (LOHMANN, 1995). Também é possível observar, ocasionalmente, a formação de pontes nucleoplásmicas, que é resultante da do posicionamento do cromossomo ligado aos dois micronúcleos filhos, conforme figura 3 (FENECH, 2000).

Vários métodos foram propostos para análise de MN, e o que é considerado o mais vantajoso é o que utiliza o bloqueio da citocinese através da citoclastina B (Cyt-B). A Cyt-B inibe a polimerização da actina que é responsável pela formação de microfilamentos que pressionam o citoplasma e os núcleos-filhos formados durante a divisão celular na etapa da citocinese. Etapa que consiste no início do processo de separação das células na divisão celular.

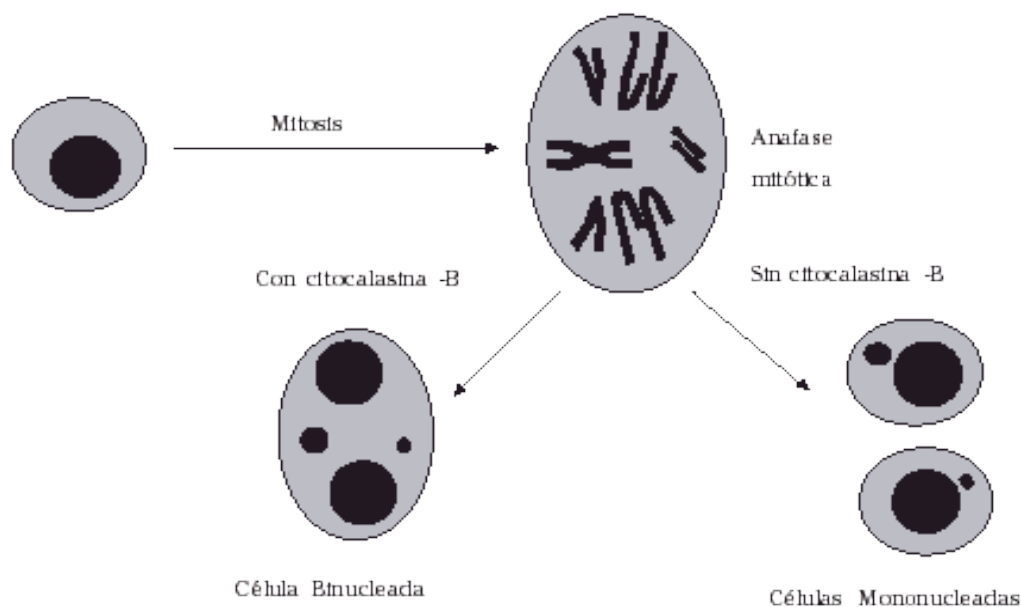


Figura 3: Formação de micronúcleos devido a perda cromossômica e fragmentos. A figura mostra o bloqueio com a citoclastina B e a obtenção de células binucleadas e as células formadas sem o bloqueio da citoclastina, o que torna impossível diferenciar células filhas (ZALACAIN, *et al*, 2005).

Os procedimentos desta técnica são bem semelhantes aos da análise de dicêntricos, porém a análise das aberrações é feita durante a citocinese e não durante a metáfase, como na análise de dicêntricos. O material utilizado pode ser o sangue periférico venoso posteriormente diluído com solução salina isotônica e homogeneizado. O sangue total é separado com um gradiente de densidade e então centrifugado, para ser utilizado as células do sedimento formado. O sobrenadante é desprezado e as células ressuspensas são adicionadas a um meio de cultura com soro fetal bovino. Para estimular a divisão celular é adicionada ao meio a fitohemaglutinina e o pH é ajustado a 7,0 com uma solução de HCl a 1N. Após isso, é adicionada a citoclastina B para o bloqueio da citocinese. Passadas as 72 horas da cultura, o material é tratado com solução salina, fixado com ácido acético e metanol (3:1) e centrifugado em seguida por mais três vezes. As lâminas preparadas são coradas com corante Giemsa (FENECH, 2000; LOHMANN, 1995).

Para contagem das células e estimativa da dose, utilizam-se modelos matemáticos que se baseiam na distribuição de danos ocorridos e não reparados nas células. O método de micronúcleos não é específico para detectar danos cromossômicos induzidos por radiação ionizante e também é utilizado para detectar injúrias causadas por agentes químicos (LOHMANN, 1995).

5. 3. Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

Devido às diversas aplicações da metodologia de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) ela apresentou um notável progresso para estudos e ganhou aplicações para classificação cromossômica e detecção de aberrações. Uma sequência de DNA que sofreu algum tipo de lesão e não foi reparada ou foi reparada de maneira inadequada, tende a se anelar com outra sequência do DNA para se

complementar. Após o processamento e fixação do material é possível visualizar os anéis formados. O material utilizado são os linfócitos do sangue periférico. O sangue é colhido por punção venosa em seringa heparinizada e o plasma é separado por hemossedimentação através de centrifugação. Do sedimento formado faz-se a cultura com soro bovino fetal e fitohemaglutinina para estimular a divisão celular. Após esses procedimentos, as amostras são incubadas a 37° C durante 48 horas e a preparação das metáfases, que serão analisadas, são tratadas com colchicina, solução hipotônica e a fixação é feita com ácido acético e metanol; as lâminas preparadas são coradas com corante Giemsa. O PCR (Polymerase Chain Reaction) pode ser utilizado para amplificar a quantidade de material de DNA, onde utiliza-se *primers* específicos e o material pode ser submetido posteriormente ao método de FISH. As lâminas preparadas são lavadas em PBS (Solução com: NaCl, KCl, Na₂HPO₄) e submetido à desidratação com álcool. Para reduzir a influência do *background* faz-se o tratamento com RNase A durante uma hora a 37°C e com pepsina a 0,05% durante 15 minutos a 37°C. Determinadas quantidades da sonda biotinilada (cujas sequências foram clonadas de plasmídeos) são adicionadas em tubos e efetua-se a desnaturação do DNA a 70°C por 5 minutos. Em seguida, o material é resfriado a 0°C e submetido a 37°C por duas horas. Assim, as sondas se ligam às sequências do DNA genômico colocado em excesso evitando ligações não específicas. As lâminas com o material são incubadas com solução de formamida a 70%, coberta por uma lamínula e colocada em placa de aquecimento a 80°C por 4 minutos. Em seguida são colocadas em etanol a 70% e mantidas a -20°C durante 5 minutos e, posteriormente, em etanol a 90 e 100% em temperatura ambiente. Por fim, as lâminas são incubadas com a sonda, cobertas por lamínulas e seladas, e mantidas em uma câmara com formamida 60%, pH 7, durante 16 horas a 37°C, ou

no aparelho de hibridização. Após esses procedimentos as lâminas são lavadas sucessivamente com formamida a 50%, pH 7 a 42°C, solução de cloreto de sódio e citrato de sódio a 60°C e com um agente emulsificante (Tween 20 a 0,05%) em temperatura ambiente. As lâminas preparadas são lidas em microscopia de epifluorescência e são contabilizadas de 500 a 1000 metáfases (RIBEIRO, SALVADORI, & MARQUES, 2003).

5.4. Condensação Prematura de Cromossomos (PCC)

A técnica de condensação prematura de cromossomos (PCC) tornou-se uma alternativa interessante para dosimetria biológica para avaliação de altas doses, apesar de prováveis limitações como, linfopenia causada pela exposição alta à radiação, interrupção do ciclo celular, que diminui a taxa de mitose, e a saturação da produção de dicêntricos em doses elevadas. Apesar disso, este método é capaz de detectar doses de até 40 Gy. Os cromossomos com bases lesadas que não foram corrigidas ou foram corrigidas de maneira inadequada tendem a se complementar com outras bases, formando um anel. Essas imagens são contadas como aberrações cromossômicas (LAMADRID, *et al*, 2007).

O PCC utiliza sangue periférico colhido por punção venosa com seringa heparinizada. Os linfócitos do sangue colhido são submetidos ao meio de cultura suplementado com soro bovino fetal a 20%, fitohemaglutinina (para estimular a divisão celular) e alguns antimicrobianos em doses padronizadas para impedir o crescimento de microrganismos. Após 24 horas adiciona-se Calyculin A na última hora, a cultura é tratada com solução hipotônica de KCl a 0,075 M por 7 minutos a 37°C e fixada com metanol e ácido acético (3:1). Depois do material fixado, ele é colocado em um equipamento (Thermotron) com umidade (45%), temperatura

(22°C) e ventilação controlados e corado com Giemsa. A contagem dos anéis formados (aberrações cromossômicas) é baseada na distribuição de Poisson (LAMADRID, *et al*, 2007).

6. CONCLUSÕES

O ser humano sempre estará exposto a diversos tipos de agentes que poderão causar injúrias ao DNA das células. Ao longo do tempo, mecanismos foram desenvolvidos pelo organismo para resistir a lesões causadas por estas injúrias, como na evolução de mecanismos de reparo do DNA mais eficientes. O polimorfismo genético pode contribuir significativamente para a variabilidade desses mecanismos de reparo. Este trabalho sugeriu a hipótese de que o polimorfismo genético pode alterar a sensibilidade dos indivíduos expostos às radiações ionizantes e a capacidade do organismo de reparar os danos causados por estas. Discute-se também a importância dos polimorfismos na determinação do nível basal de alterações citogenéticas. Foi feito um breve resumo sobre as técnicas utilizadas em dosimetria biológica, suas aplicações em triagem e acidentes. A dosimetria citogenética mostra-se a técnica mais específica para avaliação de dose através de aberrações cromossômicas radioinduzidas.

Referências

- ALVES, P. M. (2007). Análise cromossômica dos linfócitos do sangue periférico e dos polimorfismos do gene de reparo do DNA XRCC1 em indivíduos com anemia falciforme. *Dissertação de Mestrado*. Uberaba, Minas Gerais, Brasil.
- BERRA, C. M., MENK, C. F., & MASCIO, P. (2006). Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. *Química Nova*, 1340-1344.
- FENECH, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, 81-95.
- GIL, F. d. (Janeiro de 2008). Influência de polimorfismos em genes de reparação do DNA na frequência de anomalias cromossômicas radioinduzidas. *Dissertação de Mestrado*. Campo Grande, Lisboa, Portugal.
- HALL, E. J., & GIACCIA, A. J. (2012). *Radiobiology for the Radiologist - 7ª edição*. Philadelphia, EUA: Lippincott Williams & Wilkins.
- IRD, CNEN. (1999). *Curso Básico de Proteção Radiológica em Radiodiagnóstico*. Rio de Janeiro.
- LAMADRID, A., GARCÍA, O., DELBOS, M., VOISIN, P., & ROY, L. (2007). PCC-ring induction in human lymphocytes exposed to gamma and neutron irradiation. *J. Radiat. Res.*, 1-6.
- LIMA, J., SERAFIM, P., SILVA, I., & FORONES, N. (Jan/Mar de 2006). Estudo do polimorfismo genético do gene p53 (códon 72) em câncer colorretal. *Arquivo de Gastroenterologia*, pp. 8-13.
- LOHMANN, T. H. (1995). Análise da radiosensibilidade de linfócitos periféricos de pacientes com câncer de pele e de indivíduos sadios por meio do método de micronúcleo. *Dissertação de mestrado*. São Paulo, São Paulo.
- LOUREIRO, A. P., DI MASCIO, P., & MEDEIROS, M. H. (2002). Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: Implicações em mutagênese e carcinogênese. *Química Nova*, 777-793.
- LUIZ, L. C. (2011). Avaliação de um Grupo de Profissionais de Saúde Sobre os Conceitos Físicos e Toxicológicos dos Radiofármacos que Utilizam os Radioisótopos iodo-123 e iodo-131. *Physicae*, 8-10.
- NORPPA, H. (2001). Genetic polymorphisms and chromosome damage. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 31-38.
- NORPPA, H. (2004). Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicology Letters*, 309-334.
- PIETRASA, K., & ÖSTMAN, A. (2010). Hallmarks of cancer: Interactions with the tumor stroma. *EXPERIMENTAL CELL RESEARCH*, 1324 - 1331.
- PÔRTO, W. G. (2001). Radicais Livres e Neurodegeneração. Entendimento Fisiológico: Base para Nova Terapia? *Revista de Neurociência*, 70 - 78.

- RIBEIRO, L. R., SALVADORI, D. M., & MARQUES, E. K. (2003). *Genética - Mutagênese ambiental*. Canoas, Rio Grande do Sul: ULBRA.
- ROHR, P. (Abril de 2008). Influência de polimorfismo em genes de reparo no risco ocupacional de viticultores do Rio Grande do Sul. *Dissertação de Mestrado*. Porto Alegre, RS, Brasil.
- ROMM, H., OESTREICHER, U., & KULKA, U. (2009). Cytogenetic damage analysed by the dicentric assay. *Ann Ist Super Sanità*, 251-259.
- SCAPIN, F. (2008). *Disciplinas de Genética*. Acesso em Julho de 2013, disponível em genetica.ufcspa.edu.br/biomedic/conteudo/genetica_molecular
- WILLIAMS, W. (1996). *Hematologia Compêndio*. Chile: MCGRAW-HILL.
- ZALACAIN, M. S. (2005). El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *An. Sist. Sanit. Navar*, 28 (2): 227-236.