



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

O USO DA APOPTOSE DE LINFÓCITOS PERIFÉRICOS
HUMANOS COMO MÉTODO ALTERNATIVO EM
DOSIMETRIA BIOLÓGICA DOS EFEITOS
DA RADIAÇÃO DO COBALTO-60

MARISA LEMES

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
De Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear

Orientador:
Dr. Heitor Franco de Andrade Jr.

São Paulo
1997

L 552, w

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**O USO DA APOPTOSE DE LINFÓCITOS PERIFÉRICOS
HUMANOS COMO MÉTODO ALTERNATIVO EM DOSIMETRIA
BIOLÓGICA DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO DO COBALTO-60**

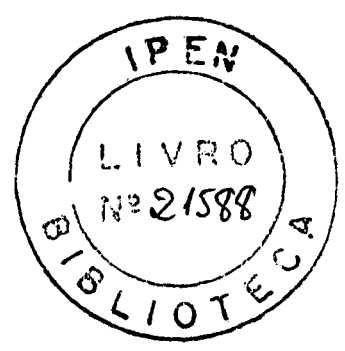
MARISA LEMES

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a
obtenção do grau de Mestre em Ciências, na Área de
Tecnologia Nuclear Básica

Orientador: Dr. Heitor Franco de Andrade Jr.

SÃO PAULO

1997



Aos meus pais, Lourdes e Alcindo, ao meu marido Zia e à minha filha Luisa.

Agradecimentos

Agradeço a todos os amigos que direta ou indiretamente colaboraram para que este trabalho fosse realizado.

Ao Dr. Heitor Franco de Andrade Jr. pela dedicada orientação.

Ao Dr. Orlando Rebelo dos Santos pela orientação no início do trabalho.

Aos Drs. José Roberto Rogero e Paólo Bartolini pela oportunidade de trabalho.

Aos amigos da Radiobiologia, especialmente à Marcia, Nanci, Patrícia e Tânia pelo companheirismo e apoio durante o trabalho.

Aos amigos da Divisão de Radioensaio, em especial à Regina, Mônica, Rosângela, Bete, Maria Helena, Teresa e João pela ajuda e apoio indispensáveis.

Aos amigos do IMT/FMUSP, em especial à Rose, Bruno, Roberto, Amâncio e Marilda pelas sugestões e incentivo.

Ao Dr. Ivan do Departamento de Bioquímica do IQUSP pelos ensinamentos em cultura celular e por fornecer as células para o desenvolvimento do trabalho.

À CAPES pela concessão de bolsa.

SUMÁRIO

Resumo.....	ii
Abstract.....	iii
I - Introdução.....	1
II - Objetivos.....	24
III - Material e Métodos.....	26
Materiais.....	26
A - Reagentes e Soluções.....	26
B - Obtenção das amostras.....	26
Métodos.....	27
A - Irradiação e conservação das amostras.....	27
B - Cultura Convencional de Linfócitos.....	27
C.1 - Preparo das células CHO.....	28
C-2 - Separação de linfócitos.....	28
C.3 - Fusão celular.....	29
D - Marcação das quebras de DNA (IDNEL).....	30
E - Eletroforese de DNA em gel de agarose.....	33
F - Análise estatística.....	35
IV - Resultados.....	36
Detecção de aberrações cromossômicas pela técnica citogenética convencional.....	37
Detecção de quebras na cromatina condensada prematuramente de linfócitos interfásicos.....	39
Detecção de fragmentação oligonucleossomal.....	40
Identificação de apoptose em células isoladas pela técnica IDNEL.....	44
Curvas dose-resposta para apoptose detectada por IDNEL.....	49
V - Discussão.....	58
VI - Conclusões.....	64
Anexo.....	65
VII- Referências Bibliográficas.....	66

O USO DA APOPTOSE DE LINFÓCITOS PERIFÉRICOS HUMANOS COMO MÉTODO ALTERNATIVO EM DOSIMETRIA BIOLÓGICA DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO DO COBALTO-60

MARISA LEMES

RESUMO

Os raios gama afetam as células, resultando na morte celular como ocorre em terapia de câncer. A radiação ionizante age pela transferência de energia, preferencialmente pela ação de radicais livres produzidos pela radiólise da água que resulta em danos nos ácidos nucleicos e outros efeitos em lipídios e proteínas. O nível de exposição é indiretamente estimado pela dosimetria física, mas a dosimetria biológica pode medir o efeito direto da radiação, principalmente em células pós mitóticas pela técnica citogenética convencional. Recentemente, foi relatado que as células irradiadas desenvolvem uma morte celular programada ou apoptose. Com uma técnica de dosimetria biológica, nós medimos a fração de células apoptóticas em células sanguíneas irradiadas *in vitro* com ⁶⁰Co de doadores voluntários saudáveis. A eletroforese em gel de agarose mostrou uma baixa sensibilidade, porque o DNA celular apresentou a característica padrão do dano somente quando as células foram expostas a 100cGy ou mais. Utilizando a técnica de marcação de quebras de DNA, foi observado que a fração de células apoptóticas aumenta proporcionalmente com aumento da dose de irradiação. Sensibilidade similar foi observada quando comparada com a técnica de citogenética convencional (nível de detecção mínimo de 3cGy). Estas técnicas são de fácil realização, não há necessidade de cultura celular e todas as células, incluindo as interfásicas podem ser analisadas, fornecendo uma importante ferramenta em dosimetria biológica.

III

THE USE OF APOPTOSIS IN HUMAN LYMPHOCYTES PERIPHERAL AS ALTERNATIVE METHODS IN BIOLOGICAL DOSIMETRY OF RADIATION EFFECTS FROM COBALT-60

MARISA LEMES

ABSTRACT

Gamma rays affect cells in dose-response manner, resulting in cell death, as in cancer radiotherapy. The ionizing radiation acts by transferring energy, mainly by free radicals from water radiolysis that result in nucleic acid damage and other effects in lipids and proteins. The level of exposure is indirectly estimated by physical dosimetry, but the biological dosimetry can measure the direct radiation effect, mainly in post-dividing cells by classical cytogenetic approach. Recently, it was reported that irradiated cells develop an induced programmed death or apoptosis. With a biological dosimetric technique, we measured apoptotic cell fraction in ^{60}Co *in vitro* irradiated blood cells from voluntary healthy donors. The agarose gel electrophoresis showed a low sensitivity, because cell DNA presented the characteristic pattern only when the cells were exposed to 100 cGy or more. Using a terminal DNA labeling technique we observed that the apoptotic cell fraction proportionally increases with irradiation. Similar sensitivity was observed when compared to classical cytogenetics (3 cGy minimum detection level). These techniques are easier to perform, do not need cell culture and all cells, including interphasic ones, can be analyzed, providing a good tool in biological dosimetry.

I - INTRODUÇÃO

Os seres vivos, desde sua origem, estão expostos constantemente às forças físicas da natureza, em especial a energia não particulada como a luz e as ondas de rádio, na forma de radiações eletromagnéticas, produzidas por fontes variadas, sendo a maior delas o nosso Sol (Pereira, 1992). Dentre estas radiações, as que apresentam maiores níveis energéticos são os raios gama, que são decorrentes de reações em núcleos de átomos, em estrelas, ou reatores, da desintegração ou decaimento de radioisótopos naturais ou artificiais, como o ^{60}Co (Bitelli, 1982).

Geralmente, estas radiações apresentam um nível energético muito elevado, permitindo sua interação direta com as moléculas constituintes do ser vivo, promovendo sua ionização através da transferência de energia (Riley, 1994).

Quando analisamos estes efeitos sobre as moléculas dos seres vivos, podemos então identificar dois tipos de ação, uma direta dependente da transferência da energia à molécula biológica alvo, causando sua ionização, alteração de sua estrutura química ou função biológica, e outra, indireta, relacionada à transferência de energia utilizando moléculas intermediárias ou radicais (Pryor, 1976). O primeiro fenômeno depende da qualidade da energia aplicada, de sua densidade e quantidade, do número de radicais radiosensíveis e do peso molecular da molécula alvo. Sua utilização em cristais de misturas de moléculas protéicas não hidratadas permite estimar o

peso molecular de frações específicas, sem necessidade de purificação (Skalka *et al*, 1970).

Para o segundo tipo de efeito, indireto, existe a necessidade de moléculas de transferência de energia, que necessitam ser bastante freqüentes no meio estudado e em relativa proximidade às moléculas alvo (Riley, 1994). Assim, este efeito de ionização e transferência de energia ocorre sobre as moléculas de água, a mais prevalente nos sistemas biológicos, que tornam-se extremamente instáveis e dissociam-se imediatamente em entidades chamadas radicais livres, as quais são caracterizadas por um simples elétron orbital não pareado, fortemente reativas com outras moléculas biológicas (Riley, 1994, Imlay *et al*, 1988).

Detalhadamente, uma das conseqüências das interações da radiação gama com as moléculas de água é a formação de vários radicais como hidrogênio molecular (H_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hidroxila (OH^*) e peroxila (HO_2^*), além de outros. Destes, o mais prejudicial para os processos metabólicos e vitalidade da célula é o peróxido de hidrogênio (Lander, 1972). Estes radicais podem interagir com oxigênio e possuem vida média longa o suficiente para interagir com outras moléculas biológicas, resultando na transferência mais eficiente da energia da radiação em soluções aquosas, afetando as funções das organelas celulares, aumentando o dano efetivo de uma determinada dose de radiação (Gajewski *et al*, 1990).

Geralmente, os danos decorrentes das várias interações energéticas são compensados por sistemas de captação preferencial pela ação de enzimas

antioxidantes como a superóxido dismutase e glutathione peroxidase ou pelo seqüestro de metais de transição pela ferrina, ou scavengers, como a glutathione, (Riley, 1994) ou reparo de uma lesão por antioxidantes de cadeias com quebras como o ascorbato e α -tocoferol (Van Zeeland *et al* 1984), reparo por excisão ou a iniciação de apoptose (Riley, 1994), mas doses maciças causam danos biológicos de alta gravidade, geralmente levando à morte do ser vivo ou pelo menos sua esterilização, dependendo do tempo de exposição e da susceptibilidade da área ou órgãos expostos (Allan, 1992). Além disso, alguns efeitos como o envelhecimento e o aparecimento de tumores são ocorrência estocástica da radiação ionizante. Esses efeitos dependem da sensibilidade individual que relacionada com o ciclo celular das células expostas, do reparo do DNA e da tolerância ao dano (McMillan *et al*, 1994, Devi, 1991).

Os alvos destes efeitos da radiação dependem da prevalência das moléculas alvo na célula. As principais moléculas biológicas afetadas são as proteínas e os ácidos nucléicos, que ocorrem em pequeno número relativo de moléculas, quando comparadas à outras moléculas biológicas, como os açúcares, lipídios e aminoácidos (Alberts *et al*, 1994, Adams *et al*, 1972). Por exemplo, só existe uma única cópia de um gene de hemoglobina em uma célula, mas várias moléculas de hemoglobina e enormes quantidades de glicose, o que torna o dano da radiação mais grave quanto mais complexa e rara for a molécula afetada e sua função biológica (Lander, 1972, Okazaki, 1995).

O efeito da radiação sobre proteínas já foi estudado tanto na ação direta, utilizado inclusive como ferramenta para determinação de peso molecular de atividades enzimáticas (Skalka *et al*, 1970), como na ação indireta em soluções, visando a destoxicação de venenos (Nascimento *et al*, 1996) ou preparação de imunógenos (Pinho *et al*, 1995). No entanto, esta ação sobre proteínas tem uma importância menor na indução da morte celular. As enzimas, por exemplo, toleram melhor os danos em decorrência do grande número de cópias das moléculas no interior das células, não afetando significativamente sua atividade dentro da célula ou a fisiologia celular (Skalka, 1970).

Em relação aos ácidos nucléicos, os conceitos supracitados também são válidos, sendo que os danos aos ácidos ribonucleicos, por sua maior freqüência e instabilidade, são de menor importância, quando comparados aos danos nos ácidos desoxirribonucleicos (DNA), de alta estabilidade e quase sempre com cópias únicas ou limitadas de genes, codificados por bases simples em perfeita seqüência, distribuídos em uma dupla fita (Okazaki, 1995).

Os danos induzidos pela radiação ionizante ao DNA celular, incluem mudança de base, quebras de fita simples e de fita dupla e ligações cruzadas (cross-links) (Costa *et al*, 1993, Natarajan *et al*, 1988). Estas alterações na estrutura do DNA, estão relacionadas com a freqüência elevada de mutação após a radiação (Kondo, 1988).

5

As mutações genéticas estão associadas, geralmente, com uma alteração na seqüência de bases na cadeia do DNA. Isto pode ocorrer como resultado da ionização, permitindo uma mudança na estrutura de uma base particular, produzindo a formação de pares errados de bases, alterações ou deleção de bases induzidas diretamente pela ionização ou pela interação de radicais livres (McMillan *et al*, 1994).

Outras alterações tem sido relacionadas à ação da radiação ionizante, mas mediados por ativação de sistemas biológicos do hospedeiro, sempre independente dos produtos diretos ou indiretos da radiação, mas desencadeados em uma forma indireta da ação da radiação ionizante, dependente da síntese funcional de novos compostos biológicos induzidos pela radiação, mas sem sua intervenção química direta (Coggle, 1971) .

Alguns autores relatam até que fenômenos como a hormese, induzidos pela radiação ionizante de baixas doses teria um efeito benéfico sobre a fisiologia do hospedeiro, em uma resposta adaptativa e benéfica, como uma forma de premunição eficiente (Devi, 1991, Brown, 1988). Por outro lado, já está bem estabelecido o potencial carcinogênico da exposição à radiação ionizante que, seguido de um período latente e variável, pode levar até décadas para o aparecimento do tumor. Embora estes tumores ocorram com maior freqüência em certos tecidos que outros, como a leucemia, a radiação sempre aumenta a freqüência de todos os tipos de câncer (Devi, 1991, Harris, 1991).

Independente do tipo de molécula afetada, outros fatores também interferem nesta susceptibilidade à radiação. Os vários precursores, que vão compor as várias espécies das quais as moléculas biológicas, respondem de maneira variada à radiação (Adams *et al*, 1972). Alguns são muito radorresistentes e outros particularmente sensíveis, tornando-se os locais de sua maior prevalência, mais sensíveis dentro de uma mesmo tipo de molécula biológica, resultando em diferentes sensibilidades de compostos de um mesmo grupo de moléculas, mas que apresentam diferentes prevalências destes compostos. O exemplo é a radiosensibilidade das moléculas de timina, que dimerizam facilmente quando irradiadas pela radiação ultravioleta, gerando pontos frágeis na molécula de DNA, justamente nas áreas de maior prevalência deste nucleotídeo (Van Zeeland, 1984).

Do ponto de vista da biologia celular, os efeitos da radiação ionizante são extremamente importantes e interferem nos vários escalões do metabolismo celular. Alguns fenômenos decorrentes da radiação ionizante podem ser explicados diretamente pelo efeito isolado da radiação sobre moléculas específicas, tanto diretamente como indiretamente, pela mediação dos radicais livres produzidos pela radiólise da água, anteriormente comentada. Entre estes fenômenos podemos identificar a peroxidação de lipídeos, disfunção celular causada pela alteração de proteínas e outros eventos relacionados a uma ação generalizada da radiação e independente de qualquer metabolismo interno da célula. Estes fenômenos resultam na morte celular através de necrose, a morte "necrótica", com destruição concomitante dos vários compartimentos celulares, ocorrendo principalmente em altas

doses de radiação, semelhante à ação do calor. As células são incapazes de manter a homeostase, principalmente por íons de cálcio que iniciam alterações bioquímicas e estruturais não específicas comum neste processo (Walker *et al*, 1988). Na morte necrótica, o processo agressor é totalmente externo à célula em processo de morte, ocasionando um sofrimento citoplasmático evidente concomitante com as alterações nucleares. Ocorre aumento da permeabilidade da membrana, aumento do volume de líquido na matriz mitocondrial; dissociação de ribossomos e lisossomos seguido por irreversível aumento de líquido intracelular e lise; para evoluir com degradação é fragmentação aleatória de DNA. A necrose ocorre geralmente em grupos de células afetadas pela mesma agressão e cujo processo provoca resposta inflamatória (Ueda *et al*, 1994, Szumiel, 1994).

As hipóteses e os dados sobre a natureza do dano letal produzido pela radiação ionizante identificam quebras heterólogas, na fita dupla de DNA, como sendo o tipo mais comum de lesão que ocasiona a morte de células de mamíferos (Haimovitz-Friedman *et al*, 1994), ocorrendo em doses de radiação muito inferiores às necessárias para causar a morte necrótica.

Tais lesões são produzidas no DNA pela interação direta da radiação, ou pela ação de intermediários reativos de oxigênio gerados dentro da célula, especialmente OH^{\bullet} . (Gajewski *et al*, 1990). Embora as células sejam capazes de reparar a maior parte dos danos, a maioria das quebras de fita dupla de DNA não são reparáveis, pelo fato de que o reparo do DNA depende da manutenção da integridade da outra fita e da proximidade das fitas lesadas,

mas algumas são reparadas por uma ligação. No caso de reparo pós-replicacional, a célula duplica seu DNA independente da presença do dano. As quebras de fita e danos na base podem ainda ser reparados por excisão, um processo complexo no qual há vários passos, como uma retirada de base próxima ao dano; seguida de excisão do dano; e síntese de nova fita por uma polimerase usando uma fita não danificada como uma cópia com ligadura das extremidades livres (IAEA, 1986). Algumas lesões não reparadas de DNA levam a morte celular, associadas com a formação de aberrações cromossômicas e disfunção no DNA, durante a próxima divisão celular, ocorrendo um desbalanceamento no material genômico das células filhas, ocorrendo uma morte celular posterior a mitose, a morte "mitótica". Este processo de agressão afeta a capacidade reprodutiva dos ácidos nucléicos, embora mantendo relativamente integra as funções somáticas da célula até o momento da divisão celular (Potten, 1987). A relação entre quebras de fita dupla e morte reprodutiva ou morte interfásica dependem do estágio do ciclo celular em que as células se encontram sendo que em linfóides e mielóides ocorre morte interfásica imediata após a exposição à radiação ionizante assim como morte mitótica progredindo para divisões posteriores. O fenômeno da morte mitótica ou reprodutiva está intimamente relacionado às quebras e rearranjos cromossômicos que impedem a adequada separação cromossômica pelo fuso mitótico, levando com que haja uma diferença significativa do material genômico de uma ou das duas células filhas. A célula afetada, com desbalanço em sua estrutura genômica não consegue

sobreviver após a primeira divisão celular (Potten, 1987, Radford, 1991 e 1994a).

Freqüentemente, este dano não ocorre em uma parte do DNA significativa para a fisiologia celular normal não reprodutiva. Ainda não está bem estabelecido se tais quebras também levam a morte celular interfásica radioinduzida, associada ou não com outros eventos do metabolismo celular (Haimovitz-Friedman *et al*, 1994, Radford, 1994a). Este tipo de fenômeno, de manutenção da capacidade vegetativa somática mas incapacidade de reprodução, tem sido proposta para uso em vacinas com agentes irradiados, como no caso da esquistossomose (Wales *et al*, 1992).

Outro fenômeno freqüente induzido pela radiação ionizante é a alteração da fisiologia da célula, levando a uma morte fisiológica ou suicídio celular, num processo bastante fisiológico característico, denominado apoptose (Story *et al*, 1992, Filippovich *et al*, 1988).

A apoptose ocorre em tecidos normais sendo regulada por uma complexa seqüência de mecanismos, alguns dos quais são também envolvidos com a regulação do ciclo celular, mitose e diferenciação. O controle preciso da apoptose está associado com seu papel de eliminar algumas células durante o desenvolvimento normal do tecido na homeostase de tecidos maduros (Hurle, 1988). Neste processo a função da apoptose é oposta àquela da mitose. A indução da apoptose pela radiação e por outros agentes de terapia de câncer agem sobre este complexo mecanismo de controle fisiológico (Allan, 1992).

Algumas considerações sobre o controle da apoptose pode ser convenientemente explicadas em três eventos seqüenciais: (a) ação de um estímulo iniciador sobre uma célula susceptível. Estes estímulos podem ser: toxina, calor, irradiação receptores para TNF ou Fas/APO-1/CD95, (b) uma fase efetora onde é feita a decisão para morte, com ativação de enzimas catabólicas e eventos reguladores e implicações de eventos mitocondriais, durante o qual a célula permanece fenotipicamente normal, e (c) a é uma fase de degradação durante a qual as células adquirem uma característica bioquímica e morfológica do estágio final de apoptose onde a fragmentação de DNA e degradação de proteínas tornam-se aparentes. (Allan, 1992 e Kroemer *et al*, 1997).

Morfologicamente, a apoptose ou morte celular programada é um processo de morte fisiológica que apresenta redução do volume celular (Story *et al*, 1992); preservação da integridade da membrana evitando a liberação de mediadores inflamatórios (Zettl *et al*, 1994); organelas morfológica e fisiologicamente intactas por um longo tempo durante a apoptose (Molloy *et al*, 1994); condensação da cromatina e degradação não aleatória de DNA em fragmentos de tamanho oligonucleossômicos (Story *et al*, 1992). Estas características fazem com que o processo ocorra em células isoladas sem causar resposta inflamatória e de maneira programável (Szumiel, 1994; Ueda *et al*, 1994). O processo é fisiológico, visando uma homoeostase do conjunto celular envolvido e varia para cada tipo de órgão ou tecido (Story *et al*, 1992).

Durante a morte celular apoptótica desenvolvem-se os sinais morfológicos precedidos por ativação de uma endonuclease (Dolzhanskiy *et al*, 1995) dependente de íons de cálcio e magnésio com subsequente clivagem de DNA em fragmentos internucleossomais com tamanho de múltiplos de 180-200 pb (oligonucleossomos). (Mori *et al*, 1994; Macklis *et al*, 1992; Yamada *et al*, 1988; Collins *et al*, 1992; Ferrer *et al*, 1994; Radford *et al*, 1994c). A apoptose pode ocorrer pela ativação de endonuclease endógena sem o desencadeamento de uma cascata gênica, mas preferencialmente é iniciada por controle gênico (Bowen, 1993).

Os sinais gerados pela membrana de uma célula afetada ativam células vizinhas intactas para a infiltração de macrófagos que fagocitam as células sob apoptose (Ueda *et al*, 1994).

O processo de apoptose ocorre por ativação de uma complexa seqüência de eventos, que são controlados por pelo menos três vias que podem ser iniciadas por sinais gerados na membrana; por quebras induzidas diretamente nas fitas de DNA ou pela ação de radicais livres dentro da célula, resultando na ativação de uma via final intranuclear (Steller, 1995).

O desencadeamento do processo apoptótico induzido pela radiação ionizante não está bem definido. Embora a radiação produza quebras duplas na fita de DNA, não são todas as células com tais danos que sofrem apoptose (Radford, 1991).

O estímulo para apoptose radio-induzida parece estar relacionado ao número de quebras de DNA produzidas, a taxa com que elas ocorrem e a rapidez e eficiência do sistema de reparo (Carson *et al*, 1986). O esgotamento de NAD consumido no mecanismo de reparo do DNA está associado com a indução de apoptose em algumas células. Este efeito pode ser revertido utilizando-se um inibidor de reparo de DNA, 3-Amino-benzamida, agindo por ribosilação de poly (ADP) e nicotinamida protegendo linfócitos periféricos contra o efeito letal. (Carson *et al*, 1986).

A duração da fase efetora entre a irradiação e o começo da apoptose pode variar de minutos em timócitos a horas na espermatogônia. Eventos na progressão do ciclo celular podem ser importante na iniciação e expressão de apoptose radio-induzida em alguns tipos celulares (Yamada *et al* 1988, Radford, 1991).

Os mecanismos de ativação dos vários modos de apoptose não estão bem estabelecidos. Em alguns modos de apoptose induzidos por radiação ou quimioterapia, as lesões primárias no DNA têm sido consideradas como sinais que disparam a resposta apoptótica (Haimovitz-Friedman *et al*, 1994).

Embora o DNA seja considerado o alvo principal, outros alvos não nucleares podem estar envolvidos diretamente ou indiretamente na indução de apoptose para radiação ionizante. A apoptose ocorre naturalmente ou sob muitas circunstâncias patológicas, controlada por mediadores e substâncias específicas agindo inicialmente via receptores da superfície celular. Tais

mecanismos mediados por receptores podem também influenciar a ocorrência da apoptose radio-induzida (Allan, 1992).

A apoptose pode ser decorrente da interação da radiação ionizante com membranas celulares gerando ceramida (Obeid *et al*, 1993), evento crítico e obrigatório na cascata apoptótica em células epiteliais. Eles sugerem esta alternativa à hipótese de que só o dano no DNA provoca morte celular radioinduzida (Haimovitz-Friedman *et al*, 1994). Em estudos com um inibidor de dano na membrana, Trolox, um análogo da vitamina E, inibiu também a fragmentação de DNA induzida por raios gama, quando adicionado 30 minutos após a irradiação pelo bloqueio do influxo de Ca^{2+} em timócitos (Ramakrishnan *et al*, 1993).

Em alguns eventos, presumindo que o DNA seja o alvo inicial para apoptose radio-induzida, a resposta celular ao dano na forma de reparo do DNA pode levar à morte celular sob expressão de oncogenes envolvidos no processo (Story *et al*, 1992; Kane *et al*, 1995), por exemplo o gene codificador da proteína p53 (Haber, 1995) e os gens *cmyc* (Radford *et al*, 1994b; Szumiel, 1994), *Ha-ras*, *bcl-2* (Allan, 1992, Wyllie *et al*, 1987).

Em geral, após a indução de quebra de fita simples e de fita dupla, processos enzimáticos reparariam ou não o dano, reparo este que se tornaria visível na próxima metáfase (Sachs *et al*, 1993). O reparo do dano pode produzir um erro que resultará na formação de aberrações cromossômicas dicêntricas, anéis cêntricos, fragmentos acêntricos, além de translocações e inversões (Sachs *et al*, 1993). O reparo do dano aos

cromossomos está relacionado ao reparo do DNA assim como de seu microambiente associado a proteínas igualmente importantes no processo de reparo (Lander et al, 1972).

Assim uma das conseqüências biológicas da radiação ionizante em células eucarióticas é a formação de aberrações cromossômicas. Análises comparativas entre diferentes tipos de radiação indicam que as quebras de fita dupla conduzem diretamente e proporcionalmente à formação de aberrações cromossômicas (IAEA, 1986). Em 1962, os pioneiros Bender e Gooch sugeriram o uso de aberrações cromossômicas como medida quantitativa de exposição a radiação de um indivíduo.

Desde então, a freqüência de aberrações cromossômicas radioinduzidas tem sido utilizada na mensuração dos efeitos de uma dose desconhecida de radiação. Esta estimativa, ou dosimetria biológica, tem sido usada por mais de 30 anos com o objetivo de fornecer um meio para a estimativa de dose equivalente de corpo inteiro, após elevadas exposições, reais ou suspeitas, à radiação ionizante (IAEA, 1986; Lloyd et al, 1990). Esta técnica permitiu a dosimetria biológica em acidentes, como ocorreu com o manuseio incorreto de rejeitos de uma fonte de ^{137}Cs por indivíduos de Goiânia em 1987 (Campos et al, 1990).

A dosimetria biológica é utilizada em todas as situações em que a dose absorvida de corpo inteiro é desconhecida ou incerta, como em exposições acidentais ou ocupacionais, ou nos casos em que a avaliação de dose por

meio de dosimetria física não é possível, além de convalidar a estimativa de dose a dosimetria física (IAEA, 1986).

O objetivo da dosimetria biológica é fornecer informações para o prognóstico dos indivíduos expostos, pois a evolução clínica destes a doses possivelmente elevadas pode ser adequadamente prevista e planejada, visando o melhor tratamento médico (Barabanova, 1990).

Dentre os diversos parâmetros biológicos estudados, a produção de aberrações cromossômicas em linfócitos sanguíneos periféricos em seres humanos como indicadores de exposição à radiação tem sido, até o momento, o melhor método para a determinação da dose de radiação, pois apresenta uma relação dose resposta precisa, é pouco influenciável por fatores externos e independe do tipo de radiação (Moura *et al*, 1986).

Outras vantagens residem na possibilidade de obtenção de um grande número de linfócitos em poucos mililitros de sangue; onde constituem uma população celular sincronizada no estágio G₀, com longa vida média e uma baixa incidência de aberrações cromossômicas espontâneas (Moura *et al*, 1986).

Habitualmente a estimativa de dose de radiação por meio de alterações induzidas em células do corpo humano tem sido estudada por meio de várias técnicas, a maioria visando detecção de quebras cromossômicas por exemplo, pela técnica citogenética convencional (Aberrações Cromossômicas), pela técnica de indução de micronúcleo, pela técnica de

condensação cromossômica prematura, etc. (Müller *et al*, 1991), que comentaremos brevemente a seguir.

A análise de aberrações cromossômicas é feita após a primeira mitose de linfócitos de sangue periférico expostos à radiação na fase G1 do ciclo celular. Estes após um período de reparo são mitogenicamente estimulados, passando para subseqüente fase do ciclo celular, sendo que então as aberrações cromossômicas induzidas são conseqüentemente do tipo cromossômico, ou seja, o dano envolve ambas as cromátides do cromossomo e geralmente dois cromossomos são envolvidos. Quando são observadas aberrações do tipo cromatídico pode-se deduzir que o dano não foi causado pela radiação, e sim durante a primeira fase de síntese de DNA *in vitro*, como resultado de um erro de replicação ou de erro de reparo de DNA danificado por eventos não relacionados a radiação. (Potten, 1987). Se adicionarmos Bromodeoxiuridina (BrdU), um análogo da timidina às culturas por duas divisões consecutivas podemos observar se ocorreu troca entre cromátides irmãs, mas estes efeitos embora causados pela ação de agentes químicos e luz ultra violeta, não estão relacionados com a ação da radiação ionizante (Wolff, 1991).

Este método obviamente possui algumas desvantagens que influenciam na obtenção de um diagnóstico rápido. A técnica consome muito tempo para execução e obtenção dos resultados (48 horas para cultivo e pelo menos 1 dia para observação e contagem), além de um profissional altamente treinado para análise (Müller *et al*, 1991).

A perda de dicêntricos, de anéis cêntricos e de fragmentos acêntricos após a primeira mitose, dificulta o uso destas aberrações em dosimetria biológica (Doloy *et al*, 1994). Após exposição acidental, fica difícil definir a extensão do período para o qual a frequência das aberrações instáveis observadas em linfócitos pode ser usada em dosimetria (Doloy *et al*, 1994).

Outro método bastante utilizado é a contagem de micronúcleos. Os micronúcleos são formados por fragmentos acêntricos resultantes de quebras de cromátides provocadas pela ação direta da radiação. Esses fragmentos acêntricos em linfócitos periféricos estimulados pela fitohemaglutinina não são incorporados ao núcleo principal após a cariocinese e podem ser vistos no citoplasma de células binucleadas, quando é bloqueada a citocinese pela ação da citocalasina B. A análise de micronúcleos em linfócitos irradiados é mais rápida e simples, mas requer 72 horas para cultura e não é tão sensível quanto a Citogenética Convencional pois não é possível a diferenciação entre uma exposição parcial ou localizada (Müller *et al*, 1991).

Durante a exposição de linfócitos à radiação, as quebras de fita dupla, que resultam nas aberrações durante a divisão celular, poderiam ser observadas sem necessidade de divisão celular, se a cromatina interfásica condensasse do mesmo modo como ocorre durante a metáfase. Isto seria possível se a célula irradiada interfásica fosse fundida com uma célula mitótica de padrão cromossômico completamente diferente, como por exemplo, através da fusão de linfócitos humanos com células CHO de hamsters chineses, uma

linhagem estabelecida. Isto permitiria a condensação das cromátides e assim a identificação das quebras pela contagem dos fragmentos obtidos, pela utilização da maquinaria de condensação cromossômica da célula em mitose (Pantelias *et al*, 1993).

Dentre os métodos de análise de células interfásicas, a técnica de indução de condensação da cromatina de linfócitos irradiados pela fusão com células mitóticas, tem apresentado alta complexidade tecnológica dificultando sua reprodutibilidade (Müller *et al*, 1991).

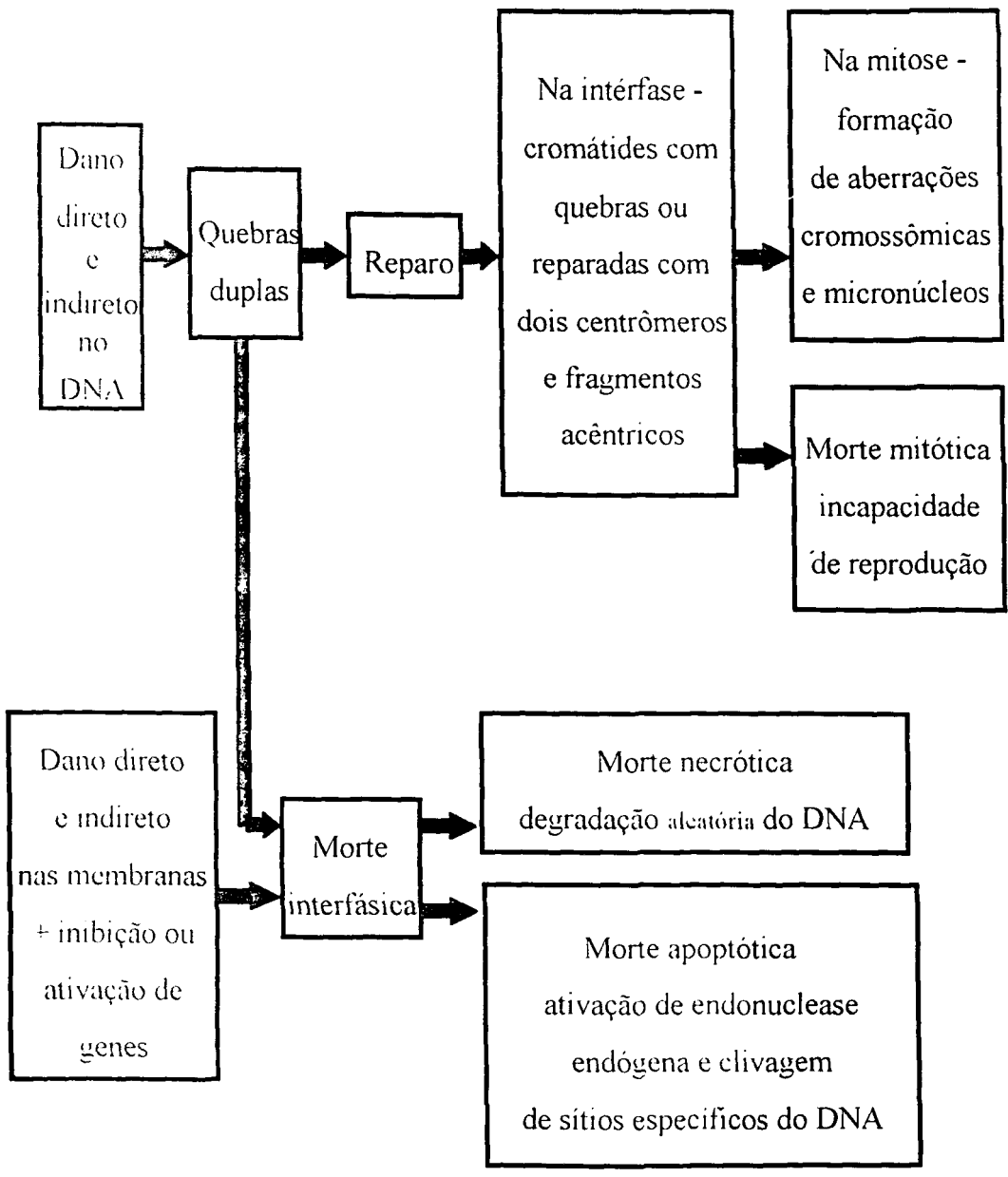
As células diferenciadas são normalmente muito radorresistentes e mostram uma lenta perda de viabilidade após a irradiação. Entretanto, os linfócitos são células altamente radiosensíveis e perdem a viabilidade rapidamente após a irradiação (Radford *et al*, 1994b; Radford, 1994a), ao contrário de outros tipos celulares que são mais radiosensíveis quando se dividem ativamente (Trowell, 1952). Alguns pesquisadores têm se interessado pelo tipo de morte morfológicamente distinta, chamada apoptose, à qual os linfócitos são submetidos por causa de sua alta radiosensibilidade. A morte de linfócitos interfásicos irradiados não requer progressão no ciclo celular, mas parece requerer síntese de RNA e de proteínas (Radford *et al.*, 1994c Okada, 1970).

Entre estes fenômenos, a apoptose ou suicídio celular tem sido um relacionado a ação da radiação ionizante em linfócitos humanos e em células intestinais. Gavrieli *et al* (1992) estudaram linfócitos em sistemas onde a apoptose foi experimentalmente induzida e mostraram que a mesma está

associada à atividade da endonuclease endógena e sugeriram que a fragmentação da cromatina é a maior característica bioquímica do processo apoptótico (Collins *et al*, 1992). Recentemente, algumas técnicas têm sido descritas para a detecção específica destas quebras de fitas de DNA ao nível molecular nas células interfásicas (Mori *et al*, 1994).

Os timócitos são células altamente radiosensíveis e apresentam morte interfásica dentro de poucas horas após baixas doses de radiação X (0,46 a 9,2 Gy). As quebras radioinduzidas de fita de DNA são geradas aleatoriamente (Story *et al*, 1992) e são reparadas no período de 2 horas de incubação a 37°C (Yamada *et al*, 1988). Após este período é possível detectar fragmentação de DNA causada por quebra de fita dupla em timócitos, mas em linfócitos o aparecimento da fragmentação ocorre 4 horas após a irradiação (Soldatenkov *et al*, 1989).

A morte celular induzida por raios X ocorre rapidamente em algumas linhagens celulares linfóides de camundongo, um modelo útil para o estudo da radiosensibilidade de linfócitos (Radford, 1994a).



Esquema 1. Evolução para a morte em células submetidas a radiação ionizante.

Foi demonstrado que os timócitos mitoticamente inativos e os linfócitos interfásicos morrem rapidamente após a irradiação, sugerindo que o processo de morte não dependa de alterações genômicas (Akagi *et al* 1993).

O fenômeno de morte interfásica apoptótica tem sido longamente associado com a alta sensibilidade de células linfóides (Macklis *et al*, 1992), e é um tipo comum de morte celular radio-induzida também em células do timo e de outras de linhagens hematopoiéticas (Haimovitz-Friedman *et al*, 1994).

As células mitoticamente ativas e células que não se dividem (incluindo linfócitos interfásicos) estão sujeitas a morte apoptótica após a irradiação (Radford *et al*, 1994b). A morte radio-induzida de linfócitos é supostamente um caso de morte celular programada (Soldatenkov *et al*, 1989).

Após a irradiação, a apoptose é o modo predominante de morte celular em linhagens de células hematopoiéticas e que ocorre em tempos diferentes. Por exemplo, a irradiação de células ST4 (linhagem de células linfóides) em cultura com 3 Gy, após 3 horas, 100% das células estavam em apoptose, mas outros tipos celulares podem entrar em apoptose até 40 horas após a irradiação (Radford *et al*, 1994a).

Embora existam evidências de apoptose em linhagens celulares linfóides e mielóides que morrem em tempos diferentes após a irradiação, tal fato não elimina a possibilidade de que também ocorra morte necrótica (Radford *et al*, 1994c).

A técnica mais comumente usada para detecção de apoptose é a análise de fragmentos de DNA por eletroforese em gel de agarose (Gavrieli *et al*, 1992; Dolzhanskiy *et al*, 1995, Hueber *et al*, 1994)).

O processo de degradação de DNA pela ação de endonucleases endógenas em regiões de ligação internucleossomal, gera fragmentos, os quais produzem bandas regulares e múltiplas quando analisados eletroforeticamente (Iwata *et al*, 1994).

Quando células necróticas são analisadas eletroforeticamente são produzidos fragmentos de variados tamanhos, gerando no gel um fundo progressivamente mais intenso, mas sem bandas definidas de DNA (smear) indicando degradação aleatória (Collins *et al*, 1992).

Assim, os fragmentos regulares formados durante a apoptose são considerados como a principal característica deste tipo de morte (Iwata *et al*, 1994). Deste modo, o gel apresenta bandas com múltiplos do tamanho de proteção nucleossomal, semelhante a uma escadaria (ladder). Entretanto, este método não permite distinguir células individuais sob apoptose, mas pode-se certificar de que houve fragmentação de DNA nuclear.

Recentemente foi desenvolvido por Gavrieli *et al* (1992), uma técnica para visualização de morte celular programada por meio de marcação de fragmentação nuclear em células isoladas por meio de preparações histológicas em tecidos com atividade apoptótica reconhecida. O método baseia-se na ligação de uma enzima terminal deoxinucleotidil transferase

(tdt) à extremidade 3'-OH das quebras simples ou duplas de DNA. A tdt catalisa a síntese de um polímero polideoxinucleotídeo biotinilado. A biotina deste composto permite a ligação de um conjugado avidina-peroxidase que quando revelado com seu substrato cromógeno, pode ser analisado por microscopia óptica (Mori *et al*, 1994; Haimovitz-Friedman *et al*, 1994, Dolzhanskiy *et al*, 1995).

Todos estes métodos apresentam diferentes aspectos de vantagens e desvantagens, mas as técnicas alternativas, utilizando células interfásicas, tem sido pouco utilizadas para dosimetria biológica e, inclusive, a apoptose radioinduzida nunca foi utilizada para este fim, até o nosso conhecimento, onde certamente poderia auxiliar na dosimetria biológica, de forma rápida e eficaz, sem a complexidade dos métodos citogenéticos.

II - OBJETIVOS

Geral:

Pesquisar métodos alternativos de dosimetria biológica que permitam estimar a dose de radiação de ^{60}Co recebida, em linfócitos periféricos humanos, sem necessidade de reprodução da célula.

Específicos:

- Verificar a ocorrência de apoptose radio-induzida em linfócitos periféricos humanos, detectada por padrão característico de quebras internucleossomais de DNA isolado, submetido a eletroforese em agarose, e sua eventual relação dose-resposta.
- Determinar a apoptose em linfócitos periféricos humanos, através da marcação terminal das quebras de DNA (IDNEL), para determinação da fração apoptótica de linfócitos periféricos humanos.
- Determinar a relação dose resposta entre eventuais alterações na fração apoptótica, determinada pela IDNEL, e a dose de radiação por ^{60}Co a que os linfócitos periféricos humanos serão expostos *in vitro*.
- Avaliar outros métodos de dosímetro biológico em células interfásicas, utilizando técnicas de condensação prematura de cromátides, pela hibridação de células humanas interfásicas e células em mitose, com avaliação de quebras cromatídicas.

- Comparar os vários métodos com a dosimetria citogenética convencional.

III - MATERIAL E MÉTODOS

Materiais

A - Reagentes e Soluções

Os reagentes e demais materiais utilizados nos experimentos foram de qualidade pró-análise, sendo adquiridos comercialmente de fontes idôneas.

Os materiais para utilização nas técnicas de marcação terminal e eletroforese foram de qualidade para biologia molecular. Todas as soluções foram preparadas com água ultra-pura de qualidade MilliQ. Os fornecedores mais específicos serão citados ao longo do texto.

B -Obtenção das amostras

O sangue foi obtido por punção venosa em seringa heparinizada, de voluntários humanos, saudáveis não fumantes que não estivessem ingerindo medicamentos, previamente informados e com consentimento expresso e testemunhado. Após a coleta, as amostras foram aliquotadas e imediatamente processadas. Informações sobre uso de drogas ou outras prováveis causas dos efeitos mutagênicos foram questionados e somente voluntários saudáveis foram incluídos nos ensaios.

Os doadores foram:

Doador no. 1 - Sexo feminino, com 29 anos de idade,

Doador no. 2 - Sexo masculino, com 51 anos de idade,

Doador no. 3 - Sexo feminino, com 36 anos de idade.

Métodos

A - Irradiação e conservação das amostras

Na presença de oxigênio, em temperatura corpórea aproximada e sem outros preservativos, alíquotas sanguíneas uniformemente colhidas e homogeneizadas foram submetidas à irradiação por ^{60}Co , em uma taxa de dose constante de 5cGy/min, em fonte panorâmica de baixa potência, ou 1Gy/min, em uma Gamma Cell 220 (Atomic Energy of Canada), utilizando blindagem de 90%, nas doses determinadas para cada experimento. Controles adequados eram incluídos em todas as fases do processo.

As amostras irradiadas foram incubadas por 24 horas a 37°C para permitir que o reparo celular ocorresse, principalmente para os estudos citogenéticos.

B - Cultura Convencional de Linfócitos

Ao sangue total foi adicionado meio de Cultura MEM enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB), fitohemaglutinina (agente mitogênico) e 5 µg/ml de Bromodeoxiuridina (BrdU), um análogo da timidina utilizado para selecionar as células em primeira divisão. A amostra sanguínea foi cultivada em estufa à 37°C durante 48 horas, sendo que duas horas antes do término deste período foi adicionada colchicina na concentração de 0,2 µg/ml, a fim de bloquear as células em metáfase. Em seguida as células foram tratadas

com solução hipotônica (KCl 0,075M e Citrato de Na 1% 3:1) e fixadas em metanol e ácido acético (3:1). Para a sensibilização da BrdU, as células foram coradas em 5 μ g/ml de Hoechst 33258, incubadas a 60^oC sob luz U.V., comprimento de onda de 254 nm, em tampão Mc Ilvaine, durante duas horas e coradas com Giemsa 2%, (Bender e Gooch, 1962).

C.1 - Preparo das células CHO

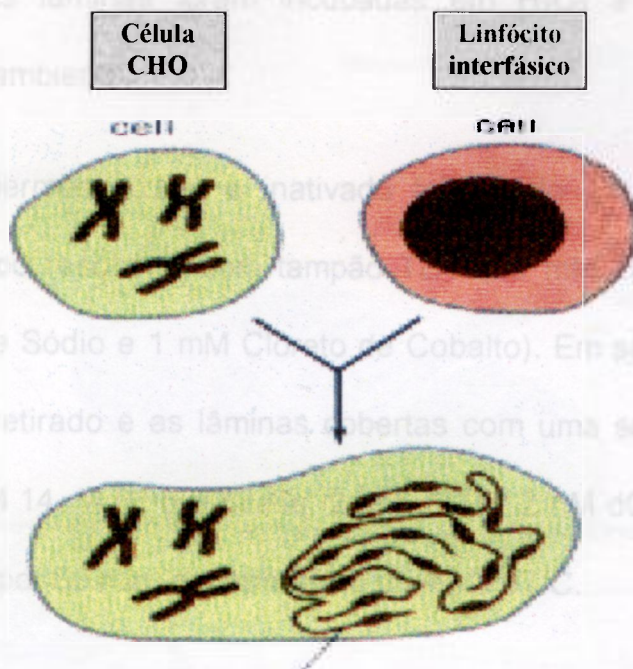
As células CHO foram cultivadas em meio RPMI 1640 enriquecido com 10% de SFB, glutamina 200 mM e 100 g/ml de penicilina/estreptomicina. Para a fusão com os linfócitos, as células CHO foram tratadas com meio de cultura enriquecido com 10% de SFB e 0,2 μ g/ml de colchicina durante 4-5 horas, para bloquear o maior número de células possível em metáfase. Após a incubação as células foram lavadas com PBSA e a separação das células mitóticas foi realizada por destacamento de modo que só as células mitóticas se desprendessem da monocamada, e as interfásicas continuassem aderidas. As células mitóticas foram então lavadas em meio sem soro e reservadas para a fusão.

C.2 - Separação de linfócitos

Para a separação dos linfócitos, o sangue total foi diluído em PBSA na proporção 1:1 e cuidadosamente adicionado sobre o gradiente Ficoll-Paque em tubo de ensaio e centrifugado a 20^oC, por 30 minutos a 2000 rpm. Em seguida as células foram lavadas em meio contendo soro fetal bovino e em meio sem soro.

C.3 - Fusão celular

Para efetuar a fusão, as células CHO mitóticas foram lavadas em meio sem soro, colocadas em tubo de ensaio juntamente com os linfócitos separados do sangue total e lavadas novamente em meio sem soro. Todo o sobrenadante foi descartado e o "pellet" de células foi ressuspensionado em uma solução de Polietilenoglicol (PEG) a 50% em meio de cultura durante 1 a 2 minutos aquecida a 37°C, em seguida as células foram centrifugadas por 4 a 6 minutos para a remoção de toda a solução de PEG e adição de meio sem soro e centrifugadas novamente a 1000 rpm, lavadas com meio contendo soro, hipotonizadas com KCl 0,075M e Citrato de Na 1% 3:1, fixadas com metanol e ácido acético 3:1, gotejadas em lâminas e coradas com Giemsa 2% (Pantelias *et al*, 1983).



Esquema 2. - Demonstração dos achados morfológicos evidenciados pelo uso da fusão com células mitóticas para identificação de quebras cromossômicas

D - Marcação das quebras de DNA (IDNEL)

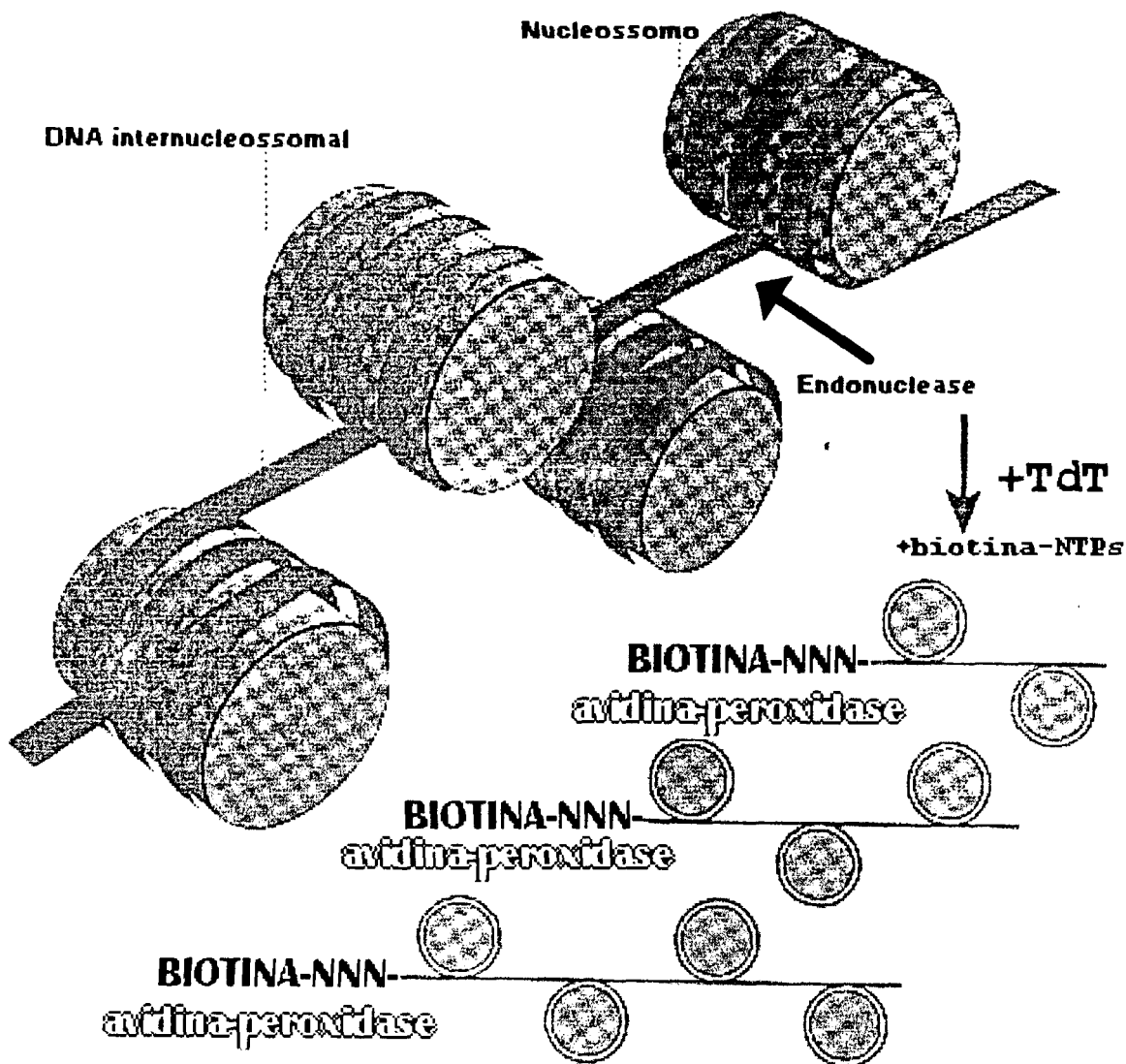
Ao sangue total foi adicionada solução isotônica (NaCl 0,85%) e centrifugado por 10 min., a 1500 rpm. Desprezou-se o sobrenadante e a papa de hemácias, separando-se o creme leucocitário que foi novamente lavado. Ao precipitado da segunda centrifugação, foi adicionado dois volumes de solução fixadora (metanol/ácido acético 3:1). A suspensão celular foi gotejada em lâminas aquecidas a 65°C e secas. A rehidratação das células foi realizada por imersão das lâminas em PBS, sendo a seguir processada a permeabilização pela incubação por 5 minutos em 2 µg/ml de Proteinase K, para liberação de algumas proteínas fixadas, aumentando o contato dos

reagentes com o substrato. Para inativar uma eventual atividade peroxidase endógena, as lâminas foram incubadas em H_2O_2 a 2% por 5 min. a temperatura ambiente.

O material permeabilizado e inativado foi lavado em água bidestilada e mergulhado ou recoberto com tampão TDT (30 mM Tris pH 7,2; 140 mM Cacodilato de Sódio e 1 mM Cloreto de Cobalto). Em seguida, o tampão de lavagem foi retirado e as lâminas cobertas com uma solução contendo 0,3 U/ μl tdt; 2 nM 14-dATP biotinilada; 2 nM dCTP; 2 nM dGTP; 2 nM dTTP em tampão TDT por 60 min. em atmosfera úmida à 37°C.

A reação acima foi terminada incubando-se as lâminas em tampão TB (300 mM Cloreto de Sódio e 30 mM Citrato de Sódio) por 15 min., a temperatura ambiente.

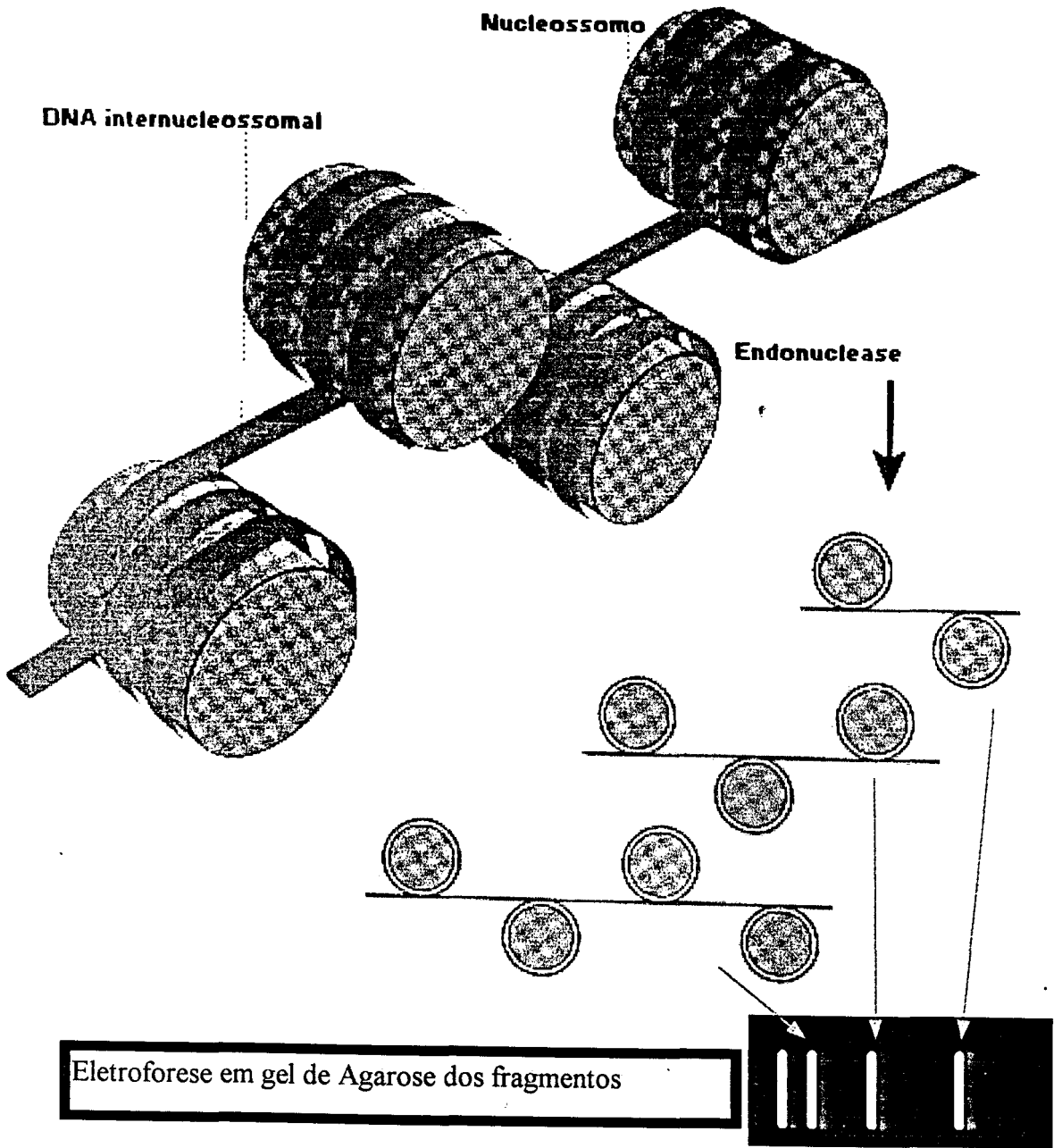
As lâminas foram novamente lavadas em água bidestilada, cobertas com solução de BSA (Albumina de Soro Bovino) a 2% por 10 min., lavadas em água bidestilada, incubadas em PBS por 5 min. e novamente incubadas com streptavidina-peroxidase por 30 min., a 37°C, para permitir a ligação desta com eventuais polinucleotídeos biotinilados. Após lavagens cuidadosas em água destilada, seguidas de incubação em PBS por 5 min., as lâminas foram incubadas com a solução reveladora, preparada como descrito a seguir. Filtra-se 35 mg de DAB em 50 ml de PBS, completa-se o volume para 100 ml com PBS, adicionando-se 60 μl de H_2O_2 a 36% no momento da colocação sobre as lâminas. a incubação com o revelador é mantida por 30 minutos sobre observação microscópica (Gavrieli et al, 1992).



Esquema 3. Demonstração da técnica de adição e reconhecimento de nucleotídeos modificados pela técnica INDNEL.

E - Eletroforese de DNA em Gel de Agarose

O sangue total (5ml para cada dose) foi centrifugado e o plasma, desprezado. Às células foi adicionado 5 ml de tampão TKM1 (10 mM tris-HCl, pH 7,6; 10 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 2 mM Edta) e 125 ul de Triton x 100 para lisar as hemácias. Centrifugado a 2.200 rpm por 10 min. a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o pellet celular foi lavado com 5 ml de tampão de TKM1 e centrifugado a 2.200 rpm por 10 min. O pellet celular foi ressuspensão em 0,8 ml de tampão TKM2 (10 mM tris-HCl pH 7,6; 10 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 0,4 M NaCl e 2 mM EDTA) e transferido para um plástico cônico de 1,5 ml. Foi adicionado 50 ul de SDS 10% e esta suspensão foi incubada por 10 min a 55°C. Após este período foi adicionado 0,3 ml de NaCl 5M, centrifugado a 12.000 rpm por 5 min. em microcentrífuga. Ao sobrenadante foram adicionados 2 volumes de etanol a 100% para que ocorresse precipitação do DNA, este foi centrifugado a 14.000 rpm por 20 min. O DNA precipitado foi removido e lavado em etanol a 70% (gelado) e novamente centrifugado por 5 min. a 12.000 rpm. O pellet de DNA foi seco à temperatura ambiente e ressuspensão em tampão TE pH 8,0 (1M Tris e 0,5M EDTA). Incubado a 65°C por 30 min., e em seguida incubado a 37°C por 1 hora. Esta suspensão de DNA foi submetida a eletroforese (80volts) por 3 horas em gel de agarose 1,8 - 2% contendo 0,4 µg/ml de brometo de etídio em tampão tris-borato. (Técnica modificada pela professora Dra. Carmem S. B. Martins, Depto. de Genética da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp - comunicação pessoal).



Esquema 4. Demonstração da separação eletroforética de fragmentos de DNA induzidos no processo apoptótico, a partir de oligonucleossomos.

E - Análise estatística

A análise dos dados quantitativos dos estudos de dosimetria biológica foi ajustada em um modelo linear quadrático, através de um software Graph-Pad Prisma, com intervalo de confiança de 95% para cada análise e ajuste medido através de r^2 . (Woolson, 1987), utilizando-se para definição de significância sempre dos conceitos de que a probabilidade de igualdade a ausência de linearidade fosse menor que 0,05.

IV - RESULTADOS

Inicialmente procuramos aprimorar nosso treinamento em dosimetria biológica pelo aprendizado das técnicas citogenéticas convencionais. Assim, em nossa abordagem inicial do objetivo proposto, incluímos experimentos de citogenética convencional onde podemos demonstrar a maior parte dos efeitos clastogênicos detectáveis por este método como pode ser observado na figura 1, onde podemos observar dois cromossomos aberrantes, sendo que o maior dicêntrico é indicado pela seta. Esta é uma mitose obtida a partir da Cultura Convencional de Linfócitos processada conforme descrito em materiais e métodos. As células foram expostas a uma dose de 6Gy de ^{60}Co com taxa de dose de 1Gy/min. Podemos observar um dos principais danos cromossômicos quando duas fitas do DNA de duas cromátides diferentes são quebradas diretamente pela ação da radiação, exibindo um cromossomo dicêntrico indicado pela seta, formado na tentativa de reparo do dano.

Detecção de aberrações cromossômicas pela técnica Citogenética Convencional



Figura 1. Reprografia computadorizada de uma preparação citogenética de linfócitos periféricos humanos irradiados com 6 Gy com ^{60}Co , mostrando aberrações cromossômicas dicêntricas, indicadas pela seta. Original com magnificação de 63x, fotografado em Microscópio Zeiss Axiophot, com óptica planapocromática.

Tendo em vista nossos objetivos de aprimoramento das técnicas de dosimetria biológica, uma vez comprovada nossa eficiência com a referida técnica, procuramos a seguir estudar o desenvolvimento de novas técnicas, embora houvesse sempre o cuidado de acompanhar o grupo que concomitantemente desenvolvia a técnica citogenética convencional.

Detecção de quebras na cromatina condensada prematuramente de linfócitos interfásicos

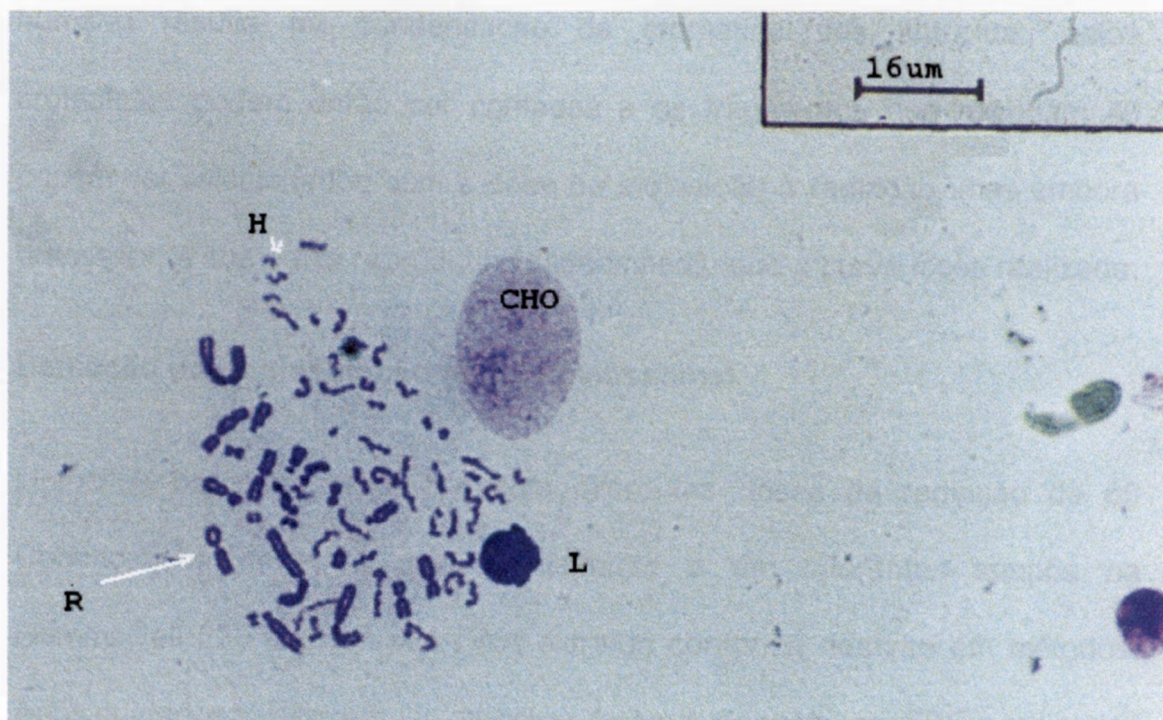


Figura 2. Reprografia computadorizada de uma fusão celular entre um linfócito humano e uma célula CHO, demonstrando claramente a cromatina do linfócito humano condensada representada por H e os cromossomos metafásicos da célula CHO representados por R. Na direita superior localiza-se uma célula CHO com seu volume aumentado devido provavelmente ao seu estágio pós síntese do ciclo celular e abaixo localiza-se um linfócito interfásico (L) com volume normal.

Como demonstrado na figura 2, a formação de híbridos entre células mitóticas de Hamster Chinês com linfócitos interfásicos de sangue periférico humano resulta na condensação da cromatina dos linfócitos, estas cromátides podem então ser contadas e os fragmentos que excedem 46 podem ser relacionados com a dose de exposição à radiação, mas embora promissor, a sua baixa reprodutibilidade impediu que a curva fosse realizada.

Deteção da fragmentação oligonucleossomal

Linfócitos humanos irradiados com diferentes doses de radiação de 60 Cobalto, com taxa de dose semelhante e em diferentes tempos na GammaCell 220 tiveram seu DNA extraído conforme descrito em métodos. Após cuidadosa secagem, as amostras foram suspensas em TBE e aplicadas a um gel de agarose adequada a biologia molecular, contendo brometo de etídio como indicador. Após a eletroforese por 1 hora, o gel foi transiluminado por luz ultravioleta e as frações fluorescentes fotografadas. Padrões de peso molecular adequados foram introduzidos em faixas corridas concomitantemente. A reprografia computadorizada desta eletroforese pode ser vista na Figura 3. O DNA extraído de linfócitos não irradiados apresenta um perfil característico com apenas uma banda na origem do gel, mostrando claramente que o processo de extração e purificação não gerou, pelo menos nesta preparação, nenhuma quebra aleatória do DNA, nem evidenciou quebras seletivas que pudessem ser confundidas com fragmentos de oligonucleossomos (Faixa 1).

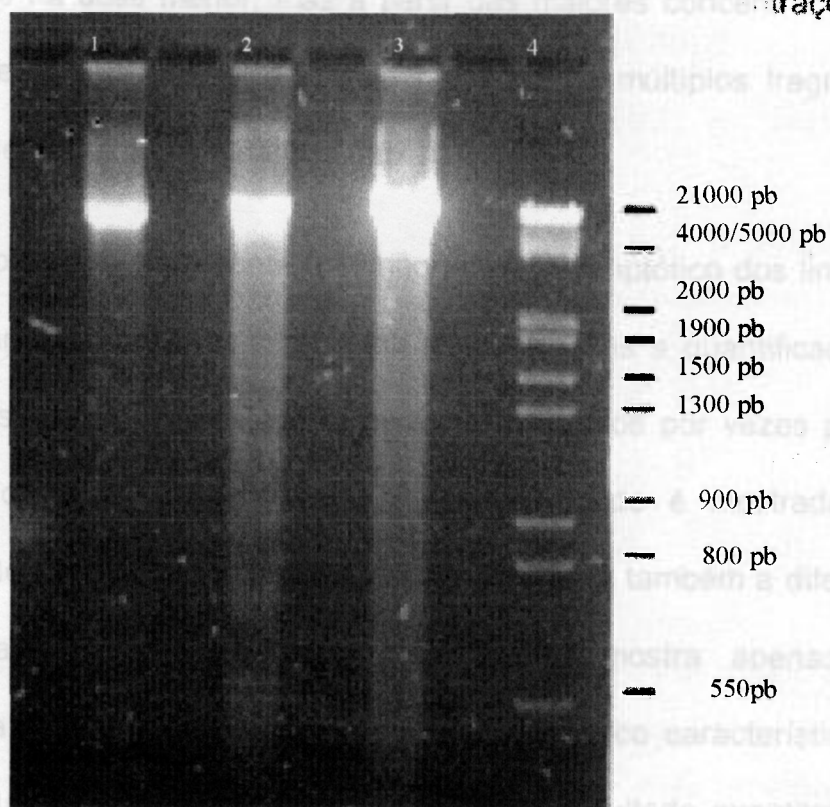


Figura 3. Eletroforese de fragmentos de DNA em gel de agarose, obtido a partir de sangue total humano proveniente do doador 2. Fotografada por transiluminação com luz ultravioleta, com Polaroid

Linha 1: Controle não irradiado. Linha 2: Células irradiadas a 5 Gy. Linha 3: Células irradiadas a 6 Gy, com taxa de dose 1Gy/min. Linha 4: DNA de Fago λ clivado com enzima Hind III e Eco R1.

Quando analisamos os DNAs de linfócitos submetidos a radiação ionizante, notamos que podemos identificar as características bandas em padrão de peso molecular múltiplos, revelando que o processo apoptótico ocorreu principalmente na dose menor, mas a partir das maiores concentrações de radiação, este perfil é prejudicado pela presença de múltiplos fragmentos decorrentes de degradação aleatória (faixa 3).

Este processo mostra claramente o comportamento apoptótico dos linfócitos humanos quando submetidos à radiação ionizante, mas a quantificação do processo e as variações intratécnica levam a resultados por vezes poucos conclusivos, como demonstrado pela figura 3.1, onde é mostrada uma eletroforese de DNA de linfócitos humanos submetidos também a diferentes doses de radiação, mas o perfil eletroforético mostra apenas uma degradação aleatória corrompendo o perfil eletroforético característico dos fragmentos oligonucleossomais e obscurecendo o resultado quantitativo do processo.

Mesmo dessa maneira, a observação criteriosa do gel revela que contra este fundo é possível identificar as bandas de DNA obtidos de fragmentos oligonucleossomais em algumas faixas, como na faixa 7 onde os linfócitos foram irradiados nas maiores doses.

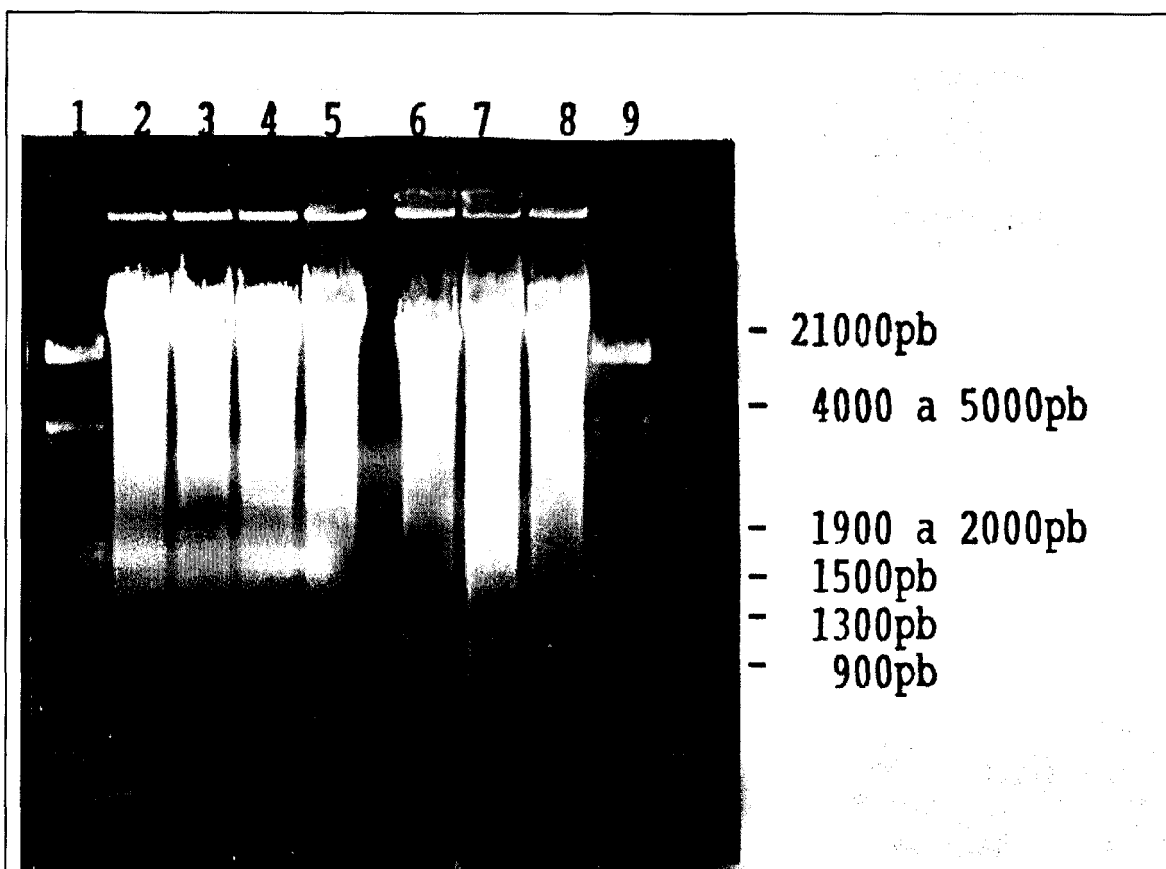


Figura 3.1. Reprografia computadorizada de uma fotomicrografia de um gel de agarose contendo DNA de linfócitos humanos submetidos a diferentes doses de radiação ionizante, mostrando a possibilidade de interferência da degradação aleatória e do processo de extração sobre a qualidade do material a ser analisado. A seguir descrevemos as origens do DNA em cada faixa. Faixa 1. Padrões de peso molecular. Faixa 2. Linfócitos não irradiados. Faixa 3. Linfócitos irradiados com 0,20 Gy, Faixa 4. Linfócitos irradiados com 0,5 Gy, Faixa 5. Linfócitos irradiados com 1 Gy, Faixa 6. Linfócitos irradiados com 2 Gy, Faixa 7. Linfócitos irradiados com 4 Gy, Faixa 8. Linfócitos irradiados com 6 Gy e Faixa 9. Padrões de Peso molecular.

ue, se

iforme o esperado, eliminando a p a de um

ativo e garantindo a especificidade da coloração a ser encontrada.

Identificação de apoptose em células isoladas pela técnica INDNEL

(in situ DNA nick end labelling)

Diante da baixa capacidade quantitativa da eletroforese de DNA, linfócitos humanos submetidos a radiação foram testados para a detecção in situ da apoptose, através de técnicas de marcação terminal das quebras de DNA com adição de nucleotídeos contendo marcadores identificáveis. Em nosso sistema utilizamos precursores nucleotídeos contendo biotina em sua molécula, o que permite a identificação através da avidina ligada a peroxidase, numa reação bastante específica e com adição de uma molécula de baixo peso molecular, a biotina.

O primeiro passo no controle desta complexa reação implicava na identificação de possíveis células que pudessem apresentar atividade peroxidásica endógena, e que seriam um fator de confusão na determinação quantitativa do fenômeno.

Na fig. 4, foi feito um teste de controle da inativação da peroxidase endógena que poderia influenciar nos resultados. Neste caso após o passo da inativação da peroxidase endógena procedeu-se a coloração com seu substrato cromógeno que, satisfatoriamente, não mostrou células marcadas conforme o esperado, eliminando a possibilidade de um resultado falso positivo e garantindo a especificidade da coloração a ser encontrada.

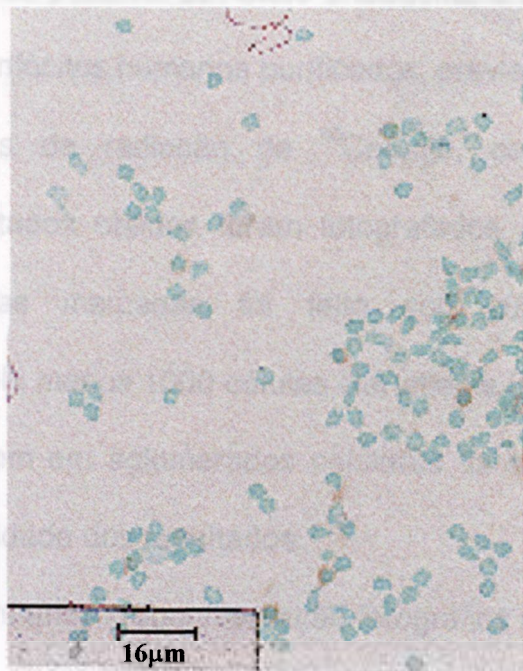


Figura 4. Reprografia computadorizada de linfócitos periféricos humanos utilizados na técnica de marcação de quebras de DNA, preparado sem adição de conjugado avidina-peroxidase, utilizado como controle da inativação da peroxidase endógena.

Após a eliminação de possível atividade endógena, a técnica foi aplicada a lâminas contendo linfócitos humanos purificados, previamente irradiados com doses progressivas de radiação de ^{60}Co , conforme descrito em Métodos. Os resultados obtidos foram fotografados e a quantificação do número de células marcadas foi feito sob cuidadosa observação microscópica em pelo menos 1000 células claramente identificáveis. A opção de evitar a contagem em aglomerados celulares foi sempre mantida, para garantia da uniformidade dos resultados.

Na figura 5, apresentamos a documentação fotográfica das células marcadas pela técnica IDNEL, mostrando claramente a identificação de células positivas, com características de marcação marrom intracelular e por vezes apresentando um perfil perinuclear. Este fenômeno pode ser interpretado pela dificuldade de penetração no interior dos núcleos celulares dos complexos enzimáticos envolvidos no processo, resultando então na presente marcação por vezes periférica.

Assim, na figura 5 A, podemos notar que na ausência de irradiação, não são identificáveis células marcadas na maioria dos campos observados, como no campo documentado. Ocasionais marcações foram identificadas em campos isolados. Esta característica pode ser observada em todas as preparações estudadas, em pelo menos dois experimentos e seis amostras.

Na figura 5 B e C, são mostradas duas preparações contendo linfócitos irradiados com doses crescentes de radiação, onde é facilmente identificável o número proporcionalmente maior de células marcadas e facilmente identificáveis pela coloração marrom.

Esta característica permitiu a obtenção de valores quantitativos confiáveis e reprodutíveis com construção de curvas e outras estimativas que serão apresentadas a seguir, utilizando-se um dos experimentos como referência.

Curva dose resposta para apoptose detectada por IDNEL no doador 1.

Os linfócitos periféricos do doador 1, quando submetidos a radiação ionizante apresentaram uma crescente proporção de células apoptóticas de

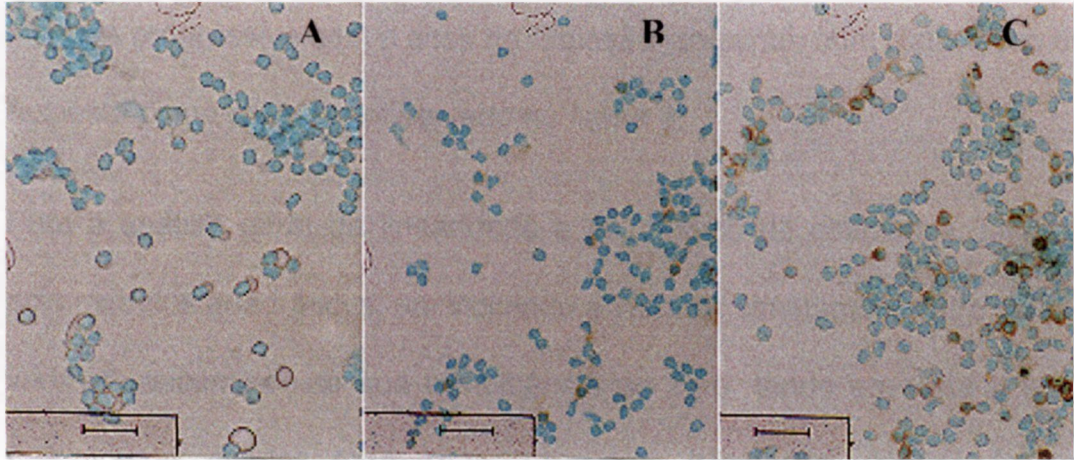


Figura 5. Reprografia computadorizada de linfócitos periféricos humanos sempre uma radiação de fundo ambiental. Os dados quantitativos utilizados para a detecção de fragmentação de DNA radio-induzida, por meio da técnica IDNEL. Em A, Controle de células não irradiadas. Em B as células foram irradiadas com 2Gy e em C as células foram irradiadas com 6Gy com taxa de dose 1 Gy/min. As barras representam 16 μm .

que optamos pela apresentação de ambos e não somente do maior. Para completar esta análise dos resultados apresentamos os valores obtidos para as constantes.

Quando o modelo utilizado foi $AX+BX^2$, encontramos valores de constantes a seguir: $A=0,1813 \pm 0,0096$ e $B=-1,5 \pm 0,02 \times 10^{-3}$

Quando o modelo utilizado foi $A+BX+CX^2$, encontramos valores de constantes a seguir: $A=1,257 \pm 1,19$, $B=0,1707 \pm 0,013$ e $C=-1,38 \pm 0,2 \times 10^{-4}$

Curva dose resposta para apoptose detectada por IDNEL no doador 1.

Os linfócitos periféricos do doador 1, quando submetidos a radiação ionizante apresentaram uma crescente proporção de células apoptóticas de maneira progressiva com a dose de radiação ionizante, num claro efeito dose resposta como pode ser observado na figura 6.

Para a análise geral da linearidade e do modelo de estimativa, utilizamos dois modelos quadráticos, um incluindo a variável constante e outro sem esta variável, assumindo-se sua coincidência ao zero, tendo em vista o fato de que poucas células eram detectadas sem irradiação, apesar de existir sempre uma radiação de fundo ambiental. Os dados quantitativos utilizados podem ser observados na tabela I do anexo.

Os modelos aplicados apresentaram alta convergência, acima de 99% e ambos com alta significância estatística, pelo que optamos pela apresentação de ambos e não somente do maior. Para completar esta análise dos resultados apresentamos os valores obtidos para as constantes.

Quando o modelo utilizado foi $AX+BX^2$, encontramos valores de constantes a seguir: $A= 0,1813 \pm 0.0096$ e $B= -1,5 \pm 0,02 \times 10^{-3}$

Quando o modelo utilizado foi $A+BX+CX^2$, encontramos valores de constantes a seguir: $A= 1,357 \pm 1,19$, $B=0,1707 \pm 0.013$ e $C= -1,36 \pm 0,2 \times 10^{-4}$

Curva dose resposta para apoptose detectada por IDNEL no doador 2.

Os linfócitos periféricos do doador 2 quando submetidos a radiação ionizante

apresentaram uma crescente proporção de células apoptóticas de maneira

progressiva com a dose de radiação ionizante, num claro efeito dose

dependente como pode ser observado na figura 7 e semelhantes as obtidas do

doador 1.

Para a análise geral da linearidade e do modelo de estimativa, utilizamos a

análise sistemática para este doador. Neste paciente notamos que a

convergência não foi tão rápida e alguns valores apresentavam sinais de

um maior valor basal de apoptose. Os dados quantitativos utilizados podem

ser observados na tabela II do anexo.

Os modelos aplicados neste caso apresentaram uma convergência, acima de

90%.

Quando o modelo utilizado foi $AX+BX^2$, encontramos valores de constantes

a seguir: $A=0,1876 \pm 0,0155$ e $B=-1,48 \pm 0,03 \times 10^{-2}$.

Quando o modelo utilizado foi $A+BX+CX^2$, encontramos valores de

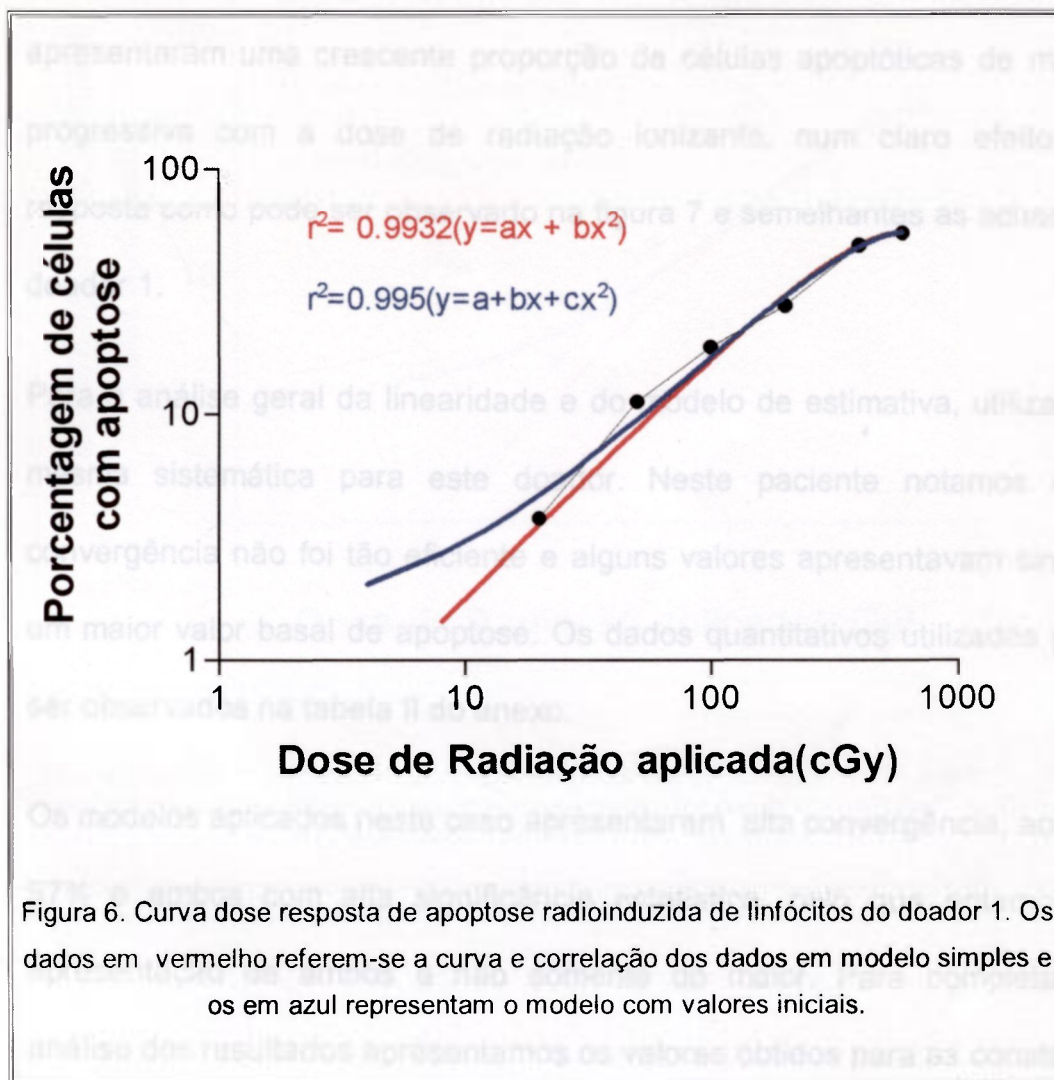
constantes a seguir: $A=3,037 \pm 1,60$, $B=0,1438 \pm 0,010$ e $C=-1,15 \pm 0,3 \times 10^{-4}$.

Quando o modelo utilizado foi $AX+BX^2$, encontramos valores de constantes

a seguir: $A=0,1876 \pm 0,0155$ e $B=-1,48 \pm 0,03 \times 10^{-2}$.

Quando o modelo utilizado foi $A+BX+CX^2$, encontramos valores de

constantes a seguir: $A=3,037 \pm 1,60$, $B=0,1438 \pm 0,010$ e $C=-1,15 \pm 0,3 \times 10^{-4}$.



Curva dose resposta para apoptose detectada por IDNEL no doador 2

Os linfócitos periféricos do doador 2 quando submetidos a radiação ionizante apresentaram uma crescente proporção de células apoptóticas de maneira progressiva com a dose de radiação ionizante, num claro efeito dose resposta como pode ser observado na figura 7 e semelhantes as achados do doador 1.

Para a análise geral da linearidade e do modelo de estimativa, utilizamos a mesma sistemática para este doador. Neste paciente notamos que a convergência não foi tão eficiente e alguns valores apresentavam sinais de um maior valor basal de apoptose. Os dados quantitativos utilizados podem ser observados na tabela II do anexo.

Os modelos aplicados neste caso apresentaram alta convergência, acima de 97% e ambos com alta significância estatística, pelo que optamos pela apresentação de ambos e não somente do maior. Para completar esta análise dos resultados apresentamos os valores obtidos para as constantes.

Quando o modelo utilizado foi $AX+BX^2$, encontramos valores de constantes a seguir: $A= 0,1676 \pm 0.0156$ e $B= -1,48 \pm 0,03 \times 10^{-3}$

Quando o modelo utilizado foi $A+BX+CX^2$, encontramos valores de constantes a seguir: $A= 3,037 \pm 1,60$, $B= 0,1438 \pm 0.019$ e $C= -1,15 \pm 0,3 \times 10^{-4}$

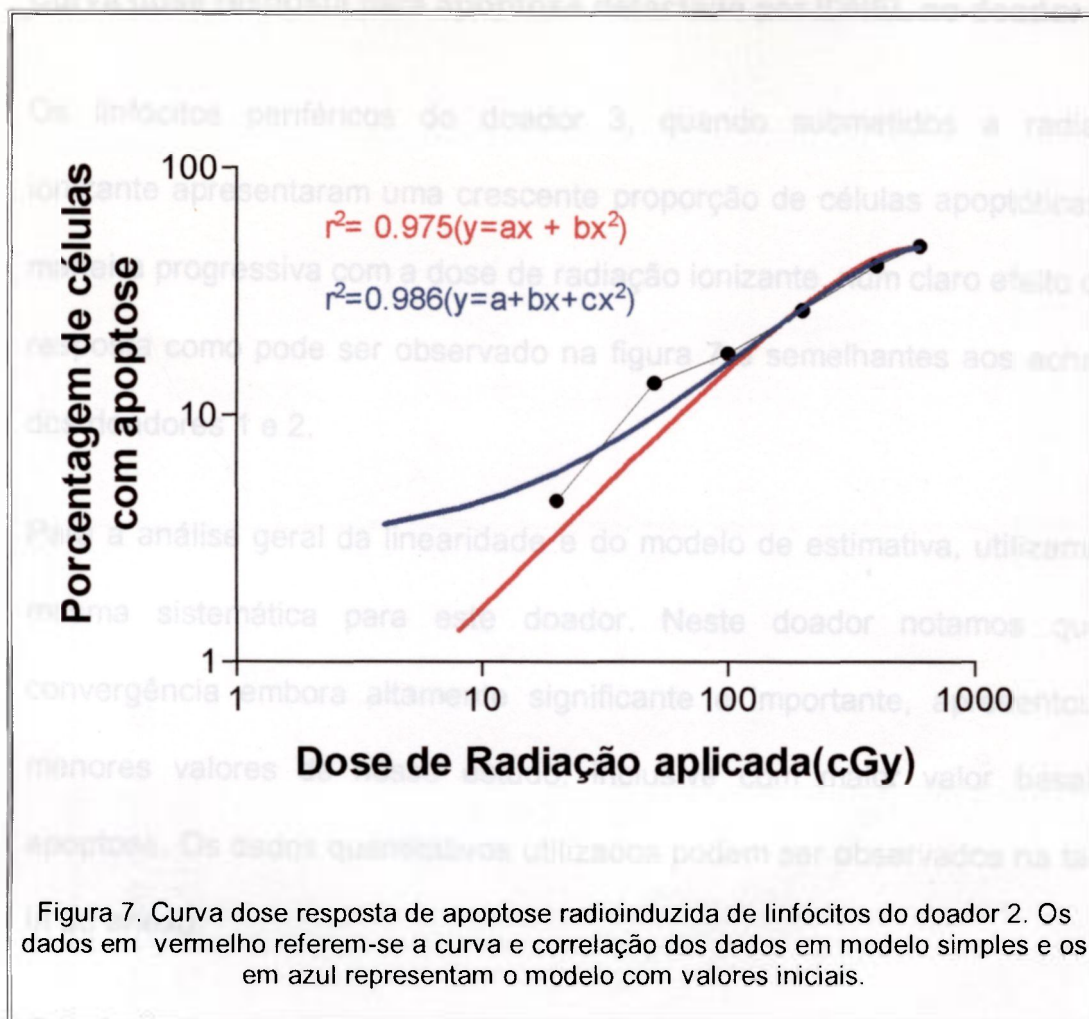


Figura 7. Curva dose resposta de apoptose radioinduzida de linfócitos do doador 2. Os dados em vermelho referem-se a curva e correlação dos dados em modelo simples e os em azul representam o modelo com valores iniciais.

Curva dose resposta para apoptose detectada por IDNEL no doador 3

Os linfócitos periféricos do doador 3, quando submetidos a radiação ionizante apresentaram uma crescente proporção de células apoptóticas de maneira progressiva com a dose de radiação ionizante, num claro efeito dose resposta como pode ser observado na figura 7 e semelhantes aos achados dos doadores 1 e 2.

Para a análise geral da linearidade e do modelo de estimativa, utilizamos a mesma sistemática para este doador. Neste doador notamos que a convergência embora altamente significativa e importante, apresentou os menores valores de nosso estudo, inclusive com maior valor basal de apoptose. Os dados quantitativos utilizados podem ser observados na tabela III do anexo.

Os modelos aplicados neste caso apresentaram boa convergência, acima de 93% e ambos com alta significância estatística, pelo que optamos pela apresentação de ambos e não somente do maior. Para completar esta análise dos resultados, apresentamos os valores obtidos para as constantes.

Quando o modelo utilizado foi $AX+BX^2$, encontramos valores de constantes a seguir: $A= 0,1605 \pm 0.0234$ e $B= -1,43 \pm 0,04 \times 10^{-3}$

Quando o modelo utilizado foi $A+BX+CX^2$, encontramos valores de constantes a seguir: $A= 4,22 \pm 2,60$, $B= 0,127 \pm 0.029$ e $C= -0,98 \pm 0,4 \times 10^{-4}$

Consolidação dos dados dos vários doadores, a determinação da sensibilidade do método.

Diante da homogeneidade dos dados quantitativos obtidos no estabelecimento da dose resposta da determinação da fração apoptótica em linfócitos periféricos humanos submetidos a radiação por ^{60}Co cobalto em diferentes condições, optamos por apresentar a consolidação destes dados.

Quando o estabelecimento de uma curva dose resposta extrapolável para outros pacientes.

No figura 9, apresentamos esta consolidação, utilizando um modelo simples, onde o maior fator de variação detectado nos pacientes individuais seja, a constante independente A . O modelo completo, foi relacionado a simplificar a análise.

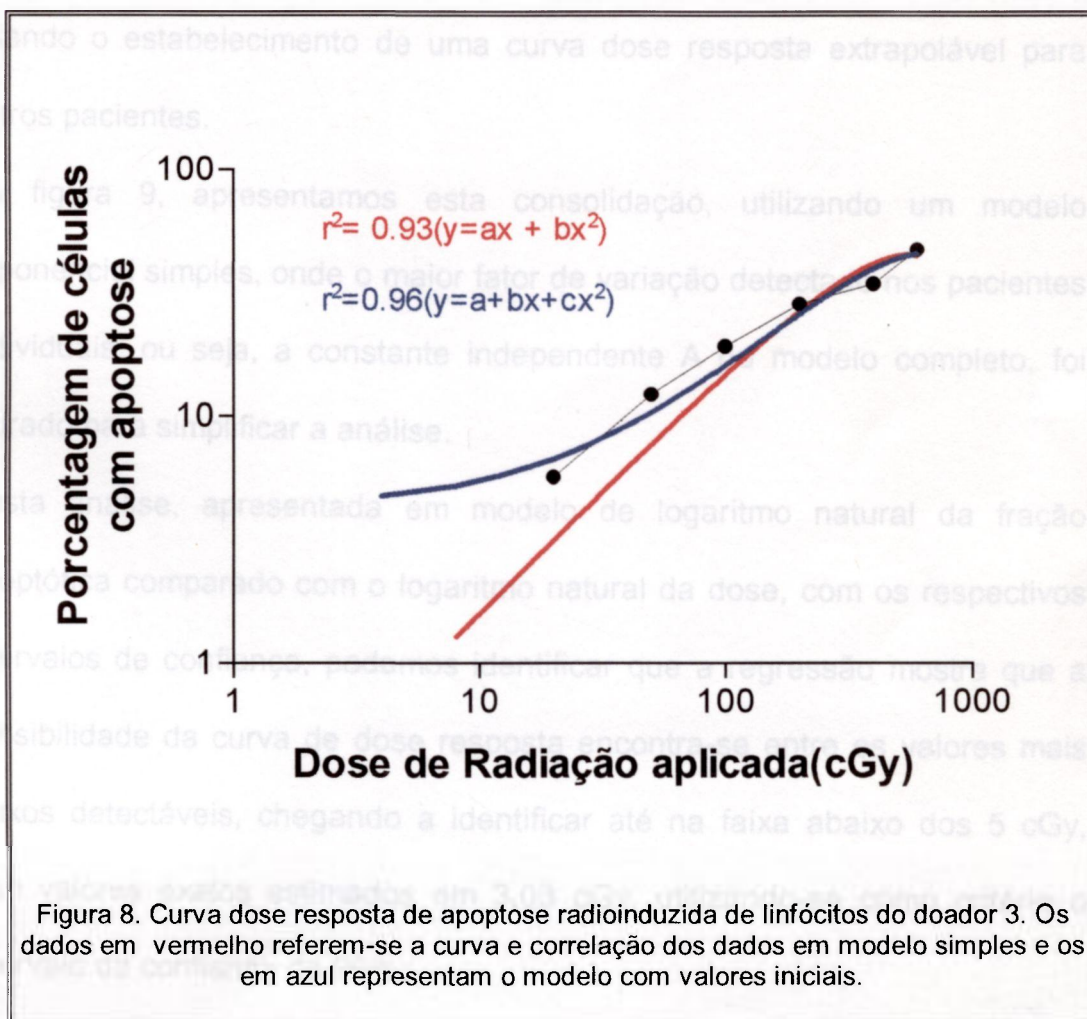
Nesta fase, apresentada em modelo de logaritmo natural da fração apoptótica comparado com o logaritmo natural da dose, com os respectivos intervalos de confiança, podemos identificar que a regressão mostra que a possibilidade de curva de dose resposta para doses maiores mais dados detectáveis, chegando a identificar até na faixa abaixo dos 5 cGy.

Os valores obtidos em 2.03 cGy, correspondem a dose mínima detectável.

Os valores matemáticos desta equação $AX+BX^2$ são:

$$A=0.1005; B=0.01072; C=-1.47; D=0.2 \times 10^{-3}$$

A convergência no modelo foi de $r^2=0.9575$, equivalente a um impacto de 95%.



Consolidação dos dados dos vários doadores e determinação de sensibilidade do método.

Diante da homogeneidade de nossos dados quantitativos obtidos no estabelecimento da dose resposta da determinação da fração apoptótica em linfócitos periféricos humanos submetidos a radiação por 60 cobalto em diferentes doadores, optamos por apresentar a consolidação destes dados, visando o estabelecimento de uma curva dose resposta extrapolável para outros pacientes.

Na figura 9, apresentamos esta consolidação, utilizando um modelo exponencial simples, onde o maior fator de variação detectado nos pacientes individuais, ou seja, a constante independente A no modelo completo, foi retirado para simplificar a análise.

Nesta análise, apresentada em modelo de logaritmo natural da fração apoptótica comparado com o logaritmo natural da dose, com os respectivos intervalos de confiança, podemos identificar que a regressão mostra que a sensibilidade da curva de dose resposta encontra-se entre os valores mais baixos detectáveis, chegando a identificar até na faixa abaixo dos 5 cGy, com valores exatos estimados em 3,03 cGy, utilizando-se como critério o intervalo de confiança de 99%.

Os valores matemáticos desta equação $AX+BX^2$ são:

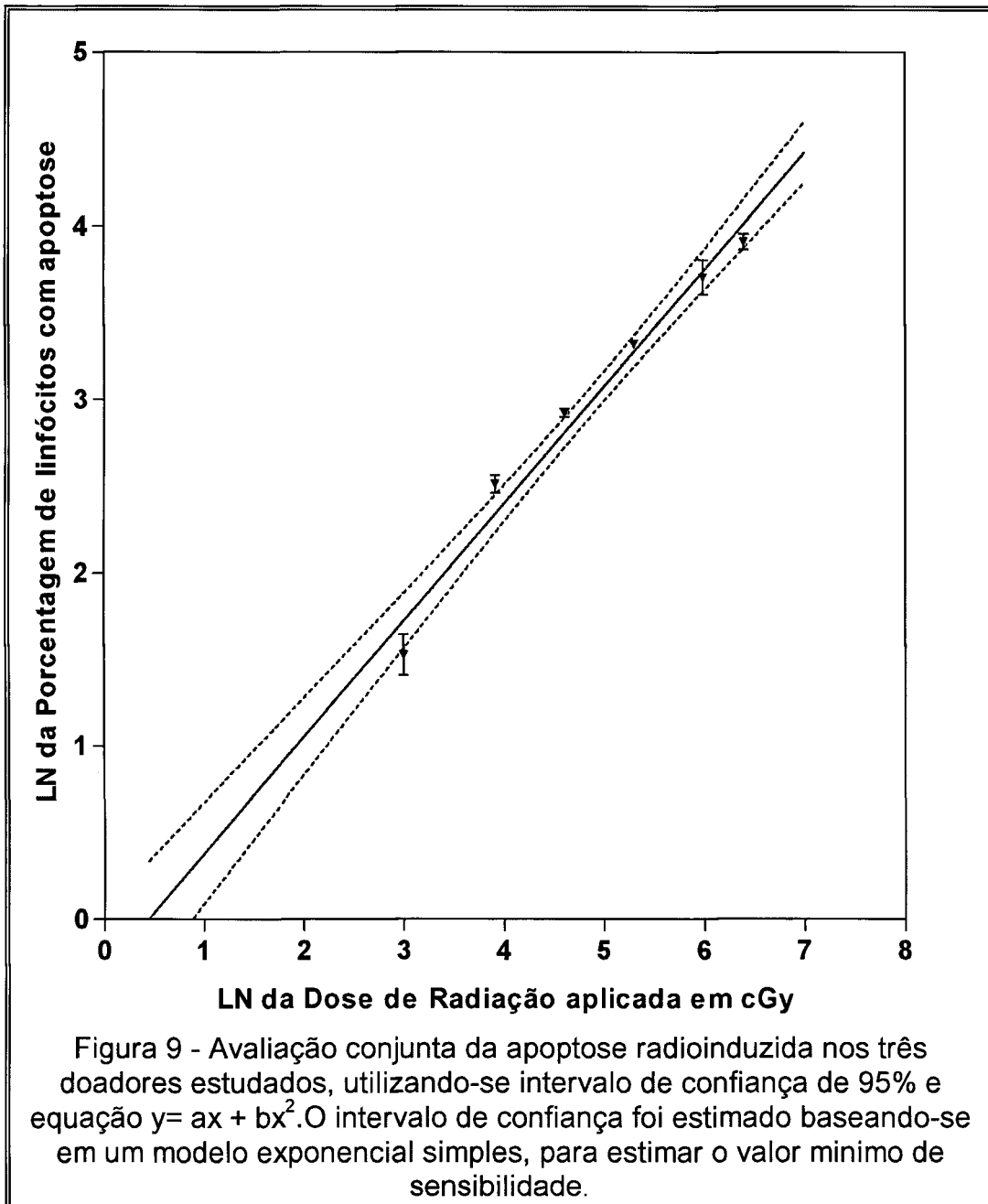
$$A=0,1698\pm 0,01082, B=-1,47\pm 0,2 \times 10^{-4}$$

A convergência no modelo foi de $r^2=0,9576$, equivalente a um impacto de 95%.

Caso utilizássemos o modelo completo $A+BX+CX^2$, os valores difeririam muito pouco assim como a convergência, sendo que os valores obtidos foram:

$$A=2,874\pm 1,252, B=0,1473\pm 0,01385 \text{ e } C= -1,163\pm 0,2305 \times 10^{-4}$$

A convergência no modelo foi de 0,9672, equivalente a um impacto de 96%., neste modelo.



V - DISCUSSÃO

Nossa abordagem visava a procura de novas técnicas que resultassem em sistemas eficientes de dosimetria biológica, procurando superar as dificuldades de tempo de definição da estimativa da dose e utilizando células em intérfase, de forma a contemplar a maioria dos efeitos da radiação no menor tempo possível.

Inicialmente, procuramos adquirir os conhecimentos com a técnica de detecção de aberrações cromossômicas pós mitóticas, como estabelecido e descrito como padrão ouro para este fim (Bender & Goech, 1962, IAEA, 1986), mas estas técnicas apresentam inúmeras dificuldades na obtenção de resultados rápidos e também somente utiliza as células pós-mitóticas, perdendo danos eventuais em célula interfásicas, com uma boa sensibilidade mas que poderia ser implementada se estas células interfásicas fossem incluídas na análise (Pantelias et al, 1995).

Em nossa procura, excluimos a pesquisa de micronúcleos, pois ela representa apenas uma simplificação da técnica citogenética, utilizando o mesmo grupo de células pos-mitóticas, apresentando inclusive restrições temporais maiores, pela necessidade de 72 hs para obter a estimativa de dose (Ballassen et al, 1991, Okazaki, 1995).

Em nossos dados iniciais, foi possível obter preparados híbridos para a detecção de fragmentação através da contração prematura de cromátides. Este teste é interessante porque utiliza células interfásicas, e tem sido

descrito como de maior sensibilidade (Pantelias et al, 1983), mas apresenta inúmeras dificuldades técnicas, como a necessidade de manutenção constante de células em rápida proliferação, para fornecimento de mitoses para a fusão, além de dificuldades operacionais na sobrevivência do híbrido até a preparação e a dificuldade de contagem das cromátides condensadas, frequentemente em diferentes estágios e ocasionalmente superpostas. Os relatos de sua maior sensibilidade também são escassos (Jinseng, et al, 1995), não sendo encontrados relatos do uso desta técnica na maioria das revisões recentes (Okazaki, 1995).

Ao continuar nossa procura, procuramos identificar um marcador molecular, na tentativa de encontrar uma forma de marcar as duplas quebras, com técnicas de biologia molecular, o que seria possível pela adição de nucleotídeos marcados aos locais onde a quebra da fita dupla permitisse. Nessa pesquisa, ficou claro que, com o uso de terminal transferase e nucleotídeos modificados, esta adição era possível e factível (Alberts et al, 1996), mas nossa preocupação era com a sensibilidade deste método, até então utilizado em preparações de DNA isolado (Alberts et al, 1996).

Os relatos de apoptose radio-induzida foram então ressaltados a nossa vista, na procura de modelos de identificação de quebras de fita dupla (Haimovich-Friedman et al, 1994). Em nossa abordagem, utilizamos inicialmente a eletroforese do DNA total de linfócitos submetido a radiação, que mostrou claramente, no DNA extraído, o perfil em fragmentos oligonucleossomais (Szumiel, 1994), conforme demonstrado em nossos dados. Embora

fundamental para a comprovação do fenômeno, a reprodutibilidade deste método em nossas condições revelou-se difícil, inclusive com dificuldade para a quantificação dos fragmentos aleatórios. Estudos mais recentes mostram inclusive a possibilidade de eletroforese do DNA de células isoladas, através de uma preparação de núcleos inseridos em um gel de agarose e submetidos a ação de proteases para extração local de proteínas e liberação do DNA para eletroforese, mas este tipo de estudo é mais concentrado em estudos de mutagênese tendo sido pouco citado para detecção de efeito direto da radiação (Sairbarn et al, 1995).

Baseados nestas dificuldades decorrentes da ausência de quantificação da eletroforese do DNA fragmentado, optamos pela técnica de detecção de apoptose em células isoladas, baseados em alguns dos princípios de biologia molecular e de histoquímica, que se revelou um excelente método quantitativo, conforme claramente demonstrado em nossos resultados. A alta reprodutibilidade dos dados e a pequena dispersão dos dados quantitativos possibilitou índices de convergência elevados com pouca dispersão o que possibilita o uso desta técnica em dosimetria biológica.

Para melhorar a comparação entre as várias técnicas de dosimetria biológica, elaboramos um gráfico comparativo entre nossos dados de determinação de fração apoptótica, dados de quantificação de aberrações cromossômicas pós-mitóticas gentilmente fornecidos pela Dra. Marcia A. Silva, de nossa Divisão de RadioBiologia do IPEN/CNEN-SP, e dados de

aberrações cromossômicas e contração prematura de cromátides, publicados de Jinseng , 1994

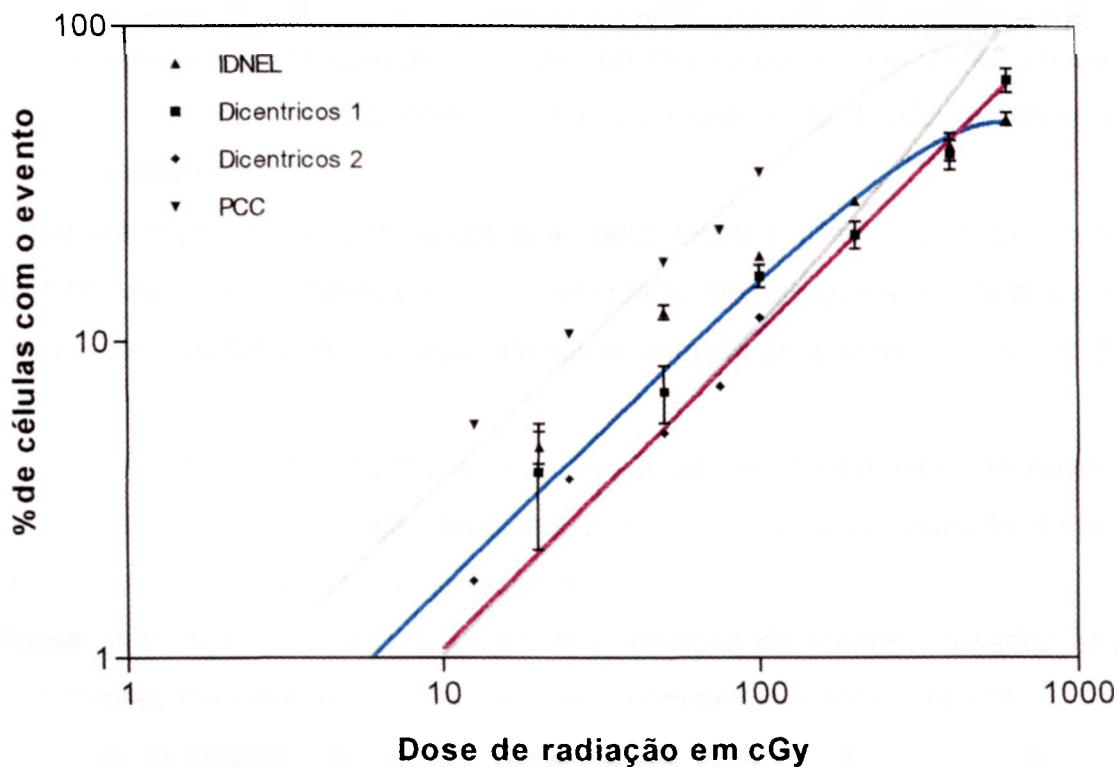


Figura 10 - Quadro comparativo da linearidade de vários testes de dosimetria biológica, tanto de nossos dados de fração apoptótica como de dados pertencentes a outros pesquisadores e à literatura, disponíveis para a execução dos modelos matemáticos. As aberrações cromossômicas de nossa instituição foram denominadas dicentricos 1, e a da literatura(Jinseng et al,1995) dicentricos 2. As barras representam a dispersão de cada ponto.

Como pode ser observado, todos os testes utilizados apresentam o mesmo tipo de perfil de dose resposta, mostrando indiretamente que todos eles medem o mesmo fenômeno, ou seja a ação da radiação ionizante sobre o material genético da célula estudada, o linfócito.

Interessante verificar que a maior sensibilidade dos testes referem-se a testes que medem também a fração interfásica não mitótica das células afetadas, sendo que o teste de contração prematura de cromátides foi o mais sensível, com uma sensibilidade estimada da ordem de 1 cGy, em nosso modelo matemático.

A determinação da fração apoptótica, pela técnica IDNEL mostrou uma sensibilidade intermediária, com a sensibilidade melhor que a dos testes de aberrações cromossômicas, mas atingindo apenas uma sensibilidade de 3 cGy.

Esta nossa abordagem mostra a importância de desenvolvimento de novos métodos para a determinação precisa e eficiente da dose de radiação a que um corpo ou organismo pode ser exposto.

Nossa abordagem concentrou-se na determinação de efeitos causados em fitas duplas mas outras abordagens mais complexas podem ser utilizadas. Caso outros modelos de biologia molecular sejam utilizados, como técnicas de polimerase, para completar cadeias simples danificadas, poderiam ser utilizadas para esta finalidade.

Além disso, outras técnicas envolvendo a interação da radiação com produtos mais estáveis do hospedeiro, como proteínas (Amâncio et al, 1997), poderiam ser utilizadas para a dosimetria biológica, permitindo uma sensibilidade tal que permita seu uso em outros usos, como em radioterapia ou em controle de exposição ambiental, onde o comum é a ocorrência de baixas exposições, o que ressalta a importância de nosso trabalho.

Finalmente, em nosso trabalho, pudemos utilizar a determinação da fração apoptótica para dosimetria biológica, sem a necessidade de cultivo de células, com resultados rápidos e de alta sensibilidade, podendo inclusive ser executada em material estocado e colhido longe do laboratório, o que

não é habitualmente factível nas áreas de acidentes, apenas com complexos e onerosos sistemas de preservação e transporte.

VI - CONCLUSÕES

Com base em nossos resultados, concluímos que a detecção e análise da apoptose radio-induzida em linfócitos humanos, representa uma abordagem importante para aplicação em dosimetria biológica.

Especificamente:

- a) ocorre apoptose radio-induzida em linfócitos humanos detectável pelo padrão característico de quebras internucleossomais do DNA extraído e submetido a eletroforese em agarose;
- b) Este fenômeno, a nível de DNA, apresenta uma resposta proporcional, mas de baixa sensibilidade à dose de radiação utilizada.
- c) A técnica de detecção da apoptose em células isoladas, através da marcação terminal do DNA (IDNEL), e apresenta alta sensibilidade e reprodutibilidade, permitindo a determinação da fração apoptótica de linfócitos humanos irradiados *in vitro*.
- d) A fração apoptótica, determinada pelo IDNEL, é proporcional à dose de radiação ^{60}Co , a que os linfócitos foram expostos, com uma relação equivalente aos métodos citogenéticos com uma sensibilidade de 3-5 cGy.
- e) Outros métodos de avaliação de dosimetria biológica, que utilizam células interfásicas, embora factíveis, tem alta complexidade tecnológica, baixa uniformidade e pouca reprodutibilidade, necessitando de maiores estudos para sua padronização.

ANEXO

Tabela I - Frequência de células marcadas pela técnica IDNEL (doador 1)

Dose (Gy)	Células analisadas	Células marcadas	Células marcadas (%)
0	1000	6	0,6
0,2	1000	45	4,5
0,5	1000	135	13,5
1	1000	178	17,8
2	1000	268	26,8
4	1000	405	40,5
6	1000	485	48,5

Tabela II - Frequência de células marcadas pela técnica IDNEL (doador 2)

Dose (Gy)	Células analisadas	Células marcadas	Células marcadas (%)
0	1000	7	0,7
0,2	1000	57	5,7
0,5	1000	123	12,3
1	1000	192	19,2
2	1000	285	28,5
4	1000	343	34,3
6	1000	474	47,4

Tabela III - Frequência de células marcadas pela técnica IDNEL (doador 3)

Dose (Gy)	Células analisadas	Células marcadas	Células marcadas (%)
0	1000	5	0,5
0,2	1000	38	3,8
0,5	1000	113	11,3
1	1000	188	18,8
2	1000	277	27,7
4	1000	487	48,7
6	1000	547	54,7

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, G. E., Aldrich, Bisby, R. H., Cundall, R. B., Redpath, J. L. Wilson, R. L., Selective Free Radical Proteins and Enzymes: Reactions of Inorganic Radical anions with Amino Acids, *Radiation Research*, **49**: 278-289, 1972.
- Akagi, Y.; Ito, K.; Sawada, S., Radiation-induced apoptosis and necrosis in Molt-4 cells: a study of dose-effect relationships and their modification. *Int. J. Radiat. Biol.*, **64**(1): 47-56, 1993.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. IN: Molecular Biology of the Cell. Third Edition, Garland Publishing, Inc. New York & London, 1994.
- Allan, D.J.; Radiation-induced apoptoses: its role in a MADCAT (mitosis-apoptosis differentiation - calcium toxicity) scheme of cytotoxicity mechanisms. *Int.J.Radiat.Biol.*, **62**:145-152, 1992.
- Amâncio, F. F., Amdrade Jr., H. F. Production and characterization of antibodies against irradiated human erythrocyte membrane proteins. IV ENAN - 4th Meeting on Nuclear Applications, Brazil, 1997.
- Anderson, R.E. & Warner, N.L., Ionizing radiation and the immune response. *Adv.Immunol.*, **24**:215-229. 1976.
- Balasen, A. N. & Ali, A. S. K. Establishment of dose-response relationships between doses of ¹³⁷Cs gamma rays and frequencies of micronuclei

in human peripheral blood lymphocytes. *Mutation Res.* **259**: 133-8, 1991.

Barabanova, A. Clinical possibilities of biological dosimetry. Interrgional training course on radiation cytogenetics in biomedical, environmental health and radiation protection problems. 11-29 June 1990, Rio de Janeiro, Brazil, 1990.

Bender, M. A., Gooch, P. C., Types and rates of X-ray-induced chromosome aberrations in human blood irradiated *in vitro*. *Proc.Natl., Acad. Sci. USA*, **48**:522-32, 1962.

Bitelli, T. Dosimetria e Higiene das radiações . Grêmio Politecnico 1ª edição., 1982 .

Boreham, D. R., Gale, K. L., Maves, S. R., Walker, J. A., Morrison, D. P. Radiation-induced apoptosis in human lymphocytes potential as a biological dosimeter, *Health Phys.*, **71**(5), 685-91, 1996.

Bowen, I. D., Apoptosis or Programmed cell death? *Cell Biol. Int.*, **17**(4), 365-380, 1993.

Brown, K., Does a little radiation radiation do you goog? *Atom.*, **378**: 26-7, 1988.

Campos, I. M. A., Santos, O. R., Mesquita, C. H., Dose estimation by cytogenetic analysis in a radiation accident with ¹³⁷Cs in Goiania

(Brazil): Evaluation of Probable Exposure doses range.

Radiat. Protection Dosimetry, **30**(1):33-36, 1990.

Carson, D. A.; Seta, S.; Wasson, D.B. & Carrera, C. J., DNA strand breaks
NAD metabolism, and programmed cell death. *Experimental Cell
Research*. **16**(4): 273-281, 1986.

Coggle, J. E, Biological Effects of Radiation. London, Wykeham, 1971

Collins, R. J.; Harmon, B. V.; Gobé, G. C.; Kerr, J. F. R.; Internucleosomal
DNA cleavage should not be the sole criterion for identifying apoptosis.
Int. J. Radiat. Biol., **61**(4): 451-453, 1992.

Costa, N. D.; Thacker, J., Response of radiation-sensitive human cells to
defined DNA breaks. *Int. J. Radiat. Biol.*, **64** (5): 523-529, 1993.

Devi, P. V., Low dose exposures and their biological effects. *AMPI Medical
Physics Bulletin*. **16**(1): 36-39, 1991.

Doloy, M. T.; Malarbet, J. L.; Guedeney, G.; Bourguignon, M.; Leroy, A.;
Reillaudou, M. & Masse, R., Use of unstable chromosome aberrations
for biological dosimetry after the first postirradiation mitosis.
Radiat. Res., **125**: 141-151, 1994.

Dolzhansky, A. & Basch, R. S., Flow cytometric determination of apoptosis in
heterogenous cell populations. *J. Immunol. Meth.*, **180**: 131-140, 1995.

Ferrer, I.; Tortosa, A.; Blanco, R.; Martin, F.; Serrano, T.; Planas, A. &
Macaya, A., Naturally occurring cell death in the developing cerebral

cortex of the rat. Evidence of apoptosis-associated internucleosomal DNA fragmentation. *Neurosc. Let.*, **182**: 77-79, 1994.

Filippovich, I. V.; Sorokina, N. I.; Soldatenkov, T. M.; Alfyerova, T. M. & Trebenok, Z. A., Effect of the inducers of cellular differentiation and of ionizing radiation of thymus lymphocytes: chromatin degradation and programmed cell death. *Int. J. Rad. Biol.*, **54** (4): 617-628, 1988.

Gajewski, E.; Rao, G.; Nacherdien, Z. & Dizdaroglu, M., Modification of DNA bases in mammalian chromatin by radiation-generated free radicals. *Biochemistry*, **29**: 7876-7882, 1990.

Gavrieli, Y.; Sherman, Y.; Ben-Sasson, S. A., Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.*, **119**: 493-501, 1992.

Haber, D. A., Clinical implications of basic research. *New Engl. J. Med.*, **332**(14) : 955-956, 1995.

Haimovitz-Friedman, A.; Kan, C. C.; Ehleiter, D.; Persaud, R. S.; McLoughlin, M. & Fuks, Z., Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *J. Exp. Med.* **180**: 525-535, 1994.

Harris, C.C., Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990's. *Cancer Res. (Suppl.)*, **51**: 5023s-44s, 1991.

- Hueber, A. O.; Pierres, M. & He, H. T., Quantitating apoptosis by a nonradioactive DNA Dot blot assay. *Analytical Biochemistry*, **221**: 431-433, 1994.
- Hurle, J.M., Cell death in developing systems. *Methods and Achiaments in Experimental Pathology*. **13**, 55-86, 1988.
- Imlay, J.A. & Linn, S., DNA damage and oxygem radical toxicity. *Science*. **240**:1302-1304, 1988.
- International Atomic Energy Agency. Biological Dosimetry: Chromosomal aberration analysis for dose assessment. Technical Reports Series, n°. 260, IAEA, Vienna, 1986.
- Iwata, M.; Myerson, D.; Torok-Starb, B. & Zager, R. A. An evaluation of renal tubular DNA laddering in response to oxygen deprivation and oxidant injury. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **5**(6): 1307-1313, 1994.
- Jinseng, G., Siyning, Z., Haiyan, J., Hong, B. Dose response curve of 60 Co for premature condensed chromosome fragments of human lymphocytes, *Nuclear Sciences and Techniques*, **6**(3), 183-187, 1995.
- Kane, K. S. & Maytin, E. V., Ultraviolet B-induced apoptosis of keratinocytes in murine skin Is reduced by mild local hyperthermia. *J. Invest. Dermatol.*, **104**(1): 62-67, 1995.
- Kondo , S., Mutation and cancer in relation to the atomic - bomb radiation effects. *Jpn. J. Cancer Res.*, **79**: 785-799, 1988.

Kroemer, G.; Zamzani, N. & Susin, S. Mitochondrial control of apoptosis.

Immunology Today, **18**: 44-51, 1997.

Lander, H..Radiation Damage:Mechanism and factors which influence it.

Workshop course of Australian Mineral Foundation Inc., Adelaide, 1972.

Lloyd, D. C. & Edwards, A. A., Biological dosimetry after radiation accidents.

IN: Obe, G. & Natarajan, A. T. (Eds.). Chromosomal aberrations, basic and applied aspects. Sprin Verlag, Berlin, p. 212-221, 1990.

Macklis, R. M.; Lin, J. Y.; Beresford, B. & Atcher, R. W., Cellular kinetics, dosimetry, and radiobiology of α -particle radioimmunotherapy: induction of apoptosis. *Radiat. Res.*, **130**: 220-226, 1992.

McMillan, T. J. & Peacock, J. H., Molecular determinantes of radio sensitivity in mammalian cells. *Int. J. Radiat Biol.*, **65**(1): 49-55, 1994.

Molloy, A.; Laochumroonvorapong, P. & Kaplan, G., Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacilus Calmette-Guérin. *J. Exp. Med.*, **180**: 1499-1509, 1994.

Mori, C.; Nakamura, N.; Okamoto, Y.; Osawa, M. & Shiota, K., Cytochemical identification of prograded cell death in the fusing fetal mouse palate by specific labelling of DNA fragmentation. *Anat. Embryol.*, **190**: 21-28, 1994.

- Moura, A. M. S.; Dottaviano, E. J. & Pinto Jr., W., Estudo das aberrações cromossômicas como indicadores de dose de radiações ionizantes. *Radiol. Bras.* **19**(4): 214-221, 1986.
- Müller, W. U. & Streffer, C., Biological indicators for radiation damage. *Int. J. Radiat. Biol.*, **59**(4): 863-873, 1991.
- Nascimento, N.; Seebart, C. C.; Francis, B.; Rogero, J. R. & Kaiser, I. I. Influence of ionizing radiation on crotoxin, biochemical and immunological aspects. *Toxicon*, **34**(1): 123-131, 1996.
- Natarajan, A. T.; Vyas, R. C.; Darroudi, F. & Mullenders, L. H. F., The relation between DNA damage and chromosome aberrations. *Berzelius Symposium XV*: 51-54, 1988.
- Obeid, L. M.; Linardic, C. M.; Karolak, L. A. & Hanuum, Y. A., Programmed Cell Death Induced by Ceramide. *Science*, **259**: 1769-1771, 1993.
- Okada, S., Radiation - induced death. in Radiation Biochemistry. Cells Academic Press. New York vol.1., pp247-307, 1970.
- Okazaki, K., Efeitos da Radiação ionizante em células - Noções Básicas. Publicação IPEN -399, 1995.
- Pantelias, G. E., Maillie, H. D. A simple method for premature chromosome condensation induction in primary human and rodent cells using polyethylene glycol. *Somatic Cell Genetics*, **9**(5), 533-547, 1983.

- Pantelias, G. E.; Iliakis, G. E.; Sambani, C. D. & Politis, G., Biological dosimetry of absorbed radiation by C-banding of interphase chromosomes in peripheral blood lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.*, **63**: 349-354, 1993.
- Pereira, E., A Radioatividade Atmosferica Natural. *Ciência Hoje*, **14**(81):42-50, 1992.
- Pinho, J.R.R; Cardi, B.A.; Andrade Jr., H.F.; Barr. P.J.; Bathurst, I.C.; Vicente, E.J. & Schenberg, A.C., Immunogenic properties of the *M. leprae* recombinant 18-Kda antigen purified from *Saccharomyces cerevisiae*; Enhancement of delayed-type hypersensitivity after gamma-irradiation. *Int.J.Leprosy*, **63**:381-390, 1995.
- Potten, C. S., Cell death , IN: Perspectives on Mammalian Cell Death, Oxford University Prezz, pp 93-119, 1987.
- Pryor, W. A.The role of free radical reaction in biologicas system. IN: Free radicals in biology. New York, N. Y., Academic, p1-49, 1976.
- Radford, I. R., Mouse lymphoma celass that undergo interphase death show markedly increased sensitivity to radiation-induced DNA double-strand breakage as compared with cells that undergo mitotic death. *Int, J. Radiat. Biol.*, **59**(6): 1353-1369, 1991.

- Radford, I. R., Radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines. Part. I. Sensitivity to killing by ionizing radiation, rate of loss of viability, and cell type of origin. *Int. J. Radiat. Biol.*, **65**(2): 203-215, 1994.
- Radford, I. R. & Murphy, T. K., Radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines. Part. III. Different signals can lead to apoptosis and may influence sensitivity to killing by DNA double-strand breakage. *Int. J. Rad. Biol.*, **65**(2): 229-239, 1994(a).
- Radford, I. R.; Murphy, T. K.; Radley, J. M. & Ellis, S. L., Radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines. Part. II. Apoptotic death is shown by all lines examined. *Int. J. Radiat. Biol.*, **65**(2): 217-227, 1994(b).
- Ramakrishnan, N., McClain, D. E. & Catravas, G. N., Membranes as sensitive targets in thymocyte apoptosis. *Int. J. Radiat. Biol.*, **63**: 693-701, 1993
- Riley, P.A., Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, **65**(1): 27-33, 1994.
- Sachs, R. K. & Brenner, D. J., Effect of Let on chromosomal aberration yields. I. Do long-lived, exchange-prone double strand breaks play a role? *Int. J. Radiat. Biol.* **64**(6): 677-688, 1993.
- Sairbarn, D. W., Olive, T. L., O'Neil, K. L. The comet assay: A comprehensive review. *Mutation Res.* **339**, 37-59, 1995.

- Skalka, A.M. & Antoni, F., Effect of radiation on the biological properties of protein. IN: Radiation sensitivity of toxins and animal poisons.
Internacional Atomic Energy Agency. pp 1-13, 1970.
- Soldatenkov, V. A.; Denisenko, M. F.; Khodarev, N. N.; Votrin, I. I. & Filippovich, I. V., Early postirradiation chromatin degradation in thymocytes. *Int. J. Radiat. Biol.*, **55**(6): 943-951, 1989.
- Steller, H., Mechanisms and Genes of Cellular Suicide. *Science*, **267**:1445-1449, 1995.
- Story, M. D.; Stephens, L. C.; Tomasovic, S. P. & Meyn, R. E., A role for calcium in regulating apoptosis in rat thymocytes irradiated *in vitro*. *Int. J. Radiat. Biol.*, **61**(2): 243-251, 1992.
- Story, M. D; Garret, K.C.; Tofilon, P.J. & Meyn, R.E., Influence of irradiation conditions on the measurement of DNA double - strand breaks by pulsed - field gel electrophoresis. *Int. J. Rad.Biol.*, **63**(3): 297-304, 1993.
- Szumiel, I., Ionizing radiation-induced cell death. *Int. J. Radiat. Biol.*, **66**(4): 329-341, 1994.
- Trowell, O.A., The sensivity of lymphocytes to ionizing radiation. *J.Pathol.*,**64**:687. 1952.
- Ueda, N. & Shah, S. V., Apoptosis. *J. Lab. Clin. Med.*, **124**: 169-177, 1994.

- Van Zeeland, A. A., DNA repair, IN: G. Obe (ed), Mutations in Man .Springer - Verlag Berlin Acidelberg.,1984.
- Wales, A. & Kusel, J. R., Biochemistry of irradiated Parasite Vaccines: Suggested Models for their Mode of Action. *Parasitol.Today*, **8**: 358-363, 1992.
- Walker, N. I.; Harmon, B.V.; Gobi, G. C. & Kerr, J. F. R., Patterns of cell death. *Meth.Achiev. Exp. Pathol.*, **13**: 18-54, 1988. ,
- Wolff, S. Biological Dosimetry with cytogenetic endpoints. In: New Horizons in Biological Dosimetry. Wiley-liss, 351-362, 1991.
- Woolson, R. F., Statistical methods for the analysis of biochemical data. John Wiley & Sons, N. York, 1987
- Wyllie, A. H.; Rose, K. A.; Morris, R. G.; Steel, C. M.; Foster, E. & Spandidor, D. A., Rodent Fibroblast tumours expressing human *myc* and *nas* genes: growth, metastasis and endogenous oncogen expression. *British J. of Cancer.*, **56**: 251-259, 1987.
- Yamada, T. & Ohyama, H., Radiation-induced interphase death of rat thymocytes is internally programmed (apoptosis). *Int. J. Radiat. Biol.*, **53**(1): 65-75, 1988.
- Zettl, U. K.; Gold, R.; Hartung, H. P. & Toyka, K. V., Apoptotic cell death of T-lymphocytes in experimental autoimmune neuritis of the lewis rat. *Neurosc. Let.*, **176**: 75-79, 1994.