

Departamento de Engenharia Nuclear

Programa de Pós-Graduação em Ciências e Técnicas Nucleares – PCTN

Prédio do PCA 1 – Anexo da Escola de Engenharia

Av. Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha

Belo Horizonte- MG – CEP: 31.270-901

E-mail: poscctn@nuclear.ufmg.br Fone: (31) 3409-6666



**ALTERAÇÕES EM CINÉTICA TEMPORAL DA EXPRESSÃO DE
PROTEÍNAS PLASMÁTICAS *IN VIVO* E DA VIABILIDADE CELULAR *IN
VITRO*, INDUZIDAS PELAS RADIAÇÕES IONIZANTES**

CELSO VIEIRA DE LIMA

TARCISIO PASSOS RIBEIRO CAMPOS (ORIENTADOR)

CIÊNCIAS DAS RADIAÇÕES

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA NUCLEAR

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TÉCNICAS NUCLEARES-
PCTN**

2016

Celso Vieira de lima

**ALTERAÇÕES EM CINÉTICA TEMPORAL DA EXPRESSÃO DE
PROTEÍNAS PLASMÁTICAS *IN VIVO* E DA VIABILIDADE CELULAR *IN
VITRO*, INDUZIDAS PELAS RADIAÇÕES IONIZANTES**

*Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em
Ciências e Técnicas Nucleares da Escola de Engenharia
da Universidade Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial à obtenção do título de doutor em
Ciências e Técnicas Nucleares.*

Orientador: Dr. Tarcísio Passos Ribeiro de Campos

L732a

Lima, Celso Vieira de.

Alterações em cinética temporal da expressão de proteínas plasmáticas *in vivo* e da viabilidade celular *in vitro*, induzidas pelas radiações ionizantes [manuscrito] / Celso Vieira de Lima. – 2016. 117 f., enc.: il.

Orientador: Tarcisio Passos Ribeiro de Campos.

Tese (doutorado) Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.

Bibliografia: f. 109-117.

1. Engenharia nuclear - Teses. 2. Radiação - Teses.
3. Radioterapia - Teses. I. Campos, Tarcisio Passos Ribeiro de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. III. Título.

CDU: 621.039(043)



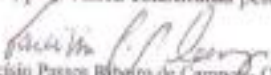
FOLHA DE APROVAÇÃO

ALTERAÇÕES EM CINÉTICA TEMPORAL DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS IN VIVO E DA VIABILIDADE CELULAR IN VITRO, INDUZIDAS PELAS RADIAÇÕES IONIZANTES.



CELSO VIEIRA DE LIMA

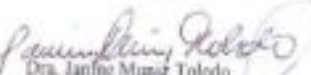
Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS E TÉCNICAS NUCLEARES, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS E TÉCNICAS NUCLEARES, área de concentração CIÊNCIAS DAS RADIAÇÕES.


Aprovada em 12 de julho de 2016, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Tarcísio Passos Ribeiro de Campos - Orientador
Departamento de Engenharia Nuclear - UFMG


Prof. Luciana Batista Nogueira
Departamento de Anatomia e Imagem - UFMG


Prof. Wanderley dos Santos Ribeiro
CEFENMG

Prof. Wagner Leite Araújo
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia


Dra. Janice Muniz Toledo
Departamento de Engenharia Nuclear - UFMG


Prof. Patrícia Lima Faício
UFAM

Belo Horizonte, 12 de julho de 2016.

*A minha família em especial a minha esposa
Alessandra por todo amparo carinho e amor!
Aos meus filhos Bernard e Vinícius, razões da minha
vida!*

*A minha mãe (in memoriam) pela doação integral e
pelo direcionamento na caminhada, por todo amor
incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Sabemos que a nossa caminhada é um fruto do conjunto de todas nossas escolhas, que nem sempre se mostram acertadas, e outras vezes sim, mas que com certeza todas estas escolhas sempre nos trazem consequências, nas quais temos que ter maturidade para lidar com elas e seus efeitos, além negociá-las a fim de que sejam bem resolvidas. Mas por uma dádiva de Deus nunca estamos sós, sempre aparece uma pessoa especial em nosso caminho e vem em nosso auxílio, para o nosso amparo e crescimento. Assim gostaria de agradecer Deus e a espiritualidade superior pelas oportunidades e por todo amparo que sem o qual não estaríamos aqui!

Ao Prof. Tarcísio ao grande amigo, instrutor e mestre!

A grande amiga e preceptora Patrícia Falcão por todos os ensinamentos e parceria.

Aos meus amigos de caminhada: André, Luiza, Viviane, Carlos, Bruno, Thaís, Wagner, Sabrina, Mateus, Daniel, Carla, Thessa e Iassudara (Sú), por todo apoio, amizade e momentos que jamais iremos esquecer!

Aos queridos Tales, Nanci, Aline e Maria Estela, que sempre nos apoiaram e nos ajudam em todas as nossas demandas!

Aos Professores do Departamento, por todo empenho, e exemplo, por nossa formação e dedicação ao ensino!

Aos animais que nos permitiram entender melhor os mecanismos essenciais no controle do nosso corpo, rumo ao entendimento maior, que nos permite proporcionar a melhoria de nossos conceitos e, por consequência, a nossa qualidade de vida.

Aos amigos Yuri e Jamil por todo empenho e ajuda!

Aos Professores e Pesquisadores do CDTN pela grande parceria e por todo o apoio, em especial à equipe do Laboratório de Irradiação Gama (LIG).

*Tudo passa.....,
Disciplina, disciplina, disciplina!”
Emmanuel*

*“Somos apenas uma gota no
oceano, mas sem essa gota,
certamente o oceano seria menor.”
Madre Teresa de Calcutá.*

Resumo

A existência humana no planeta Terra tem como um de seus fundamentos a adaptação do nosso organismo às radiações, como a solar e as de fundo, própria de cada ambiente em que vivemos. Assim devido a exposição à radiação, nosso organismo sofreu modificações fisiológicas que possibilitaram uma estabilidade genômica. No entanto, as interações das radiações com os seres vivos ainda demandam muitos estudos e entendimentos. Neste contexto, o presente trabalho busca avaliar as alterações em cinética de tempo, da expressão de proteínas do plasma de ratos Wistar isogênicos em grupo controle e irradiados de corpo inteiro utilizando fonte de cobalto-60 nas doses de 2 e 5 Gy, bem como a viabilidade celular em distintas taxas de dose, e Células Mononucleares Periféricas Sanguíneas (PBMC), radio sensíveis, a 2 e 10 Gy, intercomparada com a linhagem neoplásica epitelial de câncer de mama MDAMB-234, radioresistente.

Para o estudo foram utilizados ratos Wistar Machos de 12 a 18 semanas de vida, que foram irradiados de corpo inteiro em fonte de Co-60, com a dose de 5Gy. Após a irradiação foi coletado destes animais o volume de 0,3 mL de sangue, onde foi retirado por centrifugação o soro total que foi aplicado em um gel SDS-PAGE 10%.

Os resultados mostraram, nos animais irradiados de corpo inteiro, que existe uma alteração significativa na composição bioquímica do plasma e conseqüentemente do sangue, com uma redução acentuada da proteína albumina nas horas iniciais (24-48 h) pós-tratamento e uma possível recuperação parcial ao longo do tempo. Revelou ainda a modulação e a reprogramação da expressão de uma série de outras proteínas, como as globulinas. Em relação às células irradiadas, observou-se a redução da viabilidade das células neoplásicas e normais submetidas ao tratamento com altas doses (10 Gy), e uma elevação da viabilidade celular da MDAMB-234 em dose menor (2Gy), sendo esta viabilidade efetivamente aumentada e observada quando as taxas de doses utilizadas foram abaixo das terapêuticas (subclínicas). Estes dados sugerem a existência de sistemas dinâmicos de ajustes à exposição por radiações em nível de viabilidade celular e expressão protéica, o que poderia configurar os mecanismos evolutivos de adaptação à radiação.

Palavras-Chaves: Radiação, Radioterapia, Reprogramação, Modulação, Viabilidade celular.

Abstract

Human existence on planet Earth has as one of its foundations adaptation of our body to radiation, such as solar and fund specific to each environment in which we live. So due to radiation exposure, our body has undergone physiological changes that allowed a genomic stability. However, interactions of the radiation with living beings still require many studies and understanding. In this context, this study aims to evaluate the changes in kinetic time, plasma protein expression isogenic Wistar rats in the control group and whole body irradiated using source of cobalt-60 in doses of 2 and 5 Gy, and the Cell viability at different dose rates, and Peripheral Blood Mononuclear cells (PBMC), sensitive radio, and 10 Gy, 2, compared with the neoplastic epithelial lineage breast cancer MDAMB-234, radioresistant.

To study Wistar rats 12 to 18 weeks of age, which were irradiated whole body Co-60 source, with a dose of 5Gy. After irradiation of the animals was collected volume of 0.3 ml of blood, which was removed by centrifugation total serum that was applied to an SDS-PAGE 10% gel.

The results showed, in irradiated animals full body, that there is a significant change in the biochemical composition of the plasma and thus the blood, with a marked reduction of the protein albumin in the early hours (24-48 hours) after treatment and a possible partial recovery over time. also revealed modulation and reprogramming the expression of a number of other proteins such as globulins. Regarding the irradiated cells was observed to decrease the viability of neoplastic and normal cells subjected to treatment with high-dose (10 Gy), and a high cell viability of MDAMB-234 in lower dose (2 Gy), this viability effectively observed increased and when the doses rates were below the therapeutical (subclinical). These data suggest the existence of dynamic systems adjustments to exposure by radiation in cell viability and protein expression level, which could set the evolutionary mechanisms of adaptation to radiation.

Key Words: Radiation, Radiation Therapy, Reprogramming, Modulation, Cellular viability.

Lista de ilustrações

Figura 1	Estrutura de formação da apoptose.	41
Figura 2	Padrão eletroforético das proteínas plasmáticas em pH 8,6. [O gráfico mostra a ordem e migração ao longo do eixo horizontal. A altura da banda ao longo do eixo vertical define a concentração da proteína.	46
Figura 3	Perfil eletroforético de um paciente atendido no HOSPED/UFRN, correspondente ao proteinograma normal.	46
Figura 4	Perfil eletroforético de um paciente atendido no HOSPED/ UFRN, correspondente ao processo inflamatório agudo.	47
Figura 5	Perfil eletroforético de um paciente atendido no HOSPED/ UFRN, correspondente ao processo crônico.	47

Lista de abreviaturas e siglas

3D: Tridimensional
ATG: Sequência inicializadora do DNA
ATP: Adenosina trifosfato
Bd: Banda de proteína diferente
Bn: Banda de proteína nova
BS: Banda de proteína estável
Bu: Banda de Proteína uniforme
CTP: Citocina trifosfato
DNA: Ácido desoxirribonucleico
DP: Desvio Padrão
GTP: Guanosinatrifosfato
HS: Hemorragia
INCA: Instituto Nacional do Câncer
LET: Transferência linear de energia
ME: Músculo Equivalente
Mg: Magnésio
MH: Músculo Humano
MTT: Teste do Brometo de tetrazolio
NRI: Núcleo das Radiações Ionizantes
PBMC: Célula mononuclear periférica sanguínea
RNA: Ácido ribonucleico
SNC: Sistema Nervoso Central
TE: Tecido Equivalente
TH: Tecido Humano
TTP: Timina trifosfato
UV: Ultra violeta

Sumário

1 CAPÍTULO 1: Considerações iniciais	14
1.1 Apresentação do tema	14
1.2 Motivação e ineditismo	18
2 CAPÍTULO 2: Objetivos	19
2.2 Objetivos	19
2.2.1 Objetivo Geral	19
2.2.2 Objetivos Específicos	19
3 CAPÍTULO 3: Revisão Bibliográfica	20
3.1 Interações das Radiações Ionizantes com a Matéria	20
3.2 Efeitos Biológicos das Radiações	21
3.3 Aspectos Biológicos	25
3.4 Mecanismo Intracelular	27
3.4.1 Ácidos Nucléicos	28
3.4.2 Proteínas	29
3.4.3 As Enzimas	30
3.4.4 Genes	30
3.4.5 A Transcrição do DNA	31
3.4.6. O Processamento do RNA	32

3.4.7 A Tradução do RNA	32
3.4.8 A Replicação do DNA	33
3.5 A Divisão Celular e a manutenção dos Caracteres Genéticos	35
3.5.1 A Diferenciação Celular	36
3.6 A Morte Celular	39
3.7 O Tratamento das Neoplasias	41
3.8 As Células e o Seu Funcionamento	42
3.9 Estudo das Proteínas do Plasma pelo Perfil Eletroforético	43
3.10 Expressão e Funcionamento de Proteínas	48
4 CAPÍTULO 4: Radiation-induced changes in the electrophoretic profiles of serum albumin	51
5 CAPÍTULO 5: Cinética das expressões de proteínas plasmáticas radioinduzidas do território cardíaco em eletroforese.	64
6 CAPÍTULO 6: Aumento de viabilidade de clones radio sensíveis (PBMC) e resistente (MDAMB-231) na cobaltoterapia em taxa de dose reduzida	77
7 CAPÍTULO 7: Proteínas plasmáticas radioinduzidas em território cerebral	95
8 CAPÍTULO 8: Conclusão Geral	104
9 CAPÍTULO 9: Referências	106

Capítulo 1

Considerações Iniciais

1.1-Apresentação do Tema

A carcinogênese segundo Harris et. al., (2010), é um processo com causas multifatoriais que levam as células a perda da capacidade de controle da divisão celular, gerando clones amorfos em relação ao tecido de origem com um período metabólico alterado. Desta forma a função fisiológica das células é modificada, resultando em crescimento anormal e incontrolável de determinado órgão ou tecido, o que conseqüentemente desencadeia um processo fisiopatológico. A noção de que o câncer provém do descontrole dos mecanismos de divisão celular é relativamente recente segundo orienta Denmeade et. al., 2005. Sabe-se que a divisão celular, a mitose ou a meiose é controlada por uma rede de sinais que atuam em sinergia como os controles neurais, hormonais e de contato local intercelular, determinando o momento exato da divisão, a sua frequência e como os erros ocorridos podem ser reparados. Mutações em um ou mais segmentos desta rede podem desencadear crescimentos tumorais. No entanto, é pouco provável que uma única alteração genética ou um único agente ou uma mudança fisiopatológica isolada explique o câncer. Os estudos sobre o câncer são caracterizados por esforços prodigiosos e enormes gastos públicos e privados. No que se refere aos estudos de suas causas, têm sido, em grande parte, de caráter

epidemiológico, junto a campanhas públicas de esclarecimento à população sobre a identificação da doença, as formas de tratamento e a relevância do diagnóstico precoce, contando ainda com o suporte de técnicas experimentais em biologia celular e molecular e da terapia de apoio.

Dentre os estudos fisiopatológicos desenvolvidos no campo da oncologia, encontram-se investigações de agentes exógenos e endógenos possivelmente relacionados ao desenvolvimento, desencadeamento e/ou inibição do câncer, tais como genes, enzimas, quimioterápicos, radiações ionizantes, hormônios, receptores celulares, entre outros, Silva et.al., 2005.

Segundo Sakedai et. al. (2004), a radioterapia representa parte integrante do tratamento primário conservador do carcinoma mamário, com o objetivo de se obter um melhor controle tumoral *in situ*, no entanto, os efeitos colaterais e as recidivas são uma realidade que não podem deixar de ser consideradas, indicando que a eficiência do tratamento não é integral. O estudo dos efeitos das radiações ionizantes em nível celular e/ou molecular é importante para a compreensão da indução de alguns fenômenos, dentre os quais se encontra a apoptose e a clonogenicidade (Gammel et. al., 2009).

Conforme descrito nos estudos atuais o objetivo da radioterapia moderna é alcançar um índice terapêutico favorável, levando células malignas a perderem a sua clonogenicidade, ao mesmo tempo em que se possam preservar ao máximo os tecidos normais (Becker et. al. 2001). A radiação gama, utilizada nos tratamentos de radioterapia para o câncer, é classificada como ionizante. As radiações ionizantes, ao interagirem com os tecidos vivos, podem causar diversos danos celulares (Hayday et. al. 2003). Estas interações podem ser desde completamente reparadas, tornando-se inócuas, até tão graves que levem à morte celular, passando pelos seus possíveis efeitos mutagênicos ou de diminuição da função celular. Outra importante ação é a perda da clonogenicidade dos clones cancerosos em evolução. Há testes bioquímicos que podem avaliar a viabilidade celular de linhagens após ação de agente exógeno, como a radiação ionizante (Taams et. al. 2001). Vale a pena mencionar que a resposta clínica da mesma está relacionada à radiosensibilidade e resistência das células alvo diretamente envolvida em exposições anteriores, que está associado à atividade

clonogênica das linhagens em estudo e sua sensibilidade à radiação. Quanto mais indiferenciado e proliferativo é o tecido, mais sensível este é à radiação e, por outro lado, quanto mais diferenciado e estável, mais resistente. Uma ampla e específica variedade de sistemas bioquímicos e biofísicos celulares são ativadas pelas radiações ionizantes. É provável que lesões a esses alvos desencadeiem uma expressão gênica alterada. Alterações na cinética do ciclo celular também ocorrem e as células podem ser induzidas a paralisação do ciclo e a apoptose (Guyton et. al. 2006). As alterações genéticas e metabólicas produzidas pela radiação ionizante em células cancerosas ou não são complexas e ainda necessitam maior entendimento.

Yoshimura et. al. (2009), orienta que as radiações podem ser classificadas de acordo com a densidade de eventos ionizantes que provocam em um volume de tecido. A radiação gama é considerada de baixa LET (*Linear Energy Transfer*), ou seja, possui uma densidade de ionização esparsa. O uso de radiação de baixa LET é um importante instrumento no tratamento do câncer. Os mecanismos de reparo do DNA, conseqüentemente recuperação da habilidade clonogênica, após irradiação com baixa LET, devem ser investigados para o entendimento dos resultados da radioterapia clínica. Conforme se amplia a compreensão do efeito fisiopatológico e biológico molecular das radiações, também se aumenta a capacidade de manipular esse processo para obtenção de vantagens clínicas e terapêuticas, com a identificação de alvos moleculares específicos ou alteração dos agentes exógenos como dose, taxa de dose e escolha de partículas de diferentes LETs.

Ainda segundo Perez/Yoshimura et. al. (2009), como exemplo os protocolos de radioterapia utilizados no tratamento do câncer de mama, se tem a exposição do tecido neoplásico por dois campos opostos tangenciais, em frações de 1,8 a 2,0 Gy diários, cinco dias semanais, em múltiplas frações até o acúmulo de 45 a 50 Gy. Os tratamentos em aceleradores de partículas os espectros energéticos empregados envolvem feixes gerados de aceleradores lineares de 4 e 6 MV, ou por Co-60. O Co-60 decai em emissão beta em Ni-60, com uma meia-vida de 5,3 anos, emitindo raios gamas com energias de 1,17 MeV e 1,33 MeV. Após uma meia-vida, a atividade e a taxa de dose cai pela metade. Após uma década, a taxa de dose reduz para um quarto. Devido a dificuldades encontradas por instituições na substituição da fonte

selada de Co-60, nos sistemas de cobaltoterapia, podemos encontrar centros de radioterapia cujo aparelho já tenha mais de 10 anos e tem sua atividade reduzida, e conseqüentemente, a taxa de dose reduzida pelo tempo de uso do mesmo, o que efetivamente dificulta o trabalho dos profissionais desta área bem como a eficiência do processo. Na cobaltoterapia, segundo Brito et. al. (2005), a dose prescrita do tratamento pode ser ajustada com o tempo de exposição; entretanto, não é possível corrigir a taxa de dose durante o tratamento. Já é conhecido na literatura que a sobrevivência das linhagens cancerosas imortalizadas altera não só com a cinética de dose, mas também com a variação da taxa de dose. É consenso dos físicos médicos que variações da taxa de dose encontradas na aplicação da cobaltoterapia no período de uma década não influenciariam o tratamento; apesar de que, em termos radiobiológicos, alteração na clonogenicidade celular é observada em função da taxa da dose absorvida.

Dentro desse contexto, é importante avaliar a variação da resposta de células cancerosas irradiadas, em modelo *in vivo* (*corpo inteiro*) e *in vitro* sensível e radioresistente, em função da dose de radiação recebida e da taxa de dose, na faixa do domínio da cobaltoterapia. Dessa forma, é possível verificar os efeitos deletérios e selecionadores de clones tumorais das radiações ionizantes, de modo a auxiliar no direcionamento e equacionamento do tratamento radioterápico a ser seguido.

No entanto, não existem estudos na literatura a cerca do comportamento das células de um organismo irradiado de corpo inteiro, envolvendo uma cinética em prol de longo tempo. Neste contexto, surge o presente estudo que avalia as alterações do perfil protéico sanguíneo de animais irradiados de corpo inteiro utilizando fonte de cobalto e o compara com um perfil protéico controle de animais não irradiados. Este conhecimento é de suma relevância no sentido de esclarecer o comportamento de um organismo irradiado em doses terapêuticas, ao longo do tempo, trazendo novas informações necessárias a manutenção do tratamento e na busca do entendimento sobre o mecanismo de desenvolvimento dos efeitos adversos e das recidivas.

Estes estudos foram concebidos *in vitro*, com células imunológicas normais (PBMC- Células mononucleares periféricas sanguíneas), células tumorais de epitélio de mama MDAMB-231 e *in vivo* com ratos Wistar, oriundos do Centro de Bioterismo do ICB-

UFMG, que conferiu boa eficiência para demonstrar a cinética celular e monitoramento do perfil plasmático ao longo do tempo.

1.2- Motivação e Ineditismo

O presente tema foi proposto em virtude do avanço das técnicas de radiologia e radioterapia no diagnóstico e no tratamento das neoplasias, no contexto de aplicação específica, de ação local e de espectro controlado. Apesar do conhecimento da eficiência relativa dos tratamentos atualmente utilizados, não existem na literatura dados que investiguem as condições gerais dos organismos antes e após o tratamento, em longo prazo, no que se refere ao equilíbrio hidroeletrólítico e balanço de expressão dos genes, em especial das proteínas do sangue; fazendo correlações destas com os efeitos colaterais, a recuperação e as recidivas. Não há por parte da comunidade científica nacional e internacional evidências que haja este foco de estudo. Estudos em modelos *in vitro* com células imunológicas normais (PBMC- Células mononucleares periféricas sanguíneas), células tumorais de epitélio de mama MDAMB-231 e *in vivo* (ratos irradiados de corpo inteiro), para estes tratamentos e protocolos são inéditos.

Capítulo 2

Objetivos

2.1- Objetivo Geral

O objetivo geral do projeto foi descrever e caracterizar o efeito das radiações ionizantes na seleção e modulação de clones radiosensíveis do sangue *in vitro*, intercomparado ao modelo radioresistente e a modulação da expressão de proteínas plasmáticas *in vivo* irradiados de corpo inteiro em ratos Wistar.

2.2 - Objetivos Específicos

Foram objetivos específicos do projeto:

- Estabelecer um modelo de estudo *in vitro* usando para tal células mononucleadas normais (PBMC- Células mononucleares periféricas sanguíneas), intercomparadas com linhagem tumoral de epitélio de mama MDAMB-231, irradiadas com as doses de 2 e 10 Gy, em duas distintas taxas de dose ($\dot{D}= 345$ cGy por minuto e $X/4= 85$ cGy por minuto), para a análise dos efeitos das radiações e suas repercussões fisiopatológicas.
- Estabelecer um modelo de estudo *in vivo* usando ratos Wistar, isogênicos de 12 a 18 semanas de vida, irradiados de corpo inteiro nas doses de 5 Gy, para a análise dos efeitos das radiações a nível protéico sanguíneo.
- Estabelecer um perfil protéico plasmático de expressão de proteínas normais e específicas antes e após a irradiação à 5 Gy.

Capítulo 3

Revisão Bibliográfica

3.1- Interação das Radiações Ionizantes com a Matéria

Segundo Gershon (1970)/ Yoshimura (2009), o principal aspecto entre as interações das radiações ionizantes com a matéria é a transferência de energia. Ela define a radiação ionizante como qualquer radiação, com ou sem massa, que pode remover elétrons de átomos e moléculas. O conjunto das radiações ionizantes, usualmente estudadas, compreende três grupos, sendo o primeiro o da radiação eletromagnética com energia de fóton acima de 12 eV, que recebe várias denominações de acordo com a origem, como os raios X originados de desexcitações atômicas (raios X característicos) e de desaceleração de partículas carregadas (*Bremsstrahlung*); raios gama originados de desexcitações nucleares e fótons de aniquilação originados do processo de aniquilação dos pares matéria e antimatéria. O segundo grupo é constituído por partículas eletricamente carregadas e que possuem energia cinética bem maior que a energia térmica e superior a energias de ligação de elétrons atômicos, designados de partículas carregadas rápidas, onde suas origens podem ocorrer pela emissão dos núcleos atômicos, de partículas alfa, beta e os produtos de fissão nuclear, pela emissão de elétrons Auger, por feixes produzidos em aceleradores de partículas (elétrons, pósitrons, prótons, dêuterons, íons em geral de qualquer número atômico ou número de massa), pela radiação cósmica primária ou produtos de sua interação com a atmosfera, por produtos de reações nucleares entre outros. O terceiro grupo é formado por nêutrons livres com qualquer energia cinética e de qualquer origem. Esta divisão esta baseada nas forças responsáveis pelas interações

e na modelagem utilizada para descrevê-las. Assim, é sabido que fótons interagem pela ação de campos eletromagnéticos, atuando sobre partículas carregadas do meio, já as partículas carregadas têm sua ação, principalmente em elétrons do meio devido a interações coulombianas, (Tapio et. al., 2013). Os nêutrons atuam sobre prótons e nêutrons de núcleo atômicos pela força nuclear forte. As áreas das ciências exatas como a Física, mais especificamente a Física Nuclear, que tratam dessas interações entre campos eletromagnéticos e cargas em movimento, e para as mesmas interações entre nucleons, relatam que para estas relações em geral não há soluções ou entendimentos analíticos para a solução completa do problema; sendo as respostas dadas, obtidas por meio de soluções analíticas parciais e aproximações numéricas combinadas com resultados experimentais. Fato justificado pela presença na outra linha da relação de um sistema material como o organismo humano, que não é matemático e que não funciona de forma linear ou aritmética, não conferindo assim a exatidão matemática nas relações de interação entre a radiação e os organismos biológicos (Tapio et. al. 2013).

3.2-Efeitos Biológicos das Radiações

Os efeitos biológicos das radiações são consequência de uma longa série de acontecimentos que se inicia pela excitação e ionização de moléculas no organismo, uma vez submetido a qualquer tipo de radiação (Yoshimura 2009). Há dois mecanismos pelos quais as alterações químicas e fisiológicas nas moléculas são produzidas pela radiação ionizante: efeitos diretos e indiretos.

Os processos de ionização e excitação dos átomos e moléculas provocam modificações (ao menos temporária) nas moléculas (Leszczynski 2014). O dano mais importante e o que ocorre no DNA. Os efeitos físicos ocorrem na ordem de 10^{13} segundos, os efeitos químicos por volta de 10^{10} segundos e os efeitos biológicos ocorrem de minutos até anos, é a resposta natural do organismo a um agente agressor, não constitui necessariamente em doença. Como exemplo redução de leucócitos.

Em termos sistêmicos, como orienta (Yoshimura et. al. 2009), observa-se desde o desequilíbrio hidroeletrólítico, passando por alterações hormonais e teciduais que alguns autores classificam como patologias secundárias às radiações devido à frequência ou quantidade dos efeitos biológicos. Como exemplo a catarata, câncer e leucemia.

Segundo Nylund et. al. 2010, no estudo dos efeitos da radiação ionizante nos seres humanos surgem a princípio a classificação dos efeitos segundo a dose absorvida, assim denominados de estocásticos ou determinísticos. Na classificação segundo ao tempo de manifestação os efeitos são imediatos ou tardios e na classificação segundo ao nível de dano os efeitos são somáticos ou genéticos.

Ainda segundo Nylund, o efeito estocástico leva à transformação celular. Sua causa deve-se a alteração aleatória no DNA de uma única célula que continua a se reproduzir. Quando o dano ocorre em célula germinativa, efeitos genéticos ou hereditários podem ocorrer.

Os efeitos estocásticos não apresentam limiar de dose (Nylund et. al. 2010) e o dano pode ser causado por uma dose baixa de radiação. Tumores altamente agressivos podem ser originados por aplicações de doses baixas e outros por doses altas. A probabilidade de ocorrência em função da dose é difícil de ser medido experimentalmente, devido ao longo período de latência. A indução de um tumor por pode ocorrer em alta ou baixa dose. Citamos como exemplos o câncer (leucemia de 5 a 7 anos; tumores sólidos de 15 a 10 anos ou mais) e efeitos genéticos.

A severidade de um determinado tipo de câncer não é afetada pela quantidade de dose, mas sim, pelo tipo e localização da condição maligna. Os resultados até o momento parecem indicar que, em indivíduos expostos, além de câncer e tumores malignos em alguns órgãos, nenhum outro efeito estocástico é induzido pela radiação.

O efeito determinístico leva à morte celular, existe limiar de dose e os danos só aparecem a partir de uma determinada dose (Nylund et. al. 2010).

A probabilidade de ocorrência e a gravidade do dano estão diretamente relacionadas com o aumento da dose. Geralmente aparecem num curto intervalo de tempo. Temos

como exemplos a catarata, leucopenia, náuseas, anemia, esterilidade, hemorragia, eritema e necrose.

A morte de um pequeno número de células de um tecido, resultante de exposição à radiação, normalmente não traz nenhuma consequência clínica observável. Para indivíduos saudáveis, dependendo do tecido irradiado, não se apresentará dano para doses de até centenas ou milhares de miliSieverts (mSv). Acima de um valor de dose (limiar), o número de indivíduos manifestando o efeito aumentará rapidamente até atingir o valor unitário (100%). Isto decorre das diferenças de sensibilidade entre os indivíduos (Denmeade et. al. 2005).

Os efeitos somáticos das radiações, segundo (Guyton et. al. 2006), são aqueles que afetam apenas os indivíduos irradiados, não se transmitindo para seus descendentes. Os efeitos somáticos classificam-se em:

Efeitos somáticos, que são aqueles que ocorrem no próprio indivíduo irradiado (Guyton et. al. 2006). Podem ser divididos em efeitos imediatos e efeitos tardios.

Nos efeitos genéticos os danos provocados nas células que participam do processo reprodutivo de indivíduos que foram expostos à radiação, podem resultar em defeitos ou mal-formações em indivíduos de sua descendência.

Efeitos imediatos são aqueles efeitos que ocorrem em um período de horas até algumas semanas após a irradiação. Como exemplo de efeitos agudos provocados pela ação de radiações ionizantes se pode citar: eritema, queda de cabelos, necrose de tecido, esterilidade temporária ou permanente e alterações no sistema sanguíneo.

Efeitos tardios ocorrem quando os danos surgem após vários meses ou anos da exposição à radiação. Exemplos dos efeitos crônicos são o aparecimento de catarata, o câncer e a anemia aplástica.

Hormese significa algum evento exclusivo que é perigoso em altas doses, mas se torna benéfico em baixas doses. Os exemplos mais comuns são os elementos químicos presentes no corpo humano tais como Li, Cd, Se, e a radiação UV, que são essenciais ao nosso organismo porém se tornam letais se presentes em altas doses (Yoshimura et. al. 2009). Os estudiosos que apóiam essa teoria acreditam que a

hormese é pertinente para as radiações ionizantes. De acordo com essa teoria, em baixas doses, o sistema imunológico ficaria ativado. No entanto, estes são apenas estudos epidemiológicos e alguns ainda teóricos, Backy, 1995.

A exposição pré-natal pode ser perigosa para o embrião ou feto devido a sua alta radiosensibilidade (Yoshimura et. al. 2009). Estudos baseados nas explosões nucleares de Hiroshima e Nagasaki demonstraram as correlações entre efeitos adversos de má-formação e a fase de gestação, quando ocorreu a irradiação (Shrieve et. al. 2011).

Nas descrições fisiopatológicas da literatura e segundo (Yoshimura et. al. 2009) e (Guyton et. al. 2006), no período da gestação, dentro das 40 semanas previstas, os efeitos mais prováveis ocorrem entre 0 e 3 semanas de gestação, com a exposição da gestante, ocorrendo a falha de fixação do embrião (nidação), e conseqüente morte do feto. De 3 semanas em diante ocorre a má formação no órgão que estiver se desenvolvendo especificamente na época da exposição, ou pode ocorrer também má formações de forma difusa, com maior probabilidade de ocorrência de câncer no recém-nascido, e redução do desenvolvimento cerebral, (Fragopoulou et. al. 2012). De 8 a 15 semanas, ocorre o retardo mental severo com a redução de até 30 pontos de QI/Sv. De 16 a 25 semanas de gestação com a exposição menor que 30 pontos de QI/Sv, observa-se também o aparecimento do retardo mental severo. (ICRP 57, 1990).

Observamos como principal propriedade dos sistemas biológicos a reversibilidade, ou seja, mecanismo de reparo das células que apresenta significativa eficiência (Guyton et. al. 2006). Mesmo danos mais profundos são capazes de ser reparados ou compensados. Não existe a transmissividade do dano biológico causado pela exposição à radiação aos descendentes. O que pode ser transmitido é o efeito hereditário em células reprodutivas danificadas (Yoshimura et. al. 2009).

Fatores de influência são descritos para pessoas que receberam a mesma dose e podem não apresentar o mesmo dano (Taams et. al. 2001). O efeito biológico é influenciado pela idade, sexo e estado físico. Para uma mesma quantidade de radiação os efeitos biológicos resultantes podem ser muito diferentes.

Para efeito de segurança em proteção radiológica, considera-se que os efeitos biológicos produzidos por radiações ionizantes são cumulativos (Becker et. al. 2001). O câncer é a principal preocupação de proteção radiológica. É difícil distinguir se o câncer foi ou não induzido por radiação. Há evidências que as radiações ionizantes causam câncer nos seres humanos (Yoshimura et. al. 2009).

3.3-Aspectos Biológicos

A qualidade de vida, conforme preconiza a ciência atual, está relacionada com a forma de alimentação, a prática de atividades físicas regulares e o tipo de relação diária com seu meio ambiente (Guyton et. al., 2006). No aspecto genético, o que nos chama a atenção são os estudos que mostram a ativação de fatores de transcrição e genes por determinados fatores chamados proto-onco genes que desencadeiam as neoplasias; além das mutações gênicas que promovem alterações sistêmicas, desde doenças relacionadas ao envelhecimento como a arteriosclerose e distrofia muscular (Abbas et. al. 2005). Em uma visão mais descritiva podemos dizer que nosso organismo atua de forma complexa e integrada no gerenciamento de suas funções, bem como no reparo diário causado por seu desgaste cotidiano. Porém, por motivos ainda pouco entendidos em alguns grupos celulares com variação do DNA e da sua expressão, causado por indução química, por radiação, ou por fatores ainda não descritos, existe a perda da capacidade de controle da divisão celular, não sendo esta disfunção identificada pelo sistema imunológico (Abbas et. al. 2005), o que permite a evolução de neoplasias.

De acordo com Robbins et. al. (1989), o organismo é constituído por diversos grupos celulares, com diversidade em morfologia e funcionalidade. A diversidade pode ser vista também em seus ciclos celulares, pois cada tecido apresenta um período de funcionalidade, com seu crescimento, manutenção e divisão celular tanto por meiose quanto por mitose. Isto equivale a dizer que cada linhagem tem um período de ciclo celular específico que o diferencia dos outros, em divisão celular, crescimento, reposição tecidual e morte (apoptose). Uma perda da capacidade de controle do ciclo celular, em qualquer uma de suas etapas, pode causar a inviabilidade celular com

consequente morte ou a sua não especialização, tendo como consequência a formação de um novo tecido diferente ao de origem. Assim, este novo grupo de células formado tem como características a ausência de forma própria do tecido de origem, ausência de função específica e metabolismo relevantemente maior que a do tecido formador, fenômeno fisiopatológico denominado de câncer.

No câncer segundo Robbins et. al. (1989), pode-se observar dois comportamentos de grupos celulares: o próprio do tecido diferenciado e um de crescimento alterado referente às neoplasias, que se manifestam como concorrente pela nutrição e oxigenação junto ao tecido diferenciado. As neoplasias, por seu metabolismo acentuado, geralmente levam vantagem, expandindo-se no tecido hospedeiro, e levando em termos macroscópicos a perda gradual de função do órgão (Brito et. al. 2005). É comum metabolismo alterado, as neoplasias começam a liberar uma série de substâncias caracterizadas como proteínas, enzimas, fatores de crescimento, fatores de diferenciação, que atualmente são utilizados como fonte indireta de identificação precoce do câncer, sendo, portanto, chamadas de marcadores celulares. No desenvolvimento da patologia, o crescimento neoplásico maligno ao contrário do benigno é infiltrativo, e ao alcançar a corrente sanguínea pode atingir todo o organismo repercutindo com a disseminação das células cancerosas por todo o sistema. Após a disseminação generalizada, ou seja, metástases, não é mais possível controlar a doença. As metástases são características das neoplasias malignas. Quando a neoplasia cresce limitada por uma cápsula de tecido conjuntivo, são designadas como neoplasia benigna.

As neoplasias são patologias apresentadas em todos os mamíferos, não tendo distinção entre sexo, idade, raça e condição social. Porém, alguns tumores se manifestam com preferência em virtude de determinadas condições como exemplo: alimentares, exposição às radiações uso de medicamentos e substâncias mutagênicas como o álcool e o cigarro, (Robbins et. al. 1989). Assim, os esforços contra a doença é global, grandes esforços e investimentos são mobilizados periodicamente para o estudo e o tratamento desta doença.

3.4-Mecanismo Intracelular

Os efeitos da indiferenciação celular não estão somente relacionados aos aspectos externos do ciclo celular, mas envolvem, também, mudanças dos mecanismos intracelulares, como os receptores de membranas, segundos mensageiros e sítios de ligação, pois a alteração do metabolismo segundo (Guyton et. al. 2006) envolve também um maior fornecimento de energia pelas mitocôndrias, maior síntese de proteínas estruturais pelos ribossomos livres, proteínas regulatórias pelo retículo endoplasmático rugoso, a digestão intracelular pelo complexo de Golgi, com a própria mudança da conformação da membrana citoplasmática; o que resulta em uma grande transformação celular.

Com o avanço nos últimos anos dos processamentos e fracionamento celular, muito tem sido entendido sobre os processos fisiológicos, físicos, químicos e bioquímicos celular, bem como a descoberta de novas estruturas ativas nucleares e citoplasmáticas (Abbas et. al. 2005).

Ainda segundo Abbas, os componentes químicos das células são classificados em inorgânicos (água e minerais) e orgânicos (ácidos nucleicos, lípidos e proteínas) (Guyton et. al. 2006). Do total destes componentes, de 75% a 85% do conteúdo celular é constituído de água, 2% a 3% são os compostos inorgânicos e o restante são os compostos orgânicos. A maior parte dos compostos orgânicos são formados de gorduras ou lipídios, que são polímeros integrados por ligações covalentes. Nos organismos existem três grupos importantes de polímeros: os ácidos nucléicos, formado por associações de elementos químicos diferentes, denominados de nucleotídeos; onde a sequência linear de quatro nucleotídeos constituem a estrutura essencial do DNA, fonte inicial das informações genéticas. Os polissacarídeos que podem ser entendidos como polímeros de glicose, a partir do qual se forma o glicogênio, amido e celulose. E por fim as proteínas (polipeptídios), que são formadas pelos aminoácidos (com 20 tipos diferentes possíveis), combinados entre si em diferentes proporções. Pela grande variedade de aminoácidos, bem como as

combinações que podem surgir pelo rearranjo destes, um extraordinário número de probabilidades de expressões de proteínas são advindas dos mesmos.

3.4.1-Ácidos Nucleicos

Segundo Abbas et. al. (2005), os ácidos nucleicos são macromoléculas de relevante importância para a constituição e manutenção da vida, visto que todo ser vivo possui pelo menos um dos dois tipos de ácidos nucleicos existentes, o ácido desoxirribonucleico (DNA) e o ácido ribonucleico (RNA). O DNA constitui um banco de informação, onde estas estão depositadas em forma de sequência entre as bases nitrogenadas (Citocina, Adenina, Guanina, Uracila, Timina) sendo que uma sequência aleatória de três bases supra-citadas constituem um aminoácido e um conjunto de aminoácidos, uma proteína, e assim formando um banco de informações de todas as proteínas que potencialmente nosso corpo pode expressar e produzir. No entanto, para que as informações constantes no DNA cheguem a se tornar uma proteína, um longo processo deve ser percorrido, iniciando-se com a transcrição de um RNA mensageiro, constituído de uma sequência inversa de nucleotídeos de interesse que é transportado ao citoplasma onde vai buscar os sítios específicos de tradução. Assim, se for uma sequência de proteínas regulatórias o RNA buscará o retículo endoplasmático rugoso onde ocorrerá a tradução; no entanto, se tratar de proteínas estruturais estas serão traduzidas nos ribossomos livres.

Ainda segundo Abbas et. al. (2005), a estrutura do DNA e RNA são muito parecidas, com a diferenciação evidenciada pela presença de ribose no lugar de desoxirribose e da uracila no lugar da timina além disto a molécula de RNA é constituída de fita simples, ou seja, apenas uma só cadeia de nucleotídeos.

Existem três tipos de RNA, o mensageiro (RNAm) que leva a sequência copiada do DNA e estabelece a sequência de aminoácidos e proteínas. O RNA ribossômico (RNAr) apresenta 50% da sua massa formado de ribossomos, sendo o restante formado de proteínas. Os ribossomos são as moléculas que dão a base molecular para as reações químicas que irão ocorrer durante todo o processo de síntese de proteínas. Se os ribossomos estão livres, originam as proteínas estruturais e se os

ribossomos estão aderidos ao retículo rugoso, formam as proteínas regulatórias (Guyton e Hall, 2005). E por fim o RNA transportador (RNAt), que identifica e transporta os aminoácidos até os ribossomos.

3.4.2- Proteínas

De uma forma geral as proteínas são formadas por monômeros chamados de aminoácidos, onde um aminoácido é um ácido orgânico no qual o carbono próximo ao grupo carboxila-COOH está unido também a um grupo amino-NH₂. Ainda, este carbono está ligado a um H e a um resíduo lateral, que é diferente para cada aminoácido, (Lent et. al. 2001). Atualmente sabemos que existem 20 tipos de aminoácidos diferentes formadores de proteínas. A combinação dos aminoácidos para formar uma sequência da proteína se conduz de tal forma que o grupo NH₂ de um aminoácido se combina com o grupo COOH do aminoácido seguinte com a consequente liberação de água. A combinação NH-CO é chamada de ligação peptídica, onde a molécula formada tem um caráter anfotérico ou com dualidade porque sempre mantém um grupo NH₂ em um extremo (amino terminal), além dos resíduos laterais básicos e ácidos. Uma combinação de dois aminoácidos constitui um dipeptídeo, de três um tripeptídeo. Quando se unem entre si, poucos aminoácidos o composto é um oligo peptídeo, e um polipeptídeo é constituído por muitos aminoácidos. A maior proteína do nosso organismo já identificado tem cerca de 27.000 aminoácidos. A distância entre duas ligações peptídicas é de aproximadamente 0,35nm. Uma proteína com um peso molecular de 30KDa está constituída por 300 aminoácidos e quando estendida apresenta um comprimento de aproximadamente 100nm e uma largura de 1nm (Guyton et. al. 2006).

As proteínas em termos funcionais podem possuir pelo menos duas funções genéricas, a estrutural compondo parte de formação da estrutura celular, como membrana citoplasmática, membrana nuclear entre outros. E a outra função é caracterizada por um papel regulatório, atuando no ajuste do metabolismo intra e extracelular e outros efeitos fisiológicas definidos.

3.4.3- As Enzimas

Abbas et. al. (2005), descrevem que muitas proteínas têm entre suas funções o papel de atuar na degradação e no metabolismo de outras substâncias, sendo assim chamadas de enzimas. Estas proteínas têm algumas características gerais, como atuarem na temperatura do organismo, agirem em reações químicas sem serem degradadas, determinando o tempo de vida e de efeito de uma série de outras proteínas e agirem em pH específicos. Assim, de forma genérica as enzimas podem ser entendidas como catalisadores biológicos; acelerando as reações químicas em que estão envolvidas, modificando, atenuando ou acentuando várias ações fisiológicas.

As enzimas constituem um dos grupos mais importantes em termos de regulação dentro do corpo humano, mas para tal é necessário uma comunicação entre estas e os demais órgãos e isto é feito através de áreas específicas das enzimas chamadas de sítios de ligação, que reconhecem por estas regiões seu substrato específico onde quer que estejam. Com esta ação, o substrato é modificado quimicamente e convertido em um ou mais produtos, sendo estes também ativos ou não. Uma vez modificados, estes estão aptos a produzir um efeito ou prontos para serem eliminados através dos órgãos de eliminação, como o fígado e rins. É ainda importante ressaltar que existem substâncias não proteicas que também são providas de efeito enzimático como exemplo as ribozimas que na verdade são ácidos nucleicos.

3.4.4- Os Genes

Conforme Abbas et. al. (2005), e Guyton e Hall, (2006), gene é uma estrutura constituída por uma sequência de DNA, que contém a informação necessária para sintetizar uma molécula de RNA e se esta corresponde um RNA mensageiro, a partir do qual surgirá proteína pela formação dos transcritos. Outra observação importante é que na sequência do gene existe uma parte inicial sinalizadora para um determinado fator de transcrição, chamada de sequência promotora ou inicializadora geralmente

um ATG, e a parte final do gene uma sequência variável de adeninas chamada de telômeros que é responsável pela proteção do gene e que esta diretamente envolvida em casos de doenças passadas por herança genética (tendência hereditária). Os telômeros são a parte mais exposta do gene, quando se abrem para a transcrição, são os primeiros afetados pelas oxidações e por não codificar nada, serve como um escudo da área codificante. Lehninger et. al. (2000), ensinam que cada gene se localiza em um ponto específico do cromossoma chamado de *locus genicus*. Entende-se atualmente que os genes correspondem a aproximadamente 10% do DNA nuclear, o que significa que a maior parte do DNA restante é desconhecido em termos funcionais (Abbas et. al. 2005). Os genes não direcionam apenas as sínteses do RNA, mas também do DNA em um processo chamado de replicação principalmente durante a divisão celular na fase de interfase na meiose ou na mitose. Uma vez que as moléculas de DNA são replicadas e distribuídas nas células germinativas durante a meiose, os genes constituem entidades biológicas por meio das quais as características físicas dos pais são transmitidas aos filhos e até algumas adquiridas durante a vida como algumas mutações, por exemplo, as causadas pelas perdas dos telômeros.

3.4.5- A Transcrição do DNA

Segundo Abbas et. al. (2005), a síntese do RNA que, como já mencionado anteriormente usa a dupla fita de DNA como molde é denominada de transcrição do DNA, enquanto a síntese de proteína cujo molde é o RNA mensageiro é chamado de tradução do RNAm, estes são os eixos centrais do estudo molecular. Outro termo bastante utilizado é a replicação do DNA que ocorre no período de divisão celular, mas especificamente em interfase, onde todo o DNA é duplicado.

Lehninger et. al. (2000), ao definirem o gene como uma região do DNA que gera um caráter físico passível de ser herdado, sugere que os genes originam sequências específicas de proteínas, alguns produzem poliproteínas, ou seja, produtos transitórios, que são clivados em várias proteínas, cada uma determinante de um comportamento ou característica. Outro aspecto relevante é que todo o mecanismo de

transcrição é ativado por um elemento denominado de fator de transcrição, que quando liberado sinaliza uma sequência promotora de um gene a ser transcrito.

3.4.6- O Processamento do RNA

Segundo Guyton et. al. (2006), existem três tipos de RNA principais: os já mencionados RNA mensageiro (RNAm), que recolhem informações dos genes e dirigem a síntese das proteínas; e outros dois estruturais, representados pelos RNA ribossômicos (RNAr) e os RNA de transferência (RNAt). Estes dois últimos também participam na síntese protéica (tradução), ainda que com funções muito diversas as do RNAm.

3.4.7- A Tradução do RNA

Ainda segundo Guyton et. al. (2006), e Lehninger et. al. (2000), a tradução ocorre no interior dos ribossomos, que são as estruturas citosólicas constituídas por RNAr e proteínas. Nos ribossomos ocorrem sob a coordenação de um RNAm as reações químicas que ligam os aminoácidos entre si. A tradução inclui a participação dos RNAt, dos quais existem vários tipos. Estes RNAt atuam como transportadores que levam os diferentes aminoácidos até o ribossomo, seguindo a ordem determinada pela sequência dos nucleotídeos do RNAm. Como já mencionado, anteriormente pode haver uma separação entre a tradução das proteínas regulatórias que são traduzidas no retículo endoplasmático rugoso e as estruturais junto aos ribossomos livres. Todos os dois processos ocorrem em conjunto como se fosse apenas uma só tradução e a nossa divisão aqui explicada se dá no âmbito didático.

3.4.8- A Replicação do DNA

A replicação segundo Abbas et. al. (2005), do DNA é o processo de síntese de novas cadeias de DNA que ocorre antes da divisão celular, ou seja, o objetivo geral da replicação é duplicar o material genético necessário para as novas células filhas concebidas, o processo ocorre principalmente na fase S da interfase e permite que as células filhas tenham a mesma quantidade de moléculas de DNA cromossomal da célula mãe. A partir de uma molécula de DNA, obtêm-se duas, por isso o processo também é chamado de duplicação.

Inicialmente um complexo enzimático específico contendo a enzima helicase se liga à molécula de DNA em uma região determinada, uma sequência de nucleotídeos, chamada origem de replicação. Um cromossomo circular bacteriano tem normalmente apenas uma origem de replicação, ao passo que moléculas maiores, como as moléculas de DNA cromossomal humano têm várias. A enzima helicase separa as duas cadeias de DNA: ocorre a quebra das ligações de hidrogênio que as mantinham unidas (Lehninger et. al. 2000).

Em seguida, as chamadas proteínas de ligação à cadeia simples (SSBP – *single strand binding proteins*) se ligam às cadeias separadas especificamente e impedem que elas voltem a se unir garantido o sucesso do processo e continuidade da ação.

Antes que a replicação efetivamente aconteça, ocorre a ligação de uma enzima específica e própria do processo chamada primase, que sintetizará um fragmento de cadeia simples de RNA, chamado *primer* ou iniciador de RNA, pareado ou ladeado ao DNA e com nucleotídeos cujas bases nitrogenadas são complementares às da cadeia de DNA que serviu de molde. Isso é necessário para que haja a ligação do complexo enzimático DNA polimerase, responsável por sintetizar uma nova cadeia de DNA: a DNA polimerase não consegue iniciar a síntese de uma nova cadeia de DNA do “zero”, o que ela faz é continuar a sintetizar uma cadeia que já existe, por isso tem de haver esse iniciador. Inicialmente apenas uma primase se liga em apenas uma das cadeias, porém, posteriormente, mais primases se ligarão à outra cadeia de DNA.

Após a síntese do iniciador de RNA, a primase se desliga/desassocia da molécula de DNA. Agora o complexo enzimático responsável pela síntese de novas cadeias de DNA, contendo a enzima DNA polimerase se liga à cadeia de DNA, na ponta do iniciador de RNA e começa a ler as bases nitrogenadas da cadeia de DNA que serve de molde, adicionando à nova cadeia, que está sendo sintetizada, moléculas chamadas de nucleotídeos com bases nitrogenadas complementares (Lehninger et. al. 2000). Em *E. coli*, a taxa na qual a DNA polimerase adiciona nucleotídeos à cadeia em crescimento é de 500 nucleotídeos por segundo, ao passo que em células de humanos é de 50 por segundo, assim podemos perceber variações funcionais entre organismos de origem variadas. A síntese das novas cadeias de DNA requer energia. Essa energia é fornecida pelos próprios nucleotídeos utilizados na síntese, pois eles são trifosfatos (ATP, CTP, GTP e TTP, contendo desoxirribose e não ribose) e por conta disso, pode haver a liberação da energia contida em duas ligações entre grupos fosfatos, o que, quimicamente é uma vantagem evolutiva. Quando já estão constituindo as cadeias de DNA, os nucleotídeos são monofosfatos estabilizadores da síntese.

Assim a síntese prossegue nas duas cadeias da molécula de DNA até que a duplicação esteja completada. Note que a nova cadeia que está sendo sintetizada é produzida continuamente, pois, uma vez ligado ao DNA, o complexo DNA polimerase só se desliga ao término do processo de replicação, por isso, essa cadeia é chamada contínua e só necessita de um *primer* (Lehninger et. al. 2000). O mesmo não ocorre na cadeia que está sendo sintetizada. Nesse caso, é preciso que a helicase, aos poucos, vá abrindo a molécula de DNA matriz para que as DNA polimerases possam se ligar na porção que acabou de ter suas duas cadeias separadas. Assim, essa cadeia é sintetizada de maneira descontínua, requerendo a síntese de vários *primers* de RNA e a ligação repetida de DNA polimerases. Por isso é chamada cadeia descontínua. Cada fragmento da cadeia descontínua é denominado de fragmento de Okazaki. Antes do término do processo, outras enzimas irão remover os *primers* de RNA, adicionar nucleotídeos de DNA e ligar todos os fragmentos das novas cadeias complementando o processo.

Enfim, ao término do evento, obtêm-se duas novas moléculas de DNA a partir de uma que irão se posicionar nas novas células ou gametas. Abbas et. al. (2005), alertam que cada uma das novas moléculas têm uma cadeia nova, que acabou de ser sintetizada, e uma cadeia velha, da molécula mãe, que serviu de molde para a síntese da cadeia nova. Devido ao fato de que as moléculas novas de DNA possuem uma cadeia velha e uma nova, a replicação é dita semiconservativa.

Lehninger et. al. (2000), descrevem que enzimas especializadas do processo, chamadas de DNA polimerases, são capazes de efetuar uma checagem de erros, corrigindo os ou interrompendo o processo caso tenham adicionado um nucleotídeo cuja base nitrogenada não seja o par correto daquele lido na cadeia matriz. Caso isso ocorra, elas removem o nucleotídeo mal, pareado e o substituem por um que forme o par de maneira correta. Caso os nucleotídeos mal pareados escapem desse mecanismo de reparo, ainda há um segundo, no qual outras enzimas removem o(s) nucleotídeo(s) mal pareado(s) para que uma DNA polimerase possa acrescentar os que formem pares de maneira adequada. Esse sistema de reparos é bastante eficaz e a taxa de erros é estimada em um nucleotídeo a cada 10 bilhões, mas claro, agentes mutagênicos diversos como as radiações podem aumentar esse índice.

3.5-A divisão Celular e a Manutenção dos Caracteres Genéticos

Segundo Robertis et. al. (2001), o grande sucesso para a manutenção das características próprias de todas as espécies seria o fato de todas as divisões celulares sejam conservativas (meiose) ou reducionais (mitose) terem como início o fenômeno da replicação do DNA, assim todo o conjunto de genes é transferido às novas células, mantendo as características próprias das espécies, sendo assim, até um elemento de taxonomia. No entanto este processo tem como desvantagem o fato de transferir as novas células todas as transformações (mutações) que o DNA sofreu ao longo do tempo, onde pode haver uma perda de sua funcionalidade ou uma funcionalidade alterada (Lehninger et. al. 2000).

3.5.1- A diferenciação Celular

As células do corpo dos vertebrados exibem mais de 200 modos diferentes de especialização. A riqueza de diferentes tipos de especialização encontrada em células de um animal superior é demasiadamente maior do que a observada em seres procarióticos.

Segundo Guyton e Hall (2002), em vertebrados existem mais de 200 tipos distintos de células que são identificáveis, e muitos desses tipos de células incluem, sob um único nome, um número grande de subtipos e variedades. Nessa interação de comportamentos especializados, poderá ser vista num organismo simples, a versatilidade da célula eucariótica. Muitos dos conhecimentos atuais sobre as propriedades gerais das células eucarióticas surgiram pelo estudo dos tipos especializados, devido à existência de características próprias das quais todas as células dependem de algum modo.

Como exemplo, considere a junção neuromuscular esquelética, em que apenas três tipos de células estão envolvidas: uma célula muscular, uma célula nervosa e uma célula de *Schwann*. Cada uma delas tem um papel diferente e complexo, que só funcionam de maneira conexa e integrada ao processo cognitivo e motor central através de suas vias aferentes e eferentes.

A célula muscular lisa ou esquelética fez da contração a sua especialidade. Seu citoplasma é acondicionado com feixes de filamentos proteicos que constituem o citoesqueleto, incluindo um grande número de filamentos de actina e miosina organizada em forma de feixes denominados de sarcômeros que quando interagem com o cálcio realizam a contração muscular. Existem muitas mitocôndrias espalhadas entre os filamentos proteicos que suprem o ATP necessário para a contração.

A célula nervosa estimula a contração muscular, transportando um sinal de excitação por via motora eferente do cérebro ou da medula espinhal. A célula nervosa é extraordinariamente alongada: seu corpo principal, contendo o núcleo, poderá se localizar um metro ou mais da junção com o músculo. O citoesqueleto é conseqüentemente uma grande adaptação e auxilia para manter a forma característica

da célula e também para transportar, com eficiência, substâncias de um lado a outro da célula. A especialização crucial, no entanto, reside na membrana plasmática da célula, que contém proteínas que atuam como bombas e canais de íons, denominadas especificamente de bomba de sódio potássio, causando um movimento contínuo de radicais (Na e K), permitindo a polarização da membrana citoplasmática, que é o equivalente a um fluxo de eletricidade. A maioria das células mantém seus canais e bombas na membrana plasmática, mas as células nervosas chegaram a tal ponto de especialização que um pulso de eletricidade pode se propagar em uma fração de um segundo de uma extremidade à outra da célula, transportando um sinal para a ação despolarizando e repolarizando as células excitáveis.

As células de *Schwann*, que são as mais especializadas para a produção e na condução dos estímulos elétricos na membrana plasmática, se enrolam na volta da porção alongada da célula nervosa, como um rolo de fita adesiva, camada por camada, com a finalidade de formar a camada de mielina, que serve de isolante.

Genes podem ser ligados e desligados, os vários tipos especializados de células podem expressá-los de forma variada ao longo do tempo (Robertis et. al. 2001; Lehninger et. al. 2000). Tal fato parece um paradoxo, mas se explica pelo fato das células num organismo multicelular serem muito relacionadas pois todas tem origem em apenas uma única, a célula tronco embrionária, que geraria clones.

Linhagens comuns denotam genes similares; no entanto, não existe uma explicação segura para o aparecimento das diferenças. Em alguns poucos casos, a especialização celular envolve a perda de material genético (Abbas et. al. 2005). Um exemplo extremo é a célula sanguínea vermelha de mamíferos (eritrócitos), que perde o núcleo por inteiro durante a diferenciação. A grande maioria das células de animais e plantas, no entanto, retém toda a informação genética contida num ovo fertilizado.

A especialização depende da mudança da expressão gênica e não na perda ou aquisição de genes. Mesmo as bactérias não fabricam todos os seus tipos de proteínas continuamente, mas o seu nível de síntese é ajustado de acordo com as condições externas. Proteínas, que são necessárias para o metabolismo de lactose, por exemplo, são sintetizadas por muitas bactérias somente quando o açúcar está

presente para o uso; também quando as condições não são favoráveis para a proliferação celular, algumas bactérias suspendem a maioria de seus processos metabólicos e formam esporos, que possuem um citoplasma com composição alterada protegido por rígidas e impermeáveis paredes externas.

As células eucarióticas desenvolveram mecanismos mais sofisticados de controle da expressão gênica Guyton e Hall, (2006), e isto afeta sistemas inteiros de produtos gênicos interativos. Grupos de genes são ativados ou reprimidos em resposta a sinais externos e/ou internos. Composição de membrana, citoesqueleto, produtos de secreção e mesmo metabolismo todas essas e outras características devem mudar de maneira coordenada à medida que as células se diferenciam.

A diferença radical de caráter morfofisiológico entre tipos celulares reflete a mudança estável de expressão gênica e todos os seus produtos. Os controles que trazem tais mudanças evoluíram em células eucarióticas a um grau incomparável com células procarióticas, sendo estas mais simples, definindo as regras complexas do comportamento celular que pode gerar um organismo multicelular organizado a partir de um simples ovo ou estrutura primordial.

Sob o ponto de vista da aparência exterior, a evolução transformou o universo das coisas vivas em tal grau que eles não são mais reconhecidos como parentes. O ser humano, uma mosca, uma margarida, uma levedura, uma bactéria parecem tão diferentes que é quase loucura compará-los. Ainda assim, todos descendem de um ancestral comum, e quanto mais fundo investigamos encontramos mais e mais evidências de uma origem comum.

Sabemos que a maquinaria básica da vida foi conservada num grau elevado o que ficaria contraposto pela teoria da evolução (Jones et. al. 1990). Como foi visto, todas as formas de vida possuem essencialmente a mesma química ou bioquímica, baseada em aminoácidos, açúcares, ácidos graxos e nucleotídeos; todos sintetizam seus constituintes químicos de maneira essencialmente semelhante; todos estocam suas informações genéticas no DNA e as expressam através de RNA e proteínas. O grau de conservação evolucionária, no entanto, torna-se mais pronunciado quando examinamos os detalhes das sequências nucleotídicas, em genes específicos, e as

sequências de aminoácidos, nas proteínas. As maiores probabilidades são de que uma enzima bacteriana mais genérica que catalisa qualquer reação comum, como, por exemplo, a cisão de um açúcar de seis carbonos em duas moléculas de três carbonos na glicólise, terá uma sequência de aminoácidos (e uma estrutura tridimensional), sem sombra de dúvidas semelhante à mesma enzima que catalisa a reação no ser humano, que é um organismo muito mais complexo. As duas enzimas e, equivalentemente, os genes que as codificam não somente possuem funções semelhantes, mas também uma origem evolucionária comum. Tais semelhanças podem ser exploradas para traçar caminhos evolucionários comuns; e por comparação de sequências gênicas e pelo reconhecimento de homologia, podem-se descobrir fatos de ligação ocultos e similaridades entre diferentes organismos (Moore et. al. 2011).

Semelhanças familiares são também encontradas entre genes que codificam proteínas que executam funções relacionadas num organismo, como exemplo, o metabolismo (Lehninger et. al. 2000). Tais genes são ou estão evolucionariamente relacionados, e sua existência demonstra uma estratégia básica pela qual organismos mais complexos surgiram, assim genes ou porções de genes se tornaram duplicados, e as novas cópias, então, divergiram das originais por mutações e recombinações para se ajustar a novas tarefas adicionais. Assim, começando com diversos genes nas células primitivas, as formas de vida mais complexas foram capazes de desenvolver mais de 50.000 genes hoje presentes em uma célula de um animal ou de uma planta superior. A partir do entendimento de um gene ou proteína, ganha-se conseqüentemente introspecção de famílias inteiras de genes homólogos a ele.

3.6-A Morte Celular

A apoptose é um termo utilizado para definir morte celular programada, e, quando relacionado ao tecido como um todo, é chamado de necrose. As células de todos os tecidos tem uma vida útil programada, uma vez cumprido este tempo, as células estão programadas para a autólise, (Guyton e Hall. 2006). Este evento é um mecanismo necessário para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, pois está

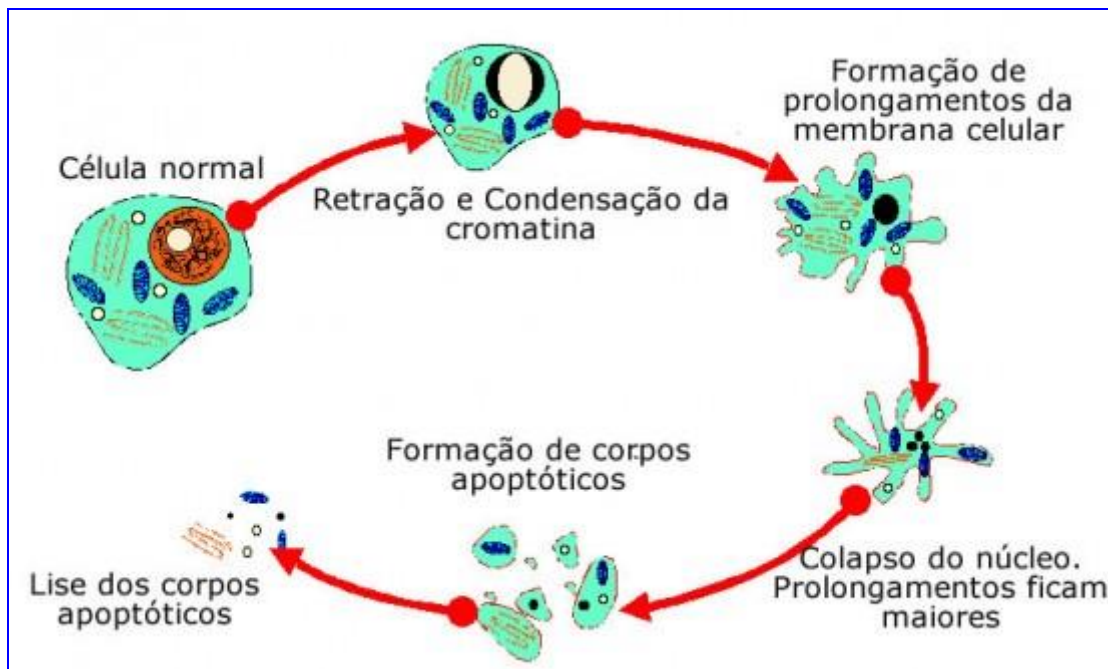
relacionado com a manutenção da homeostase e com a regulação fisiológica do tamanho dos tecidos, a renovação dos organismos e também a estímulos patológicos. Existem diversos processos distintos, além da apoptose, que resultam em morte celular como a autofagia, necrose, mitose catastrófica e senescência ou envelhecimento. No ano de 1964, foi proposto o termo “morte celular programada” para designar o processo que ocorre de uma forma não acidental (Guyton e Hall. 2006). Já no ano de 1972, Kerr, Wyllie e Currie sugeriram o nome apoptose para este processo (Kerr et.al. 1972).

Como mencionado, a apoptose pode ter causas fisiológicas e fisiopatológicas. A apoptose causada por estímulos fisiológicos é útil na manutenção do equilíbrio interno funcional dos organismos multicelulares, sendo que, nos humanos pode ocorrer em certas situações, como nos casos de involução de estruturas fetais, durante o desenvolvimento embrionário do feto como a separação dos dedos. No entanto, situações críticas como a de hipóxia e de corte no suprimento de hormônios estimulatórios como na menopausa, em tecidos onde existe uma constante renovação celular, a apoptose ocorre estimulada pelo linfócito T citotóxico, (Abbas et. al. 2005).

Já a apoptose causada por patologias, ocorre como nos casos de lesão do material genético (DNA) da célula, através de estímulos radioativos, químicos ou virais, nos casos de lesão por isquemia ou hipóxia que pode resultar em necrose ou apoptose. Certos estímulos à morte celular por necrose também desencadeiam a morte celular por apoptose.

A figura 1 ilustra o ciclo celular com a formação do processo de apoptose desde o seu início até a etapa de conclusão com a formação dos debris celulares.

Figura1 - Estrutura de formação da apoptose, adaptado de Abbas et. al. 2005.



3.7-Tratamento das Neoplasias

Conforme Brito et. al. (2005), são aplicadas formas de conduta terapêutica as neoplasias: a hormonioterapia, a radioterapia, a quimioterapia e o ato operatório, onde para cada caso, o tempo e estágio de desenvolvimento da doença indica a prescrição de uma destas técnicas de forma isolada ou associadas. Assim a principal forma de garantir o sucesso do tratamento reside no fato de realizar o diagnóstico de forma mais precoce possível para que os meios de intervenção possam ser eficientes e de baixa letalidade. Porém, ainda o pouco entendimento do câncer ou das neoplasias e o grande índice de letalidade associado à fatores culturais corroboram para que o tratamento ainda se dê de forma pouco específica causando grandes desconfortos,

dor e na maioria dos casos não apresentando um índice de tratamento e cura desejáveis. Não existe na literatura dados e tecnologia suficientes para que o tratamento seja específico no meio intracelular, ficando os mesmos restritos ao meio extracelular, assim o desenvolvimento de técnicas externas que promovam a atenuação ou a erradicação das neoplasias com pequeno ou nenhum comprometimento do organismo é de grande relevância, sendo este um dos principais objetivos do presente trabalho, ao caracterizar a ação terapêutica das radiações investigadas junto às células neoplasias e sadias.

3.8-As Células e o Seu Funcionamento

Entendemos que uma proteína complexa é o resultado de uma automontagem de várias unidades protéicas menores, como, exemplo, podemos citar a organização de um vírus, que se forma no interior de uma célula hospedeira a partir de seu código genético DNA ou RNA por meio destes modelos o rearranjo se estabelece e estas células podem ser formadas. O mesmo ocorre para as células mais complexas. Assim são as informações contidas no DNA que determinarão a formação de novas estruturas e por fim as células. Neste contexto, podemos perceber que uma evolução química produz moléculas orgânicas compostas de carbono mais complexas que se tornam a base da organização de todos os seres vivos (Guyton e Hall, 2006). Estas evoluções químicas permitiram a formação de várias estruturas complexas que deram origem ao corpo celular, como exemplo, a membrana citoplasmática formada por uma bicamada lipídica em forma de um mosaico fluido, com proteínas integrais inseridas na membrana. A presença de tais proteínas e de grande relevância por formarem poros e canais, permitindo o contato de substâncias polares com o interior das células, desde que tenham a dimensão para passar por estes, o que não ocorreria pela matriz lipídica da célula. Assim, esta estrutura altamente especializada permite uma individualização do conteúdo próprio celular do restante do meio, ao mesmo tempo em que permite uma intensa comunicação do meio intracelular (LIC) com o meio extracelular (LEC) (Guyton et. al., 2006). Ao mesmo tempo em que a membrana determina o que é próprio e o que não é das células em seu interior se organiza uma

série de organelas citoplasmáticas com finalidades específicas. As mitocôndrias por um processo de simbiose se associaram as células ficando incumbidas da geração de energia sob a forma de ATP para que todas as demais estruturas funcionassem de forma sincronizada. O retículo endoplasmático liso é o responsável pela síntese de todas as formas de lípidos, cabendo ao retículo rugoso o papel de sintetizar as proteínas regulatórias a partir de um transcrito e os ribossomos livres, a síntese de proteínas estruturais. O complexo de golgi tem como papel principal fazer a digestão intracelular por se tratar de um importante centro enzimático, que simultaneamente pode estruturar as vesículas digestivas como os lisossomos e peroxissomas, que constituem unidades semelhantes, mudando apenas as enzimas de seu interior onde o primeiro grupo possui as hidrolases e o segundo as peroxidases. Outras estruturas de grande importância são os proteassomas, recentemente descritas pelo Professor César Martins Mendes de Sá, (1986), estruturas estas destinadas ao metabolismo as proteínas regulatórias intracelulares.

Por todo o exposto podemos entender que nenhuma organela que está presente na estrutura celular, ali está por simples adereço; mas sim por um aspecto funcional integrado, que garante o sucesso da adaptação e funcionamento das células eucariotas e procariotas no processo evolutivo.

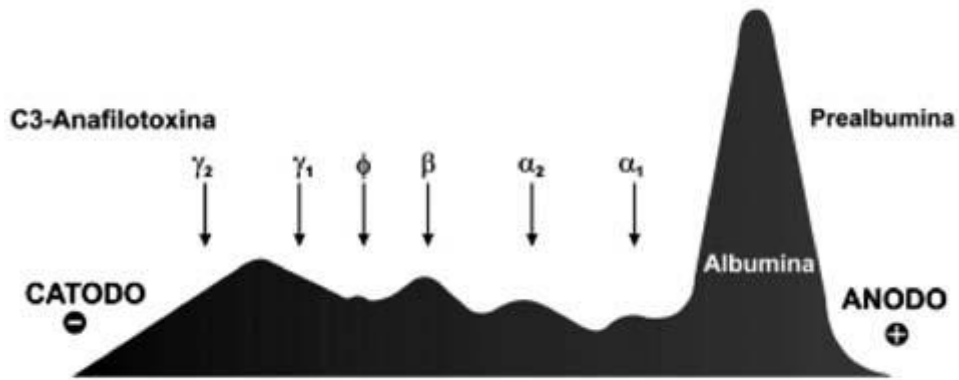
Dessa maneira, evidenciamos a importância das proteínas e seus efeitos dentro do metabolismo celular. Mas para o melhor entendimento devemos ter em nossas mentes que todos os processos de efeito proteico tem origem em uma sequência inicializadora abrigada no núcleo, chamada de DNA; que em seu conjunto constituem os genes (Abbas et. al., 2005).

3.9-Estudo das Proteínas do Plasma pelo Perfil Eletroforético

Silva et. al., (2005), estabeleceram um perfil eletroforético de proteínas plasmáticas em crianças atendidas no Hospital de Pediatria da Cidade de Natal, uma vez que segundo este grupo, as proteínas plasmáticas podem ser separadas por eletroforese em duas frações principais, sendo uma constituída pela albumina e outra constituída pelas

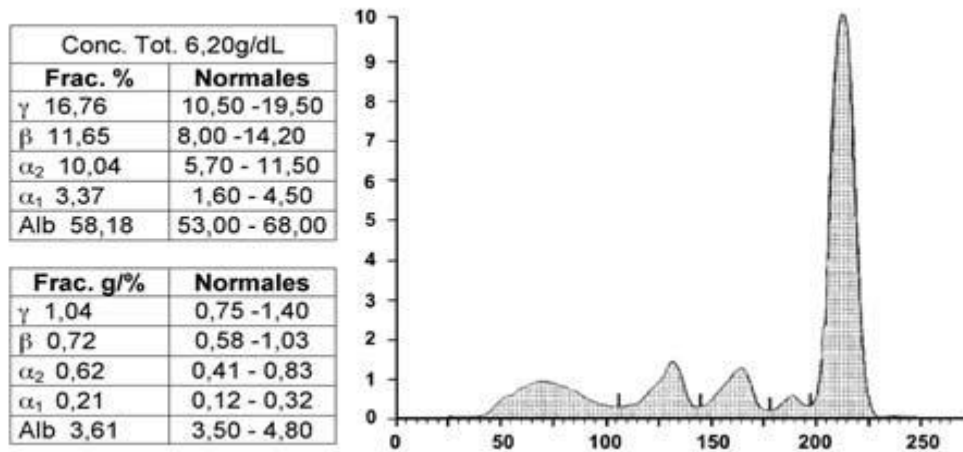
globulinas, as quais se diferenciam da albumina por apresentarem maior tamanho e peso molecular. Ainda segundo estes autores a concentração total de proteínas no plasma é de aproximadamente 6,0 a 8,0 g/dL, em pH de 7,4, encontrando-se estas proteínas na forma aniônica, constituindo uma relevante faixa de complemento aniônico do sangue. A proporção entre albumina e globulinas encontradas foi de 2:1 conforme já descrito por (Silverman et. al.,1998). A Albumina, também conhecida como soroalbumina é a proteína sérica mais abundante (3,5 a 5,5 g/dL), sendo sintetizada no fígado a uma taxa de aproximadamente 12g/dia, o que representa 25% da síntese total do fígado por dia e a metade de toda a proteína exportada pelo órgão. A fração de globulina mencionada anteriormente é formada por uma mistura muito complexa, sendo dividida em 05 subfrações: alfa1, alfa2, beta1, beta2 e gamaglobulinas. Dentre estas frações a de migração eletroforética mais rápida é a alfa 1 e a mais lenta e a gama globulina, que de forma geral é sintetizada pelas células do sistema macrofágico, em especial pelos linfócitos B como descrevem (Naum et. al. 1990). A fração alfa1 globulina é formada principalmente pelas proteínas alfa-1-antitripsina (AAT), alfa-1-glicoproteína ácida (AGA), alfa-1-lipoproteína (α LP) e alfa-1-fetoproteína (α Ft), enquanto a fração alfa 2 é constituída pela haptoglobina (HAP), ceruloplasmina (Cer) e alfa-2-macroglobulina (AMG). Os principais componentes da fração beta-1 são a transferrina (TRF) e a hemopexina (Hpx), enquanto a beta 2, é a beta-lipoproteína (β Lp), além dos componentes séricos C3, C4 e fibrinogênio. Já a fração gama é formada pelos vários tipos de anticorpos ou as imunoglobulinas, a saber: IgA, IgG, IgD, IgE, IgG e pela proteína C reativa (PCR), tendo este grupo na IgG sua principal representante correspondendo a até 80% das gamaglobulinas, mesmo porque seria esta molécula a memória imunológica, conforme afirmam (Miura, et. al., 2000). Outros componentes encontrados de relevância são as mucoproteínas e as glicoproteínas as quase são encontradas principalmente nas frações alfa1 e alfa 2 e as lipoproteínas que são formadas por combinação de proteínas com os lipídeos e que migram na eletroforese junto as globulinas alfa e 5% destas junto as globulinas beta, (Ohnishi, et. al., 2002). Ainda no sentido de estabelecer parâmetros para definir um padrão e utilizá-lo como referência Rezende et. al. (2006), classificaram as proteínas em três grupos distintos quanto a causa de sua transcrição, as que são sintetizadas continuamente (constitutivas) como a albumina, as proteínas de fase aguda (pontuais) que necessitam

de um estímulo próprio para sua síntese, como exemplo a insulina sendo o seu estímulo o aumento da glicemia, e as proteínas estruturais que formam o corpo celular. As proteínas plasmáticas constitutivas como a albumina, mesmo que presente naturalmente no sangue apresentam sua síntese alterada pelas células do parênquima do fígado, em resposta a uma variada gama de estresses como inflamações, infecções, radiações, toxinas, isquemia, choque térmico, tendo como principais representantes positivas deste grupo as proteínas alfa-1 glicoproteína-ácida, haptoglobina, alfa-2-macroglobulina, ceruloplasmina, fibrinogênio, C3 e proteína C reativa, e ainda como representante negativas as proteínas pré-albumina, albumina e transferrina. Como observamos a falta de especificidade nestas respostas acima descritas clinicamente as alterações fisiopatológicas podem ser percebidas e detectadas utilizando qualquer uma das proteínas acima citadas, como exemplo a proteína C reativa. Com base nos parâmetros acima expostos, fica fácil estabelecer uma comparação entre estados fisiológicos e patológicos, pois, segundo Muratsubaki et. al. (2002), existe o aumento das proteínas de fase aguda em pacientes com doenças inflamatórias e pós-operatório. Ainda segundo Miura et. al. (2000), confirmaram-se estas informações em pacientes que sofriam de mieloma múltiplo, dando mais segurança as observações e ao modelo proposto, considerando que cada patologia a ser analisada apresenta um perfil eletroforético característico, e este será utilizado em comparação ao padrão para fechar o diagnóstico e acompanhar a evolução da doença.



A figura 2 ilustra um perfil eletroforético correspondente ao proteinograma plasmático normal, utilizado como controle (padrão).

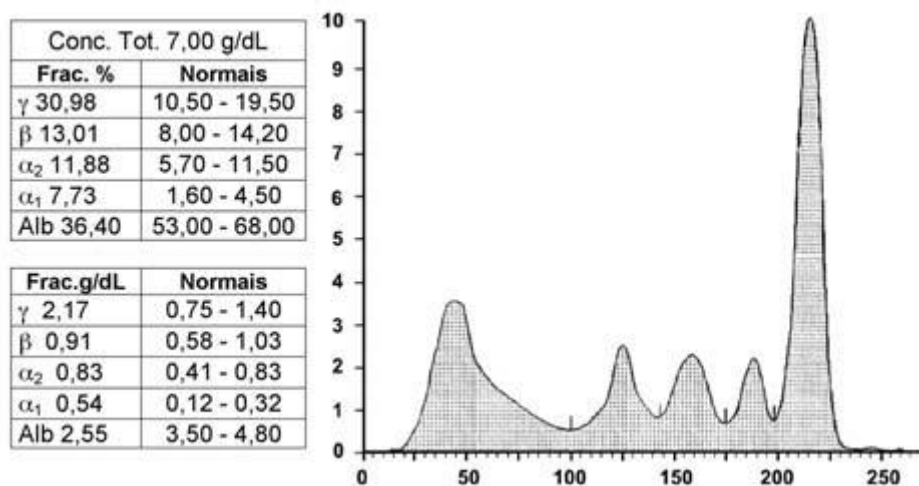
Figura 3: Perfil eletroforético de paciente atendido no HOSPED/UFRN, correspondente ao proteinograma normal, adaptado de DEVLIN, T.M. – 1998.



Assim, nesta condição é importante ressaltar que o padrão eletroforético de processos inflamatórios de reação aguda consiste em níveis diminuídos de albumina e elevação do nível de alfa1 e alfa2-globulina. Já o perfil inflamatório crônico consiste na redução do nível de albumina, junto a níveis elevados de gama globulinas e ainda pela elevação de alfa 2-globulinas. Evidentemente que estas modificações não são abruptas, sendo específicas em prol do tempo em relação a cada fase do desenvolvimento da doença.

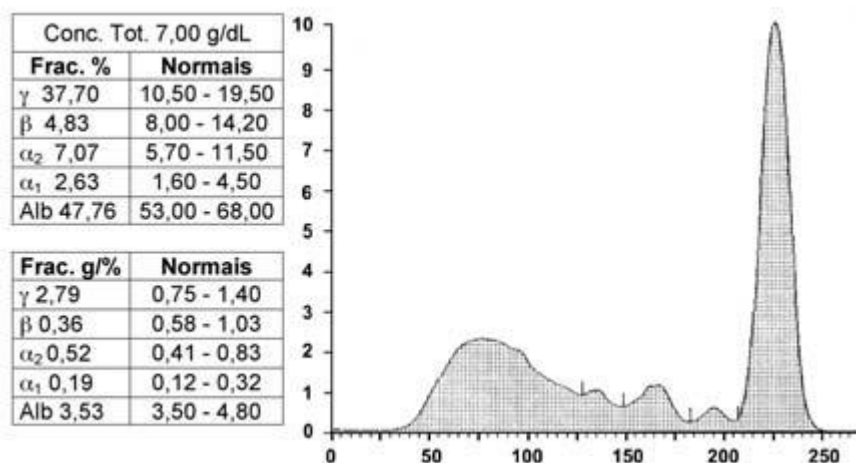
A figura 4 apresenta um perfil eletroforético, correspondente ao processo inflamatório agudo utilizado para as análises.

Figura 4: Perfil eletroforético de paciente atendido no HOSPED/ UFRN, correspondente ao Processo inflamatório agudo, adaptado de DEVLIN, T.M. – 1998.



A figura 5 apresenta um perfil eletroforético, correspondente ao processo inflamatório crônico utilizado também para as análises.

Figura 5: Perfil eletroforético de paciente atendido no HOSPED/ UFRN, correspondente ao processo inflamatório crônico, adaptado de DEVLIN, T.M. – 1998.



3.10-Expressão e Funcionalidade de Proteínas

Em estudos interdisciplinares, Leszczynski. et. al. (2014), buscaram por meio de uma revisão, apontar os vários grupos de pesquisa que trabalham com expressões e funções das proteínas, fazendo uma atualização do conhecimento. Neste trabalho, eles explicam que as pessoas de forma voluntária, ou não, estão expostas as radiações do próprio planeta ou as vindas de fora do planeta como as do sol e do universo, e que estas radiações podem desencadear respostas biológicas patológicas na humanidade.

Dentre as principais alterações relacionadas em seu trabalho estão às expressões e modulações dos genes, com suas expressões positivas ou negativas através de seus transcritos. No entanto, o conhecimento das estruturas das proteínas é recente, motivado pela deficiência tecnológica. E apenas estamos no estágio inicial da parte funcional destas substâncias (Análise proteômica), pois as técnicas para estes estudos estão sendo desenvolvidas recentemente.

O Professor Dairusz, (Leszczynski et. al. 2014), da universidade de Helsinki, na Finlândia admite que as radiações causam efeitos diretos e indiretos sobre os sistemas biológicos, independente das doses, podendo ocorrer estes efeitos por baixas doses (mGY) ou por elevadas doses (Gy). No entanto, segundo o mesmo autor é quase impossível mapear estas alterações, pois muitas são fisiológicas por adaptação do nosso organismo as radiações e outras são patológicas, cabendo aqui neste contexto uma efetiva ação conjunta no sentido de identificá-las e buscar tratamento para as mesmas.

Conforme a literatura é reforçado por Moore et. al. (2011), nos organismos animais incluindo o corpo humano, existe a possibilidade de transcrição de pelo menos dois grandes grupos de proteínas, as estruturais responsáveis pela formação da unidade básica das células, como a membrana citoplasmática, organelas, entre outras. Mas segundo Nylund et. al. (2013), outro grupo importante é o formado pelas proteínas regulatórias que podem ter efeito dentro das próprias células, como os segundos mensageiros, ou aquelas que terão efeitos em outras células, como os hormônios e os

neurotransmissores. No entanto o consenso que existe, é que todas poderão sofrer alterações em virtude da interação com as radiações ionizantes de baixa ou alta dose. Uma dificuldade é padronizar os tipos de alterações por elas exibidas, por se tratar de um universo muito extenso de modificações. Como exemplo Tapio et. al. (2013), descrevem uma série de alterações ocorridas por proteínas diferentes como a SILAC que é muito sensível à radiação, sendo sua síntese inibida ou a 2D-DIGE, que também possui uma redução de suas taxas sistêmicas. Em contrapartida Nylund et. al., (2013), descrevem que não encontraram modificações em linhagem de células endoteliais (EA.hy926) submetidas as radiações. Já Yan et. al. (2010), descrevem alterações por aumento de fibroblastos de pele, utilizando eletroforese para este estudo e concluindo que estas alterações são devidas a mecanismos de resistência das células à radiação. Em um estudo mais aprofundado, Yuasa et. al. (2006), mostraram que as alterações visualizadas nas expressões proteicas têm início com as interações das radiações no processo de replicação, que pode ser pontual ou definitivo, sendo esta reprogramação gênica transmitida às novas populações ou as futuras gerações celulares.

Em complementação estudos envolvendo radiações eletromagnéticas (como sinal de celular, computador entre outros), foram desenvolvidos por Karinem et. al. (2008), usando mulheres voluntárias, eles mostraram pequenas alterações das expressões proteicas, no entanto, não conclusivas Fragopoulou et. al. (2012), demonstraram através de eletroforeses 2D-PAGE, alterações da expressão e funcionamento de 100 proteínas. No entanto, Nylund et. al., (2010), não observaram modificações em células endoteliais da linhagem EA.hy926 submetidas a estas radiações.

Ainda em complementação, Mattos et. al. (2002), realizaram estudos de ativação de proteínas, mais especificamente a TGF em pulmão de ratos irradiados *in vivo*, e demonstraram a existência de duas isoformas das citocinas TGF β 1 (fator transformador do crescimento), sendo uma latente e outra ativa. A forma inativa esta ligada a LAP (peptídeo associado à latência) e que é degradada pela plasmina, que é uma proteína (enzima) envolvida neste processo. Nos animais normais existem quantidades fixas em proporções estabelecidas de TGF β 1 latente e ativa, determinando a espessura do parênquima pulmonar e sua fisiologia, não ocorrendo a

deposição do colágeno. Após a irradiação de corpo inteiro dos animais, em bomba de cobalto-60 com rendimento de 7 Gy, ocorre uma redução do TGF β 1 latente com aumento do TGF β 1 ativo, isto resulta em deposição do colágeno e aumento do parênquima pulmonar, sendo este fenômeno mais evidente aos 14 e 30 dias após a irradiação, fato comprovado por estudos de imuno-histoquímica, havendo uma forma de reprogramação da expressão gênica, do transcrito e conseqüentemente das proteínas e do efeito proteômico, causando modificações fisiológicas e/ou patológicas.

Embora muito bem documentados e bem produzidos, todos os ensaios supra qualificados, definir a relevância de cada trabalho é ainda difícil, pois são relativamente poucos estudos e muito focados em aspectos clínicos, não havendo uma abordagem generalista que permita um entendimento multifatorial de todos os aspectos efetivamente envolvidos no processo. No entanto, um ponto em comum que podemos observar é que pela interação da radiação com a matéria, várias modificações são produzidas, e que os tecidos testados possuem sensibilidades diferenciadas ao ponto de um ser efetivamente modificado como o aumento, bloqueio ou redução da expressão de uma ou um grupo de proteínas e outros tecidos submetidos a mesma taxa de dose não apresentam nenhuma modificação.

Assim, por todo o exposto, e pelo trabalho que apresentamos, viemos buscar preencher mais alguns pontos da grande lacuna do conhecimento que identificamos, em virtude de poucos ou quase nenhum estudo, que avaliou sistemas vivos (ratos) irradiados de corpo inteiro suas modificações de proteínas sanguíneas expressas em longo tempo (cinética de tempo). Os resultados que serão apresentados refletem uma análise integrativa dos conhecimentos já descritos e outros ainda em fase de proposição, necessitando de novos estudos para sua efetiva comprovação.

Capítulo 4

RADIATION-INDUCED CHANGES IN THE ELECTROPHORETIC PROFILE OF SERUM ALBUMIN

Artigo submetido à revista: Hemoterapia Brasileira.

RADIATION-INDUCED CHANGES IN THE ELECTROPHORETIC PROFILE OF SERUM ALBUMIN

Celso Vieira de Lima and Tarcísio P R Campos
Núcleo de Radiações Ionizantes, Programa de Ciências e Técnicas Nucleares
Universidade Federal de Minas Gerais
Av. Antonio Carlos, 6627, Bloco 4, S.2285
31270901 - Belo Horizonte, Minas Gerais.
limacv2004@yahoo.com.br;

ABSTRACT

Propose: The albumin protein profiles had been investigated in electrophoresis system in function of the whole body exposition to the radiation. **Methods:** Two groups of rats Watchman were set up, the control and the irradiated one. The irradiated group was exposed to Co-60 at dose of 5 Gy. After-irradiation, 300 μ L of blood was collected in inferior vena cava, renal, jugular, hepatic, and pulmonary veins at 72h after exposition, and serum separated. The albumin protein was identified by vertical electrophoresis in acrylamide Commassi blue or silver stained. Calibration procedure was applied using albumin samples with well-known concentrations. Mathematical correlation was developed involving eletrophoretic parameters and band's intensities and sizes from gel representation, providing protein concentration values based on a standard bands with known concentrations. **Results:** There were significant difference in the physiological concentrations in jugular and pulmonary sites in relation to renal and cava sites. Significant differences induced by radiation on in serum albumin concentration were also found in hepatic and jugular sites. **Conclusions:** A regional differential physiological concentration of albumin was identified on jugular site. Alteration of albumin protein concentration was found as an early effect from whole body irradiation. This phenomenon points out to alteration's in cell's metabolism in the liver justified by a possible induction of proteomic damage from radiation.

Keywords: serum protein, rats, radiation, albumin, electrophoresis.

INTRODUCTION

Limit factors on human live, such as aging and cancer, are theme of research in order to mitigate or remediate its effects. The basis of the cancer control, surgery's removed or not, remains the radiotherapy and the chemotherapy. Radiation induces molecular, cellular and tissue effects [1,2]. There are no doubt on the effectiveness of radiotherapy but the quantization and minimization of the deleterious effects should always be pursued, especially on blood and in normal tissues [3,4].

Human blood is composed of over 500 different proteins and proximally 12 of them are of the paramount importance for maintenance the metabolic functions of the blood. The main plasmatic proteins are albumin, antitrypsin, TBG, alpha-fetoprotein, alpha1-acid glycoprotein, alpha2-globulin, haptoglobin, macroglobulin, ceruplasmin, immunoglobulin, transferrin, C3 and

betalipoproteín. All these proteins are formed by chains of amino acids joined together by peptide bonds, globulins and immunoglobulins [5].

The most abundant plasma protein is albumin representing 60% of the total protein content, accounting for 80% of blood oncotic pressure and transport of substances, such as bilirubin, calcium, hormones, drugs, and also for controlling the plasma pH, among other functions. It is synthesized exclusively in the liver, being released as preproalbumina [6]. After removal the initial sequences, the action of the proalbumin enzymes will be modified by the removal of six residues from the new N-terminus propeptide. Thus, albumin appears shaped and sent to the blood with a half-life of 19 days. Recent studies indicate that serum albumin is approaching an ellipsoid of 140 x 40 Angstroms with three homologous domains of 67 kDa and the human plasma concentration around 5.0 mg.dL⁻¹. Albumin is filtered in the nephrons, being reabsorbed by the distal peritubular capillaries. Albumin can be released in the urine when there is the presence of renal glomeruli damaged [5-7].

The relative concentration of albumin in serum can be analyzed by electrophoresis. Protein electrophoresis is a very simple technique that uses electrophoresis forces and electro-osmosis present in the system [8]. The separated fractions are visible after treatment with the proteins sensitive dyes. The present study is to characterize and analyze electrophoresis profiles of the protein albumin in control and irradiated animal model.

MATERIALS AND METHODS

Grouping and ethic treatment. Two groups of isogenic animals, Wistar rats, were used with the age of 12 weeks and weighing 300±10 g, with free access to water and food with a photoperiod of 12 h; holding same feed and ambient conditions. The animals were divided into control group (n = 6) and one subjected to irradiation (n = 6). The same lineage, family, weight and age were preserved. The research project was previously approved on the Ethical Committee, CEUA – UFMG 339/2014.

Irradiation. The animals were exposed together to a dose of 5 Gy of Co-60, Laboratory of Gamma Irradiation – LIG, *Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear – CDTN* at same irradiation conditions, time and absorbed dose.

Sample time and collection and separation of components. The blood samples were obtained from control and irradiated animals after 72h after exposure. Under deep anesthesia, thoracic and abdominal laparotomy was performed, and subsequently collected 300 µL of blood from the inferior vena cava, renal, jugular, hepatic, and pulmonary veins, in heparin tubes. The samples were submitted to centrifugation at 2500 rpm for 30 min to separate the components.

Electrophoresis. Serum samples from the distinct vascular sites and animal groups were submitted to vertical electrophoresis of acrylamide, SDS-PAGE. The gels were prepared at 10%, with comb of 4% gel and run to 120 V and 15 mA. An amount of 15 µL sample was used in the wells. After the running, the gels were stained with Commassie blue R-250 and silver, and fixed.

Scanning and processing information. The electrophoresis profile of proteins was digitalized in transmission scanner, identified and analyzed using the digital imaging system ImageJ[®].

Isogenic test. Blood samples from isogenic animals at control group, living in controlled environment, were collect in different periods (hour and days) and in different vascular sites, being one sample from each animal. Serum samples were separated and electrophoresis of a set of samples were prepared as previous described. Distinct staining patronizations were tested. A set of pair of bands from distinct time and site were compared to check equivalent protein expression.

Standardization of albumin. A standard sample with albumin concentration of 4.0 g.dL⁻¹ from Bradford assay was employed. Also, a high range protein weight pattern was used. SDS-PAGE was run with framework eluted concentrations, and stained with Commassi Blue R-250. The intensity of the gray level of the samples after processed in software ImageJ was obtained and generated patterns of intensities, band's areas and concentration level for performing semi-analytical analysis.

Semi-quantitative analysis. Small aliquots of albumin obtained from diluted patterns were quantified by Bradford assay. On gel, a scale of level of band's intensities and areas were created relating to measured concentration. The electrophoresis and stain conditions were preserved. The relative intensities and areas of the bands from the gels provided a relationship to a standard concentrations, holding a mathematical correlation. The following equation was proposed:

$$C \cdot D = (C_p \cdot D_p) \cdot \{ (V \cdot P) / (V_p \cdot P_p) \} \cdot \{ (I^b \cdot A^b) / (A_p^b \cdot I_p^b) \}^n , \quad (1)$$

in which: C and C_p are the protein concentrations in g.dL⁻¹ of the sample and the standard; D and D_p are the dilution fraction of the standard; V and V_p are the volumes of the sample and standard applied in the lanes of the electrophoresis, in μL ; P_p and P , protein abundances on the whole medium applied, in %, from the sample and the standard; A^b and A_p^b protein band's areas of the sample and the standard, in mm^2 ; and I^b and I_p^b protein band's intensity of the sample and the standard, in gray level intensity, and n is an arbitrary number adjusted by calibration. The use of such method is justified due to the small amount of serum removed in each vascular site.

Statistic analysis. Electrophoresis of three samples from the isogenic animal control group was prepared following same methodological conditions and electrophoretical parameters. The standard deviations on the gray level intensity and area from the albumin bands were evaluated, and its maximum deviation was applied to perform statistical analysis on all irradiation samples.

RESULTS

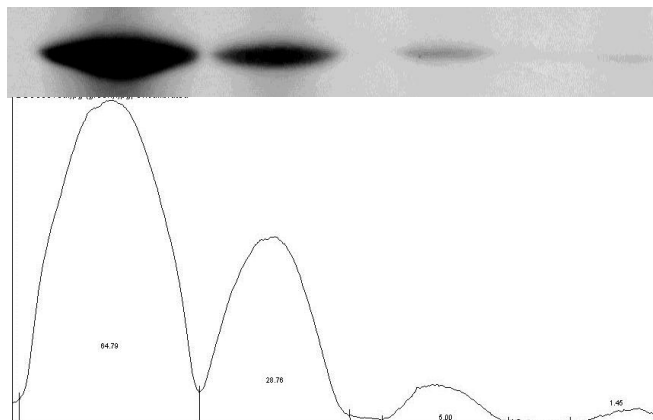
Standardization of albumin in electrophoresis and standard deviation analysis.

Fig.1 illustrates the response of the experiment to standardize the albumin protein in SDS-PAGE under operating conditions. After imaging, one can observe the changes in patterns of area and of the gray level intensities of the bands in function of the albumin concentrations and dilution. The gray level intensities on the distinct protein bands, normalized in percentage, were 68.78, 28.72, 5.00 and 1.45%. It was found at pre established concentrations of 4.0g.dL^{-1} com dilution of 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, providing a diluted concentration of 4.0, 2.0, 0.8, 0.4g.dL^{-1} , respectively.

Figure 1 - Standardization of albumin concentrations in SDS-PAGE gel and Commassi blue stained.

Based on the calibration process of the albumin, the parameter n was found equal to 0.60. Therefore Eq.1 could provide an estimative of the concentrations on each lane taken one as a reference “ p ”. As described on Eq.1, the unknown concentration C will depend on the parameters of application C_p , D_p , V_p , P_p and the ratio of the product of the area A_p and intensity I_p from gel images for the standard p protein, taken as reference, and the lane whose concentration shall be estimated. If applying data from Fig.1 on Eq.1, one can verify the concentration C of the albumin in each albumin band on its lane, considering one of them as standard p with C_p , D_p , V_p and P_p known.

Let consider the data from lane 1 being known ($C_p = 4.0$; $D_p = 1:1$), based on the data from image of lane 2, 3 and 4, with dilution D of 1:2, 1:5 and 1:10. From Eq.1, one can estimate the real concentration applied with error of 13% (lane 2), 1% (lane 3) and -5% (lane 4), only based on the representation of the band's size and intensity on Commassi blue stained. Taken now lane 4 as standard ($C_p = 0.4$, $D_p = 1:10$), the concentration on lane 3 can be estimate, in relation to 4, with error of -6%. The same between lanes 2 to 3 found concentration error of -12%. The larger



error was found when lane 1 was taken as reference. Maybe, it is due to the large amount of protein running on the electrophoresis that did not stained completely on the gel, properly, losing a small part of them; in turn for small amount of protein (line 4) error are large. Such results from the standard albumin band validate the proposal expression (Eq. 1) for estimating concentration in gel electrophoresis taken a known standard band p ; assuming a super estimation

behavior of +13% at the interval of 1.0-4.0 g.dL⁻¹, and a sub estimation behavior of -12% at the concentration lower than 1.0 g.dL⁻¹.

From the analysis of the Commassi blue stained electrophoresis gel of the samples from the animal control group, the deviation found from the estimative of the value $A_p I_p$ was $\pm 8.1\%$. Such deviation was applied to all gel analysis.

Isogenic test in control group. Fig. 2 presents the silver stained electrophoresis gels from samples taken at isogenic watchman rats from systemic, jugular and cava sites. The intercomparison was made in distinct pair of times from distinct animals living in controlled environment. The samples from systemic: (12h, 2d), (3d, 4d), (7d, 2d); and, jugular vein: (7d,1d), (7d, 30d) was compared.

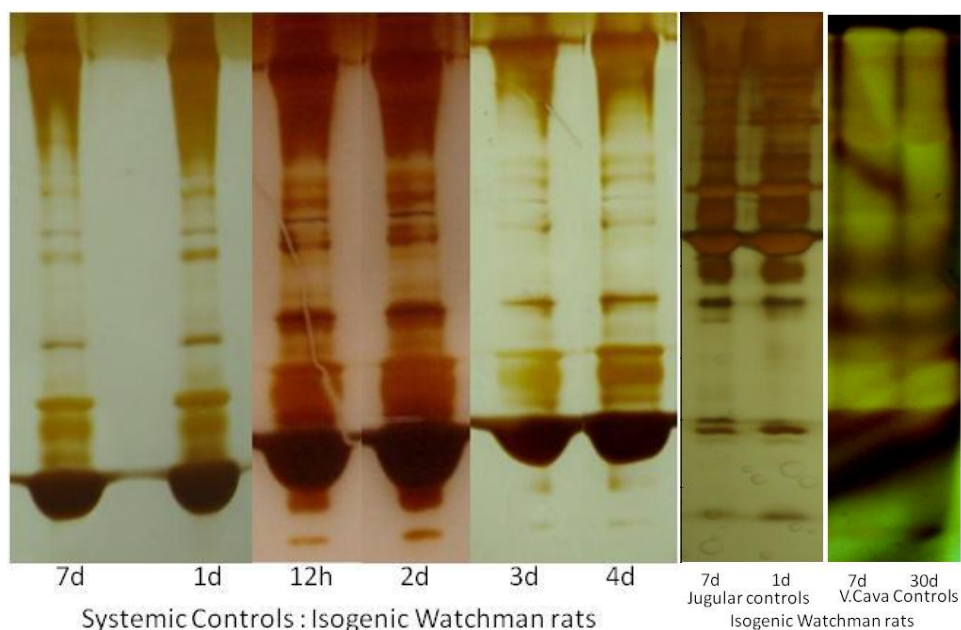


Figure 2 – the silver stained electrophoresis gels from samples taken at isogenic watchman rats taken from systemic, jugular and cava vein sites, inter compared at distinct periods of hours and days, in silver stained.

Analysis at the albumin concentration in gel from control group at distinct vascular sites. Fig 3 presents a example of a digitalized silver staining electrophoresis's image and intensity's profiles from albumin cut band from 15 μ L plasma samples obtained at regional jugular, renal, hepatic, vena cava and pulmonary veins in a animal from the control group.

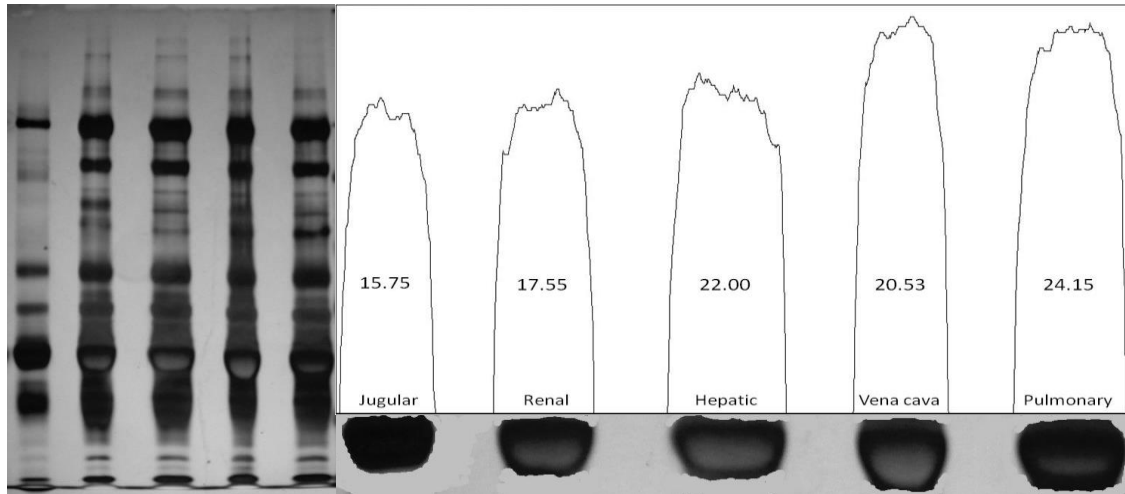


Figure 3 – Digitalized silver staining electrophoresis’s image and intensity’s profiles from albumin cut band from 15 µL plasma samples obtained at jugular, renal, hepatic, vena cava and pulmonary veins.

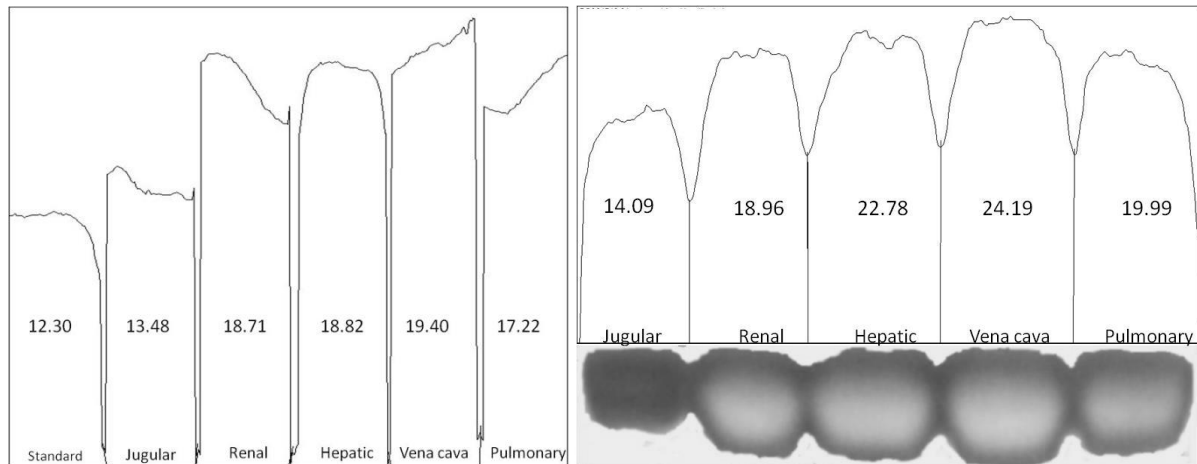


Figure 4 - Intensity variation profiles from ImageJ analysis at (a) blue staining electrophoresis’s image for standard diluted albumin at 10µL with 0.4 g.dL⁻¹; and, 15 µL plasma samples, and at (b) silver staining only in plasma samples and electrophoresis’s image, both obtained from the jugular, renal, hepatic, vena cava and pulmonary veins.

An example of a Commassi stained gel’s profile of the control group, in which the albumin bands were recorded and identified is shown in Fig. 4. In according to the maximum standard deviation of $\pm 8.1\%$ observed on the overall control group, there is no statistic difference between renal, hepatic and vena cava samples; however on jugular and pulmonary differences were found in individual samples; however pulmonary samples presented large standard deviation. In the overall samples, the average and standard deviation of the albumin concentration at jugular, renal, hepatic, vena cava and pulmonary veins were $15.1 \pm 0.7\%$, $19.3 \pm 1.4\%$, $22.1 \pm 0.5\%$, $22.3 \pm 1.3\%$, $21.3 \pm 1.9\%$, respectively.

As the blood was treated to heparin, pure heparin was assessed by SDS-PAGE verifying the absence of bands in the range of interest taken on the conditions of the experiment electrophoresis control. Thus, it was shown that heparin does not interfere with the electrophoresis experiment.

Applying Eq.1 on blue staining samples running with a standard albumin, one can find the concentration of such protein based on band profile. Tab. 1 shows as example the regional variation of albumin concentrations in the vascular sites, pointing out that these changes are related to the animal's physiological control. The band's intensities of physiological albumin serum in the control group, taken in vascular sites of jugular, renal, hepatic, inferior vena cava and pulmonary veins, respectively, showed 9.5%, 52.1%, 52.9% and 58.1%, and 40.0% higher than the standard albumin concentration recorded by electrophoresis. Values were adjusted by the different concentrations of applied samples, areas and intensities found in staining the bands at electrophoresis. Concentration was achieved through Eq.1. On the staining gels, Tab. 1 depicts significant difference in the physiological concentrations in jugular and pulmonary sites in relation to renal, hepatic and cava sites.

Table 1 – Concentrations in control group, in g.dL^{-1} , and relative percentage changes normalized in relation to standard albumin value.

Venous vascular site	Intensity Relative to standard	C [g.dL^{-1}]	Standard deviation
Jugular	1.09	*2.62	0.21
Renal	1.52	4.60	0.37
Hepatic	1.52	3.61	0.29
Cava	1.58	4.39	0.36
Pulmonary	1.40	*2.45	0.20

Analysis at the irradiated group. A decrease in band's stains was observed in electrophoresis albumin bands in almost all sites surveyed from the irradiated group, with the exception of the renal site. This analysis was made comparing to albumin bands from control group not exposed to ionizing radiation and the irradiated one, shown in Fig.5. Also, Fig. 6 depicts the pulmonary and jugular lanes of electrophoresis profiles from control and irradiation group, as example, demonstrating the lower area and intensity in albumin band at the gel, which represent a lower concentration found after radiation on sample from such vascular sites.

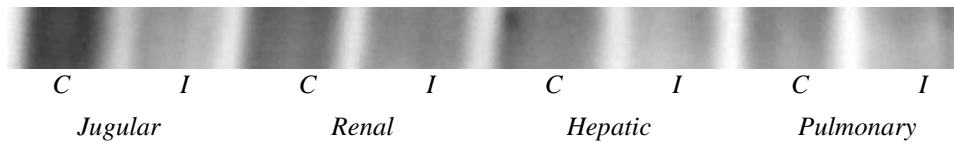


Figure 5 – Serum albumin bands at SDS-PAGE from samples at vascular sites: jugular, renal, hepatic, pulmonary veins from control (*C*) and irradiated (*I*) groups, respectively.

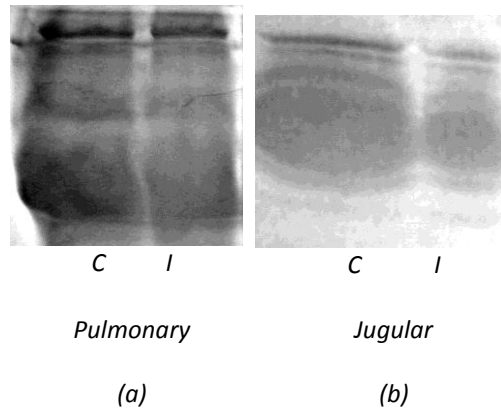


Figure 6 - SDS-PAGE from samples: a) of the control and the irradiated pulmonary vein, b) of the control (*C*) and the irradiated (*I*) jugular veins.

Table 2 - protein concentration and the normalized values in the investigated sites.

Vascular site	Concentration in the groups [g.dL ⁻¹]		Reduction [%]
	Control	Irradiated	
Jugular	2.62	2.00	*23.8
Renal	4.60	4.45	3.0
Hepatic	3.61	3.05	*16.1
Pulmonary	2.45	2.29	6.2

* statistically different for jugular and hepatic.

Table 2 summarizes the results, in which the quantitative values representing the albumin concentration reduction are presented in the vascular sites under study. There were significant reductions of the albumin concentration in jugular and hepatic sites in relation to control. The

concentrations estimated by Eq.1, especially on the irradiation group, was found on the interval of 1.0-4.0 g.dL⁻¹; so that, those may be super estimated on the range of 5 to 13%, observed on the calibration process. Therefore the effect of reduction of the concentration may be little larger than presented.

DISCUSSION

The study of blood proteins, particularly albumin, in their biochemical aspects such as molecular weight, structure of spatial chain and its concentration in blood starts in 1960s [9]. As example, Deim K. (1962) had studied a profile of blood proteins assigning their functional and physico-chemical features [9]. On previous studies, there was no concern of changes on plasma protein concentrations induced by extrinsic phenomena such as radiation and its consequences on the human metaboloma.

Later in 1976, Anderson and Warner showed the effects of ionizing radiation in producing several blood alterations in exposed human body, confirming the findings in victims of nuclear weapons in Hiroshima and Nagasaki [10]. They addressed that the immune suppression is the most important blood deleterious effect. Such blood alterations have been casually demonstrated on exposed subjects in various nuclear events, such as the Goiania's accident in Brazil, Chernobyl in 1991, and recently Fukushima in 2011[11].

Early, proteomic analysis from radiation exposure subjects has been addressed [12]. Tapio et. al., 2013, described a series of changes for different blood proteins, as SILAC, which is very sensitive to radiation, due to inhibition of its synthesis. [13] By contrast, Nylund et. al., 2013, reported no changes in the protein expressions of the endothelial cell line (EA.hy926) submitted to radiation.[13,14] Since Yan et. al., 2010, described the metabolism's increasing of skin fibroblasts and concluded that such behavior is due to resistance mechanisms of radiation cells [15]. Further studies, Yuasa et. al., 2006, showed that the changes on protein expressions shall start with the interactions of radiation in the process of DNA replication, which can be occasional or permanent, and this gene reprogramming transmitted to new populations or new cell generations [16]. In additional, in studies involving electromagnetic radiation such as cell phone signal or computer, Karinem et. al., 2008, based on a female volunteers group, showed small changes in skin protein expressions although not conclusive [17]. In addition, Fragopoulou et. al., 2012, demonstrated through 2D-PAGE electrophoresis, changes in the expression and function of 100 proteins in blood [18]. On many of those 1D and 2D electrophoresis studies, immunoglobulin's and albumin proteins are removed previously by special kits, since its band cover large space of the gel and it is stained easily creating difficult in separating small spots of low expression proteins.

Moreover, Mattos et. al., 2002, performed protein's activation studies, specifically on transforming growth factor - TGF in lung from *in vivo* irradiated mice [19]. They demonstrated the existence of two isoforms of TGFβ1 cytokines, being a latent and another active. The inactive form is linked to a latency associated peptide - LAP, which is degraded by plasmin that is an enzyme involved in this process. In normal animals, there are constant proportions of latent and active TGFβ1, which determines the thickness of the lung parenchyma and its normal

physiology with no collagen deposition. Although, after the whole body animal irradiation with 7 Gy in Co-60, there is a reduction of the latent TGF β 1 with increasing of active TGF β 1; having, as consequence, collagen deposition and lung's parenchyma thickness increase. It is more evident phenomenon at 14 and 30 days after irradiation. This effect was confirmed by immune histochemical studies, showing the reprogramming of gene expression. Falcão et. al. also found TGF and MMP9 metalloproteinase alterations in skin induced by UV radiation which may be related to cancer induction [20]. Thus, protein transcription and proteomic irradiation effect causing physiological changes and pathological establishment had already observed. All proteomic studies cited are specific and targeted a physiological condition and cannot be generalized. However, those demonstrated the possibility of protein's modulation induced by radiation in different human tissues. Our findings demonstrated similar blood protein's modulation induced by radiation.

At first, in the control group, each organ analyzed represented by a specific vascular site, showed a distinct albumin serum concentration itself, corresponding to a physiological vein identification. Indeed, there is a difference on albumin concentration in jugular in relation to other sites such as renal, hepatic, and pulmonary. However, there were no differences of albumin concentration among the hepatic, cava and renal sites. Therefore, the brain metabolism changes the physiological jugular concentration of albumin, may be due to the water and plasma organ's diffusion which alter the protein's concentration.

Second, in the irradiated group, there was a variation in the concentration of albumin in the vascular sites at the time of 72 h after irradiation. Such differences were in jugular and hepatic veins. Data showed that the whole body irradiation dose of 5 Gy could alter the expression of albumin in the blood due to brain and liver irradiation. This fact may contribute to the worsening of side effects, since albumin is a major blood protein responsible for controlling blood osmolarity and much of the transport of substances such as hormones and drugs.

Third, silver staining gel of jugular, renal, hepatic, vena cava, pulmonary on three samples presented a standard coloration in which the albumin's band from jugular sample took the strong silver staining coloration while others similar bands found larger and a central clear coloration. Such clear coloration is found in bands of glycosylated proteins. Glycosylation is the process by which a sugar is covalently attached to a protein. Glycosylated proteins are difficult to stain with silver. The image's standard found in silver gel of jugular, renal, hepatic and vena cava samples may suggest that albumin is not glycosylated on the brain; while it may found on the bloodstream.

The increasing of plasma proteins is associated with the increase of protein synthesis by hypergamma globulinemia or paraproteinemia; by the hemoconcentration due to blood stasis during puncture or by decreasing the distributed volume due to dehydration. In turn, the lowering the concentration of plasma proteins is associated with the decrease of protein synthesis; the reduction of distributed volume by hyper hydration and the increase of capillary permeability; catabolism by increasing excretion of proteins and loss catabolic state. Thus, the amounts of albumin in serum can failure due to reduction of its synthesis in the liver, kidney loss, bowel or skin or conditions that increase the capillary permeability in states of bad absorption.

Moreover, there are also many pathological processes that cause changes in plasma

concentrations [21,22]. Hepatic and lung irradiation induces tissue's inflammation which may be the cause of albumin's alterations. Our findings demonstrated that radiation induces the concentration's changes of the albumin protein in serum. This phenomenon points out to alteration's in gene metabolism in the liver justified by a possible induction of proteomic damage from radiation.

CONCLUSIONS

Regional differential physiological concentration of albumin was identified on the jugular site. Also, our findings from electrophoresis analysis suggest that the expression and the serum albumin concentrations may be modulated by radiation, representing an early effect of the whole body irradiation. This fact may be adjuvant on the increases of intensity and severity of the deleterious effects of the whole-body radiation, since the serum albumin, the most abundant protein in blood, is responsible for drugs and active substances transports and for the control of systemic osmolarity.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Laboratory of Gamma Irradiation - LIG from *Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear* - CDTN, who kindly pursued the irradiation. The authors is thankful to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento da Ciência e Tecnologia* (CNPq), the financial support from process 456719 / 2013-0 REBRAT-SUS, and *Fundação da Pesquisa do Estado de Minas Gerais* - FAPEMIG, Universal Process FAPEMIG-18565 - FAPEMIG / EE / DENU / Ho-166, scholarships and DTI granted, and the *Conselho de Apoio a Pósgraduação e Ensino Superior* (CAPES) for a PhD scholarship granted.

REFERENCES

1. HAWK, JLM and NORRIS, PG. Abnormal Responses to Ultraviolet Radiation: Idiopathic. In: FITZPATRICK, TB et al. *Dermatology in General Medicine*. McGraw Hill.1993; 1661-1667.
2. TOLEDO JM, SIQUEIRA SL, FALCAO PL CAMPOS TPR., Phenotypic behavior of dogs irradiated PBMC form based on flow cytometry, *Journal of Biological regulators and Homeostatic Agents* vo.27, .2. 309-317, 2013.
3. SOLTER M.P.; WALTER, E.H.; HUNGERFORD, L.L. et al. Haptoglobin and ceruloplasmin the determinants of inflammation in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, V.52, p.1738-1742, 1991.
4. GRUYS, E.; OBWOLO, M. J.; TOUSAINT, MJM. Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. *Vet. Bull.*, V.64, p.1009-1018, 1994.
5. PAULA O., SILVA C., BRANDÃO K. M. A., PINTO P. V. M., FARIA R.M. D., CLEMENTINO C. D., LOPES A. F., Multiple myeloma: clinical and laboratory characteristics in the diagnosis and prognostic study, *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2009; 31(2):63-68.
6. OLIVEIRA, R.P. and SILVA; LOPES, A.F.L.; Malena Rose DELBONE, M.R.F. Electrophoresis of serum proteins: interpretation and clinical correlation of Minas Gerais Medical Journal 2008; 18 (2): 116-122.
7. CALAZANS, SG, DALECK, FAGLIARI, JJ, REPETTI, CF DE NARDI, BA CASTRO, JHT, FERNANDES, SC, CAESAR, SC, RODIGHERIS M. Serum protein profile of healthy dogs with lymphoma and obtained by polyacrylamide (SDS-PAGE) gel. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, V.61, n.5, p.1044-1048, 2009.

8. GORDON, AH. Electrophoresis of proteins in starch gels and polyacrilamide. New York: Elsevier, 1995 213P.
9. DEIM, K. Synopsis of plasma proteins. In: Scientific Tables, 6th edn. Basel: DocumentaGeigy, 1962.
10. ANDERSON, R.E. and WARNER, N.L. Radiosensitivity of T and B lymphocytes. III: Effect of radiation on immunoglobulin production by B cells.
11. TAPIO S., Ionizing radiation effects on cells, organelles and tissues on proteome level. *Adv Exp Med Biol.* 2013;990:37-48. doi: 10.1007/978-94-007-5896-4_2. Review.PMID:23378001. 2013.
12. NYLUND R., KUSTER N., LESZCZYNSKI D., Analysis of proteome response to the mobile phone radiation in two types of human primary endothelial cells. *Proteome Sci.* 2010 Oct 18;8:52. doi: 10.1186/1477-5956-8-52. PMID: 20955554. 2010.
13. NYLUND, R., LEMOLA, E., HAKANEN A. The lack of acute affect of low-to-moderate-dose ionising radiation on endothelial proteome. *Int. J. Low Radiat.* 9,127-137. 2013.
14. YAN Y, XU H, PENG S, ZHAO W, WANG B., Proteome analysis of ultraviolet-B-induced protein expression in vitro human dermal fibroblasts. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2010 Dec;26(6):318-26. doi: 10.1111/j.1600-0781.2010.00556.x. 2010.
15. YUASA M.S., MASUTANI C., HIRANO A., COHN M.A., YAMAIZUMI M., NAKATANI Y., HANOAOKA F., A human DNA polymerase eta complex containing Rad18, Rad6 and Rev1; proteomic analysis and targeting of the complex to the chromatin-bound fraction of cells undergoing replication fork arrest. *Genes Cells.* 2006 Jul;11(7):731-44. PMID: 1682419. 2006.
16. KARINEN A., HEINARA S., NYLUND R., LESZCZYNSKI D., Mobile phone radiation might alter protein expression in human skin. *BMC Genomics*, 77-81. 2008.
17. FRAGOPOULOU A.F., SAMARA A., ANTONELOU M.H., XANTHOPOULOU A., PAPADOPOULOU A., VOUGAS K., KOUTSOGIANNOPOULOU E., ABASTASIADOU E., STRAVOPODIS D.J., TSANGARIS G.T., MARGARITIS L.H. Brain proteome response following whole body exposure of mice to mobile phone or wireless DECT base radiation. *Electromagn Biol Med.* 2012 Dec;31(4):250-74. 2012,
18. MATTOS D.M., KIMURA E.T., SILVA M.R.R, EGAMI M.I., SEGRETO R.A., SEGRETO H.R.C. Ativação da Proteína TGFβ1 latente em pulmão irradiado *in vivo*. *Revista Associação Médica Brasileira, São Paulo, SP.* 2002.
19. FALCAO, PL, CUPERSCHMID, E.M.; TRINDADE, B.M.; CAMPOS, T.P.R., Transforming growth factor-b and matrix metalloproteinase secretion in cell culture from ex vivo PBMC after exposure to UV radiation, *Journal of Biological regulators and Homeostatic Agents*, Vol. 28th, n.2, 333-340, 2014.
20. GABAY, C.; KUSHNER I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N. Engl. J. Med.*, V.340, p.448-454, 1999.
21. MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIMOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet. J.*, v.168, p.28-40 2004.

Capítulo 5

CINÉTICA DAS EXPRESSÕES DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS RADIOINDUZIDAS DO TERRITÓRIO CARDÍACO EM ELETROFORESIS

**Artigo publicado na revista: Jornal Brasileiro de Patologia e
Medicina Laboratorial.**

Kinetics of the expressions of radiation-induced plasma proteins of the cardiac territory in electrophoresis

Cinética das expressões de proteínas plasmáticas radioinduzidas do território cardíaco em eletroforese

Celso V. Lima; Tarcisio P. R. Campos

Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Minas Gerais, Brazil.

abstract

Introduction: Radiation induces acute and late alterations in blood proteins. **Objective:** The present study aims at analyzing in time kinetics the electrophoretic profiles of expression bands of blood protein, in the molecular weight range greater than and equal to that of albumin, modulated by ionizing radiation in the cardiac territory, in animal model. **Material and methods:** Animals were exposed to a whole-body dose of 5 Gy ionizing radiation (Co-60). Serum samples were collected from isogenic Wistar rats (control and irradiated groups). At a time kinetics of 12, 24, 48, 72, 96 hours and 35 days post-irradiation, thoracolarotomies were performed with anesthesia, and 0.3 ml of blood was collected between the left ventricle and the pulmonary artery. The samples were held in heparin and their components were separated by centrifugation. Protein bands with similar molecular weight were identified by vertical 10% electrophoresis, silver staining. **Results:** The findings indicate a systemic acute altered expression of proteins with molecular weight greater than or equal to that of albumin in acrylamide gel, presenting suppression and increased expression due to modulation of preexisting bands, identified in time kinetics. **Conclusion:** These findings point out to acute alterations of protein expression modulated in time, but also to a late modulation of gene expression.

Key words: radiation effects; serum albumin; blood; polyacrylamide gel electrophoresis; blood protein electrophoresis.

introduction

All living beings, including the human being, are compulsorily subject to radiation, either by cosmic, cosmogenic, or terrestrial radiation; natural sources and radioisotopes in the body. Additionally, people have become more and more exposed to ionizing radiation from artificial sources. For example, control and treatment of neoplasms are still based on ionizing radiations for diagnostic imaging and radiation therapy. On the other hand, physiological and pathological conditions that limit quality of life, such as aging, cancer, hormonal and neural dysregulation, are associated with environment. Therefore, the correlation between these processes and exposure to low-dose ionizing radiation can be considered a hypothesis.

The human body exposure to a total body irradiation (TBI), on its turn, can occur in radiological accidents and in radiotherapy, by means of controlled exposures. The therapeutic modality of systemic high-dose TBI has been applied since 1950^(1, 2). TBI has used exposures with Co-60 keeping a large distance between patient's skin and the source, reducing the dose in lungs with physical blocks positioned near the irradiator gantry. Presently, megavoltage radiotherapy systems have been applied, such as intensity-modulated radiation therapy (IMRT), arc techniques and translational methods^(3, 4). TBI is frequently used to eliminate bone marrow cells for immunosuppression, necessary in bone marrow transplants; or eliminate leukemic cells, in treatments of leukemia and diverse lymphomas, high-risk Ewing sarcoma, advanced non-Hodgkin lymphoma, and lymphosarcoma. Total doses range from 3 to 10 Gy presented as a single dose, or 10 to 14 Gy fractioned during the day for several days. TBI is a complex technique that depends on dose, fractioning method and dose rate, and presents high pulmonary toxicity⁽⁵⁾. 14 Gy fractioned during the day for several days. TBI is a complex technique that depends on dose, fractioning method and dose rate, and presents high pulmonary toxicity⁽⁵⁾.

There are no doubts about the beneficial action of radiotherapy, but the deleterious side effects must always be quantified and minimized, principally those on blood and tissues^(6, 7). Blood is a tissue with high metabolic rate, and extremely radiosensitive mononuclear cells. Its cell components are affected by exposure to ionizing radiation, although pathophysiologic evaluation after artificial exposures has not been a routine.

Human blood is known to be constituted by more than 500 different proteins, with a small group of utmost relevance for metabolic, osmotic, and maintenance functions. The main plasma proteins

are albumin, antitrypsin, thyroxine-binding globulin (TBG), alpha-fetoprotein, alpha-1-acid glycoprotein, alpha 2-globulin, haptoglobin, macroglobulin, ceruloplasmin, immunoglobulins, transferrin, betalipoproteins, globulins, gammaglobulins and C3. All of them are made up by chains of aminoacids held together by peptide bonds⁽⁸⁾.

The most abundant protein in plasma is albumin, with around 60% of total. It is responsible for 80% of blood oncotic pressure; transportation of substances, such as bilirubin, calcium, hormones and drugs; control over plasma pH, blood viscosity, and consequently, the biophysical nature of blood flow, among other functions⁽⁹⁻¹¹⁾. It is exclusively synthesized in the liver as pre-proalbumin; after signal peptide is cleaved, proalbumin appears, and will be modified with removal of the new N-terminal six-residue propeptides^(12, 13). Once formed, albumin is sent to blood, and has a half-life of 19 days. However, there are other subgroups of molecular weight greater than that of albumin, of diverse forms and functions, constituted by a wide variety of substances, which are the focus of this study^(13, 14).

In analysis and identification of blood proteins, agarose or vertical (acrylamide) gel electrophoresis⁽¹⁴⁻¹⁶⁾ can be employed. This technique uses the electrophoretic and electro-osmotic forces present in the system for protein separation according to molecular weight. The separated fractions are visible after treatment with protein-sensitive stains^(17, 18).

The present study aims at characterizing and analyzing time kinetics of the electrophoretic profile of expression bands of blood proteins, in the band of molecular weight greater than that of albumin, in animal model, modulated by ionizing radiation in the cardiac territory. It is not the scope of this work to quantify, in an absolute manner, volumetric concentrations, or identify, in a specific form, proteins in the electrophoretic profile, but to point the radiation- induced kinetic modulation of bands of the group of blood proteins.

Material and Methods

Grouping

Eight isogenic healthy Wistar rats were used, with a rigid age- group criterion of 12 weeks and body weight of 320 ± 15 g. They were given free access to water and food, with a photoperiod of 12 hours. The animals were divided into two groups: a control group ($n = 2$), called C; and a group undergoing TBI ($n = 6$), named IR. In order to linearize the variables, animals of the same lineage, family, weight and age were used, with isogenic characteristics, provided by the animal facility of Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Irradiation protocol

The animals of the IR group were whole-body irradiated by a Co-60 source with a 5-Gy dose at Laboratório de Irradiação Gama (LIG) of Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN). The selected dose represents a single dose, possible to be delivered in TBI, but lower than the 30-day median lethal radiation dose (LD50/30) for rats, because of the interest in collecting samples after a month.

Sample collection and separation of blood components

On collection day, the animals were administered a general anesthetic agent. Thoracotomy was performed, to gain access to the cardiovascular system, between the left ventricle and the pulmonary vein. A total of 0.3 ml blood was collected. The samples were heparinized, and their components were separated by centrifugation at 2,500 rpm for 30 minutes.

Sampling time

Samples were taken from animals of the C group on hour 0 and day 30; from the IR group, on hours 12, 24, 48, 72, 96 and day

35 for each irradiated animal.

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Serum samples, in the aforesaid collection times, of IR and C groups, were run on a vertical electrophoresis system. The running gels were prepared with 10% resolving gel and 4% stacking gel, at 120 V and 15 mA. An amount of 15 ml of the sample was loaded in Celso V. Lima; Tarcisio P. R. Campos the wells. The same amount of sample of high-molecular-weight standard (LGC Biotecnologia high range) was included in the run.

Silver staining

After the run, the gels were stained with silver, according to the protocol established by Kang *et al.* (2002)⁽¹⁹⁾.

Image processing

The protein electrophoretic profiles were scanned, treated, and analyzed, using the image processing program *Image J*[®]. Gray intensities of bands of the same molecular weight were analyzed, and the values were converted into range percentages contrasted to the control. The relative data, put in equivalent conditions of electrophoresis and staining, provided the range percentage value of these protein bands of similar molecular weight in relation to control.

Division into subgroups

The electrophoretic profiles were divided into subgroups for better analysis: albumin (SGA), subgroup 1 (SG1), subgroup

2 (SG2), subgroup 3 (SG3), and subgroup 4 (SG4). These protein subgroups represent groups of proteins of similar molecular weight. Each subgroup refers to an attempt to assemble proteins, as in SGA, albumin; SG1, alpha 1-globulins; SG2, alpha 2-globulins; SG3, beta 1- and beta 2-globulins; and SG4, gammaglobulins.

Ethical treatment

The project was previously approved by the ethics commission on animal use of UFMG 339/2014. The norms of Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) and Colégio Brasileiro de Experimentação

Animal (COBEA), as well as those of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Institute for Laboratory Animal Research/National Academy of Science, USA) were respected.

Results

According to analysis of the electrophoretic gel presented in **Figure 1**, we can observe four distinct behaviors for the expression of protein bands, in the region of high molecular weight and albumin:

- 1) expression of protein bands that were not expressed in control and were induced after exposure to radiation (new expression-B_n);
- 2) reduction of protein expression after irradiation (down-regulation – B_d);
- 3) modulated reduction in the time of some proteins, such as albumin up to 24 h, with this effect being reverted in 48 h with the increased albumin expression. The increase was kept higher over the time analyzed, in relation to control (up-regulation – B_u);
- 4) unaltered behavior after irradiation in comparison with control (stable – B_s);
- 5) initial control (C 0 h) and control on day 30 (C 30 d) show slight differences between band intensities, non-significant in comparison with the altered expressions in post-irradiation time kinetics, possibly due to the accelerated metabolism of the animal, collected after 30 days.

Analyses can also be detailed in relation to subgroups SGA, SG1, SG2, SG3, and SG4.

IR: irradiated animals; C: control group; SG1: subgroup 1; SG2: subgroup 2; SG3: subgroup 3; SG4: subgroup 4; SGA: subgroup albumin

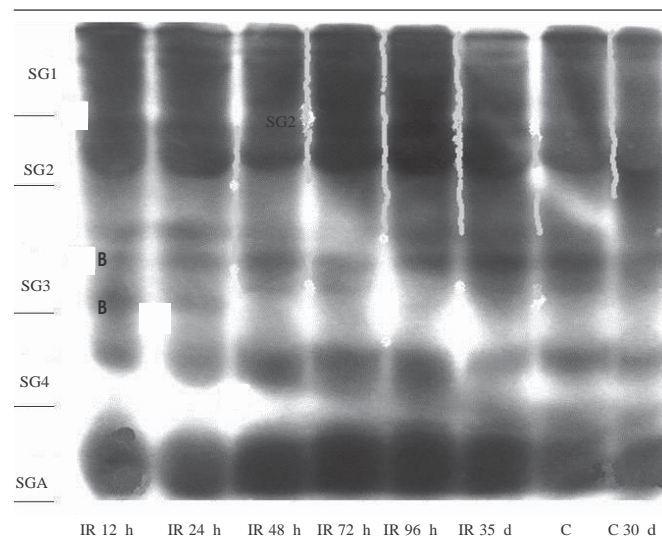


figure 1 – Electrophoretic profile at 10%, blood serum in cardiac territory of IR and C on days 0 and 30, in kinetics of 12, 24, 48, 72, and 96 h, and 35 days, identified in SG1, SG2, SG3, SG4, and SGA

IR: irradiated animals; C: control group; SG1: subgroup 1; SG2: subgroup 2; SG3: subgroup 3; SG4: subgroup 4; SGA: subgroup albumin.

SGA

Figure 2 illustrates SGA response to radiation, in a profile developed on a 10% SDS-PAGE, with samples collected from animals of the IR group on hours 12, 24, 48, 72, and 96, and day 35 after irradiation; the latest two profiles belong to group C on hour 0 and day 30. A quantitative analysis can show a kinetic dynamics of albumin response to radiation, because a reduced expression is initially observed after irradiation at 5 Gy (12 h-24 h), what goes on up to 24 h, but the behavior reversed in 48 h with the increased expression of this protein in comparison with the control. This increase was more intense between hours 72 and 96, still with a higher expression than the control, as observed in controls on hour 0 and day 30, indicating a possible modulation and/or reprogramming of protein expression.

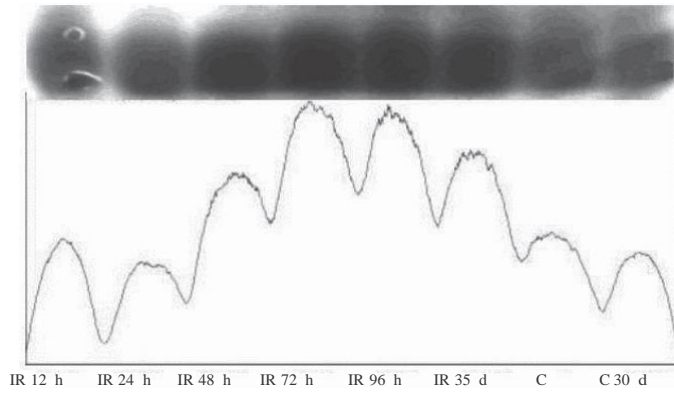


figure 2 – Electrophoretic profile of subgroup SGA after whole-body exposure to 5 Gy SGA: subgroup albumin. Sinetics of the expressions of radiation-induced plasma proteins of the cardiac territory in electrophoresis

SG4

Figure 3 illustrates SG4 protein response to radiation. A behavior similar to that of albumin was observed: within 12 h and 24 h after irradiation there was reduction of protein expression in comparison with the control. However, after hour 48, a marked expression of this protein occurred, increasing even more its expression on hours 72 and 96, with a decrease on day 35, returning to levels similar to those of the control on hour 0 and day 30.

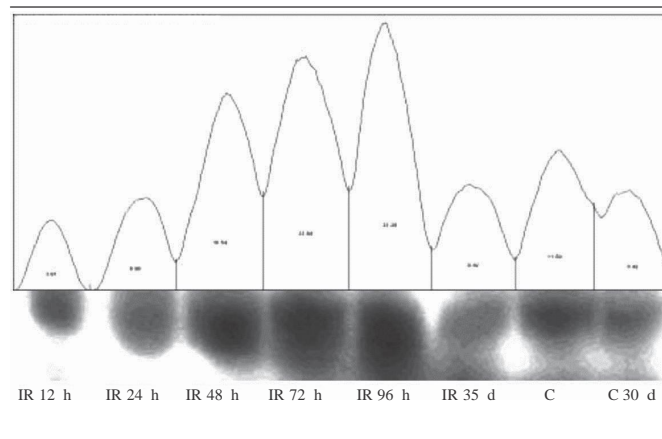


figure 3 – Electrophoretic profile of SG4 proteins after whole-body exposure to 5 Gy SG4: subgroup 4.

Figure 4 presents the response of SG3 to 5 Gy Co-60, in time kinetics on hours 12, 24, 48, 72, and 96 and day 35. Band incidence was maintained in controls 12, 24, and 48 hours post-irradiation; however, increased expression of this protein occurred within 72 h to 35 days. Thus, after 35 days there is a differentiated expression rate of these proteins in relation to the normal physiological rates of the control group.

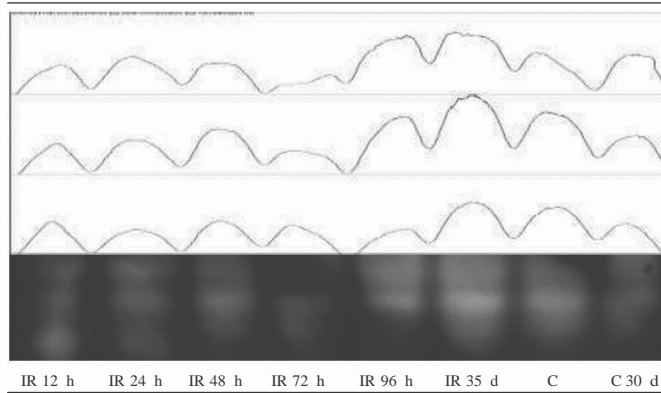


figure 4 – Electrophoretic profile of SG3 proteins after whole-body exposure to 5 Gy SG3: subgroup 3.

SG2

It represents proteins of the group beta-globulins. It behaves in a different manner, as reported in SG1. According to **Figure 5**, a slight reduced expression was observed on hours 12, 24, 48, 72 (IR), and after this time, there was a slight increase on hour 96; however, a significant increase occurred on day 35 (IR) post- irradiation, when the protein presented higher expression than the control. This fact corroborates the possibility of late existence of radiation-induced modulation and reprogramming of expression.

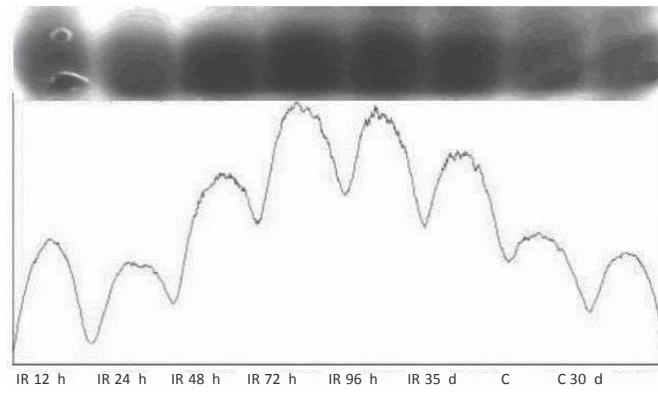


figure 2 – Electrophoretic profile of subgroup SGA after whole-body exposure to 5 Gy. SGA: subgroup albumin.

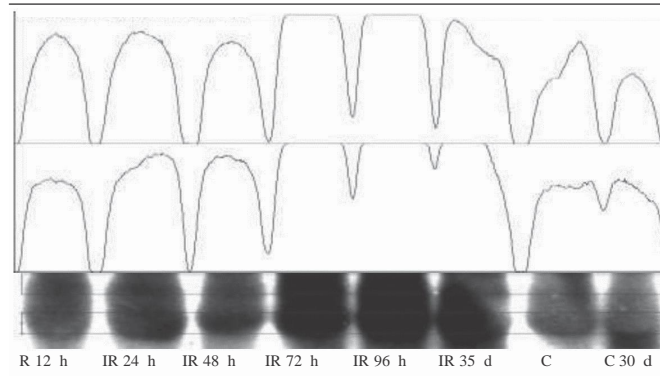


figure 5 – Electrophoretic profile of SG2 proteins after whole-body exposure to 5 Gy SG2: subgroup 2.

SG1

Figure 6 presents bands of pre-albumins of subgroup 1, possibly gammaglobulins. There was no apparent altered intensity of protein of higher molecular weight in this subgroup in time kinetics with radiation. There are alterations in bands with lower weight within the subgroup; however, there is low resolution, insufficient for further detailing.

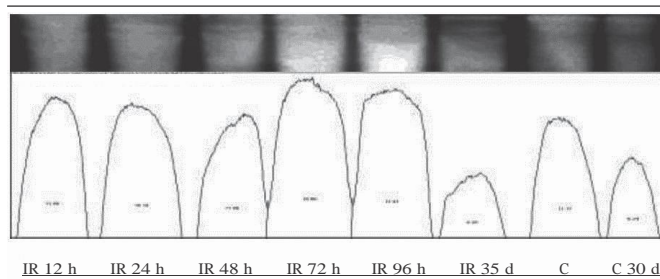


figure 6 – Electrophoretic profile of SG1 proteins after whole-body exposure to 5 Gy

SG1: subgroup 1.

Analysis of time kinetics

Figure 7 presents time kinetics of protein expression variation in electrophoresis of the main blood proteins of high molecular weight, in a period of up to 96 h. Two types of variation were observed: in subgroups SGA and SG1, there is a decrease followed by high expression, while in subgroups SG2, SG3, and SG4, there is high expression followed by reduction, and again high expression. These fluctuations point out to modulation and regulation of temporal protein expression induced by whole-body exposure to ionizing radiation.

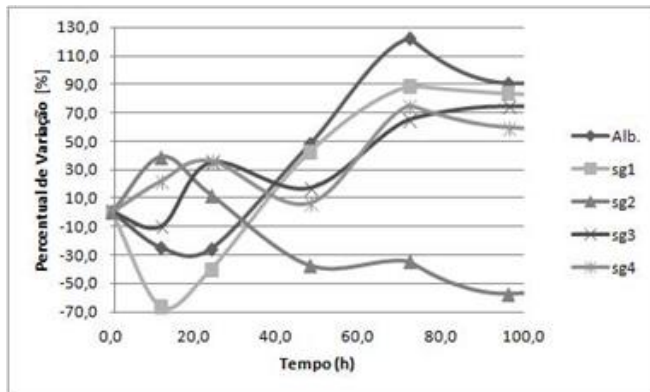


figure 7 – Time kinetics of protein expression variation in electrophoresis, contrasted to control, of the main blood proteins of molecular weight greater than and equal to that of albumin, in a period of 12 h to 96 h

SGA: subgroup albumin; SG1: subgroup 1; SG2: subgroup 2; SG3: subgroup 3; SG4: subgroup 4.

Discussion

According to Maratsubaki *et al.* (2002), serum is an extremely elaborate solution of proteins hardly found in an isolate form; they are often associated, as, for instance, albumin and antitrypsin⁽²⁰⁾. Therefore, it is difficult to designate a control because the baseline comparison parameters are very complex. Many times the establishment of pure parameters is necessary, what is not always possible. The authors also report the existence of few studies about blood proteins heavier than albumin, 67 KDa, due to its low clinical interest. This keeps their study and understanding in a secondary plan, if compared with low-weight proteins, as cytokines, growth factors and tumor necrosis factor (TNF), interleukins, vasoactive peptides, as bradecinin, angiotensins, prostaglandins, and hormones, all with mass smaller than that of albumin^(21, 22). However, there is a reference point that allows for comparisons and analyses of the radiation effects tested here: **albumin**.

Calazans *et al.* (2009) observed there is no albumin variation in control dogs and lymphoma patients⁽²³⁾. Our data show that TBI at a 5 Gy dose may affect the expression of high-molecular-weight proteins and albumin itself in blood, acutely, with identified albumin reduction up to 24 h after irradiation; with constitutive overexpression observed 48 h after exposure, with levels being kept high over time, differently from the control levels. This fact may contribute to worsen side effects, as albumin is one of the main blood proteins,

responsible for blood osmolarity control and great part of transportation of substances as hormones and medicines.

The findings demonstrated the existence of distinct behaviors in the expression of proteins with molecular weight greater than that of albumin, and albumin itself, in the cardiac territory. Thus we observe a high dynamics for SG4 in favor of time. After 12 h exposure, decreased expression was observed, as an acute effect, with its expression gradually increasing after 24 h on hours 48,

72, and 96 after exposure. This behavior was reduced within 35 days, remaining apparently with a lower expression than control levels even after one month of radiation. However, late analyses need to be further investigated, since metabolic alterations are also influencing this variation.

SG3 proteins behave differently from SG4, because after irradiation three discriminated proteins reduce their expression when compared with the control. However there is a marked increase of expression on hour 96, kept 35 days after the assay, a fact that corroborates the hypothesis of a modulation and/or protein reprogramming, with the new baseline levels becoming higher than the presented controls.

SG2 presents distinct behaviors, because it initially exhibits a slight increasing expression up to hour 72, when a marked increase appears and continues up to day 35 after the assay. SG1 proteins are very stable; they do not demonstrate major variations in relation to the control. There is little resolution regarding the proteins of this subgroup.

Conclusion

The findings from the assays indicate that the expression and the serum concentrations of proteins of molecular weight greater than or equal to that of albumin are modulated and/or reprogrammed by TBI. It was demonstrated that there is still no stable behavior pattern of electrophoretic profile to differentiate a radiation-induced pathology, but a temporal dynamics pattern. We observed changes in the expressions of the aforementioned proteins, especially: 1) inhibition; 2) increase and modulated reduction in time, with the physiologic expression remaining altered in contrast with the control; 3) a stable behavior, not altered by radiation. Yet, it is worth noting that all the observed changes are distinct from those described in the literature for infectious, inflammatory and hypersensitivity processes caused by traumatic events.

Our data suggest the existence of a group of genes and proteins whose expression is radiation-induced. Its activation or inhibition promotes acute modulation in time kinetics, with signs of a systemic late reprogramming of plasma proteins of molecular weight greater than that of albumin in individuals subject to TBI.

Resumo

Introdução: A radiação de corpo inteiro induz alterações agudas e tardias no perfil proteico sanguíneo. Objetivo: O presente estudo tem como escopo analisar em cinética de tempo o perfil eletroforético de bandas de expressão das proteínas solúveis do sangue, na faixa de peso molecular superior e igual à albumina, moduladas por radiação ionizante no território cardíaco em modelo animal. Materiais e métodos: Animais foram expostos à radiação de Co-60, em dose de 5 Gy corpo inteiro. Foram coletadas amostras de soro sanguíneo em ratos Wistar isogênicos (no grupo-controle e no irradiado). Em uma cinética de tempo de 12, 24,

48, 72 e 96 horas e 35 dias pós-exposição, foram realizadas toracolaparotomias com anestesia profunda e, posteriormente, foi coletado 0,3 ml de sangue entre ventrículo esquerdo e artéria pulmonar. As amostras foram heparinizadas, sendo, em seguida, separados seus componentes por centrifugação. As bandas proteicas de peso molecular similar foram identificadas por eletroforese vertical a 10%, coradas com prata. Resultados: Os achados indicam alteração aguda sistêmica da expressão das proteínas de peso molecular superior ou igual à albumina em gel de acrilamida, representando supressão e aumento de expressões por meio da modulação de bandas preexistentes identificadas em cinética de tempo. Conclusão: Esses achados apontam tanto para uma alteração aguda modulada no tempo da expressão proteica quanto para uma alteração moderada tardia da expressão gênica.

Unitermos: efeitos de radiação; albumina sérica; sangue; eletroforese em gel de poliacrilamida; eletroforese das proteínas sanguíneas.

References

1. Salvajoli JV. Radioterapia em oncologia. São Paulo, SP: Editora Médica e Científica; 1999. p.1181-93.
2. Hussein S, El-Khatib E. Total body irradiation with a sweeping 60 Cobalt beam. Int J Rad Onc Biol Phys. 1995; 33: 493-7.
3. Salz H, Bohrisch B, Howitz S, et al. Intensity-modulated total body irradiation (TBI) with TomoDirect™. Radiat Oncol. 2015; 10(58). DOI:10.1186/s13014-015-0362-3.
4. Quast U. Physical treatment planning of total body irradiation: patient translation and beam zone method. Med Phys. 1985; 12: 567-74.
5. Galvin GP, Glasgow EB, Podgorsak J, Van Dyk JM. The physical aspects of total and half body photon irradiation. A report of task group 29 Radiation Therapy Committee American Association of Physicists in Medicine. American Association of Physicists in Medicine by the American Institute of Physics. 1986.
6. Solter PF, Walter EH, Hungerford LL, et al. Haptoglobin and ceruloplasmin as determinants of inflammation in dogs. Am J Vet Res. 1991; 52: 1738-42.
7. Gruys E, Obwolo MJ, Tousaint MJM. Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. Vet Bull. 1994; 64: 1009-18.
8. Paula e Silva RO, Lopes AF, Faria RMD. Eletroforese de proteínas séricas: interpretação e correlação clínica. Rev Med Minas Gerais. 2008; 18(2): 16-122.
9. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. N Engl J Med. 1999; 340: 448-54. Celso V. Lima; Tarcisio P.R. Campos



10. Giraudel MJ, Pagès J, Guelfi J. Monoclonal gammopathies in the dog: a retrospective study of 18 cases (1986-1999) and literature review. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2002; 38: 135-47.
11. Murata H, Shimada N, Yoshimoka M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet J.* 2004; 168: 28-40.
12. Cardoso MJL, Machado LHA, Moutinho FQ, et al. Sinais clínicos do linfoma canino. *Arch Vet Sci.* 2004; 9: 25-9.
13. Dhaliwal RS, Kitchell BE, Messick JB. Canine lymphosarcoma: clinical features. *Compend Contin Educ Pract Vet.* 2003; 25: 573-81.
14. Gordon AH. Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels. New York: Elsevier; 1995. 213p.
15. Lammeli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680-5.
16. Saquetti CHC, Faleiros RR, Macoris DG, Fagliari JJ, Silva SL. Perfil eletroforético do proteinograma sérico de equinos com obstrução experimental do cólon menor. *Arq Bras Med Vet Zootec, Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.* 2008; 60(4): 794-9.
17. Madewell BR. Tumor markers. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, editors. *Clinical biochemistry of domestic animals.* 5 ed. San Diego: Academic; 1997. p. 761-84.
18. Mac Ewen EG, Hurvitz AI. Diagnosis and management of monoclonal gammopathies. *Vet Clin N Am Small Anim Pract.* 1977; 7: 119-32.
19. Kang D, Gho YS, Suh M, Kang C. Highly sensitive and fast protein detection with Coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *Bull Korean Chem Soc.* 2002; 23(11): 1511.
20. Muratsubaki H, Satake K, Yamamoto Y, Enomoto K. Detection of serum proteins by native polyacrylamide gel electrophoresis using Blue Sepharose CL-6B-containing stacking gels. *Anal Biochem.* 2002; 307: 337-40.
21. Toledo JM, Siqueira SL, Falcao PL, Campos TPR. Phenotypic behavior of PBMCs from irradiated dogs based on flow cytometry. *J Biol Reg and Homeostatic Agents.* 2013; 27(2): 309 17.
22. Falcao PL, Cuperschmid EM, Trindade BM, Campos TPR. Transforming growth factor-beta and matrix metalloproteinase secretion in cell culture from ex vivo PBMC after exposure to UV radiation. *J Biol Reg Homeostatic Agents* 28th. 2014; 2: 333-40.
23. Calazans SG, Daleck CR, Fagliari JJ, et al. Proteinograma sérico de cães sadios e com linfoma obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2009; 61(5): 1044-8.



Capítulo 6

AUMENTO DE VIABILIDADE DE CLONES RADIOSENSÍVEL (PBMC) E RESISTENTE (MDAMB-231) NA COBALTOTERAPIA EM TAXA DE DOSE REDUZIDA.

Artigo publicado na revista: Radiologia Brasileira.



AUMENTO DE VIABILIDADE DE CLONES RADIOSENSÍVEL (PBMC) E RESISTENTE (MDAMB-231) NA COBALTOTERAPIA EM TAXA DE DOSE REDUZIDA

Falcão PL¹, Motta BM¹, Lima, FSC¹, Lima CV¹, Trindade BM¹, Campos TPR¹

Departamento de Técnicas Nucleares, Prédio PCA1, Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG); Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 31.270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil. Tel: +553134096666; Fax: +553134096660

RESUMO

O câncer de mama tem sido nos últimos anos alvo de atenção parte das políticas de saúde pública e pesquisas têm sido desenvolvidas em todo o mundo devido à sua alta incidência e mortalidade, especialmente no Brasil. Estudos *in vitro* continuam sendo de grande interesse com objetivo de investigar as respostas celulares produzidas frente às doses de radiação administradas e as respectivas taxas, afim de fornecer melhor suporte a radioterapia clínica. No presente estudo foi investigado e comparado o comportamento *in vitro* de linhagem de adenocarcinoma mamário MDA MB-231, radio resistente e de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), como modelo sensível à radiação. As PBMC compõem a resposta imunológica e são capazes de induzir quadros de imunossupressão em diferentes graus. As linhagens foram irradiadas com Co-60, baixa LET (Linear Energy Transfer), com doses de 2 e 10 Gy, em duas taxas de exposição distintas, sendo a última um quarto da primeira, presentes em um período de 10 anos da cobalto terapia, tomados em distancia fonte-superfície de 51,5 cm e a 103 cm, respectivamente. As coletas pós-irradiação foram realizadas em cinética temporal pré-estabelecida de 24, 48 e 72 h, tomadas em triplicata. Para as avaliações da curva de crescimento celular, foi avaliada a resposta da densidade óptica (DO) referente ao ensaio de metabolização do MTT. Os resultados demonstraram diferenças significativas em relação à viabilidade celular para as duas linhagens avaliadas para doses e taxas de dose crescentes de radiação. A linhagem radioresistente MDA MB-231 apresentou viabilidade celular similar ao controle após receberem 2 Gy em comparação com as PBMCs nas duas taxas de dose aplicadas. Nos intervalos de tempos investigados, observou-se uma expansão clonal de MDA MB-231 em baixa dose, independente da taxa de dose e tempo fenômeno evidenciado principalmente após 48 h em cultura. No entanto, tanto a 2 e 10 Gy, observou-se diminuição significativa na curva de viabilidade na taxa de dose maior, e recuperação de clonogenicidade a 48 e 72 h, em taxa de dose reduzida a um quarto, sugerindo a importância fundamental da taxa de dose, em tempo ou distância redimensionada. As investigações radiobiológicas em linhagens sensível e radioresistente, em duas taxas de dose, demonstraram que há ampliação da viabilidade de clones radiosensível (PBMC) e resistente (MDAMB-231) em taxa de dose reduzida em período de duas meias vidas do Co-60, tendo como possível impacto clínico a redução do controle tumoral em câncer de mama em cobaltoterapia.

Palavras-chave: Radiação, MDA-MB-231, PBMC, LET, dose e taxa de dose.



I. INTRODUÇÃO

A carcinogênese é um processo no qual a função fisiológica normal das células vivas é alterada, resultando em crescimento anormal e incontrolável de determinado órgão ou tecido. [1] A noção de que o câncer provém do descontrole dos mecanismos de divisão celular é relativamente recente. Sabe-se que a divisão celular é controlada por uma rede de sinais que atuam em sinergia, determinando o momento exato da divisão, a sua frequência e como os erros ocorridos podem ser reparados. Mutações em um ou mais segmentos desta rede podem desencadear crescimentos tumorais. No entanto, é pouco provável que uma única alteração genética ou um único agente explique o câncer. Os estudos sobre o câncer de mama são caracterizados por esforços prodigiosos e enormes gastos públicos e privados. No que se refere aos estudos de suas causas, têm sido, em grande parte, de caráter epidemiológico, com o suporte de técnicas experimentais em biologia celular e molecular [2,3].

Dentre os estudos desenvolvidos no campo da oncologia, encontram-se investigações de agentes exógenos e endógenos possivelmente relacionados ao desenvolvimento, desencadeamento e/ou inibição do câncer, tais como genes, enzimas, quimioterápicos, radiações ionizantes, hormônios, receptores celulares, entre outros. A radioterapia representa parte integrante do tratamento primário conservador do carcinoma mamário, com o objetivo de se obter um melhor controle tumoral *in situ* [4,5] O estudo dos efeitos das radiações ionizantes em nível celular é importante para a compreensão da indução de alguns fenômenos, dentre os quais se encontra a apoptose e a clonogenicidade [6,7].

O objetivo da radioterapia moderna é alcançar um índice terapêutico favorável, levando células malignas a perderem a sua clonogenicidade, ao mesmo tempo em que se possam preservar ao máximo os tecidos normais. A radiação gama, utilizada nos tratamentos de radioterapia para o câncer de mama, é classificada como ionizante. As radiações ionizantes, ao interagirem com os tecidos vivos, podem causar diversos danos celulares. Estas interações podem ser desde completamente reparadas, tornando-se inócuas, até tão graves que levem à morte celular, passando pelos seus possíveis efeitos mutagênicos ou de diminuição da função celular. [8] Outra importante ação é a perda da clonogenicidade dos clones cancerosos em evolução. Há testes bioquímicos que podem avaliar a viabilidade celular de linhagens após ação de agente exógeno, como a radiação ionizante. Vale a pena mencionar que a resposta clínica da mesma está relacionado a radio sensibilidade e resistência das células alvo, que está associado à atividade clonogênica das linhagens em estudo e sua sensibilidade à radiação. Quanto mais indiferenciado e proliferativo o tecido, mais sensível à radiação e, ele no outro extremo, quanto mais diferenciado e estável, mais resistente. Uma ampla variedade de sistemas bioquímicos celulares é ativada pela radiação ionizante. É provável que lesões a esses alvos desencadeiem uma expressão gênica alterada. Alterações na cinética do ciclo



celular também ocorrem, e células podem ser induzidas a paralisação do ciclo e a apoptose [1]. As alterações genéticas e metabólicas produzidas pela radiação ionizante em células cancerosas são complexas e ainda necessitam maior entendimento.

As radiações podem ser classificadas de acordo com a densidade de eventos ionizantes que provocam em um volume de tecido. A radiação gama é considerada de baixa LET (*Linear Energy Transference*), ou seja, possui uma densidade de ionização esparsa. O uso de radiação de baixa LET é um importante instrumento no tratamento do câncer. Os mecanismos de reparo do DNA, conseqüentemente recuperação da habilidade clonogênica, após irradiação com baixa LET devem ser investigados para o entendimento dos resultados da radioterapia clínica. [9] Conforme se amplia a compreensão do efeito biológico molecular das radiações, também se aumenta a capacidade de manipular esse processo para obtenção de vantagem terapêutica, com a identificação de alvos moleculares específicos ou alteração dos agentes exógenos como dose, taxa de dose, e escolha de partículas de diferentes LETs.

Dos protocolos de radioterapia utilizados no tratamento do câncer de mama está a exposição da mama a dois campos opostos tangenciais, em frações de 1,8 a 2,0 Gy diários, cinco dias semanais, em múltiplas frações até o acúmulo de 45 a 50 Gy. Os espectros energéticos empregados envolvem feixes gerados de aceleradores lineares de 4 e 6 MV, ou por Co-60. O Co-60 decai em emissão beta em Ni-60, com uma meia-vida de 5,2714 anos, emitindo raios gamas com energias de 1,17 MeV e 1,33 MeV. Após uma meia vida, a atividade e a taxa de dose cai pela metade. Após uma década, a taxa de dose reduz para um quarto. Devido a dificuldades encontradas na substituição da fonte selada de Co-60 nos sistemas de cobaltoterapia é comum encontrarmos centros de radioterapia cujo aparelho tem sua atividade, e conseqüentemente, a taxa de dose reduzida pelo tempo de uso do mesmo. Na cobaltoterapia, a dose prescrita do tratamento poder ser ajustada com o tempo de exposição; entretanto, não é possível corrigir a taxa de dose durante o tratamento. Já é conhecido na literatura que a sobrevivência das linhagens cancerosas imortalizadas altera não só com a cinética de dose, mas também com a variação da taxa de dose. É consenso dos físicos médicos que variações da taxa de dose encontradas na aplicação da cobaltoterapia no período de uma década não influenciariam o tratamento; apesar de que, em termos radiobiológicos, alteração na clonogenicidade celular é observada em função da taxa da dose absorvida.

Dentro desse contexto, é importante avaliar a variação da resposta clonogênica de células cancerosas irradiadas, em modelo *in vitro* sensível e radioresistente, em função da dose de radiação recebida e da taxa de dose, na faixa do domínio da cobaltoterapia. Dessa forma, é possível verificar os efeitos deletérios das radiações ionizantes, de modo a auxiliar no equacionamento do tratamento radioterápico a ser seguido.

Este estudo foi subdividido em duas etapas, referente aos dois tipos de linhagens empregados. A primeira foi constituída por experimentos utilizando-se o modelo de cultura celular *in vitro*, com PBMCs, que conferiu boa eficiência para demonstrar a cinética de viabilidade celular e monitoramento de proliferação celular frente a diferentes doses submetidas a duas taxas de dose de radiação. Simultaneamente, os experimentos utilizaram a linhagem de câncer de mama MDA MB-231, também frente a diferentes doses de radiação e duas taxas de dose, sendo uma o quarto da primeira.

II. MATERIAL E MÉTODOS

Linhagens pré-estabelecidas e manutenção das culturas. Foram empregadas Células Mononucleares do Sangue Periférico – PBMC e linhagem de adenocarcinoma de mama – MDA MB-231. A linhagem de mama de origem de adenocarcinoma tem morfologia epitelial, derivada de um sítio metastático. As células de carcinoma mamário humano MDA MB-231 foram doadas pela Dra. Mirian Paz do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas – ICB/UFMG. As células do sangue periférico humano (PBMC) foram obtidas de voluntários saudáveis. As culturas celulares foram mantidas em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de SBF e antibióticos gentamicina (50µg/µl) e estreptomicina (500mg/mL), em frascos de cultura T-25 em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37 °C. A MDA MB231 confluiu de forma aderente no frasco de cultura.

Separação das células PBMC. As células mononucleares do sangue periférico de pacientes foram separadas segundo procedimento descrito por GAZZINELLI e colaboradores (1983). O sangue heparinizado foi aplicado em tubos de 15 mL (PyrexLaboratoryGlassware), siliconizados contendo uma mistura de Ficoll-diatrozato, obtida comercialmente (LSM - LymphocyteSeparationMedium, OrganonTeknika Corporation, Durhan, NC), na proporção de uma parte de Ficoll-diatrozato para duas partes de sangue. A preparação era submetida à centrifugação por 30 min, a 1400 rpm à temperatura ambiente. Ao final da centrifugação, obteve-se um anel de células mononucleares na interface entre o Ficoll e o plasma, o qual foi cuidadosamente removido com o auxílio de uma pipeta Pasteur (Thomas LaboratorySpecialities) e transferido para tubos de fundo cônico de 15 mL estéreis (2070 GraduatedConical Tube, Falcon). O volume foi completado para 15 mL com solução RPMI-1640 (GIBCO) não suplementado e se procedeu a outra centrifugação (10 min, 1200 rpm). As células foram lavadas por mais duas vezes (10 min, 1200 rpm). Ao final, uma alíquota da suspensão de células foi coletada e diluída (1:20) em tubo eppendorf contendo 90 µL de solução de Türck's, e o número de células determinado através de contagem em câmara de Neubauer, com o auxílio de um microscópio ótico. A concentração de células foi ajustada para uma suspensão contendo 10 x 10⁶ células/mL de RPMI-1640 suplementado. Toda manipulação das células foi realizada em condições estéreis, em capela de fluxo laminar (BBL – BiologicalCabinet, modelo 60474).

Controle. O controle foi feito com culturas de PBMCs e MDA MB-231 não irradiadas, mantidas em cultura como descrito.

Irradiação. As garrafas T-25 contendo as células foram vedadas com parafilme e transportadas dentro de um frasco plástico rígido tampado, previamente descontaminado com álcool a 70%, até o local de irradiação. Uma placa espessa de material tecido equivalente foi colocado abaixo do frasco T-25, bem como, o meio de cultura foi preenchido até 5 mm de altura, em relação a superfície das células aderidas. Este procedimento foi necessário para alcançar o equilíbrio eletrônico, e garantir as doses prescritas nas células aderentes. Frascos T-25 de cultura confluentes foram submetidas à irradiação com Cobalto-60, aparelho de radioterapia Gammatron 580 do Hospital Luxemburgo/Belo Horizonte. O campo foi de 35 x 35 cm² à temperatura ambiente. Após a exposição, as células retornaram à incubadora de CO₂.

Cinética de dose. Foram empregadas doses de 2 e 10 Gy para células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) e para a linhagem MDAMB231. O valor elevado de 10 Gy foi adotado para que fosse efetivamente observadas variações clonogênicas na linhagem radioresistente MDAMB-231, na cinética de tempo e taxa de dose.

Cinética de taxa de dose. Foram empregadas duas taxas de dose. Uma foi tomada o quarto da primeira, obtidas pela aproximação da amostra a ser irradiada da fonte de Co-60. Assim, uma amostra foi irradiada a uma distância fonte-superfície de 103 cm e a outra a 51,5 cm. As taxas de dose variam diariamente e suavemente na cobaltoterapia. No, caso, as amostras foram irradiadas ao mesmo tempo, no mesmo dia.

Coleta de amostras. Alíquotas de células irradiadas, homogeneizadas e em suspensão, das culturas de PBMCs e MDA MB-231 foram coletados de garrafas (T-25) confluentes, em triplicatas. As triplicatas de alíquotas de 500 µL foram coletadas das garrafas T-25 e transferidas para eppendorfs utilizando-se pipeta automática (Pipetman-P, Gilson). Os eppendorfs foram identificados para realização do teste de MTT. Um segundo grupo de amostras foi estocado a -20 °C para posterior investigação do perfil de citocinas/fatores de crescimento.

Cinética no tempo. Os frascos de culturas *in vitro* que foram submetidas às doses e taxas de dose supracitadas, retornaram para estufa de CO₂ a 37 °C após a irradiação. Alíquotas de células irradiadas e não irradiadas (controle) foram coletados em tempos pré-estabelecidos, em 24, 48 e 72 h pós-irradiação, respectivamente.

Avaliação de Viabilidade. Das triplicatas de alíquotas de distintos tempos de irradiação, foram plaqueadas 100 µL de amostra em cada poço, em placas 12 x 8 poços de fundo plano, e mantidas em incubação por 24 h. Foram adicionados 20 µL (5 mg/mL) de MTT (3-(4,5dimethylthiazol-2yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide) em cada poço e as amostras retornaram para a incubadora onde permaneceram metabolizado o MTT por 4 h. Após a metabolização, 80 µL foram descartados de cada poço e foram adicionados 80 µL de isopropanol (0,04 M). As placas foram incubadas por mais 18 h. A viabilidade celular foi mensurada pela medida da densidade óptica (DO) utilizando o leitor de ELISA no comprimento de onda de 595 nm. A primeira fileira correspondente ao branco da leitora de ELISA (análise de imunoabsorção por ligação enzimática). As placas foram lidas com o comprimento de onda de 595 nm no aparelho de ELISA, Elx800, Universal Microplate Reader, Bio-Tek Instruments Inc.

Análise Estatística. Foi feita uma comparação intragrupos, de acordo com duas doses (2 e 10 Gy) e duas taxas de dose diferentes para cada uma dessas doses. Utilizou-se o teste T-student para obtenção da média de densidade óptica obtidas nas leituras. Foi adotado um nível de significância de 5%. O software utilizado para as análises foi SPSS para Windows 7.

III. RESULTADOS

III.1 Viabilidade de PBMCs pós 2 e 10 Gy por Co-60

De acordo com os cálculos realizados no Departamento de Física Médica do Hospital Luxemburgo no dia de irradiação das amostras, as taxas de dose utilizadas foram: taxa padrão 339,56 cGy/min (X) e um quarto da padrão 84,89 cGy/min (X/4).

O teste de viabilidade celular pelo MTT teve como princípio a verificação da viabilidade e quantificação da proliferação celular baseada na clivagem do sal tetrazólio (MTT). Após a incubação das células submetidas a esse ensaio, formou-se uma solução corante, que é medida através de leitor de ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay), e dessa forma foi possível correlacionar a absorbância com o número de células. Foi realizada uma avaliação quantitativa da viabilidade celular utilizando as linhagens radiosensível e radorresistente, respectivamente, com o intuito de demonstrar que as células viáveis após a irradiação foram capazes de formar cristais de formazan em torno das mesmas pela clivagem do sal tetrazólio. Após a incubação das células submetidas a esse ensaio, formou-se uma solução corante, que foi visualizada em microscópio óptico conforme pode ser observado na Figura 1.

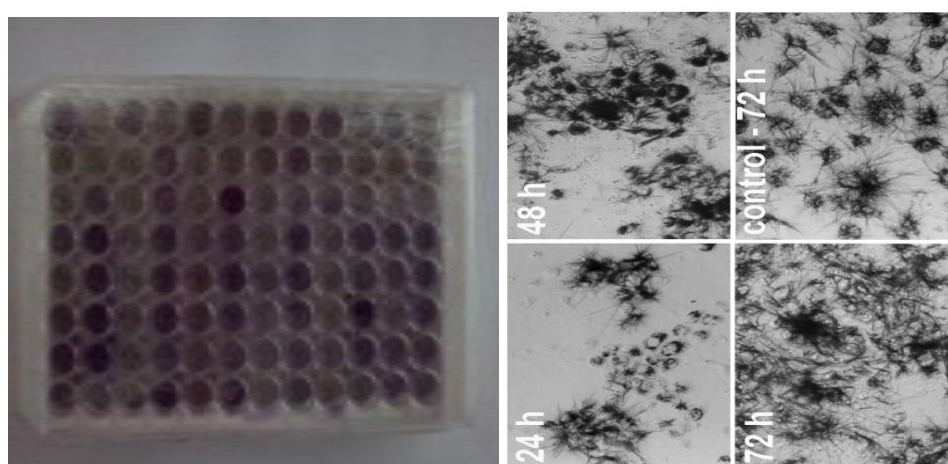


Figura 1 – Fotografia das culturas submetidas ao teste do MTT, apresentando duas fileiras de poços com presença da formação do cristal de Formazan e imagem de um dos poços, indicando a formação de cristais superpostos à células inviáveis.

Dose de 2 Gy nas taxas padrão e um quarto da padrão. A Figura 2 mostra a curva de viabilidade celular avaliada pelo teste de MTT para a cultura de PBMCs *in vitro*, de suspensão homogenizada de células de frascos (T-25) de cultura de PBMCs que foram irradiadas com 2 Gy na taxa de dose padrão de 339,56 cGy/min e um quarto da padrão.

Os dados mostram uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) da densidade ótica (DO) na dose de 2 Gy em relação ao controle em todos os tempos estudados. Pode-se mostrar também uma equivalência da redução da sobrevivência da linhagem no tempo de 24 h para ambas as taxas de dose. É interessante notar que nos tempos pré-estabelecidos foi observado o aumento da proliferação celular no controle (não irradiado), que pode ser devido ao processo fisiológico de replicação celular (mitose). Entretanto, no tempo de 48 h, comparando a viabilidade celular na taxa de dose X e X/4, sugere-se que na linhagem radiosensível os efeitos da taxa de dose de radiação já podem ser percebidos através da alteração da viabilidade mostrando que a redução da taxa de dose induz maior viabilidade. O mesmo efeito pode ser observado à 72 h; entretanto, de forma menos pronunciado.

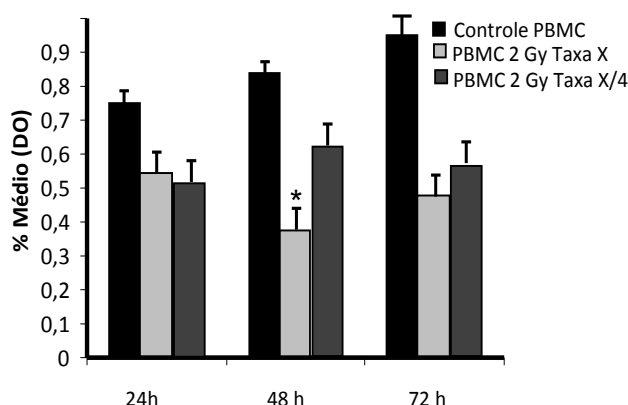


Figura 2 – Curva de sobrevivência determinada pelo teste de MTT, antes e após exposição de cultura *in vitro* de PBMCs na dose de 2 Gy. A barra preta representa o controle de células não irradiadas e a barra cinza claro representa suspensão de cultura irradiada com 2 Gy. As células foram irradiadas com a taxa de dose X e X/4. As barras expressam a média de triplicatas e o desvio-padrão para culturas de PBMCs, irradiadas na dose de 2 Gy e também para o respectivo controle (não irradiado). * Representa diferença estatisticamente significativa em relação às barras sem *. ($p < 0,05$).

Dose de 10 Gy nas taxas padrão e um quarto da padrão. A diminuição da viabilidade celular foi extremamente significativa ($p < 0,05$) nos tempos de 24, 48 e 72 h, não somente em relação ao controle não irradiado, , mas também de forma equivalente para as duas taxas de dose, conforme podemos observar na Figura 3, tendo o percentual médio de DO sido reduzido à ~7 a 15%, principalmente em 72 h, sugerindo que alta dose potencializa a morte celular em cultura, com uma tendência de irreversibilidade na viabilidade da mesma, quando a dose foi aplicada com a taxa 339,56 cGy/min. Entretanto, a um quarto da taxa de dose, apesar da redução da DO, pode

ser verificado um efeito de reversibilidade no decréscimo da viabilidade celular em 48 h e mesmo 72 h.

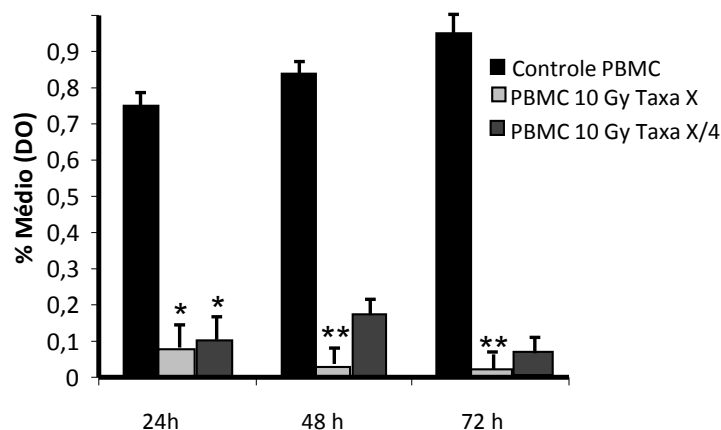


Figura 3 – Curva de sobrevivência determinada pelo teste de MTT, antes e após exposição de cultura *in vitro* de PBMCs de indivíduo sadio na dose de 10 Gy. A barra preta representa o controle de células não irradiadas e a barra cinza claro representa suspensão de cultura irradiada com 10 Gy. As células foram irradiadas com a taxa de dose $X = 339,56$ cGy/min e $X/4$. As barras expressam a média de triplicatas e o desvio-padrão para culturas de PBMCs, que foram irradiadas na dose de 10 Gy e também para o respectivo controle (não irradiado). * Representa diferença estatisticamente significativa em relação às barras sem *. ($p < 0,05$).

III.1 Viabilidade da linhagem MDAMB-231 pós 2 e 10 Gy por Co-60

Dose de 2 Gy nas taxas padrão e um quarto da padrão. A Figura 3 mostra a curva de viabilidade celular avaliada pelo teste de MTT para a suspensão de células MDA MB-231 *in vitro*. A Figura 3 mostra a curva de viabilidade celular avaliada pelo teste de MTT para a cultura de MDA MB-231 *in vitro*, da cultura de MDAMB-231 em frasco(T-25) que foram irradiadas com 2 Gy na taxa de dose 339,56 cGy/min e um quarto da mesma.

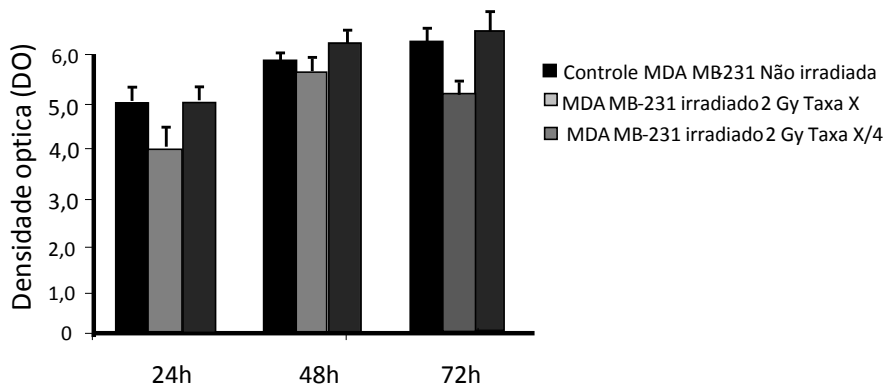


Figura 3– Curva de sobrevivência determinada pelo teste de MTT, antes e após exposição de cultura *in vitro* de linhagem de adenocarcinoma mamário MDA MB-231 na dose de 2 Gy na taxa X = 339,56 cGy/min e X/4. A barra preta representa o controle de células não irradiadas. A barra cinza claro representa suspensão de cultura irradiada com 2 Gy. As barras expressam a densidade óptica (DO) para culturas *in vitro* da linhagem MDA MB-231, às quais foi adicionado a suspensão proveniente de cultura de garrafas que foram irradiadas nas duas doses e também para o respectivo controle (não recebeu a suspensão e não foi irradiado)

O experimento controle mostrou a capacidade das células MDA MB-231 preencherem o frasco T-25 e manter-se clonogênicas além de 48 h pós confluentes sem troca de meio, conforme podemos observar na curva de viabilidade do controle (Figura 3). O experimento controle mostrou também que após 72 h a concentração de células é alta e a densidade celular leva ao elevado de consumo de nutrientes do meio suplementado, tornando-o ácido devido aos subprodutos excretados em período de tempo de 70-120 h, nas condições de não troca de meio.

Considerando uma baixa dose de radiação, os resultados observados nesse ensaio foram opostos às observações feitas para as PBMCs em cultura, nas mesmas condições de exposição e doses correlatas. Os dados, além de não apontarem diminuição da viabilidade celular após a irradiação com 2 Gy, mostraram um aumento dessa viabilidade, sugerindo uma expansão clonal nessa dose, principalmente após 48h em cultura. As mesmas observações foram feitas para a dose de 2 Gy na taxa em um quarto da taxa de dose, sugerindo também uma radiorresistência quando a dose foi reduzida (Figura3).

Pode se observar que a redução da taxa de dose não impactou significativamente na sobrevivência a 24 h, mas tornou-se impactante na viabilidade a 48 e 72 h, sendo que a taxa menor leva a um aumento na sobrevivência celular ao longo do tempo.

Dose de 10 Gy nas taxas padrão e um quarto da padrão. A Figura 4 evidenciou uma diminuição significativa ($P < 0,05$) da viabilidade celular quando a suspensão de células recebeu a dose de 10 Gy mensurados a 24 h após a exposição na taxa 339,56 cGy/min em relação ao controle não irradiado. A diminuição da viabilidade celular com esta dose acompanhou a cinética de tempo de forma crescente em contraste com o efeito observado quando a suspensão de células recebeu a dose de 2 Gy na mesma taxa.

Da mesma forma que células radiosensíveis, o comportamento dos clones radioresistentes de MDAMB231 mostram recuperação da viabilidade na taxa reduzida, enquanto na taxa padrão esta recuperação não é perceptível.

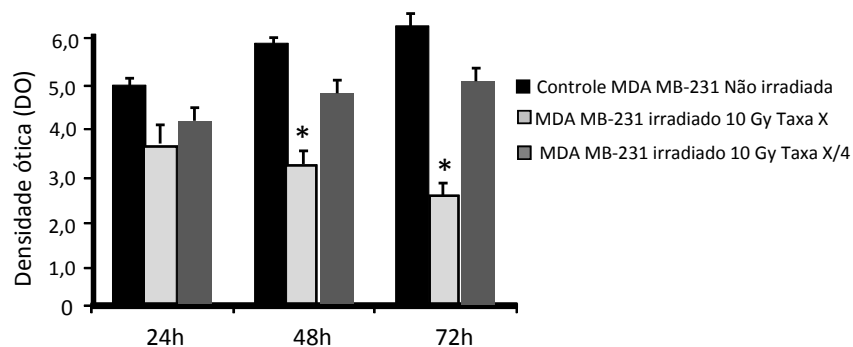


Figura 4 – Curva de sobrevivência determinada pelo teste de MTT, antes e após exposição de cultura *in vitro* de células MDA MB-231 na dose de 10Gy. A barra preta representa o controle de células não irradiadas e a barra cinza claro representa suspensão de cultura irradiada com 2 Gy. As células foram irradiadas com a taxa de dose $X = 339,56$ cGy/min e $X/4$. As barras expressam a média de triplicatas e o desvio-padrão para culturas de células MDA MB-231, irradiadas na dose de 10Gy e também para o respectivo controle (não irradiado). * Representa diferença estatisticamente significativa em relação às barras sem *. ($p < 0,05$).

Morfologia de linhagens irradiadas. A Figura 5 mostra células MDA MB-231 não irradiadas obtidas do frasco controle, além de poços de cultura de MDA MB-231 irradiadas em tempos de exposição distintos. As células apoptóticas apresentam uma morfologia diferenciada em relação ao tamanho e granulosidade, sendo muito mais granulosas do que aquelas que não sofreram os danos decorrentes da radiação. Há indícios de presença de vacúolos e corpos apoptóticos existentes. Há também a presença de células disformes com possível indicação de necrose. É interessante notar que os aspectos morfológicos de células em cultura da linhagem de adenocarcinoma mamário MDA MB-231 já haviam sido abordados anteriormente em outro estudo sugerindo efeitos deletérios nas doses mais elevadas (10 Gy). Estudos de Campos & colaboradores (2010), que corroboram nossas observações, mostraram a análise de imagens providas de frascos com células da linhagem MDA MB-231 durante a irradiação e sugeriram a existência de processos apoptóticos.

A figura 5 ilustra no lado esquerdo, uma cultura de células radio resistentes MDAMB-231, no estado controle com 100% de confluência, e ao lado direito as mesmas células irradiadas com a dose de 10 Gy e com a taxa de dose de 345 cGy/ minuto. Observamos nesta condição quatro modificações distintas, restos celulares devido à morte celular, células em apoptose, células indiferenciadas e ao centro células viáveis.

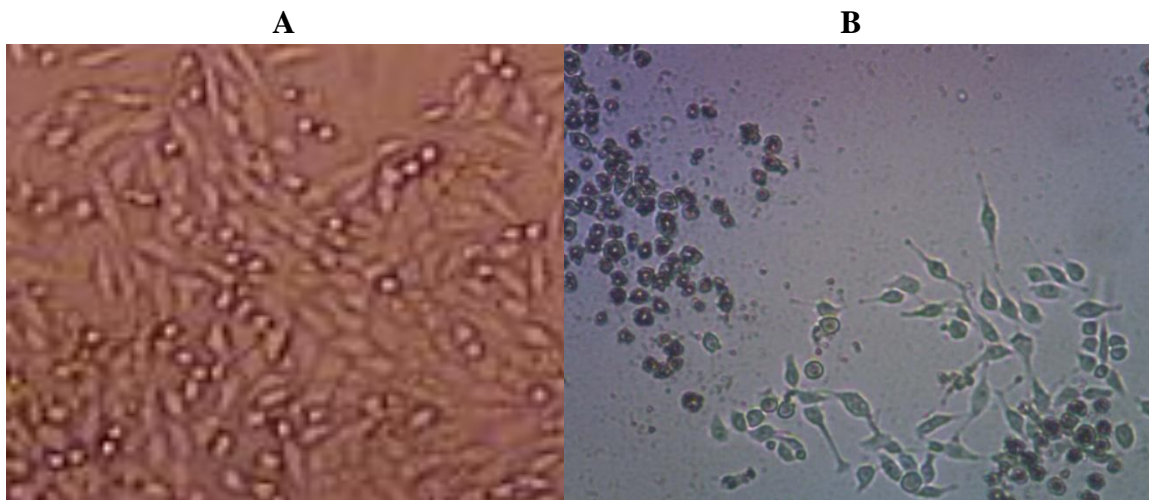


Figura 5 – morfologia das células MDAMB231 não irradiadas, previamente ao experimento e pós irradiadas à 10 Gy, em um campo onde aparece corpos apoptóticos e células ainda viáveis.

DISCUSSÃO

A redução de viabilidade celular com a dose confirmam os achados de Cocherham (2002) [11], que sugerem que os efeitos tóxicos da radiação sobre linhagens celulares dependem da dose total absorvida; entretanto, foi acrescido que é um fato tanto para as linhagens radioresistentes quanto radiosensíveis. Em nosso estudo, foi demonstrado que a viabilidade de linhagem proveniente de adenocarcinoma mamário e PBMC foi influenciada pela dose; mas também pela taxa de dose, de forma significativa. O efeito da taxa de dose pôde ser reconhecido através da análise de viabilidade nos tempos intermediários de 48 e 72 h que se seguiram após a exposição à radiação. Muito embora tenha ficado claro que o efeito da dose em si foi considerado impactante para indução de morte celular, levando, provavelmente, ao desbalanço entre proliferação e apoptose; a influência deste processo com variações da taxa de dose ainda não estão claros.

Vale a pena ressaltar que a dose é a quantidade total de energia absorvida por unidade de massa, enquanto a taxa de dose reflete a cinética de como essa dose é absorvida ao longo do tempo. Em radiobiologia, tanto a dose como a taxa da dose têm importância crucial, ou seja, doses elevadas podem ter efeitos diminutos se aplicados com taxas extraordinariamente diluídas, da mesma forma que reduzidas doses podem ter efeitos reconhecidos se dados em taxas de dose elevadas, em tempos muito curtos. [8] Em verdade, a taxa de dose reflete a maneira como os danos subletais são distribuídos e reparados ao longo do tempo.

O ensaio do MTT foi utilizado para a verificação da viabilidade celular, ou seja, as que mantiveram o metabolismo celular intacto. O ensaio do MTT é baseado na capacidade das células de reduzirem o brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio em cristais de formazan, metabolizado nas mitocôndrias, através da ação das desidrogenases. Este sal é transformado em cristais púrpuros denominados cristais de Formazan. Estes cristais são visualizados por microscopia óptica e a viabilidade celular é mensurada através da leitura de densidade óptica usando-se um aparelho leitor de ELISA com comprimento de onda de 595 nanômetros. Dentro deste contexto, foi realizado o ensaio demonstrando que é possível a avaliação da viabilidade celular *in vitro*, bem como monitorar micro e macroscopicamente a proliferação de linhagens celulares.

Como já nos reportamos anteriormente, o objetivo do tratamento radioterápico é o de conduzir o paciente a um índice terapêutico favorável, levando o tumor a perder a sua clonogenicidade, ao mesmo tempo em que se possam preservar ao máximo os tecidos normais adjacentes ao mesmo. [6] Dessa forma, a radioterapia deve ser utilizada com sucesso para o tratamento local do câncer primário. [14] No entanto, algumas linhagens tumorais submetidas ao tratamento se tornam potencialmente mais agressivas, no caso produzindo recidivas. Dentro desse contexto, um dos questionamentos levantados diz respeito ao planejamento do tratamento e de sua própria eficiência, considerando a relação entre efeito da taxa de dose na cobaltoterapia, visto que o Co-60 tem meia-vida de 5 anos, e após duas meias vidas (10 anos) a atividade atingiu $\frac{1}{4}$ da inicial, e conseqüentemente o tratamento radioterápico aplicado na mesma dose terá uma taxa de dose reduzida por $\frac{1}{4}$. Esta é uma situação presente nos centros de radioterapia, e conseqüentemente, pelos resultados radiobiológicos aqui apresentados, pode-se prever que o tratamento de cobaltoterapia será influenciado pelo tempo de decaimento da fonte primária, mesmo que a quantidade de ionização seja ajustada.

Estudos pioneiros de *Kaplan e Murphy* [16], em modelo experimental *in vitro*, demonstrou que a radiação ionizante pode exercer efeito prometastático paradoxal. Este efeito foi observado após doses consideradas insuficientes para induzir a morte de células malignas no tumor primário em experimentos com animais e raramente após tratamento com radiação curativa. Estudos mais recentes têm indicado que a radiação ionizante pode promover a seleção positiva de tumor pré-existente, intrinsecamente radiorresistente sugerindo uma explicação mecanicista atraente para a progressão do tumor induzido por radiação [14,15,16]. No entanto, há também evidências de que a radiação é capaz de induzir um fenótipo adaptativo destinado a regeneração de tecidos, que pode dar suporte ao comportamento metastático [17,18]. Esta alteração de fenótipo pode ser compreendido como uma resposta do estresse gerado pela radiação e pela tentativa de reparos dos danos ao DNA [17]. Em células individuais, danos ao DNA induz mecanismos moleculares específicos, principalmente orquestrados pelo eixo telangiectasia mutada (ATM), ataxia - p53, que são capazes de bloqueiar a replicação e reparação do DNA. [18,19] Se tal reparação falhar, uma célula normal é programada para executar a apoptose ou a sofrer supressão proliferativa através do processo de senescência. No entanto, após a morte das células danificadas por radiação, os tecidos devem restabelecer o seu número padrão adequado de células, em função da regeneração e/ou cicatrização pelas células sobreviventes, normal ou neoplásica. Tal como observado *in vitro*, este processo inclui a separação a partir da borda da ferida, a aquisição de um fenótipo de fibroblastos, a migração para a área vazia, e, possivelmente, a proliferação. O oncogene *Met* (*Epithelial-mesenchymal Transition*)



que codifica o receptor do fator de crescimento de hepatócitos (HGF) [20,21] e é conhecido por induzir ao crescimento invasivo através de um programa regenerativo e pró sobrevivência celular, é indevidamente ativado em casos de metástase. Este programa complexo tem sido referido mais recentemente, também como "crescimento invasivo" (GI) sendo de fundamental importância funcional para o desenvolvimento do câncer. É agora amplamente aceito que *MET* é um programa para o desenvolvimento fisiológico e regeneração tecidual que é inadequadamente ativado nas células malignas, muitas vezes como uma resposta adaptativa a condições ambientais adversas, levando à invasão e metástase. [14-16,22]

Estudos em modelo experimental têm demonstrado que as linhagens *MDAMB-231*, *MDAMB-435S* e *U251* apresentam perfil biomolecular diferenciado quando tratadas e não tratadas terapêuticamente, apresentando elevada expressão de mRNA e de proteínas. No estudo de *DeBacco e cols* [13], a expressão de proteínas e a transdução de sinal foram comparadas em células irradiadas e não irradiadas. A capacidade invasiva de células foi associada à não inibição de quinases de siRNA (silenciamento de RNA) *PHA665752* ou *JNJ-38877605* e também em ensaios de viabilidade e clonogênese. A associação de terapia direcionada para *MET* e radioterapia foi realizada em linhagens *MDA-MB-231* e *U251* em 6 camundongos que receberam xenoinxerto, sugerindo que a superexpressão e atividade do oncogene *MET* promove a invasão celular e é capaz de proteger as células malignas de entrarem em apoptose, através da via de sinalização *ATM* e *NF-kB*, induzindo à radioresistência. Nesse caso, a terapia direcionada para inibição dessas vias de sinalização tem induzido à radiosensibilidade. [12]

Em nosso estudo, células que apresentam padrão radiosensível foram irradiadas com doses (2 e 10 Gy) que potencialmente interferiram na clonogenicidade da linhagem altamente radiosensível (*Células Mononucleares do Sangue Periférico-PBMC*). As *PBMCs* estão envolvidas na resposta imunológica ao próprio tratamento, estando intimamente associadas à capacidade respondedora do paciente. Em contrapartida, investigamos a viabilidade de uma linhagem de adenocarcinoma de mama *MDAMB-231*, que apresenta comportamento radioresistente e é considerada alvo no tratamento radioterápico do câncer de mama. De acordo com estudo em modelo experimental, doses ineficientes de radiação poderiam definir o destino de uma linhagem de células malignas.[ref] Podemos também incluir que a taxa de dose pode também influir neste contexto.

No caso das *PBMCs* irradiadas, podemos sugerir que a alteração observada na diminuição da proliferação após a dose de 2 Gy poderia ser devido ao papel que a radiação ionizante possivelmente exerce deflagrando alterações biomoleculares, muito provavelmente ativando a fosforilação de quinases responsáveis pela cascata de apoptose na linhagem que apresenta radiosensibilidade, e que esse efeito já pôde ser observado numa dose considerada baixa, se compararmos com as doses observadas de 2 e 10 Gy.

Na dose de 2 Gy, o efeito da aplicação diluída no tempo parece ter efeito reconhecível se compararmos o percentual médio de DO para *PBMCs*. A diminuição da curva de viabilidade foi bem menos perceptível com a taxa reduzida a um quarto, nos tempos de 24, 48 e 72 h, muito embora tenhamos observado a diferença do controle não irradiado. Reportamos-nos a importância do impacto desse tempo na recuperação dessas células, na indução do processo fisiológico de replicação e/ou na mutagênese celular. Além disso, foi observada diminuição (embora não significativa) da

viabilidade celular, refletida pelo percentual médio de densidade óptica nas primeiras 24 h, quando a cultura de células foi irradiada também com doses intermediárias (dados não mostrados). Essa queda foi significativa nas 48 h seguintes em relação ao tempo de 24 h, sugerindo que as funções vitais das *PBMCs* já parecem ter sido afetadas após a exposição com essa dose. Vários fatores podem influenciar nos efeitos radio biológicos, tais como a qualidade da energia ionizante, a intensidade da radiação (efeito reversível e irreversível), a maneira da exposição - isto é, se de corpo inteiro ou de parte dele, se externa ou interna, se simples, continuada ou fracionada - o tempo de exposição e a distribuição de doses entre os diversos tecidos. É interessante notar que a recuperação significativa observada com o tempo de 72 h pode ter ocorrido devido ao processo fisiológico de blastogênese, e não porque os danos celulares possam ter diminuído.

O efeito da dose crescente diluída no tempo com a taxa reduzida a um quarto sugeriu que o processo fisiológico de replicação foi influenciado com o tempo de exposição uma vez que parece ter havido uma recuperação significativa do percentual de DO. Sugere-se então que a taxa de dose parece exercer um papel importante na forma como esses danos são potencializados na célula e, possivelmente, que a própria indução da cinética de morte celular possa ser desencadeada por vias de sinalização alternativas em função da dose administrada.

Em contrapartida, quando essa mesma dose foi administrada à cultura, num intervalo de tempo maior, em taxa de dose reduzida a um quarto, observamos que o efeito sobre a curva de sobrevivência foi melhor reconhecível a partir das 48 h, se considerarmos a dose de 2 Gy. No entanto, vale a pena ressaltar que com 72 h, podemos atestar uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da viabilidade celular. Vale a pena lembrar que o efeito de doses fracionadas de radiação já havia sido demonstrado anteriormente por *Soto & cols (1996)*, utilizando uma linhagem de câncer mamário com resistência intermediária na qual foi avaliada a proliferação de fibroblastos submetidos às doses muito mais baixas do que a utilizada em nosso estudo. [11]

Uma dose mais elevada (10 Gy) pode ter produzido um impacto sobre as vias enzimáticas que levam as células a entrar em apoptose numa cinética de tempo mais rápido, o que reflete a baixa DO observada nos três tempos de coleta (24, 48 e 72 h), com “start” de TNF- α e presença de *ROS (Reactive Oxygen Species)*. [23] Embora tenha ficado claro que o efeito da dose em si foi considerado impactante para indução de morte celular, levando ao desbalanço entre proliferação e apoptose, seria interessante que, num momento posterior, fossem marcados os receptores dessa linhagem radio sensível para apoptose, de acordo com *De Bacco (2011)*. [13]

Em relação à linhagem *MDAMB-231*, mesmo com a dose de 10 Gy, pôde ser observado que a taxa reduzida a um quarto, conferiu à linhagem maior potencial de recuperação a partir de 48 h pós-irradiação. Ensaio biomoleculares posteriores se fazem necessários para se detectar a atividade de *Met*, no caso de células *MDAMB-231*, bem como avaliar a qualidade de ligação do próprio fator de transcrição *NF-kB* promotor endógeno de *Met* na linhagem irradiada, já que a superexpressão de *NF-kB* aumenta a fosforilação e a transdução de sinal de *Met*. [24, 25, 26] A avaliação molecular desse fator de transcrição com as duas doses e com as taxas de doses diferentes talvez possa vir a justificar cinéticas de tempo de recuperação celular de *MDA-MB-231* tão diferenciadas entre o controle (*MDAMB-231*) não irradiado e as *MDAMB-231* com aumento de clonogênese após curto período de tempo, mesmo com dose elevada.

CONCLUSÃO

As investigações radiobiológicas em linhagens sensível e radioresistente, em duas taxas de dose, demonstraram que há ampliação da viabilidade de clones radiosensível (PBMC) e resistente (MDAMB-231) em taxa de dose reduzida em período de duas meias vidas do Co-60, tendo como possível impacto clínico a redução do controle tumoral em cobaltoterapia.

REFERÊNCIAS

- 1-Pollock, R. E.; *Uicc Manual De Oncologia Clínica*. 8 Ed. São Paulo: Fundação Oncocentro De São Paulo, 2006. 919 P.
- 2-Fentiman, I. S. *Diagnóstico E Tratamento Do Câncer Inicial De Mama*. Porto Alegre: Artes Médicas, 1993. 223 P.
- 3-Santos, C. E. R.; Mello, E. L. R. *Manual De Cicurgia Oncológica*. 2 Ed. São Paulo: Tecmedd, 2008. 1180 P.
- 4-Zucali, R. *A Conservação Da Mama: Indicações E Técnicas Da Quadrantectomia, Dissecção Axilar E Radioterapia No Câncer De Mama*. São Paulo: Ícone, 1992. 171 P.
- 5-Liu Y. *Et Al*. P53 And Gamma Radiation In The Normal Breast. *International Journal Of Radiation Biology*. V. 11, N. 85, P. 1026-1031, 2009.
- 6-Tamamoto, T.; Ohnishi, K.; Takahashi, A.; *Et Al*. Correlation Between Gamma-Ray-Induced G2 Arrest And Radiorresistance In Two Human Cancer Cells. *International Journal Of Radiation Oncology Biololy Physics*. N. 44, P. 905-909, 1999.
- 7-Andrade, L. M. *Estudos "In Vitro" De Câncer De Mama Humano Da Linhagem Mda Mb-231 Irradiado Por Co-60 & Estudos Correlatos*. Dissertação (Mestrado Em Ciências E Técnicas Nucleares) – Faculdade De Engenharia, Universidade Federal De Minas Gerais. Belo Horizonte, 2002. 112 P.
- 8-Murad, A. M.; Katz, A. *Oncologia: Bases Clínicas Do Tratamento*. Rio De Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 435 P.
- 9-Vandersickel, V.; *Et Al*. The Radiosensitizing Effect Of Ku70/80 Knockdown In Mcf10a Cells Irradiated With X-Rays And P(66)+Be(40) Neutrons. *Radiation Oncology*. V. 5, N. 30, P. 1-7, 2010.
- 10- De Bacco, F.; *Et Al*. Inductions Of Met By Ionizing Radiation And Its Role In Radioresistance And Invasive Growth Of Cancer. *Journal Of The National Cancer Institute*. V. 8, N. 103, P. 645-661, 2011.



- 11- Chockerham, K. P.; Kennerdell, J. S. Does Radiotherapy Have A Role In The Management Of Thyroid Orbitopathy? *British Journal Of Ophthalmology*. V. 1, N. 86, P. 102-107, 2002.
- 12- Soto, J.; *Et Al*. Influence Of Low Doses Of Radiation Due To ²²²Rn On Proliferation Of Fibroblasts And MCF-7 Human Breast Cancer Cells In Vitro. *Science Of The Total Environment*. V. 3, N. 181, P. 181-185, 1996.
- 13- De Bacco F, Luraghi P, Medico E, Reato G, Girolami F, Perera T, Gabriele P, Comoglio PM, Boccaccio C. Induction of MET by ionizing radiation and its role in radioresistance and invasive growth of cancer. *J Natl Cancer Inst*. Apr 20;103(8):645-61. doi: 10.1093/jnci/djr093. Epub 2011 Apr 4. 2011.
- 14- Bernier J, Hall EJ, Giaccia A. Radiation oncology: a century of achievements. *Nat Rev Cancer*. [CrossRef Medline Web of Science](#);4(9):737-747. 2004.
- 15- Suit HD. Local control and patient survival. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. *Medline Web of Science*.23(3):653-660. 1992.
- 16- Kaplan HS, Murphy ED The effect of local Roentgen irradiation on the biological behaviour of a transplantable mouse carcinoma. Increased frequency of pulmonary metastasis. *J Natl Cancer Inst*.;9(5-6):407-413. 1949.
- 17- Von Essen CF. Radiation enhancement of metastasis: a review. *Clin Exp Metastasis*.;9(2):77-104. 1991.
- 18- Lovey J, Fazekas K, Ladanyi A, Nemeth G, Timar J. Low-dose irradiation and short-exposure suboptimal-dose paclitaxel adversely modulate metastatic potential of squamous carcinoma cells. *Strahlenther Onkol*.;179(12):812-818. 2003.
- 19- Seol DW, Chen Q, Smith ML, Zarnegar R. Regulation of the c-met proto-oncogene promoter by p53. *J Biol Chem*.;274(6):3565-3572. 1999
- 20- Hegedus B, Zach J, Czirik A, Lovey J, Vicsek T. Irradiation and taxol treatment result in non-monotonous, dose-dependent changes in the motility of glioblastoma cells. *J Neurooncol*.;67(1-2):147-157. 2004.
- 21- Prat M, Narsimhan RP, Crepaldi T, Nicotra MR, Natali PG, Comoglio PM. The receptor encoded by the human c-MET oncogene is expressed in hepatocytes, epithelial cells and solid tumors. *Int J Cancer*.;49(3):323-328. 1991.
- 22- Stella GM, Benvenuti S, Comoglio PM. *Targeting the MET oncogene in cancer and metastases*. *Expert Opin Investig Drugs* 2010;19:1381-94
- 23- Naldini L, Vigna E, Ferracini R, et al. The tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene is activated by autophosphorylation. *Mol Cell Biol*.;11(4):1793-1803. 1991.
- 24- Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF- κ B signaling. *Cell*.;132(3):344-362. 2008

- 25- Gilmore TD. Rel/NF-kB Transcription Factors. 2008. www.NF-kB.org. Accessed January 11, 2011.
- 26- Dai JY, DeFrances MC, Zou C, Johnson CJ, Zarnegar R. The Met protooncogene is a transcriptional target of NF kappaB: implications for cell survival. *J Cell Biochem.*;107(6):1222-1236. 2009.



Capítulo 7

PROTEÍNAS PLASMÁTICAS RADIOINDUZIDAS EM TERRITÓRIO CEREBRAL

Artigo publicado na revista: Radioterapia Mineira.



PROTEÍNAS PLASMÁTICAS RADIOINDUZIDAS EM TERRITÓRIO CEREBRAL

Celso Vieira Lima e Tarcísio Passos Ribeiro de Campos

Núcleo de Radiações Ionizantes,
Programa de Ciências e Técnicas Nucleares
Universidade Federal de Minas Gerais.
Av. Antonio Carlos, 6627, Bloco 4, S.2285
31270901 - Belo Horizonte, Minas Gerais.

Autor correspondente: TPR Campos, PhD; tprcampos@pq.cnpq.br

RESUMO

Objetivos: O presente estudo tem como escopo analisar, em cinética de tempo, o perfil eletroforético de bandas de expressão das proteínas solúveis do sangue, na faixa de peso molecular superior e igual à albumina, moduladas por radiação ionizante no território cerebral em modelo animal. **Métodos:** Animais foram expostos à radiação de Co-60, em dose de 5 Gy corpo inteiro. Foram coletadas amostras de soro sanguíneo em ratos Wistar isogênicos, em grupo controle e irradiado. Foram realizadas laparotomias abdominal e torácica com anestesia profunda, e posteriormente coletados 0,5 mL de sangue da veia jugular em uma cinética de tempo de 12, 24, 48, 72, 96 h e 35 d pós-exposição, e 0 h, 1 semana e 35 d no grupo controle. As amostras foram heparinizadas e posteriormente seus componentes separados por centrifugação. As bandas proteicas de similar peso molecular foram identificadas por eletroforese vertical 10%, coradas com prata. **Resultados:** Os achados indicam alterações aguda e crônicas da expressão das proteínas de peso molecular superior ou igual à albumina em gel de acrilamida representando em supressão, aumento de expressões, bandas estáveis e outras bandas moduladas para maior ou menor expressão protéica em relação ao controle, identificadas em cinética de tempo. **Conclusão:** Estes achados apontam para uma alteração aguda modulada no tempo da expressão protéica plasmática, mas também para uma alteração moderada tardia da expressão gênica.

Palavras-chave: proteínas plasmáticas, ratos, radiação, modulação gênica, eletroforese.



INTRODUÇÃO

Vivenciamos nas últimas décadas o surgimento e aprimoramento de tecnologias na saúde, com a incorporação de novas abordagens, de diagnósticos e de tratamento, aplicadas a antigas doenças. No entanto, o câncer continua a desafiar a ciência em virtude da diversidade de causas e consequências, e pela existência de mecanismos bioquímicos próprios que a ciência ainda não foi capaz de, totalmente, desvendar. As possíveis recidivas e os efeitos adversos sofridos pelos pacientes em quimioterapia e radioterapia, como náuseas, vômitos, tonturas, diarreias são fatos. No entanto, não é questionável a eficiência dos tratamentos existentes, principalmente a radioterapia, que mostra uma potente ferramenta anti-tumor. Entretanto, há diversas facetas ainda não investigadas totalmente no âmbito deste tema.

Um dos principais tecidos afetados pela radioterapia é o sangue (SOLTER, P.F. *et alii* 1991; GRUYS, E. *et alii* 1994), e conseqüentemente os possíveis efeitos adversos estão presentes. Por ser o sangue um tecido com alta taxa metabólica, e com componentes celulares mononucleados altamente radiosensíveis é fato que este apresenta os efeitos deletérios da radiação. Aprofundar o conhecimento da fisiopatologia deste tecido após exposições planejadas, para melhor entender os fenômenos e efeitos produzidos pela interação da radiação nos tecidos.

É sabido que o sangue humano tem, em sua constituição, mais de 500 proteínas diferentes sendo que um pequeno grupo é de suma relevância para as funções metabólicas, osmóticas e de manutenção da fisiologia do sangue. As principais proteínas plásmicas são a albumina, antitripsina, TBG, alfafetoproteína, alfa1-glicoproteína ácida, alfa2-globulina, haptoglobina, macroglobulina, ceruplasmina, imunoglobulinas, transferrina, betalipoproteínas, globulinas, gamaglobulinas e C3. Todas estas proteínas são formadas por cadeias de aminoácidos, unidos entre si por ligações peptídicas (PAULA e SILVA, R. O. *et alii* 2008; GORDON, A. H. 1995).

Na análise e identificação das proteínas do sangue pode ser empregada a técnica de eletroforese em gel de agarose ou eletroforese vertical em acrilamida (GORDON, A. H. 1995; LAMMELI, U. K. 1970; MACORIS, D. G. *et al* 2008). Esta técnica utiliza forças eletroforéticas e eletro endosmóticas presentes no sistema para separação proteica pelo peso molecular. As frações separadas são visíveis após o tratamento com corantes sensíveis a proteínas (MADEWELL, B. R. 1997; MacEWEN, E. G. *et al*).

O presente estudo tem como escopo caracterizar e analisar a cinética temporal do perfil eletroforético das bandas de expressão das proteínas solúveis do sangue, na faixa de peso molecular superior a albumina, em modelo animal (Ratos Wistar), tratados com radiação

ionizante no território cerebral. Não é o escopo deste trabalho quantificar, de forma absoluta, concentrações volumétricas ou identificar, de forma específica, as proteínas no perfil eletroforético; mas, apontar as variações e modulações cinéticas radioinduzidas das bandas do conjunto proteico sanguíneo.

Para tal propósito foram utilizados 16 ratos isogênicos Wistar saudáveis, com rígida faixa etária de 12 semanas e peso corporal entre 320+/-15 g, com livre acesso a água e a alimento com foto período de 12 h. Os animais foram divididos em dois grupos: um controle (n=8), e outro submetido à irradiação de corpo inteiro (n=8) em fonte de Co-60, em conjunto, na dose de 5 Gy no Laboratório de Irradiação Gama – LIG do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear - CDTN. (n=8). Para linearizar as variáveis foram utilizados animais da mesma linhagem, família, com mesmo peso e idade, com características isogênicas, providos pelo biotério da Universidade Federal de Minas Gerais.

Os animais no dia da coleta foram submetidos à anestesia geral e realizada uma laparotomia abdominal, onde a veia jugular foi acessada. A coleta de sangue realizada totalizou 0,5 mL. As amostras coletadas foram heparinizadas e seus componentes separados por centrifugação em 2500 rpm por 30 min. As amostras foram obtidas de animais dos grupos controle (C), no tempo 0 h, 1 semana e 30 d; e no grupo de animais irradiados(IR), após 12, 24, 48, 72, 96 h e 35 d para cada animal irradiado.

Amostras do soro, nos tempos de coleta supracitados, dos grupos IR e C, foram submetidas à eletroforese vertical. Os géis de corrida foram preparados com gel de corrida SDS-PAGE 10%, e após a corrida, os géis foram corados com prata, de acordo com o protocolo estabelecido por Kang *et al.* 2002. Os perfis eletroforéticos das proteínas foram digitalizados, tratados e analisados utilizando o sistema de imagem digital *Image J*. As intensidades de grau de cinza das bandas de mesmo peso molecular foram analisadas e os valores de intensidade convertidas em percentuais de variação em relação ao controle. Os dados relativos, postos em condições equivalentes de eletroforese e coloração, forneceram o valor percentual da variação das intensidades de bandas de proteínas de peso molecular similar, em relação ao controle.

O perfil eletroforético foi avaliado e dividido em 10 proteínas distintas (P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, Albumina) onde identificamos um comportamento diferente em suas expressões se comparados ao grupo controle.

O projeto foi previamente aprovado em Comitê de Ética, CEUA – UFMG 339/2014. As normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), bem como foram respeitados as recomendações referente aos cuidados dos animais. (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals - Institute for Laboratory Animal Research/ National Academy of Science - USA).

RESULTADOS

A Fig. 1 ilustra o perfil de intensidades em função do comprimento das colunas do gel controle para amostras obtidas a 0 h, 1 semana, 35 dias do grupo controle. Os géis gerados demonstraram-se muito baixa coloração em prata, visto a muito baixa concentração fisiológica de proteínas do plasma no território cerebral, nas condições de coleta e de apresentação eletroforética propostas no experimento. Foi opção não aplicar técnicas de concentração das proteínas do plasma em nenhuma das amostras para não induzir alterações indesejadas. Na Fig.1 também é apresentada o perfil de intensidades em função do comprimento da coluna do gel da amostra irradiada coletada à 24 h. Observa-se vasta variação da intensidade de picos referente às bandas presentes à 24 h (P1 a P9).



Figura 1 – Intensidades das bandas em função do comprimento do gel em colunas de amostras controle a 0h (C 0h), 1 semana (C 1sem) e 35 d (C 35d), intercomparadas com a amostra coletada a 24h de sujeito irradiado (IR 24h).

Conforme análise do gel eletroforético das amostras irradiadas, apresentado na Fig.2, pode-se observar cinco comportamentos distintos para a expressão das bandas proteicas, na região de alto peso molecular e da albumina, dentro do território cerebral de animais irradiados se comparados ao controle:

- i) expressão de bandas proteínicas que não apresentam no controle nas condições estabelecidas no experimento, e que estão presentes após a exposição à radiação (“new expression”) em P1, P2, P3, P5, P6 e P8.
- ii) redução da expressão de proteínas pós irradiação se comparada ao controle (“down-regulation”), comportamento observado na parte superior do gel, junto as proteínas de alto peso molecular;
- iii) aumento da expressão de proteínas pós-irradiação se comparada ao controle (“up-regulation”) em P7 e P9;
- iv) redução modulada no tempo de algumas proteínas como a albumina até 24h, sendo este efeito revertido em 48h com um aumento da expressão da albumina, aumento mantido superior ao longo do tempo analisado, em relação ao controle (“up-regulation”);
- v) comportamento inalterado após radiação, comparado ao controle (“stable”).

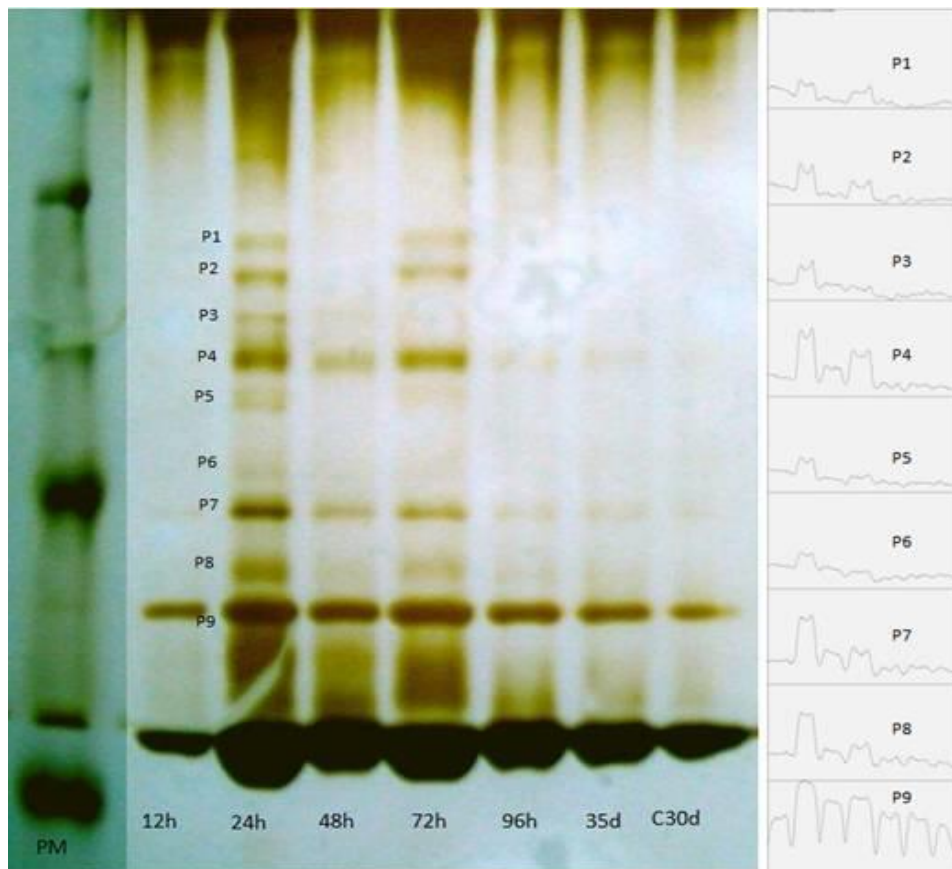


Figura 2: Gel SDS-PAGE 10%, onde foi aplicado o soro total e a corrida mostrando uma cinética de expressão de proteínas plasmáticas nos animais irradiados após 12, 24, 48, 72, 96 horas e 35 dias pós-irradiação, e controle (C30); seguida de perfis de intensidades em função nos tempos coletados das proteínas identificadas P1 a P9.

DISCUSSÃO e CONCLUSÕES

O soro é uma solução extremamente complexa de proteínas que muitas vezes não permite uma análise isolada de seus componentes, assim estabelecer padrões é uma tarefa muito difícil, o que faz com que o seu estudo e seu entendimento fiquem em um plano secundário, se comparado com outros tecidos (MURATSUBAKI, H. *et alii*, 2002; TOLEDO, J. M. *et alii*, 2013; FALCÃO, P.L. *et alii*, 2014). Por exemplo, Calazans e colaboradores observam não haver variação da albumina em cães controle e portadores de linfoma, que possa direcionar a um padrão para a doença. (CALAZANS, S.G. *et. al.* 2009) Enquanto, é estável e conhecido padrões eletroforéticos para doenças como hepatite crônica, gamapatias, artrite reumatoide, Lúpus Eritematoso Sistêmico, inflamação aguda, etc. (Wilson, K. e Walker, J.,2010)

Os achados científicos apresentados mostram que a radiação de corpo inteiro na dose de 5 Gy pode alterar a expressão das proteínas de alto peso molecular e da própria albumina no sangue, no território cerebral. Foi observada uma redução da albumina em 12 h após a irradiação, como resposta aguda. No entanto, foi também identificada uma hiperexpressão constitutiva de proteínas após 48 h da exposição, que é mantida ao longo do tempo, com níveis superiores aos do controle. Foi também observado a expressão de bandas proteicas não presentes no controle, diferindo do perfil eletroforético padrão. Alterações do perfil proteico em cinética temporal dificulta a definição de um padrão para a exposição à radiação de corpo inteiro.

Entretanto, pode-se supor que estas alterações contribuem para o agravamento dos efeitos agudos e tardios referente à exposição a radiações ionizantes, visto que cada uma destas proteínas, P1 a P9, cumpre seu papel regulatório. Como exemplo, a albumina é uma das principais proteínas do sangue responsável pelo controle da osmolaridade sanguínea e pelo transporte de substâncias como hormônios e medicamentos. Alterações na concentração de albumina interferem no metabolismo humano.

Os achados demonstraram a existência de comportamentos distintos na expressão das proteínas de peso molecular acima da albumina e da própria albumina em relação ao controle, no território cerebral. Observou-se que tais proteínas apresentam uma elevada dinâmica em prol do tempo. Por exemplo, após 12 h da exposição, ocorreu a redução da expressão de albumina como efeito agudo, sendo que após 24 h observou-se a tendência de aumento gradual da expressão nos tempos de 48, 72, 96 h após exposição, reduzindo este comportamento em 35 d. Neste tempo, há um conjunto de proteínas com expressão superior ao controle, mesmo após 1 mês pós radiação. Entretanto, as análise dos efeitos



tardios tem que ser melhor investigadas visto que alterações metabólicas fisiológicas podem estar somadas aos efeitos da radiação.

Outras proteínas do soro se comportam de maneira diversa ao da albumina. O fato é que existe uma intensa modulação da expressão no grupo de proteínas identificadas (P1 a P9), que é duradoura no tempo de 30 d analisado, ou seja, existe uma reprogramação da expressão protéica. Assim os achados obtidos em nossos ensaios sugerem que a expressão e as concentrações séricas das proteínas de peso molecular superior ou igual à albumina podem ser moduladas e/ou reprogramadas pela radiação de corpo inteiro a 5 Gy.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Laboratório de Irradiação Gama - LIG do *Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear - CDTN*, que gentilmente procedeu à irradiação dos grupos de animais. Os autores estão agradecidos ao *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)*, devido à ajuda financeira processo 456719 / 2013-0 REBRAT-SUS, e *Fundação da Pesquisa do Estado Minas Gerais (FAPEMIG)*, e à *Coordenação de Apoio aos Programas de Ensino Superior (CAPES)* pela bolsa de doutorado.

REFERÊNCIAS

- CALAZANS, S.G.; DALECK; FAGLIARI, J.J., REPETTI, C.F.; DE NARDI, A.B.; CASTRO, J.H.T.; FERNANDES, S.C.; CÉSAR, S.C.; RODIGHIERI, S.M.. Proteinograma sérico de cães saudáveis e com linfoma obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.61, n.5, p.1044-1048, 2009.
- CARDOSO, M.J.L.; MACHADO, L.H.A.; MOUTINHO, F.Q. et al. Sinais clínicos do linfoma canino. *Arch. Vet. Sci.*, v.9, p.25-29, 2004.
- DHALIWAL, R.S.; KITCHELL, B.E.; MESSICK, J.B.. Canine lymphosarcoma: clinical features. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.*, v.25, p.573-581, 2003.
- FALCAO, P. L.; CUPERSCHMID, E. M.; TRINDADE, B. M.; CAMPOS, T. P. R.. Transforming growth factor- β and matrix metalloproteinase secretion in cell culture from ex vivo PBMC after exposure to UV radiation, *J Biol Reg and Homeostatic Agents* 28th , v. 2, p. 333-340, 2014
- GABAY, C.; KUSHNER, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N. Engl. J. Med.*, v.340, p.448-454, 1999.
- GIRAUDEL, M.J.; PAGÈS, J.; GUELFÍ, J. Monoclonal gammopathies in the dog: a retrospective study of 18 cases (1986-1999) and literature review. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, v.38, p.135-147, 2002.



- GORDON, A. H. Electrophoresis of proteins in polyacrilamide and starch gels. New York: Elsevier, 213p, 1995.
- GRUYS, E.; OBWOLO, M.J.; TOUSAINT, M. J.M. Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. *Vet. Bull.*, v.64, p.1009-1018, 1994.
- Guide for the Care and Use of Laboratory Animals - Institute for Laboratory Animal Research/ National Academy of Science – USA, 8.o edição, Washington, DC, www.nap.edu. 2016.
- KANG H.S; Expression of the human homologue of the small nucleolar RNA-binding protein NHP2 gene during monocytic differentiation of U937 cells. *Biochim Biophys Acta* 1575(1-3):31-9. 2002.
- LAMMELI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.277, p.680-685, 1970.
- MacEWEN, E.G.; HURVITZ, A.I. Diagnosis and management of monoclonal gamopathies. *Vet. Clin. N. Am. Small Anim. Pract.*, v.7, p.119-132, 1977.
- MACORIS, D.G. et al. Perfil eletroforético do proteinograma sérico de equinos com obstrução experimental do cólon menor. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.60, p.794-799, 2008.
- MADEWELL, B.R.. Tumor markers. In:KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5.ed. San Diego: Academic, 1997. p.761-784.
- MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIMOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet. J.*, v.168, p.28-40, 2004.
- MURATSUBAKI, H.; SATAKE, K.; YAMAMOTO, Y.; ENOMOTO, K.. Detection of serum proteins by native polyacrylamide gel electrophoresis using Blue Sepharose CL-6B-containing stacking gels. *Analytical biochemistry*, v.307, p.337-340, 2002.
- PAULA e SILVA, R.O.; LOPES, A.F.; FARIA, R.M.D.. Eletroforese de proteínas séricas: Interpretação e correlação clínica. *Revista Médica de Minas Gerais*, v.18, n.2, p.16-122, 2008.
- SOLTER, P.F.; WALTER, E.H.; HUNGERFORD, L.L. et al. Haptoglobin and ceruloplasmin as determinants of inflammation in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, v.52, p.1738-1742, 1991.
- TOLEDO, J. M.; SIQUEIRA, S. L.; FALCAO, P. L.; CAMPOS, T. P. R.. Phenotypic behavior of dogs irradiated PBMC form based on flow cytometry, *J Biol Reg and Homeostatic Agents*, v.27, n.2, p. 309-317, 2013.
- WILSON, K., John WALKER, J.; *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*, 7th Edition, 2010.



Capítulo 8

Conclusão Geral

Na concepção do trabalho aqui apresentado buscamos analisar os efeitos da radiação em sua interação com organismo em nível sistêmico, bem como ao nível celular. No entanto o nosso estudo foi focado no tecido sanguíneo, por ser este um tecido integrador do organismo, com uma alta taxa metabólica, muito sensível a radiação e ainda por ser formado por dois componentes distintos: uma parte bioquímica e outra celular, que podem ser estudados em conjunto ou separados não sofrendo interferência dos resultados nestas abordagens.

Utilizamos também no estudo ao nível celular, duas linhagens específicas, uma radiosensível: as células mononucleares do sangue periférico (PBMC), que são células do sistema imunológico e as células do adenocarcinoma de mama a MDAMB-231, células com grande resistência às radiações. Todas estas foram analisadas sob doses de radiação específicas (2 e 10 Gy) e com taxas de dose variadas (345 cGy e 85 cGy). A grande virtude do trabalho foi a fazer estas análises ao longo de uma cinética de tempo, pós-irradiação, de longa duração com resultados de até 35 dias, o que não existe descrição na literatura até então.

Assim, neste contexto observamos uma série de modificações estruturais e metabólicas, ao nível celular e sistêmico. Dentre as alterações estruturais observadas podemos citar a indução a apoptose e a lise celular *in vitro*, causadas por desnaturação da matriz lipoproteica ou ativação enzimática que modificam a viabilidade celular. No aspecto regulatório ou metabólico observamos uma alteração

da expressão de proteínas plasmáticas extracelulares, que modificam o ritmo de funcionamento do organismo. Muitas destas modificações são transitórias. Mas, no entanto, outras mudanças são definitivas ou tardias, como a expressão de proteínas ou a modulação de outras, que foram observadas no plasma. Outro aspecto relevante no trabalho feito foi à análise da taxa de dose e dose utilizadas sobre as células neoplásicas e sanguíneas em cobaltoterapia, onde podemos observar que as taxas de doses subclínicas utilizadas potencializaram a clonogenicidade das células cancerosas, promovendo uma seleção das mais resistentes podendo colaborar para falha no controle da doença na cobalto terapia de baixa dose.

Assim nossos dados indicam a existência de uma alteração da viabilidade celular *in vitro* dependente da dose e taxa de dose clínicas e subclínicas, bem como a uma reprogramação da expressão de proteínas de peso molecular superior ou igual a albumina em plasma sanguíneo após exposição de corpo inteiro.

Com base em nossos dados ainda podemos concluir que existem proteínas que foram moduladas em intensidade de expressão, sendo aumentadas ou diminuídas na cinética de tempo, indicando uma ação direta da radiação, na transcrição e tradução destas proteínas de curto e longo prazo. Mas ainda podemos identificar o surgimento de proteínas novas se comparadas aos controles, sugerindo a existência de genes que são expressos constitutivamente por estímulo da radiação, corroborando com a idéia da existência de genes radio-induzidos, e de uma reprogramação da expressão das proteínas plasmáticas dos animais expostos a radiação de corpo inteiro, sendo, portanto estes animais diferentes em termos morfofuncionais dos que não foram irradiados.

No entanto, novos estudos são necessários no sentido de identificar quem são estas novas proteínas, seus efeitos fisiológicos e qual a repercussão em termos metabólicos deste novo hall de gene ativados pós-irradiação.

Cabe ressaltar que estes estudos são de grande relevância e urgência, pois podem servir de base para próximos sistemas de planejamento dos tratamentos do câncer que tem como fundamento a exposição do corpo a radiação.

Capítulo 9

Referências



A randomized clinical trial comparing prednisone and azathioprine in myasthenia gravis. Results of the second interim analysis. Myasthenia Gravis Clinical Study Group. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1993;56(11):1157-63.

Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology, 5th ed. Philadelphia: Saunders; 2005. p 225-243.

Acute inflammation. Disponível em: <<http://www.mds.qmw.ac.uk/biomed/kb/generalpathology/acuteinflammation.htm>>. Acesso em: 28 out. 2001.

Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Lord GM. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* 2007; 148(1): 32-46.

Alves, L.S.. *Eutanásia.Revista Jurídica Consulex*, Brasília, v. I, n. 29, p. 12-17, maio1999.

Andrade; L.M. 1 ; Leite; M.F. 1,2 ; Goes; A.M. 3 and Campos;T.P.R.1, Cellular Viability and Apoptosis of Human Breast Cancer MDAMB-231 Cell Line After Co60 Irradiation.

Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, Manetti R, Vanini V, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S. Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4(+)CD25(+) human thymocytes. *J Exp Med* 2002; 196(3): 379-87.

Attix, F.E. Introduction to Radiological Physics and Radiation Dosimetry. New York: John Wiley and Sons; 1986.

Bacchetta R, Gambineri E, Roncarolo MG. Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120(2):227-35; quiz 36-7.

Bach JF. Organ-specific autoimmunity. *Immunol Today* 1995; 16(7): 353-5.

Baecher ACM, Hafler DA. Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4+CD25+ T cells. *Clin Immunol* 2005; 117(2): 192. Discussion 193.

Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25 high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001; 167(3): 1245-53.

Barry, W. Connors & Mark F. Bear & Michael A. P. *Neurociências: Desvendando o sistema nervoso*. 2ª ed., Rio de Janeiro, Ed. Artmed, 2002.

Becker W, Meller J. The role of nuclear medicine in infection and inflammation. *Lancet Infect Dis* 2001; 1, 326–333.

Brasileiro CB, Cardoso VN, Ruckert B, Campos TPR. Avaliação de processos inflamatórios na articulação temporomandibular empregando leucócitos autólogos marcados com tecnecio-99m em modelo animal. *Radiol. Bras.* 2006; 39:283–286.

Brasileiro CB, Pacheco CMF, Queiroz-Junior CM, de Lima CF, Silva JB e Campos TPR. ^{99m}Tc labeled 1-thio-b-d-glucose as a new tool to temporomandibular joint inflammatory disorders diagnosis. *Applied Radiation and Isotopes* 2010; 68:2261–2267.

Brito D, Madeira H. Malignant mutations in hypertrophic cardiomyopathy: fact or fancy? *Rev Port Cardiol*. 2005 Sep; 24(9):1137-46. Review. 2005.

Brito, C.; Portela, M. C.; Vasconcellos, M. T. L. Assistência oncológica pelo SUS a mulheres com câncer de mama no Estado do Rio de Janeiro. *Rev. Saúde Pública* [online]. 2005, vol.39, n.6, pp. 874-881. ISSN 0034-8910.

Burns J, Rosenzweig A, Zweiman B, Lisak RP. Isolation of myelin basic protein-reactive T-cell lines from normal human blood. *Cell Immunol* 1983; 81(2): 435-40.

Campbell DJ, Ziegler SF. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2007;7(4):305-10.



Campbell, Reece *et al.* *Biologia*. 8ª Ed. Artmed. 2010.

Campos TPR, Brasileiro CB, Maia MJO. Radiofármaco e suas composições para cintilografia de sítios inflamatórios e infecciosos, INPI 2010, PI0904754-9.

Cao D, Borjesson O, Larsson P, et al.: FOXP3 identifies regulatory CD25bright CD4+ T cells in rheumatic joints. *Scand J Immunol* 63(6): 444-52, 2006.

Cao D, Malmstrom V, Baecher-Allan C, et al.: Isolation and functional characterization of regulatory CD25brightCD4+ T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 33(1): 215-23, 2003.

Cao D, van Vollenhoven R, Klareskog L, et al.: CD25brightCD4+ regulatory T cells are enriched in inflamed joints of patients with chronic rheumatic disease. *Arthritis Res Ther* 6(4): R335-46, 2004.

CEEL Biology Lab. V. 256. Protein composition and structure: a review of the basics. Disponível em: <<http://fig.cox.miami.edu/~ddiresta/bil256/electro.htm>>. Acesso em: 3 nov. 2001.

Chopra R, Pu QQ, Elefanty AG. Biology of BCR/ABL. *Blood Rev* 1999;13:211-29. 1999.

Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ. The development of imatinib as a therapeutic agent for CML. *Blood* 2005;105(7):2.640-2.653. 2005.

Demengeot J, Zelenay S, Moraes-Fontes MF, Caramalho I, Coutinho A. Regulatory T cells in microbial infection. *Springer SeminImmunopathol* 2006; 28(1): 41-50.

Denmeade SR, Isaacs JT. Programmed cell death (apoptosis) and cancer chemotherapy. *Cancer Control J* 2005;3(4):1-10. 2005.

Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, et al.: Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med* 200(3): 277-85, 2004.

Essaro, S., Béria, J.U., Tomasi, E. et al. (2001) Contraceptivos Orais e Câncer de Mama: estudo de casos e controles. *Rev.Saúde Pub.* 35:1, 32-38.

Evoli A, Batocchi AP, Palmisani MT, Lo Monaco ML, Tonali P. Long-term results of corticosteroid therapy in patients with myasthenia gravis. *Eur Neurol.* 1992;32(1):37-43-47.

Falcão PL, Malaquias LC, Martins-Filho OA, Silveira AM, Passos VM, Prata A, Gazzinelli G, Coffman RL, Correa-Oliveira R. Human Schistosomiasis mansoni: IL-10 modulates the in vitro granuloma formation. *Parasite Immunol.*1998 Oct;20(10):447-54.

Falcao PL. Método e usos da técnica de citometria de fluxo para controle e acompanhamento de lesões musculares em atletas submetidos a esforço físico; abordagem imunológica e condicionamento físico, INPI 2002, PI0206722-6.

Fehervari Z, Sakaguchi S. CD4+ Tregs and immune control. *J Clin Invest* 2004; 114(9): 1209-17.

Fernandez, J. G. *10 palavras-chave em bioética*. São Paulo: Paulinas, 2000.

Florentina Cutas; Tesio, C. Electrophoresis study of some biochemical parameters in collagenosis. *Romanian Journal of Biological Sciences*, v. 1-2, p.33-36, 1997.

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4(4): 330-6.



- Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, et al. Y: Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 22(3): 329-41, 2005.
- Fragopoulou A.F., Samara A., Antonelou M.H., Xanthopoulou A., Papadopoulou A., Vougas K., Koutsogiannopoulou E., Anastasiadou E., Stravopodis D.J., Tsangaris G.T., Margaritis L.H. Brain proteome response following whole body exposure of mice to mobile phone or wireless DECT base radiation. *Electromagn Biol Med*. 2012 Dec;31(4):250-74. 2012.
- França, G.V.- *Medicina Legal*, 5ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S/A, 1998.
- Fredriksson, I., Liljergren, G., Arneson, L.G. *et al.* (2001) time trends in the results of breast conservation in 4694 women. *Eur.J.Cancer*. 37:1537-1544.
- Gemmel F, Dumarey N, Welling M. Future diagnostic agents. *Semin Nucl Med* 2009; 39:11–26.
- Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 1970; 18(5): 723-37.
- Gianazza, E.; Eberini, I.; Villa, P Fratelli, M.; Pinna, C.; Wait, R.; Gemeiner, M.; Miller, I. Review - Monitoring the effects of drug treatment in rat models of disease by serum protein analysis. *Journal of Chromatography B*, pp771:107–130, 2002.
- Graninger, W.; Thalhammer, F.; Hollenstein, U.; Zoter, G. M.; Kremsner, P G. Serum protein concentration in plasmodium falciparum malaria. *Acta Tropica*, v. 52, pp 121-128, 1992.
- Gregghi, C.M. *Biologia Celular- Aterosclerose*, Rio de Janeiro. 2012.
- Guyton, A.C. E Hall, C.C, *Tratado de Fisiologia Médica*, Ed. Elsevier, 8ª edição, São Paulo, 2006.
- Guyton, A.C., Hall, J.E *Tratado De Fisiologia Médica* 10. Ed. Rj . Guanabara Koogan, 2002.
- Haddad, N., Silva, M.B. (2001) Mortalidade por Neoplasias em Mulheres em Idade Reprodutiva-15 a 49 anos- no Estado de São Paulo, Brasil, de 1991 a 1995. *Rev.Ass.Med.Brasil*. 47:3, 221-230.
- Harris, J., Morrow, M. and Norton, L. (1997) *Malignant Tumors of the Breast*. In *Cancer, Principles & Practice of Oncology*. Lippincott-Raven, Philadelphia. Pp1541-1616.
- Harris, J., Morrow, M. and Norton, L. (1997) *Malignant Tumors of the Breast*. In *Cancer, Principles & Practice of Oncology*. Lippincott-Raven, Philadelphia. pp1541-1616.
- Hayday A, Tigelaar R. Immuno regulation in the tissues by gamma delta T cells. *Nat Rev Immunol* 2003; 3(3): 233-42.
- Imam SK, Lin P. Radiotracers for imaging of infection and inflammation - a review. *World J Nucl Med* 2006; 5:40–55.
- Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F et al. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 1999; 162(9): 5317-26.
- Janeway CA Jr. How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect* 2001; 3(11):67-71.
- Jiang H, Chess L. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest* 2004;114(9): 1198-208.
- Jones, H.W., Wents, A.C. and Burnett, L.S. (1990) *Novak Tratado de Ginecologia*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. pp 391-407.

Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Hohenbeck AE, Lerman MA, et al.. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2001; 2(4): 301-6.

Kaneyama K, Segami NT, Sun W, Sato J, Fujimura K. Analysis of tumor necrosis factor interleukin-6, interleukin-1 soluble tumor necrosis factor receptors I e II, interleukin-6 soluble receptor, interleukin-1 soluble receptor type II, interleukin-1 receptor antagonist, and protein in the synovial fluid of patients with temporomandibular joint disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 99: 276-284.

Kappler JW, Roehm N, Marrack P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 1987; 49(2): 273-80.

Karinen, A., Heinara., S., Nylund, R., Leszczynski, D., Mobile phone radiation might alter protein expression in human skin. *BMC Genomics*, 77-81. 2008.

Kerr JFR, Wyllie AH, Curie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-257.

Khazaie K, von Boehmer H. The impact of CD4+CD25+ Treg on tumor specific CD8+ T cell cytotoxicity and cancer. *Semin Cancer Biol* 2006; 16(2): 124-36.

Lavrnjic D, Losen M, Vujic A, De Baets M, Hajdukovic LJ, Stojanovic V, et al. The features of myasthenia gravis with autoantibodies to MuSK. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005;76(8):1099-102.

Lehninger, A. L. Princípios de bioquímica. São Paulo, Ed. Sarvier, 2000. cap. 6 e 7, pg 134-195. 2000.

Lent. R. *Cem Bilhões de Neurônios: Conceitos fundamentais de neurociência.*, 1ª ed. Rio de Janeiro Ed. Atheneu, 2001.

Leszczynski D., Radiation proteomics: a brief overview. *Proteomics*. 2014 Mar;14(4-5):481-8. doi: 10.1002/pmic.201300390. Review. PMID:24376023. 2014.

Levings MK, Sangregorio R, Sartirana C, Moschin AL, Battaglia M, Orban PC, Roncarolo MG. Human CD25+CD4+ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. *J Exp Med* 2002; 196(10): 1335-46.

Lindberg C, Andersen O, Lefvert AK. Treatment of myasthenia gravis with methylprednisolone pulse: a double blind study. *Acta Neurol Scand*. 1998;97:370-3.

Lippolis JD. Immunological signaling networks: integrating the body's immune response. *J Anim Sci* 2008; 86(14): 53-63.

Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 203(7): 1701-11, 2006.

Lu L, Werneck MB, Cantor H. The immunoregulatory effects of Qa-1. *Immunol Rev* 2006; 212:51-9.

Maggi E, Cosmi L, Liotta F, Romagnani P, Romagnani S, Annunziato F. Thymic regulatory T cells. *Autoimmun Rev* 2005; 4(8): 579-86.

Martins de Sa C, Grossi de Sa MF, Akhayat O, Broders F, Scherrer K, Horsch A, Schmid HP. Prosomes. Ubiquity and inter-species structural variation. *Mol Biol*. 1986 Feb 20;187(4):479-93. 1986.

Mattos D.M., Kimura E.T., Silva M.R.R, Egami M.I., Segreto R.A., Segreto H.R.C. Ativação da Proteína TGFβ1 latente em pulmão irradiado *in vivo*. *Revista Associação Médica Brasileira*, São Paulo, SP. 2002.

Meldau S, Kästner J, von Knorre D, Baldwin IT. Salicylic acid-dependent gene expression is activated by locomotion mucus of different molluscan



herbivores. *Commun Integr Biol.* 2014 Apr 3;7:e28728. doi: 10.4161/cib.28728. eCollection 2014.

Meldau, D.C. Neoplasias, São Paulo, 2014.

Miura, T.; Funato, T.; Yabuki, S.; Sasaki, T.; Kaku, M. Detection of monoclonal proteins by capillary electrophoresis using a zwitterion in the running buffer. *Clinica Chimica Acta*, V. 299: pp 87–99, 2000.

Mizoguchi A, Mizoguchi E, Takedatsu H, Blumberg RS, Bhan AK. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity* 2002; 16(2): 219-30.

Moore HM¹, Bai B, Boisvert FM, Latonen L, Rantanen V, Simpson JC, Pepperkok R, Lamond AI, Laiho M., Quantitative proteomics and dynamic imaging of the nucleolus reveal distinct responses to UV and ionizing radiation. *Mol Cell Proteomics*. 2011 Oct;10(10):M111.009241. doi: 10.1074/mcp.M111.009241. Epub 2011 Jul 21. 2011.

Möttönen M, Heikkinen J, Mustonen L, et al.: CD4+ CD25+ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol.* 140(2): 360-7, 2005.

Muratsubaki, H; Satake, K.; Yamamoto, Y. and Enomoto, K. Detection of serum

Naoum, P C. Eletroforese: técnicas e diagnósticos. 2 ed. São Paulo: Santos, 1990.

Ni Choileain N, Redmond HP. Regulatory T-cells and autoimmunity. *J Surg Res* 2006; 130(1): 124-35.

Nistala K, Moncrieffe H, Newton KR, et al.: Interleukin-17-producing T cells are enriched in the joints of children with arthritis, but have a reciprocal relationship to regulatory T cell numbers. *Arthritis Rheum* 58(3): 875-87, 2008.

Nylund R, Kuster N, Leszczynski D., Analysis of proteome response to the mobile phone radiation in two types of human primary endothelial cells. *Proteome Sci.* 2010 Oct 18;8:52. doi: 10.1186/1477-5956-8-52. PMID: 20955554. 2010.

Nylund, R. Lemola, E., Hakanen, A. The lack of acute effect of low-to-moderate-dose ionising radiation on endothelial proteome. *Int. J. Low Radiat.* 9,127-137. 2013.

Ohnishi, T.; Mohamed, N. A. L.; Shibukawa, A.; Kuroda, Y.; Nakagawa, T.; El Gizawy, S.; Askal, H. F.; El Kommos, M E. Frontal analysis of drug-plasma lipoprotein binding using capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v 27: pp 607–614, 2002.

Palace J, Newsom-Davis J, Lecky B. A randomized double-blind trial of prednisolone alone or with azathioprine in myasthenia gravis. *Neurology.* 1998;50(6):1778-83.

Papiernik M, do Carmo Leite-de-Moraes M, Pontoux C, Joret AM, Rocha B, Penit C, Dy M. T cell deletion induced by chronic infection with mouse mammary tumor virus spares a CD25-positive, IL-10-producing T cell population with infectious capacity. *J Immunol* 1997; 158(10): 4642-53.

Pearson CI, McDevitt HO. Redirecting Th1 and Th2 responses in autoimmune disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 238: 79-122.

PROTEIN eletroforese: serum. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pbmed>> Acesso em: 3 nov. 2001.

Proteins by native polyacrylamide gel electrophoresis using Blue Sepharose CL- 6B-containing stacking gels. *Analytical Biochemistry* v307: pp 337–340, 2002.

PROTEINS: Albumin, globulins, etc - serum proteins. Disponível em: <http://www.drkaslow.com/html/proteins_-_albumin_globulins_.html>. Acesso 3 nov. 2001.



- Queiroz, M.G.R.; Oliveira E.M.; Santos, M.S.; Holanda, B.A.P Alencar. N.M.N.; Melo, C.L. Perfil eletroforético das proteínas e concentração das imunoglobulinas plasmáticas em pacientes assintomáticos e sintomáticos portadores de HIV. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 32 (3):pp 221-223, 2000.
- Qureschi AI, Choudhry MA, Akbar MS, Mohammad Y, Chua HC, Yahia AM, et al. Plasma exchange versus intravenous immunoglobulin treatment in myasthenic crisis. *Neurology*. 1999;52(3):629-32.
- Reed JC, Pellecchia M. Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies. *Blood* 2005;106(2):408-18. 2005.
- Rennen HJMM, Boerman OC, Oyen WJG, Corsten FHM. Kinetics of ^{99m}Tc labeled interleukin-8 in experimental inflammation and infection. *J Nucl Med* 2003; 44(9):1502-1509.
- Rennen HJMM, Boerman OC, Oyen WJG, Corstens FHM. Scintigraphy imaging of inflammatory processes. *Curr Med Chem* 2002; 1:63-75.
- Robbins, S.L., Cotran, R.S. and Kumar, V. (1989) *Robbins Pathologic Basis of Disease*, W.B Saunders Company, Philadelphia. pp 975-995.
- Robertis, E.M.F., Hib, J. *Bases da Biologia Celular e Molecular*, Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2001.
- Ronager J, Ravnborg M, Hermansen I, Vosstrup S. Immunoglobulin treatment versus plasma exchange in patients with chronic moderate to severe myasthenia gravis. *Artif Org*. 2001;25(12):967-73.
- Sakaguchi S, Fukuma K, Kuribayashi K, Masuda T. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance. Deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J Exp Med* 1985; 161(1): 72-87.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155(3): 1151-64.
- Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 531-62.
- Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 2000; 101(5): 455-8.
- Schwartzmann, G. (2001) Breast cancer in South America: challenges to improve early detection and medical management of a public health problem. *J. Clin. Oncol*. 18:118-124.
- Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 2006; 203(7): 1693-700.
- Sharif S, Arreaza GA, Zucker P, Mi QS, Delovitch TL. Regulation of autoimmune disease by natural killer T cells. *J Mol Med* 2002; 80(5): 290-300.
- Shevach EM. Regulatory T cells in autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 423-49.
- Shrieve DC, Loeffler JS (2011) *Human radiation injury*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2011.
- Signore A, Soroa VE, De Vries FJ. Radiolabelled white blood cells or FDG for imaging of inflammation and infection? *Q J Nucl Med Mol. Imag* 2009; 53: 23-25.
- Silva D.G.K.C.E., Teodoro G.M., De Sena L.V., De Souza Z.M., Rezende A.A., *Electrophoretic profile of plasmatic proteins: Study in children assisted at the*



PEDIATRIC HOSPITAL – HOSPED/UFRN in Natal city. RBAC, vol. 37(4): 239-242, 2005.

Silverman, L.M., Christenson, R.H. Aminoácidos e proteínas. In: BURTIS, C.A.; ASHWOOD, C. R. Tirez: Fundamentos de Química Clínica. Quarta ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. cap. 18, p. 234-274. 1998.

Sukedai M, Tominaga K, Habu M, Matsukawa A, Nishihara T. Involvement of tumor necrosis factor and interleukin-8 in antigen-induced arthritis of the rabbit temporomandibular joint. *J Oral PatholMed* 2004; 33:102-110.

Taams LS, Smith J, Rustin MH, Salmon M, Poulter LW, Akbar AN... Human anergic/suppressive CD4(+)CD25(+) T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. *Eur J Immunol* 2001; 31(4): 1122-31.

Tapio S., Ionizing radiation effects on cells, organelles and tissues on proteome level. *Adv Exp Med Biol.* 2013;990:37-48. doi: 10.1007/978-94-007-5896-4_2. Review.PMID:23378001. 2013.

The New England Journal of Medicine Anencephalic Newborns. *Can organs be transplanted before brain death?* Vol.321, p 388, 1989.

Van Amelsfort JM, Jacobs KM, Bijlsma JW, et al.: CD4 (+) CD25 (+) regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum* 50(9): 2775-85, 2004.

Van Amelsfort JM, van Roon JA, Noordegraaf M, et al.: Proinflammatory mediator-induced reversal of CD4+,CD25+ regulatory T cell-mediated suppression in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 56(3): 732-42, 2007.

Vasconcelos, A.B., Mendonça, G.A., Sichieri, R. (2001) Height, weight, weight change and risk of breast cancer in Rio de Janeiro, Brasil. *São Paulo Med. J.* 119:2, 62-66.

Von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 2005; 6(4): 338-44.

Way, L.W. (1991) *Current surgical Diagnosis & Treatment*, Appleton Lange. 959p. 1991

Wedler, V.; Prokop S.; Kunzi, W; Meyer V.E.; Burgi, U. Tracking dysproteinaemia in thermal injuries using serum protein electrophoresis. *Annals of Burns and Fire Disasters*, v. 11,n. 4, dec., p. 1-8, 1998.

Wing K, Ekmark A, Karlsson H, Wing K, Ekmark A, Karlsson. Characterization of human CD25+ CD4+ T cells in thymus, cord and adult blood. *Immunology* 2002; 106(2): 190-9.

Yan Y, Xu H, Peng S, Zhao W, Wang B., Proteomeanalysis of ultraviolet-B-induced protein expression in vitro human dermal fibroblasts. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2010 Dec;26(6):318-26. doi: 10.1111/j.1600-0781.2010.00556.x. 2010.

Yin XM, Dong Z. (ed). 2003. *Essentials of apoptosis: a guide for basic and clinical research.* Humana Press, New Jersey. 2003.

Yoshimura E.M., Física das Radiações: Interação da radiação com a matéria. *Revista Brasileira de Física Médica*, 2009,3(1): 57-67. 2009.

Yoshimura, E.M. Física das Radiações: interação da radiação com a matéria. São Paulo, *Revista Brasileira de Física Médica.* 2009.

Yuasa MS, Masutani C, Hirano A, Cohn MA, Yamaizumi M, Nakatani Y, Hanaoka F., A human DNA polymerase eta complex containing Rad18, Rad6 and Rev1; proteomic analysis and targeting of the complex to the chromatin-bound fraction of

cells undergoing replication fork arrest. *Genes Cells*. 2006 Jul;11(7):731-44. PMID: 1682419. 2006.

