**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**“MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DE
REPARO DO DNA EM CÉLULAS HUMANAS
IRRADIADAS COM RAIOS GAMA SOB
DIFERENTES TAXAS DE DOSE”**

Igor Magela Merchi

**RIBEIRÃO PRETO
2007**

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Genética

**“Modulação da expressão de genes de
reparo do DNA em células humanas
irradiadas com raios gama sob diferentes
taxas de dose”**

**Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina de Ribeirão Preto, da
Universidade de São Paulo, para a
obtenção de título de Mestre em
Ciências, área de concentração
Genética.**

**Pós-graduando: Igor Magela Merchi
Orientador: Prof^ª Dr^a Elza Tiemi Sakamoto Hojo**

2007

Ficha calatográfica

MERCHI, Igor M.

“Modulação da expressão de genes de reparo do DNA em células humanas irradiadas com raios gama sob diferentes taxas de dose”

Ribeirão Preto, 2007

72 p. il. 30cm

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, departamento de Genética.

Orientador: Prof^a Dr^a Elza Tiemi Sakamoto Hojo

Apoio e suporte financeiro

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Proc nº 04/15611-6, 02/13317-8 e 99/12135-9).
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.
- Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência – FAEPA – FMRP/USP.
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP).
- Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP/USP).

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado à minha querida mãe, **Regina**, que com tanto suor e sacrifício, possibilitou meus estudos. Com certeza sem você eu jamais poderia ter chegado ao final de mais esta etapa.

Amo muito a senhora!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, **Profª Drª Elza Tiemi Sakamoto Hojo**, por ter me acolhido em seu laboratório e por guiar-me sempre, desde os meus primeiros passos no caminho da pesquisa.

À **Profª Drª Catarina Satiê Takahashi** pela amizade e ótima convivência durante este período de trabalho. Pela amizade e por todos os momentos de alegria.

Ao **Prof Dr Geraldo Aleixo S. Passos Junior**, por ter me aceitado em seu laboratório e pelos momentos de conversa e ensinamentos.

À **Profª Drª Patrícia Nicolucci**, pela ajuda nas etapas de irradiação das células.

À **Profª Drª Nilce Maria Martinez Rossi**, chefe do Departamento de Genética da FMRP/USP, e ao **Prof. Dr. Moacyr Antonio Mestriner**, ex-chefe do departamento.

Ao **Prof Dr Ademilson Espencer E. Soares**, coordenador do curso de Pós-graduação do departamento de Genética da FMRP-USP e à **Profª Drª Lucia Regina Martelli**, ex-coordenadora.

Às funcionárias do departamento, **Susie Adriana Nalon**, **Maria Aparecida Elias** e **Cleusa Mazzucatto** (ex-secretária), por toda ajuda e atenção.

Ao pós-doutorando **Stephano Spanó Mello** por toda ajuda e pela orientação na análise dos dados.

Aos **professores** membros da banca examinadora, pela disponibilidade e contribuição com críticas e sugestões.

Aos técnicos deste laboratório, **Luiz Augusto da Costa Junior** e **Sueli Aparecida Neves**, por todo o apoio prestado e momentos de entretenimento.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética e Mutagenese Ambiental que propiciaram um ótimo ambiente de trabalho: **Aline**, **Ana Claudia**, **Ana Paula**, **Cristiano**, **Daily**, **Danilo Jordão**, **Danillo Espósito**, **Flávia**, **Douglas**, **Giovana**, **Gustavo**, **Juliana**, **Leonardo**, **Mônica**, **Patrícia**, **Paulo**, **Raquel** e **Vinícius**. Pessoal, muito obrigado pela convivência maravilhosa e por todo o apoio prestado.

Aos colegas que passaram pelo Bloco G: **Ana Lúcia**, **Carla**, **Carmen**, **Cássia**, **Clara**, **Cleide**, **Douglas**, **Gilmara**, **Gustavo**, **Luciana**, **Marcelo**, **Marjori**, **Maria Sol**, **Marcelo** e **Stephano**.

Aos companheiros do laboratório de Imunogenética Molecular por toda a ajuda que prestaram e pela ótima convivência.

À **Adriana** e **Lúcia**, por zelarem pela limpeza do laboratório.

À minha mãe, **Regina** por nunca ter medido esforços para que eu pudesse completar meus estudos e por ter sido tão boa mãe.

À **Fernanda**, pelo carinho, apoio, companheirismo, paciência e compreensão nos momentos mais difíceis.

E mais uma vez, aos amigos de todos os momentos, sempre presente nos instantes de alegria e de serão no laboratório: **Danilo (Xitão)**, **Danillo (Bollor)**, **Douglas (Biscuit)**, **Paulo (Cop)** e **Stephano (Meninão)**.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIACÕES	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iv
 INTRODUÇÃO	
Radiações Ionizantes	1
Respostas celulares ao estresse genotóxico	2
Mecanismos de reparo do DNA em resposta à RI	7
 OBJETIVOS	
Objetivo Geral	15
Objetivos Específicos	15
 MATERIAL E MÉTODOS	
Sistemas celulares e cultivo	16
Irradiação	16
Teste de sobrevivência	17
Ciclo celular	17
Extração de RNA	17
Preparação dos microarranjos de cDNA.....	18
Análise dos dados gerados por microarrajos de cDNA	21
Nomenclatura dos genes	23
Transcrição Reversa para realização da qPCR	23
PCR em tempo real	23
Western Blot	25
Anticorpos	27
 RESULTADOS	
Teste de sobrevivência em fibroblastos	28
Cinética do ciclo celular em linfócitos	28
Perfil de expressão gênica por microarranjos de cDNA em fibroblastos	29
Expressão gênica transcricional avaliada por qPCR em linfócitos e fibroblastos irradiados	37
Expressão protéica	42

DISCUSSÃO

Perfis de expressão gênica em fibroblastos primários (método de microarranjos de cDNA)	46
Expressão transcricional analisada por qPCR em fibroblastos e linfócitos.....	52
Análise de expressão protéica	54

CONCLUSÕES	68
-------------------------	-----------

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
---	-----------

ANEXOS	70
---------------------	-----------

LISTA DE ABREVIações

A

ATD	Alta taxa de dose
ATM	“Ataxia telangiectasia mutated”
ATP	“Adenosine triphosphate”
ATR	“Ataxia telangiectasia and Rad3 related”
AP	“Abasic site”

B

BER	“Base excision repair”
BTd	Baixa taxa de dose

C

CDK	“Cyclin-dependent kinase”
CHK1	“Checkpoint kinase 1 homolog (S. cerevisiae)”
CHK2	“Checkpoint kinase 2 homolog (S. cerevisiae)”

D

DSB	“Double strand break”
DNA-PKcs	“DNA-dependent protein kinase”

F

FDR	“False discovery rate”
FHN	Fibroblasto humano normal

G

GGR	“Global genome repair”
-----	------------------------

J

JNK	“c-Jun N-terminal kinase”
-----	---------------------------

H

HRR	“Homologous recombinational repair”
-----	-------------------------------------

M

MMR	“Mismatch repair”
-----	-------------------

N

NER	“Nucleotide excision repair”
NHEJ	“Non-homologous end joining”

P

PCNA	“Proliferating cell nuclear antigen”
------	--------------------------------------

R

RI	Radiação ionizante
ROS	“Reactive oxygen species”

S

SSB	“Single strand break”
-----	-----------------------

T

TCR	“Transcription-coupled repair”
TD	Taxa de dose
TP53	“Tumor protein p53”

U

UV	Radiação ultra-violeta
----	------------------------

RESUMO

As radiações ionizantes (RI) são amplamente utilizadas na área médica, principalmente para diagnóstico e terapia. Uma vez que a exposição às radiações implica em sérias complicações para a saúde humana e para o meio ambiente, torna-se relevante a compreensão dos mecanismos moleculares que coordenam as respostas em diferentes tipos celulares, especialmente em células normais.

A taxa de dose (TD) é um importante fator a ser considerado em radiobiologia, com base em alguns estudos sobre a sua influência nas respostas celulares. Nesse contexto, duas TD distintas (0,5 e 2,0 Gy/min) foram testadas para verificar a influência da TD na expressão gênica e protéica em fibroblastos e linfócitos humanos. Fibroblastos primários em estado de confluência foram irradiados com 4 Gy e linfócitos com 2 Gy, sob as TDs de 0,5 e 2,0 Gy/min. Em fibroblastos, o RNA foi coletado 6 h após a irradiação, tempo em que foram analisados os níveis de expressão gênica pelo método de microarranjos de cDNA e, para alguns genes de reparo do DNA e algumas proteínas (γ H2AX, PCNA e FEN1) a expressão foi analisada por qPCR e *Western blot*, respectivamente, em ambos os tipos celulares, 2 e 6 h após a irradiação.

A análise de expressão gênica por microarranjos de cDNA efetuada pelo programa SAM revelou 94 genes (FDR < 0.05) induzidos sob a TD de 0,5 Gy/min. Os principais processos biológicos associados aos genes modulados foram metabolismo, reparo do DNA, apoptose e resposta ao estresse. Por outro lado, 34 genes foram modulados nas células irradiadas sob a taxa de dose de 2,0 Gy/min. Nesta TD, os processos biológicos de maior importância foram: metabolismo, reparo do DNA, replicação, resposta ao estresse e apoptose.

Na análise por qPCR, alguns genes de reparo (*ERCC1*, *ERCC3* (ou *XPB*), *XPF*, *XPA*, *FEN1*) e *ATM* (sensor de dano) apresentaram uma ampla diferença na modulação gênica detectada em resposta à variação na TD, principalmente nos fibroblastos analisados 2 h após a irradiação. Entretanto, essa diferença foi menor nos linfócitos. Em linfócitos houve um maior número de genes do NER reprimidos relativamente aos fibroblastos, principalmente quando se consideram as células analisadas 2 h após a irradiação, sugerindo que em linfócitos irradiados sob a menor TD, outras vias alternativas de reparo do DNA podem ter ocorrido, possivelmente para lesões do tipo quebra dupla, que são eficientemente induzidas por 2 Gy.

A análise protéica de expressão da proteína PCNA indicou que esta se mostrou reprimida nos fibroblastos irradiados com a maior TD, enquanto que a expressão de γ H2AX nos linfócitos diminuiu 6 h após a irradiação. A proteína PCNA apresentou potencial como um bom indicador dos efeitos de diferentes TDs em fibroblastos irradiados.

Em conjunto, os resultados do presente trabalho mostraram uma ampla variedade de processos biológicos envolvidos na resposta ao estresse gerado pela irradiação sob duas diferentes TDs em células humanas (linfócitos e fibroblastos) demonstrando que a TD realmente é capaz de influenciar as respostas celulares em nível transcricional e protéico, o que ainda não foi descrito na literatura. Assim, os resultados constituem informações relevantes que podem contribuir para o esclarecimento das respostas moleculares e vias de sinalização em células normais irradiadas.

ABSTRACT

Ionizing radiation (IR) has been widely applied in medicine, mainly in diagnosis and therapy purposes. Considering that the exposure to radiation lead to serious complications to human health and environment, it has been relevant to study molecular mechanisms underlying cell responses to gamma-rays in different cell types, especially in normal cells.

In radiobiology, dose rate (DR) is an important factor to be taken in account, on the basis of previous results in the literature. In this context, two distinct DR (0.5 and 2.0Gy/min.) were tested aiming to verify the influence of DR on profiles of gene and protein expression displayed by human fibroblasts and lymphocytes. Confluent primary fibroblasts were irradiated with 4Gy and lymphocytes with 2 Gy of γ -rays, doses delivered at 0.5 and 2.0 Gy/min. RNA was extracted at 6 h post-irradiation for the expression analysis by the cDNA array method in fibroblasts. Few DNA repair genes and proteins (γ H2AX, PCNA and FEN1) were analyzed by qPCR and Western blot, respectively, in both cell types, at two time-points (2 and 6 h post-irradiation).

Results on gene expression were analyzed by the SAM method, which indicated 94 up-regulated genes (False discovery rate < 0.05) at 0.5 Gy/min. The most significant biological processes associated with modulated genes were metabolism, DNA repair, apoptosis signaling and stress response. On the other hand, 34 genes were modulated in cells irradiated at 2.0 Gy/min. (4 up-regulated and 30 down-regulated genes). For such DR, the major biological processes were metabolism, DNA repair, replication, stress response and apoptosis.

By using qPCR method, some DNA repair genes (*ERCC1*, *ERCC3* (or *XPB*), *XPF*, *XPA*, *FEN1*) and *ATM* (damage sensor) were studied. A wide difference in gene modulation was detected in response to different DR, mainly for fibroblasts analyzed at 2 h post-irradiation. However, this difference was slight in lymphocytes, suggesting that other alternative repair pathways could occur in irradiated lymphocytes under low TD, possibly in consequence of DNA lesions such as double strand breaks, which are efficiently induced by 2 Gy. Interestingly, the expression of PCNA was down-regulated in fibroblasts irradiated at 2.0 Gy/min, while the expression of γ H2AX in lymphocytes decreased at both DR 6 h post-irradiation,

These findings indicated several biological processes involved in stress responses generated by irradiation at two different DR in human cells. Actually, DR influenced cellular responses at transcriptional and protein levels. These data obtained at molecular level provide relevant information towards clarifying the mechanisms underlying cellular responses displayed by irradiated- normal cells.

INTRODUÇÃO

Radiações Ionizantes

As radiações ionizantes (RIs) são amplamente utilizadas na área da saúde, principalmente em diagnóstico e terapias, mas a exposição crônica ou aguda, sob diferentes doses ou taxas de dose, pode implicar em sérias complicações para a saúde humana. Portanto, a compreensão das respostas celulares aos danos induzidos no DNA pela RI sob diferentes condições de exposição é de grande importância.

O DNA é o principal alvo da RI e sofre vários tipos de lesões, incluindo alterações de base, quebras de fita simples (single-strand breaks-SSBs), dano oxidativo e quebras de fita dupla (double-strand breaks-DSBs) (Li *et al.*, 2001; Belli *et al.*, 2002). As células respondem às lesões no DNA por meio da ativação de um complexo mecanismo que envolve diversos processos, como a ativação transcricional e pós-transcricional de grupos de genes incluindo aqueles associados ao bloqueio do ciclo celular, reparo do DNA e, em algumas circunstâncias, à apoptose (Khanna & Jackson, 2001; Li *et al.*, 2001), dependendo da extensão dos danos no DNA e do tipo celular.

Segundo Little (2000), o que diferencia a RI de outros agentes químicos ou físicos carcinogênicos, os quais são específicos para certos tecidos, é a sua capacidade de penetrar nas células sem ser impedida por barreiras celulares. Assim, todas as células do corpo são susceptíveis aos danos provocados pela RI. Esta, não é por si só, o fator determinante do processo de carcinogênese, pois o câncer é formado progressivamente a partir do acúmulo de eventos mutacionais, sendo que a frequência desses eventos pode variar de acordo com outros fatores, como pré-disposição ou tipo de exposição. De acordo com Ulrich e Ponnayia (1998), o papel específico, e talvez único da RI na instabilidade genômica é a iniciação do processo carcinogênico. A radiação pode induzir uma instabilidade transmissível nas células, sendo que estas podem apresentar uma probabilidade aumentada de ocorrência de mutações, mesmo muitas gerações após a irradiação (Little, 2000).

As DSBs são consideradas as lesões mais importantes no DNA induzidas pelas radiações (Khanna *et al.*, 2001; Belli *et al.*, 2002). Além destas, danos oxidativos gerados pelas espécies reativas de oxigênio (reactive oxygen species: ROS) também podem ser produzidos (Bohr & Dianov, 1999; Slupphaug *et al.*, 2003). Quando essas lesões não são processadas ou são processadas de maneira

inadequada pelos mecanismos de defesa da célula (incluindo o reparo do DNA), a consequência é a indução de mutações e rearranjos cromossômicos, e eventualmente, morte celular.

Há evidências de que a RI altera a expressão gênica, interferindo em vias de sinalização intra e intercelulares. Algumas características das radiações, como qualidade, meia-vida, dose e taxa de dose (TD) podem causar diferentes respostas biológicas (Hall, 2000; Dainiak, 2002). Estudos utilizando a formação de micronúcleos e inibição de proliferação como indicadores de resposta biológica demonstraram que a TD influencia a resposta celular em células humanas de osteossarcoma (Magaie *et al.*, 2003). Para raios γ ou γ , a TD é um dos principais fatores que determinam as consequências biológicas de uma dose absorvida. Em células de hamster Chinês (linhagem CHL-F), uma alta taxa de dose (ATD) induziu um aumento nas frequências de morte celular (Hall, 2000). Os efeitos da TD foram associados a processos de reparo do DNA, sendo que a literatura continua escassa sobretudo quanto à sua influência sobre a expressão gênica transcricional e protéica. Recentemente, Collis *et al.* (2004) demonstraram que lesões no DNA provocadas sob condições de TD reduzida não ativaram a proteína ATM sensora de dano no DNA, sendo que essa falha em ativar vias de reparo associadas à proteína ATM contribui para o aumento da letalidade em células expostas continuamente a baixas taxas de dose (BTD).

Respostas celulares ao estresse genotóxico

É bem conhecido que a exposição a certas substâncias químicas está associada ao desenvolvimento de câncer. Por exemplo, essa ligação já foi feita entre a aflatoxina e a indução do câncer de fígado, o benzeno e a leucemia, e o tabagismo associado ao câncer de pulmão. Diversos carcinógenos já foram identificados, muitos dos quais foram classificados como agentes genotóxicos, o que significa que esses químicos atuam sobre o DNA e produzem alterações no material genético do indivíduo. Esses agentes são apenas algumas das fontes ambientais de estresse genotóxico. Outras incluem as radiações UV e ionizantes (RI), drogas terapêuticas e produtos do metabolismo celular normal. Como resultado, os organismos estão constantemente expostos a uma grande variedade de agentes causadores de estresse genotóxico. As células lidam com os danos induzidos no DNA por esses agentes por meio de um repertório de respostas. Alterações que afetem esses

mecanismos podem desencadear o processo de carcinogênese e outras doenças somáticas. Por essa razão, o entendimento das respostas celulares a agentes causadores de estresse genotóxico é importante para a prevenção e para o tratamento de cânceres humanos.

As respostas ao estresse genotóxico podem ser definidas como uma cascata de sinalização na qual as lesões no DNA atuam como um sinal inicial que é detectado por proteínas sensoras e transmitido aos efetores por transdutores de sinais. As proteínas efetoras recebem o sinal e executam diversas funções celulares, entre elas, o bloqueio do ciclo celular, o reparo do DNA e a apoptose (Figura 1). Alguns autores sugerem que membros da superfamília de proteínas PI3K (fosfatidilinositol 3-quinases), que são ativadas muito cedo em resposta a lesões no DNA, podem atuar como sensoras e/ou iniciadoras de mecanismos de resposta ao estresse genotóxico (Durocher & Jackson, 2001; Shiloh, 2003). A família PI3K em humanos inclui as proteínas ataxia telangiectasia mutada (ATM), ATM- e Rad3-related (ATR), ATX/SMG-1, mTOR/FRAP e DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) (Plumb *et al.*, 1999; Rotman & Shiloh, 1999; Abraham, 2001; Bao *et al.*, 2001).

Figura 1: As respostas celulares ao estresse genotóxico compreendem cascatas de sinalização nas quais as lesões no DNA atuam como um sinal inicial. Esse sinal é detectado por proteínas sensoras e transmitido aos efetores por transdutores de sinais. As proteínas efetoras recebem o sinal e executam diversas funções celulares, entre elas, bloqueio do ciclo celular, reparo do DNA e apoptose.

Tanto ATM quanto ATR podem ser ativadas por danos no DNA, embora não seja conhecido exatamente como essas duas quinases reconhecem o dano. ATM responde principalmente a quebras duplas induzidas por RI, ao passo que ATR responde a lesões induzidas pelos raios UV ou a agentes que causam bloqueio na forquilha de duplicação (Wright *et al.*, 1998; Hekmat-Nejad *et al.*, 2000; Lowndes & Murguia, 2000; Pandita *et al.*, 2000; Abraham, 2001; Andegeko *et al.*, 2001). Não há uma distinção clara entre os sinais que ativam essas duas proteínas, pois ATM também atua em algumas respostas à radiação UV, mediando o reparo de lesões induzidas por esse tipo de radiação e a fosforilação de STAT3 (proteína que participa do crescimento celular e apoptose) (Hannan *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003). ATM também está envolvida na sinalização em resposta a UVA e no controle de apoptose, ao passo que ATR atua na sinalização em resposta a UVC e também no controle de apoptose (Heffernan *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002). Além disso, ATM está envolvida na resposta ao estresse oxidativo, tendo sido demonstrado que os alvos de ATM/ATR são fosforilados por ATR em resposta à hipóxia e por ATM em resposta à reoxigenação (Hammond *et al.*, 2002; Hammond *et al.*, 2003; Watters, 2003).

A ativação de ATM / ATR pode conduzir as células a um bloqueio do ciclo celular, que pode ocorrer nas fases G1, S ou G2. Esse processo pode ser mediado através da ação de CHK1 e CHK2, duas quinases de *checkpoint* (Figura 2). O principal responsável pelo *checkpoint* em G1 é a proteína TP53. CHK2 pode fosforilar TP53 na serina 20, ativando o *checkpoint* em G1 (Chehab *et al.*, 2000; Hirao *et al.*, 2000). Esse processo é ATM-dependente, uma vez que ATM fosforila CHK2 em Thr68 (Ahn *et al.*, 2000; Matsuoka *et al.*, 2000). O envolvimento da via ATR-CHK1 no *checkpoint* em G1 permanece desconhecido. Estudos recentes mostraram que a via ATM-CHK2 não atua apenas no bloqueio em G1. A exposição à RI durante a fase S ativa a mesma via, exceto pelo fato de que, nesse caso, ocorre a degradação de Cdc25A (Falck *et al.*, 2001). De modo semelhante, CHK1 também medeia a degradação de Cdc25A para promover o bloqueio em S (Xiao *et al.*, 2003).

Além de CHK1 e CHK2, várias outras proteínas também estão implicadas no *checkpoint* em S mediados por ATM ou ATR, ou ambos, em resposta a vários agentes indutores de danos no DNA (Tibbetts *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2000; Rappold *et al.*, 2001; Girard *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2002; Foray *et al.*, 2003). Diferentemente dos *checkpoints* em G1 e S, a via ATR-CHK1 desempenha um papel mais

importante no bloqueio em G2 (Liu *et al.*, 2000; Zhao & Piwnica-Worms, 2001). Embora a via de bloqueio ATR-CHK1 atue efetivamente no checkpoint em G2, quando as lesões no DNA ocorrem durante a fase G1 ou S, esse mecanismo falha se o dano no DNA for provocado durante a fase G2. Nesse caso, a via ATM-CHK2 é ativada e realiza o bloqueio em G2 pela fosforilação de Cdc25C (Brown *et al.*, 1999). Desse modo, pode-se notar que as vias ATR-CHK1 e ATM-CHK2 não são braços paralelos que atuam independentemente no mecanismo de resposta ao dano no DNA, mas são vias que trabalham de maneira integrada e coordenada.

O bloqueio do ciclo celular é uma resposta extremamente importante observada em resposta a danos induzidos no DNA, sendo que interferências nesse mecanismo podem resultar em acúmulo de alterações genéticas e/ou crescimento celular descontrolado, levando à instabilidade genômica e desenvolvimento neoplásico (Tlsty *et al.*, 1995). Diferentes tipos de estresse genotóxico podem ativar mecanismos de controle do ciclo celular (*checkpoints*) diferentes. Por exemplo, as radiações ionizantes podem promover os bloqueios nas fases G1/S, intra-S e G2/M algumas horas após a irradiação (Kuerbitz *et al.*, 1992; Han *et al.*, 1995; Bartek *et al.*, 2004), ao passo que agentes metilantes, como por exemplo a droga temozolomida, provocam o bloqueio em G2/M após a segunda fase S depois do tratamento com a droga (Hirose *et al.*, 2001).

Em células de mamíferos, o bloqueio do ciclo nas fases G1, S, e G2 pode ocorrer (conforme mencionado anteriormente) após a exposição das células a agentes genotóxicos, sendo que este protege as células de danos genéticos permanentes e transformação neoplásica. O bloqueio do ciclo após lesões no DNA favorece a sobrevivência celular fornecendo um tempo maior para que as células reparem os danos no DNA. Entretanto, dependendo das lesões, a célula pode entrar em apoptose.

O mecanismo pelo qual a célula toma a decisão final pela manutenção das vias de reparo do DNA em alternativa à apoptose, ou vice-versa não é muito bem conhecido, mas parece estar relacionado à quantidade de lesões no DNA. O processo de reparo do DNA é altamente dependente de energia, de tal maneira que quando a quantidade de lesões é excessiva, o reparo do DNA pode consumir muito ATP, de modo que a célula deixa de ter energia para realização de outros processos metabólicos fundamentais, como troca iônica por exemplo. Dessa forma, as células acabam morrendo por necrose. A necrose é um tipo de morte celular que provoca a

ativação de resposta imunológica, o que para o tecido é indesejável, uma vez que células saudáveis também morrem devido à resposta inflamatória. Por esse motivo, em uma tentativa de evitar essa “catástrofe energética”, as células “optam” pela morte celular programada, em alternativa ao reparo, quando a quantidade de lesões no DNA é muito grande (Eguchi *et al.*, 1997; Leist *et al.*, 1997; Ha & Snyder, 1999; Bernstein *et al.*, 2002).

Figura 2: As vias de sinalização de ATM, ATR e DNA-PK após a indução de danos no DNA. Uma vez ativadas, essas quinases podem fosforilar vários efetores que executam as respostas que podem, tanto conduzir a célula ao bloqueio do ciclo celular nas diversas fases do ciclo, quanto iniciar o processo de apoptose. ATR e ATM desempenham funções importantes na mediação dos *checkpoints* por meio da ação de CHK1 e CHK2, respectivamente, e TP53. Por outro lado, a DNA-PK ativa a via de apoptose mediada por TP53. Além disso, um *feedback* negativo permite que MDM2 iniba TP53. (Modificado de Yang *et al.*, (2003)).

Uma das moléculas envolvidas no processo da troca da resposta de reparo para a apoptose é a proteína TP53. Após o dano no DNA, essa proteína é rapidamente ativada pós-transcricionalmente. O aumento nos níveis de TP53 ativa, regula a expressão de efetores (Appella & Anderson, 2000). A concentração celular de TP53 é controlada pela proteína MDM2 (mouse double minute 2), que se liga à TP53, inibindo a sua atividade, atuando como uma ligase de ubiquitina, promovendo a passagem dessa proteína do núcleo para o citoplasma para a degradação pelo sistema ubiquina-proteassomo (Alarcon-Vargas & Ronai, 2002). TP53 possui a capacidade de ativar a transcrição, tanto de genes pró-sobrevivência (P21, GADD45, 14-3-3 σ e MDM2) quanto de genes pró-apoptóticos (APAF1, BID, BAX, TNF, FAZ, PUMA e NOXA). Uma explicação para essa aparente contradição é que baixos níveis de TP53 desempenham uma atividade anti-apoptótica, enquanto que altos níveis dessa proteína desempenham atividade pró-apoptótica (Chen *et al.*, 1996; Lassus *et al.*, 1996). Esse fato sugere a existência de uma concentração intracelular limite de TP53 que determina o “destino” celular. Uma importante observação é que independentemente do papel dessa proteína como um fator de transcrição, uma porção de TP53 ativa pode translocar diretamente para as mitocôndrias, induzindo a permeabilização da membrana mitocondrial pela formação de complexos com as proteínas BCL-XL e BCL-2, resultando na liberação de citocromo c desencadeando a apoptose (Marchenko *et al.*, 2000; Mihara *et al.*, 2003). Portanto, as diversas funções de TP53 em resposta às DSBs incluem a regulação transcricional de genes de controle do ciclo celular, reparo e apoptose, além da ativação direta de apoptose pela via mitocondrial (Bree *et al.*, 2004; Sengupta & Harris, 2005).

Mecanismos de reparo do DNA em resposta à RI

Os mecanismos de reparo do DNA e os “checkpoints” atuam conjuntamente na manutenção da integridade genômica das células danificadas pela radiação ionizante. Conforme já mencionado, esta produz um amplo espectro de lesões no DNA, como danos nas bases, SSBs e DSBs (Little, 2000; Belli *et al.*, 2002). As DSBs são consideradas o tipo de lesão de maior efeito biológico para a formação de aberrações cromossômicas, morte celular e transformação (Natarajan *et al.*, 1993; Hall, 2000; Belli *et al.*, 2002), mas sem dúvida, as outras lesões também são importantes. As DSBs podem ser induzidas, tanto por agentes exógenos como as radiações ionizantes e alguns tipos de drogas, quanto por agentes endógenos, como

as ROS (*Reactive oxygen species*). Uma forquilha de duplicação que encontra uma quebra de fita simples ou outros tipos de lesões também pode produzir uma DSB (Scott & Pandita, 2006).

São conhecidos vários sistemas de reparo do DNA, sendo que aqueles que atuam sobre DSBs são principalmente de dois tipos: recombinação homóloga (*homologous recombinational repair* - HRR) e junção de extremidades não-homólogas (*non-homologous end joining* - NHEJ) (Karran, 2000; Khanna *et al.*, 2001; Weterings & van Gent, 2004).

A recombinação homóloga une as DSBs utilizando uma fita de DNA homóloga como molde. Como consequência, esse tipo de reparo promove uma alta fidelidade e está menos propenso a erros (Belli *et al.*, 2002). A via de reparo HRR envolve o processamento das extremidades, formando uma região de fita simples no DNA, seguido pela invasão da fita molde do DNA homólogo, formando uma estrutura conhecida como junção de Holliday (Haber *et al.*, 2004). A síntese do DNA é então realizada, prosseguindo com a migração da cadeia seguida pela resolução do heteroduplex (West, 2003). A proteína RAD51 se associa às regiões de fita simples e é responsável pela invasão dessa fita no DNA homólogo. O complexo MRE11/RAD50/NBS1 pode atuar nas extremidades das DSBs antes da associação de RAD51. BRCA2 está envolvida na associação de RAD51 nos locais de fita simples (Pellegrini *et al.*, 2002). BRCA1 também é requerida na via de reparo HRR, possivelmente exercendo atividade regulatória. Outras proteínas envolvidas nesta via de reparo são RAD52, XRCC2 e XRCC3.

A via HRR é ativada no reparo de DSBs que surgem devido ao bloqueio da forquilha de duplicação. Células deficientes para a via de reparo HRR são levemente sensíveis às RI, entretanto, são altamente sensíveis a agentes indutores de *crosslinks* no DNA (Thompson & Schild, 2001). Essas evidências são consistentes com a hipótese de que a função primária de HRR é o reparo de DSBs nas forquilhas de duplicação, ao passo que NHEJ pode reparar as DSBs que foram induzidas em qualquer outra parte do DNA (Scott *et al.*, 2006).

A principal via de reparo de DSBs em mamíferos é a NHEJ (Lees-Miller & Meek, 2003; Pastwa & Blasiak, 2003; Valerie & Povirk, 2003). As proteínas que fazem parte dessa via incluem o heterodímero formado por KU70 e KU80, e a subunidade catalítica da DNA-PKcs. Heterodímeros das proteínas KU se associam às extremidades das quebras duplas do DNA, e fazem o recrutamento das proteínas

Artemis, XRCC4, LIG4 e DNA polimerase μ . Artemis tem uma atividade endonuclease que promove o processamento das extremidades da quebra necessário para a ligação apropriada e para o preenchimento do *gap* pela LIG4 e pela DNA polimerase μ . O complexo MRE11/RAD50/NBS1, que apresenta atividade de exonuclease, endonuclease e de abertura da dupla fita de DNA *in vitro*, também pode estar envolvido no processamento das extremidades (Trujillo *et al.*, 1998; Paull & Gellert, 1999). Além dessas proteínas, recentemente foi relatada a descoberta de uma outra que também parece estar envolvida na via NHEJ. Ahnesorg *et al.* (2006) identificaram uma proteína denominada XRCC4-like factor (XLF, também conhecida como Cernunnos). Os mesmos autores mostram que XLF interage diretamente com o complexo XRCC4-Ligase IV e que a repressão de XLF em linhagens celulares humanas promove radiosensibilidade e uma diminuição na eficiência de NHEJ.

No que se refere a alteração de bases e dano oxidativo no DNA, outros mecanismos de reparo, tais como *nucleotide excision repair* (NER) e *base excision repair* (BER) também estão envolvidos. O reparo pela via NER está relacionado à presença de *crosslinks* entre as fitas do DNA ou qualquer tipo de lesão que induza distorções no DNA (Drablos *et al.*, 2004). De uma maneira geral, o reparo por essa via apresenta os seguintes passos: (1) reconhecimento da lesão no DNA; (2) recrutamento do complexo de reparo; (3) preparação do DNA para o reparo pela ação de helicases; (4) incisão na fita danificada, de cada lado da lesão, com a liberação do fragmento danificado com cerca de 24-32 nucleotídeos; (5) preenchimento do *gap*; (6) ligação do novo fragmento sintetizado (ligação fosfodiéster) (Balajee & Bohr, 2000; Hanawalt, 2002; Sancar *et al.*, 2004).

Em humanos, o reparo por excisão é realizado por 6 fatores principais (RPA, XPA, XPC, XPG, e os complexos TFIIH e XPF-ERCC1) (Mu *et al.*, 1995; Mu *et al.*, 1996; Evans *et al.*, 1997). A deficiência no reparo por excisão de nucleotídeos leva a uma síndrome de fotossensibilidade denominada xeroderma pigmentosum (XP), caracterizada pela alta incidência de câncer de pele induzido pelos raios-UV (Cleaver, 1968). Algumas das proteínas do NER também estão envolvidas em outros processos biológicos. Três dos seis fatores de reparo por excisão de nucleotídeos desempenham funções essenciais na duplicação do DNA (RPA), transcrição (TFIIH) e recombinação (XPF-ERCC1) (Sancar *et al.*, 2004). As proteínas RPA, XPA e XPC estão envolvidas no reconhecimento das lesões (Mu *et al.*, 1997; Wakasugi & Sancar, 1998; Wakasugi & Sancar, 1999). TFIIH é um complexo formado por 6 sub-unidades com atividades de helicase 3'-5' e 5'-3' fornecidas pelas sub-unidades XPB

e XPD respectivamente (Egly, 2001). Após o reconhecimento da lesão, XPF-ERCC1 é recrutada para o complexo, resultando em duas incisões nos arredores da lesão, culminando com a excisão do oligômero danificado (Sancar *et al.*, 2004). O *gap* resultante é preenchido pelas DNA polimerases δ e ϵ , seguindo-se pela ligação da fita por uma DNA ligase (Figura 3).

O NER apresenta duas vias distintas: o reparo genômico global (*global genomic repair* - GGR) e o reparo associado à transcrição (*transcription coupled repair* - TCR). O GGR atua sobre danos localizados em regiões não transcritas do DNA, ao passo que o TCR repara danos localizados em regiões transcricionalmente ativas (Balajee *et al.*, 2000; Hanawalt, 2002). O reparo em regiões transcricionalmente ativas ocorre de maneira muito mais rápida que em regiões não transcricionalmente ativas (Bohr *et al.*, 1985; Mellon *et al.*, 1987; Mellon & Hanawalt, 1989). O TCR requer a atividade das proteínas CSA e CSB (Venema *et al.*, 1990; Friedberg, 1996; Hanawalt, 2002).

Figura 3: Reparo por excisão de nucleotídeos em células humanas. A lesão no DNA é reconhecida pelas proteínas RPA, XPA e XPC/TFIIH, que se associam ao sítio do dano de maneira aleatória. Essas proteínas formam um complexo no sítio da lesão e por meio da hidrólise de ATP, realizam o relaxamento da fita do DNA por cerca de 25 pb nos arredores da lesão formando o Complexo de Pré-incisão 1 (PIC1). XPC é então liberada e em seu lugar se associa XPG formando um complexo de pré-incisão ainda mais estável, o PIC2. Finalmente, XPF/ERCC1 é recrutado no sítio da lesão gerando o complexo de pré-incisão 3 (PIC3). A fita danificada sofre uma incisão aproximadamente na 6ª ligação fosfodiéster na posição 3' do dano por XPG e na 20ª $\pm$ 5 ligação fosfodiéster na posição 5' por XPF/ERCC1. O fragmento resultante com cerca de 24-32 nucleotídeos é liberado e o gap preenchido por POL δ/ϵ com o auxílio das proteínas de duplicação PCNA e RFC. (Modificado de Sancar et al. (2004)).

As mutações ocorridas nas bases do DNA são também reparadas pelo mecanismo BER (*base nucleotide excision*) que inclui: (1) excisão da base danificada, (2) incisão no esqueleto do DNA no sítio AP, (3) remoção da extremidade AP, (4) preenchimento do gap formado, e (5) ligação da nova fita sintetizada (Wilson *et al.*, 2003). Em células de mamíferos, o BER é a principal via de reparo que atua contra danos de fita simples causados por agentes metilantes, oxidantes e outros agentes genotóxicos, além de um grande número (cerca de 10000 por célula por dia) de depurinações espontâneas (Evans *et al.*, 2000).

O reparo por excisão de bases é iniciado por uma DNA glicosilase que retira a base danificada formando um sítio abásico (AP) na molécula do DNA. As DNA glicosilases são específicas, reconhecendo bases oxidadas/reduzidas, alquiladas (geralmente metiladas), bases desaminadas ou bases mal pareadas (Sancar *et al.*, 2004). Algumas DNA glicosilases apresentam somente a função glicosilase, catalisando apenas a remoção da base danificada formando um sítio AP, ao passo que outras clivam a base por um mecanismo clivagem da fita do DNA (McCullough *et al.*, 1999). As reações de lisases estão associadas à remoção de bases oxidadas, mas não à remoção de bases alquiladas.

Após a reação de clivagem, o resíduo 3' é geralmente removido por uma AP endonuclease pela incisão 5' no açúcar formando um gap que é preenchido por uma DNA polimerase, culminando com a ligação da fita. Nos casos em que a glicosilase não apresenta a atividade liase, a incisão é feita por APE1 em células de mamíferos e o açúcar é removido pela atividade liase da DNA polimerase β (POL β) (Matsumoto & Kim, 1995; Beard & Wilson, 2000) que também preenche o gap formado de 1 nucleotídeo. Essa via realizada com o preenchimento de apenas um nucleotídeo é denominada Via Curta do BER. Em mamíferos, POL β , APE1 e DNA ligase III-XRCC1 são utilizadas na via curta do reparo por excisão de bases. Já em outra via do BER, a Via Longa, APE1 faz uma incisão 5' no sítio AP. Então um complexo formado por DNA POL δ/ϵ , PCNA e FEN1 realizam a excisão produzindo um gap de 2-13 nucleotídeos (Sancar *et al.*, 2004). O gap é preenchido pela DNA POL δ/ϵ com o auxílio de PCNA e em seguida a ligação é feita pela DNA ligase 1 (Frosina *et al.*, 1996; Klungland & Lindahl, 1997). A POL β também pode atuar na via longa (Prasad *et al.*, 2000) (Figura 4). Dependendo do tecido, uma ou outra via pode predominar, entretanto acredita-se que o reparo iniciado por glicosilases ocorre pela via curta, ao passo que aqueles iniciados em sítios AP resultantes de hidrólise

espontânea ou perda oxidativa de base seguem a via longa do BER (Sancar *et al.*, 2004).

Figura 4: Reparo por excisão de base em células de mamíferos. A base danificada é removida por uma DNA glicosilase gerando um sítio AP. Dependendo dos eventos iniciais durante a remoção da base, a via a ser seguida pode ser a curta (remoção de apenas 1 nucleotídeo) ou a longa (remoção de 2-10 nucleotídeos). Quando a base danificada é retirada por uma glicosilase que apresenta função de clivagem, a via curta é ativada. Ocorre a clivagem da ligação fosfodiéster na posição 3' do sítio AP e a endonuclease APE1 cliva a fita na posição 5' após o dano e recruta a POL β que preenche o gap de 1 nucleotídeo. A ligação é feita pelo complexo LIG3/XRCC1. Quando o sítio AP é gerado por glicosilases hidrolíticas ou por hidrólise espontânea, o reparo geralmente segue a via longa. APE1 cliva a fita na posição 5' e o complexo RFC/PCNA-POL δ/ε realiza a síntese deslocando cerca de 2-10 nucleotídeos. Esses nucleotídeos são clivados pela endonuclease FEN1 e a nova fita sintetizada é ligada pela Ligase 1. (Modificado de Sancar et al. (Sancar *et al.*, 2004)).

Resumidamente, as DSBs podem ser reparadas tanto por HRR ou NHEJ, sendo que HRR atua principalmente na fase S/G2 quando há bloqueio da forquilha de duplicação e NHEJ atua principalmente na fase G1 reparando DSBs em qualquer local do DNA. Por outro lado, a maioria das alterações nas bases do DNA é removida pela via BER, sendo que o NER remove principalmente aductos que distorcem a conformação do DNA. Entretanto, é importante ressaltar que podem ocorrer algumas sobreposições nos substratos das proteínas e estas podem, eventualmente, atuar em mais de uma via de reparo (Lindahl *et al.*, 1997; Norbury & Zhivotovsky, 2004; Brugmans *et al.*, 2007).

No presente trabalho foi realizado um estudo sobre a influência da taxa de dose nas respostas celulares em uma linhagem de fibroblastos primários e em linfócitos de sangue periférico humano, partindo da hipótese de que a variação da TD das radiações gama pode causar diferenças nas respostas biológicas.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Estudar a influência da taxa de dose sobre a expressão gênica em uma linhagem de fibroblastos (células primárias) e em linfócitos de sangue periférico humano irradiados com raios-γ sob duas taxas de dose distintas: 0,5 e 2,0 Gy/min com uma dose final de 4 Gy para fibroblastos e 2 Gy para linfócitos. Nesse estudo, pretende-se focalizar genes envolvidos nos mecanismos de reparo do DNA, visando determinar a contribuição das possíveis vias envolvidas no processamento das lesões induzidas pelos raios-gama.

Objetivos Específicos

1) Avaliar a sobrevivência celular (viabilidade pelo método do kit XTT) em fibroblastos e analisar o ciclo celular, por citometria de fluxo, nos linfócitos, ambos irradiados com as taxas de dose de 0,5 e 2,0 Gy/min.

2) Avaliar os perfis transcricionais (pelo método de microarraios de cDNA) em fibroblastos humanos normais em resposta a duas taxas de dose de radiação ionizante gama (0,5 e 2,0 Gy/min) 6 h após a irradiação.

3) Investigar a contribuição dos processos de reparo pelas vias NER e BER (dano oxidativo) em resposta à irradiação sob duas taxas de dose diferentes em fibroblastos e linfócitos humanos, por meio da análise de expressão gênica transcricional (método da qPCR) para genes participantes do BER e NER, tais como FEN1 e XRCC1 (BER), XPA, ERCC3 (XPB) e XPC (NER).

4) Investigar a contribuição dos processos de reparo (vias NER e BER) em resposta à irradiação sob duas taxas de dose diferentes em fibroblastos e linfócitos humanos, por meio da análise de expressão protéica para proteínas-chave participantes do BER e NER, tais como FEN1 e XRCC1 (BER), XPA, ERCC3 (XPB) e XPD (NER) além de outras participantes do controle do ciclo celular, como PCNA e a proteína de sinalização de DSBs γH2AX.

MATERIAIS E MÉTODOS

Sistemas celulares e cultivo

a) Linfócitos de indivíduos normais

As culturas de linfócitos foram preparadas a partir de amostras de sangue provenientes de indivíduos sadios ($n=3$ e $n=4$, para a análise de expressão gênica e ciclo celular, respectivamente), não subordinados a nenhum membro responsável por esse trabalho, cujas ocupações não os expunham à RI. Foram coletados 30 ml de sangue/indivíduo, por punção venosa, usando tubos Vacutainer (Beckton & Dickinson, EUA) contendo heparina sódica. Os linfócitos foram cultivados em frascos de cultura cilíndricos (3,5 x 6,5 cm) contendo meio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) suplementado com 20% de soro fetal bovino (Cultlab) e 2% de PHA (fitohemaglutinina A) e mantidos em estufa à temperatura de 37°C após serem irradiados.

b) Fibroblastos primários (linhagem FHN)

As células da linhagem de fibroblasto humano normal (FHN) foi cultivada em monocamada em frascos de 25 cm², com 10 ml de meio de cultura HAM F10 + DEM (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) na proporção de 1:1, suplementado com 15% de soro fetal bovino (Cultlab) e mantidas em estufa à temperatura de 37°C. Para manutenção, as culturas foram subcultivadas quando ocorria confluência celular. As células foram irradiadas em estado de confluência (fase G0 do ciclo celular).

Irradiação

Nos experimentos de expressão gênica e protéica e análise do ciclo celular, as células foram submetidas à irradiação (radiação- γ , fonte ⁶⁰Co, aparelho Gammatron S-80, Siemens, 1,25 MeV, do HC-FMRP) com uma dose de 4 Gy para os fibroblastos e 2 Gy para os linfócitos, sob duas taxas de doses distintas: 0,5 e 2,0 Gy/min. Para a realização da análise da sobrevivência celular nos fibroblastos, os mesmos foram irradiados com as doses de 1, 2, 4 e 8 Gy sob as TD de 0,5 e 2,0 Gy/min. Durante as irradiações, um dosímetro foi posicionado no campo de irradiação para que possíveis desvios entre as doses administradas fossem corrigidas antes do término da irradiação. A utilização de um sistema de dosimetria

in vivo para a monitoração das irradiações das linhagens celulares proporciona confiabilidade das taxas de dose e das doses totais administradas às células.

Teste de sobrevivência

Os fibroblastos foram irradiados com as doses de 1, 2, 4 e 8 Gy com uma TD de 0,5 e 2,0 Gy/min, totalizando três experimentos independentes. As culturas foram mantidas a 37°C por aproximadamente seis dias, sem atingir confluência. A curva de sobrevivência foi estimada com a utilização do Cell Proliferation Kit II (XTT) (Roche, Germany) de acordo com as instruções do fabricante.

Ciclo celular

A análise do ciclo celular foi feita em linfócitos de 4 indivíduos diferentes, sendo 2 do sexo masculino e 2 do sexo feminino. Os tempos de colheita para a análise do ciclo celular foram 2, 6, 24 e 48 h após a irradiação. Para tanto, as culturas foram centrifugadas em um tubo de 15 mL por 5 min a 1000 rpm; as células foram ressuspensas em 1 mL de PBS gelado e centrifugadas novamente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensado em 100 µL de PBS gelado. Adicionou-se cuidadosamente 2 mL de etanol (70%) gelado, sendo as amostras deixadas *over night* a -20°C e centrifugadas por 5 min a 1500 rpm. O *pellet* foi ressuspensado em 333 µL de PBS e transferido para um tubo de 1,5 mL. Foi adicionado 1 mL de RNase (10 mg/mL) por 30 min à 37 °C. Foram adicionados 164 µL de iodeto de propídio (50 µg/mL) e as amostras deixadas por 1 h no gelo e no escuro até o momento da análise. Foram analisadas 10000 células em citômetro PCA (Guava Technologies, Hayward, CA, USA) utilizando-se o programa CytoSoft (Guava Technologies, Hayward, CA, USA). Os dados foram analisados pelo teste de análise de variância (ANOVA) com pós teste de Bonferroni, comparando grupos tratados com o grupo controle. Para dados sem distribuição normal, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn comparando grupos tratados com o grupo controle.

Extração de RNA

Para a extração de RNA total, as células foram lisadas com trizol (Invitrogen) e o RNA precipitado com isopropanol a -20°C. A qualidade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose com formaldeído.

Preparação dos microarranjos de cDNA

Biblioteca de cDNAs

Os microarranjos utilizados neste estudo de caracterização em larga escala da expressão diferencial foram construídos a partir de uma biblioteca de cDNA humano (proveniente do IMAGE Consortium, gentilmente cedida pela Dr^a Catarina Nguyen, (INSERM, França) e Dr. Geraldo Aleixo S. Passos (Faculdade de Odontologia –FORP- Departamento de Genética – FMRP).

A biblioteca possui alguns clones com seqüências EST, sendo que a maioria dos genes já foram totalmente caracterizados, com tamanhos moleculares que variam de 250 a 1500 pb, cujos clones encontram-se seqüenciados e catalogados. Os clones estão identificados com seus respectivos “accession number” (acc) no GenBank, Clone ID, nome do gene e a posição de cada clone nas placas de 384 poços em planilhas do programa Excel (Microsoft, EUA). Esta biblioteca está conservada em placas de microtitulação (384 poços) a -80°C .

Preparação dos microarranjos em membranas de nylon (Hybond N+) para marcação com radioisótopo

As membranas de Nylon foram recortadas e coladas sobre lâminas de vidro como suporte. Os cDNAs foram aplicados na forma de produtos de PCR. A deposição dos clones (560 clones em duplicata totalizando 1120 elementos), foi feita em um jogo de membranas de nylon (2,5 x 7,5 cm, dimensão de uma lâmina de microscópio) com o auxílio do robô Generation III Array Spotter (Amersham-Molecular Dynamics). As membranas foram retiradas do suporte de vidro e transferidas para folhas de papel de filtro embebidas em solução denaturante (NaOH 0,5M; NaCl 1,5M), sendo mantidas nesta solução por 20 minutos. A seguir, as membranas foram incubadas em folhas de papel de filtro embebidas em solução neutralizante (Tris HCl pH 7,4 1M; NaCl 1,5M) por 20 minutos. Posteriormente, estas foram lavadas rápida e diretamente em solução 2x SSC. O DNA foi fixado nas membranas por 2 horas a 80°C e a seguir em luz UV por 2 minutos.

Foram preparados nove pares de membranas, um par para cada ponto do experimento (um controle, um irradiado com taxa de dose 0,5 Gy/min e outro com 2,0 Gy/min; em três repetições experimentais contabilizando um total de nove pontos).

A qualidade dos microarranjos foi avaliada por hibridação com oligo-vetor marcado com ^{33}P , cuja imagem permitiu apontar os “spots” defeituosos.

Detecção do padrão de pontos por hibridação com oligo-vetor

A hibridação com um oligo-vetor tem por finalidade determinar a quantidade exata de DNA retida em cada ponto do microarranjo. Os resultados dessa hibridação inicial com o vetor são utilizados em um passo de correção dos dados obtidos pelas sondas complexas de RNA.

As membranas foram submetidas à pré-hibridação a 42 °C “overnight” com a seguinte solução de pré-hibridação: 5X SSC, 5X solução Denhardt's (5g de Ficoll 400, 5g de Polyvinyl pyrrolidone, 5 g de albumina bovina para 500ml de solução) 0,5% SDS. Foram adicionados 100µg/ml (concentração final) de DNA de esperma de salmão sonificado; a solução estoque de DNA de esperma de salmão utilizada foi de 5mg/ml e a alíquota a ser usada foi denaturada por 10 minutos a 100°C e colocada rapidamente em banho de gelo por 10 minutos.

Após a pré-hibridação, realiza-se a marcação com oligo-vetor 1S. Foi utilizada como sonda um oligonucleotídeo de DNA complementar a uma região dos vetores utilizados na biblioteca IMAGE (5' GCAAGGCGATTAAGTTGGG 3'). A marcação radioativa deste oligo foi realizada segundo o protocolo: 1 µl de oligo (1 µg/ul), 5µl de tampão 10x T4 polinucleotídeo kinase (Biolabs), 3 µl de $\gamma^{33}\text{P}$ ATP (5000Ci/mM), 1µl de T4 polinucleotídeo kinase (100 U/µl, Biolabs) , acertar o volume final para 25 µl. Incubar 10 minutos a 37°C. Incubar 10 minutos a 65 °C. Completar o volume da reação para 100 µl e purificar a sonda com sephadex G25 .

Essa sonda foi adicionada à solução de hibridação. Esta foi processada “overnight” a 42°C e a seguir foram lavadas com 1000 ml de solução 2X SSC /0,1 % SDS, 10 minutos à temperatura ambiente e 5 minutos na mesma solução aquecida a 42 °C. As membranas foram expostas à placa de sensibilidade por 24 h e a seguir foi processada a leitura dos sinais de hibridação no aparelho leitor de fósforo radioativo (Cyclone, Packard Inst., EUA).

Preparação das sondas complexas

As sondas complexas de cDNA foram preparadas a partir do RNA total extraído dos fibroblastos submetidos ao procedimento experimental proposto. Em um tubo foram adicionados: 7 µg de RNA total, 1 µl de oligo dT25 (8 µg/, µl), água q.s.q 13 µl. A reação foi incubada a 70°C por 8 minutos, 30 minutos de 70°C a 42°C. Esse processo é utilizado para garantir o anelamento do oligo (dT25) com as caudas poli-A dos RNAs mensageiros.

A seguir foram adicionados: 1 µl de RNasin (Promega, refN2511, 40U/ul), 6 µl de tampão 5x, 2µl de DTT 0,1M, 0,6 µl de dATP 20mM, 0,6 µl de dTTP 20mM, 0,6 µl de dGTP 20mM, 0,6 µl de dCTP 120µM, 3µl de $\alpha^{33}\text{P}$ dCTP 10µ Ci/µl (≥ 3000 Ci/mM), 1 µl de transcriptase reverse (SUPERScript RNase H free RT, BRL, 200U/µl), 2,8µl de água estéril (q.s.q 30 µl). A mistura de reação foi incubada a 42°C por uma hora, sendo adicionado 1 µl de transcriptase reversa incubando-se por mais uma hora a 42°C.

Após a preparação das sondas complexas pela reação de transcrição reversa e marcação de DNA fita simples, procedeu-se à degradação dos mRNA moldes e do rRNA. Para isso, foram adicionados: 1 µl de SDS 10%, 1µl de EDTA 0,5M, 3 µl de NaOH 3M. A reação foi incubada a 68°C por 30 minutos e, a seguir, por 15 minutos à temperatura ambiente. Para a neutralização da reação foram adicionados 10 µl de Tris 1M, 3 µl de HCl 2N. A seguir o volume foi ajustado para 100 µl e a sonda foi purificada em coluna sephadex. A sonda foi quantificada no cintilador e foram utilizados cerca de 40.000 cpm.

Para a incorporação de poli-A, foram adicionados 2 µg de A80; a seguir, a sonda foi denaturada por 5 minutos a 100 ° C. Em seguida, a sonda foi incubada em 1 ml de tampão de hibridação (pré-aquecido a 65 ° C) e a reação incubada a 65 °C por 2,5 h com a finalidade de proporcionar a hibridação do oligo A80 com as caudas poli-T remanescentes da reação de transcrição reversa. Após tais procedimentos, as sondas estavam prontas para proceder à hibridação.

Hibridação com as sondas complexas

Cada conjunto de membranas foi submetido à pré-hibridação durante 24 h a 65°C em 4 ml de solução de pré-hibridação com constituição igual à utilizada para a hibridação com o oligo-vetor. A hibridação com a sonda complexa foi realizada a 65°C durante 48 h. Após a hibridação, as membranas foram lavadas durante 3 horas em 1000 ml de solução de 0,1xSSC, 0,1% SDS a 68°C e expostas em placas de sensibilidade à radioatividade durante 48 h.

Deteção e quantificação dos sinais de hibridação

A aquisição das imagens foi realizada através de um leitor de fósforo incorporado (Phosphor Imager, “Cyclone” - Packard Inst.,EUA), utilizando o programa OptiQuant (Packard Inst., EUA).

Os pontos foram identificados e os sinais de hibridação foram quantificados através do programa BZScan (desenvolvido no TAGC-Inserm, Marseille, FR.) disponível no site: <http://tagc.univ-nrs.fr>.

Análise dos dados gerados por microarranjos de cDNA

Normalização

A primeira transformação aplicada aos dados é a normalização, que se incumbe de ajustar as intensidades individuais de hibridação para balanceá-las corretamente, possibilitando as comparações acerca do significado biológico das modificações. Existe uma série de razões pelas quais a normalização deve ser realizada. Estas incluem as quantidades iniciais diferentes de RNA nas sondas testadas, diferenças na eficiência de marcação, ou erros sistemáticos provenientes da leitura dos níveis de expressão. Existem muitas maneiras de se realizar essa normalização, sendo que algumas são baseadas em hipóteses simples.

No caso dos experimentos utilizando sonda marcada radioativamente, é comum que, previamente à marcação com a sonda complexa, realize-se a hibridação com uma sonda complementar ao sítio iniciador da duplicação do vetor (sonda oligo-vetor) onde os cDNAs foram clonados, procedimento que permite a quantificação da concentração de cDNA presente em cada alvo na lâmina. Existem evidências de que a eficiência de marcação é dependente da concentração de DNA no alvo, fato que leva a um erro na quantificação correta do efeito biológico. Dessa maneira, os dados gerados pelo procedimento acima mencionado (hibridação da membrana com a sonda oligo-vetor) são de grande importância para a normalização dos dados obtidos com a mesma membrana para a sonda complexa. Os valores de hibridação obtidos para a amostra biológica (sonda complexa) são apresentados como uma razão dos valores de hibridação obtidos para a sonda oligo-vetor, permitindo que essa variação seja eliminada e a significância biológica possa assim ser analisada.

Deteção de genes diferencialmente expressos

Nos primeiros trabalhos de microarranjos de cDNA, o desenvolvimento tecnológico que possibilitou a análise da expressão gênica em larga escala não foi acompanhado pelo desenvolvimento estatístico necessário para a validação desses dados. Os dados gerados sobre os níveis de expressão de milhares de genes

necessitam ser analisados conjuntamente, mas sem que ocorra a perda do nível de significância ao nível de genes individuais. Esse tipo de problema demonstra a necessidade de empregar métodos estatísticos eficazes para a detecção das alterações com real significado biológico.

De acordo com Tusher et. al. (2001), métodos baseados no teste-t convencional permitem a análise da probabilidade de que uma modificação em um gene seja ao acaso. Entretanto, no caso da análise de expressão gênica para centenas ou milhares de genes, mesmo um $p=0,01$, que no contexto da análise de poucos genes é significativa, não se mostra suficiente. Em um arranjo com 10000 genes, por exemplo, uma análise convencional (considerando-se $p = 0,01$) indicaria que existe a probabilidade de que 100 genes sejam erroneamente considerados como diferencialmente expressos. Problemas desse tipo levaram o grupo de bioestatística do Prof. Robert Tibshirani (Stanford University) a desenvolver um método estatístico adaptado especificamente para “microarrays”, o “Significance Analysis of Microarrays (SAM)” (Tusher et al., 2001).

Para efetuar a análise estatística dos dados gerados, optou-se por utilizar o programa SAM (<http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/index.html>). A análise baseia-se em uma série de testes-t específicos para cada gene, adaptados para a detecção (em larga escala) de genes diferencialmente expressos. A partir da observação de que as flutuações casuais são específicas para cada gene, o teste SAM é baseado na razão entre a diferença das médias das situações controle e tratado e o desvio padrão de cada gene, calculados a partir de repetição experimental. A porcentagem de genes identificados por mudanças aleatórias é chamada de Frequência de Descobertas Falsas (FDR), um método inicialmente idealizado por Benjamini e Hochberg (1995) e definido como a proporção esperada de rejeições falsas.

Na versão mais recente do SAM, um novo fator para estimar a significância foi acrescentado: o “*q-value*” (valor q), que é uma determinação para cada gene sob o menor FDR, no qual o valor do diferencial de expressão daquele gene é chamado de significativo. Este fator corresponde ao valor p , adaptado para a análise de um grande número de genes. Assim, o valor q mede o quão significativo é o diferencial de expressão para um determinado gene.

O programa SAM estabelece automaticamente uma ligação (“link”) do número de acesso das seqüências utilizadas com as páginas de informação sobre o clone em questão, situadas no banco de dados S.O.U.R.C.E. (“Stanford Online Universal

Resource for Clones and ESTs"). O S.O.U.R.C.E compila informações de vários bancos de dados públicos (UniGene, dbEST, Swiss-Prot, GeneMap99, RHdb, GeneCards and LocusLink) e as disponibiliza de maneira a facilitar a análise dos perfis de expressão de um grande número de genes. Além disso, os genes significativamente modulados foram divididos em grupos funcionais (Gene ontology, processos biológicos) usando o banco de dados DAVID-NIH (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/tools.jsp>) (Dennis *et al.*, 2003).

Nomenclatura dos genes

Devido à dificuldade de traduzir corretamente o nome de todos os genes citados nesse trabalho, optou-se por utilizar o nome dos genes em inglês, com a mesma grafia utilizada no arquivo do banco de dados da biblioteca IMAGE.

Transcrição Reversa para realização da qPCR

Para a preparação do cDNA a ser utilizado nas reações de PCR quantitativa em tempo real, preparou-se o mix de reação para cada amostra a ser submetida à transcrição reversa, seguindo a seguinte proporção para uma reação com o volume final de 100uL: 10uL do Buffer TaqMan RT 10X (concentração final de 1x), 22uL de MgCl₂ (25mM) (concentração final de 5.5mM), 20uL da mistura de dNTPs (concentração final de 500μ/dNTP), 5uL de random hexâmeros (concentração final de 2.5 uM), 2 uL de inibidor de RNase (20U/ul) (concentração final de 0.4 U/μ), transcriptase reversa (50 U/ul) (concentração final de 1.25 U/μ), 1ug de RNA total e água livre de RNase o suficiente para completar 100μ de reação.

A reação foi incubada e ciclada utilizando-se o seguinte programa: incubação (10 minutos a 25 °C), transcrição reversa (30 minutos a 48 °C) e inativação (5 minutos a 95 °C). O produto da reação foi estocado a -20 °C até a sua utilização nos ensaios de PCR em tempo real.

PCR em tempo real (qPCR)

Para determinar a quantidade inicial do número de cópias do gene de interesse, utilizou-se o kit SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e o método de curva padrão relativa para cada gene, através da diluição seriada de uma

amostra conhecida. Mais especificamente, utilizou-se o método de C_T comparativo, ou $2^{-\Delta\Delta C_T}$, de acordo com Livak e Schmittgen (2001).

As reações foram realizadas em volumes de 15 μ L. Para esse volume, o mix foi preparado de acordo com a seguinte proporção: 7,5 μ L do PCR Master Mix, 0,75 μ L do primer “forward” (sol. estoque de 10 μ M), 0,75 μ L do primer “reverse” (sol. estoque de 10 μ L), 5,4 μ L de água livre de RNase e 0,6 μ L do cDNA obtido na reação de transcrição reversa.

As reações foram montadas em placas de 96 poços, adequadas ao aparelho utilizado. O mix foi distribuído na placa e as amostras de cDNA foram adicionadas aos poços corretos; em seguida, as placas foram seladas.

As reações foram incubadas e processadas utilizando-se o seguinte programa: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, 40 ciclos a 95°C por 15 seg e 60°C por 1 min, e então 4°C.

Todos os iniciadores (Tabela 1) foram desenhados utilizando-se o programa Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3_code.html).

Tabela 1: Combinação de primers utilizados para a análise de expressão gênica pelo método de PCR quantitativa em tempo real (qPCR).

Primer	Sequência	Posição	Tamanho do produto de PCR (bp)
ERCC1-forward ERCC1-reverse	5'-CCTATGAGCAGAAACCAGC-3' 5'-TGTTCCAGAGATCCAAATGTG-3'	786 930	144
ERCC3-forward ERCC3-reverse	5'-GCAAATCTGCCATTTCTAAGAC-3' 5'-CATAGAAGTCAAACAGGTCCA-3'	741 851	110
ERCC4-forward ERCC4-reverse	5'-GGTCCTAGAAAGCAACCC-3' 5'-AGTACTTGACCTGGACCAC-3'	1118 1222	104
FEN1-forward FEN1-reverse	5'-CCAGCTCTTCTTGGAACCTG-3' 5'-CGCTCCTCAGAGAACTGCTT-3'	1212 1331	120
XPA-forward XPA-reverse	5'-CATCATTCACAATGGGGTGA-3' 5'-TTTTCTCGGTTTCTCTGTCG-3'	576 703	128
XPF-forward XPF-reverse	5'-GGTCCTAGAAAGCAACCC-3' 5'-AGTACTTGACCTGGACCAC-3'	1118 1222	104
ACTB-forward ACTB-reverse	5'-GATGAGATTGGCATGGCTTT-3' 5'-ATTGTGAACTTTGGGGGATG-3'	57 197	141

Western Blot

Extração de proteínas

As proteínas foram extraídas das culturas celulares utilizando o reagente *Trizol* (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. A precipitação foi realizada através da adição de 1.5 ml de isopropanol para cada 1 ml de *Trizol* usado na homogeneização inicial. Em seguida, as proteínas foram incubadas por 10 minutos a 15-30°C e centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos a 2-8°C. Após a lavagem das proteínas (de acordo com a bula do reagente *Trizol*), as mesmas foram dissolvidas em SDS 1% e quantificadas em um espectrofotômetro, pela comparação com uma curva-padrão construída a partir de uma série de diluição de concentrações conhecidas da proteína soroalbumina bovina.

Eletroforese de proteínas

O perfil das proteínas foi analisado utilizando-se géis de Bis-Tris com dimensões 8x8x0.1 cm (Invitrogen). As amostras foram preparadas com 40 µg de proteína. Em seguida, as proteínas foram desnaturadas a 70°C por 10 minutos e posteriormente aplicadas ao gel. A eletroforese foi realizada em cubas (XCell SureLock™ Mini-Cell/Invitrogen) contendo tampão de corrida SDS (Invitrogen), sendo aplicados 200V por 35 minutos.

Transferência eletroforética

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas do gel para membranas Invitrolon PVDF (Invitrogen) utilizando-se o sistema XCell II™ Blot Module (Invitrogen). Os componentes da transferência foram previamente imersos em tampão de transferência antes de serem colocados na cuba. A voltagem aplicada foi de 30V por cerca de 90 minutos, sendo que esse tempo pode variar dependendo do peso molecular da proteína a ser estudada. Para a confirmação da transferência das proteínas, as membranas foram coradas por 5 minutos com o corante SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen). Posteriormente, as mesmas foram lavadas e submetidas à imunodeteção.

Imunodeteção e visualização das proteínas

A imunodeteção e a visualização das proteínas foram realizadas com o auxílio do kit “WesternBreeze Chromogenic” (Invitrogen). A membrana foi imersa em 10 ml de solução bloqueadora e incubada durante 30 minutos em um agitador rotatório. Em seguida, a mesma foi enxaguada com 20 ml de água deionizada durante 5 minutos e incubada com 10 ml da solução de anticorpo primário por uma hora. O tempo de incubação com o anticorpo primário é variável dependendo do anticorpo utilizado. Após esse passo, foram realizadas 4 lavagens de 5 minutos com 20 ml de solução de lavagem para anticorpos. A membrana foi então incubada em 10 ml da solução de anticorpo secundário por 30 minutos, sendo em seguida, novamente lavada 4 vezes por 5 minutos com solução de lavagem para anticorpos. Posteriormente, foram realizados 3 enxágües com 20 ml de água por 2 minutos. Após este último, a membrana foi incubada com 5 ml de substrato cromogênico até o aparecimento de bandas roxas em sua superfície. Finalmente, as membranas foram lavadas 3 vezes em água deionizada, sendo posteriormente secadas em papel de filtro. A quantificação das bandas do Western blot foi realizada pelo

software Scion Imaging (Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA) (<http://www.scioncorp.com/index.htm>).

Anticorpos

Os anticorpos empregados para a detecção de proteínas por Western blot foram os seguintes: anti- β -actina (Cell Signaling) na diluição de 1:1000, anti-FEN-1 (Santa Cruz Biotechnology) na diluição de 1:1000, anti-XRCC1 (Abcam) na diluição de 1:500, anti-H2AX na diluição de 1:1000, anti-XPA (Abcam) na diluição de 1:1000, anti-PCNA (Novus Biologicals) na diluição de 1:5000, anti-ERCC2 (Abnova) na diluição de 1:1000 e CHK1 (Cell Signaling) na diluição de 1:1000.

RESULTADOS

Teste de sobrevivência em fibroblastos

No teste de sobrevivência celular, a curva de sobrevivência dos fibroblastos construída a partir dos dados obtidos em três experimentos independentes mostraram uma resposta similar quando foram comparadas as células irradiadas com baixa e alta taxa de dose. Uma diferença significativa foi observada apenas nas células irradiadas com 4 Gy sendo que as taxas de sobrevivências para essa dose foram de 83.8 e 55.5% para a menor e a maior TD respectivamente (Figura 5).

Figura 5: Curva de sobrevivência (estabelecida pelo teste XTT) obtida para fibroblastos primários irradiados com diferentes doses de radiação gama (1, 2, 4 e 8 Gy), administradas sob as taxas de dose de 0,5 e 2,0 Gy/min.

Cinética do ciclo celular em linfócitos

Para detectar possíveis alterações na progressão dos linfócitos pelo ciclo celular em resposta à radiação ionizante, analisou-se a cinética do ciclo celular por citometria de fluxo. Esta técnica permitiu detectar a proporção de células nas fases G0/G1, S e G2/M do ciclo celular, em diferentes tempos após a irradiação com 2 Gy. A distribuição das células nas diversas fases do ciclo foi analisada nos tempos de 2, 6, 24 e 48 h (Tabela 2 e Figura 6). No tempo de 2 h, houve um acúmulo de células na fase G1 no caso da maior TD. Após 6 h houve um acúmulo significativo de células nas fases S e G2 para ambas as TD. Entretanto, nos demais tempos (24 e 48 h), não foram observadas diferenças significativas entre as células irradiadas e não irradiadas.

Tabela 2: Distribuição de células nas diferentes fases do ciclo celular. Os resultados foram obtidos em diferentes tempos (2, 6, 24 e 48h) após a irradiação dos linfócitos com 2 Gy de radiação gama, sob as TDs de 0,5 e 2,0 Gy/min.

Tempo de colheita após a irradiação (h)	Distribuição das células (%)								
	Controle			0,5 Gy/min			2,0 Gy/min		
	G1	S	G2/M	G1	S	G2/M	G1	S	G2/M
2	48.97	40.74	10.28	47.18	41.88	10.93	51.44	38.6*	9.95
6	47.67	40.44	11.87	41.17*	44.15	14.66	39.22*	45.53*	15.23*
24	39.38	48.92	11.58	39.08	47.31	13.6	39.66	47.71	12.50
48	49.21	40.55	10.15	49.78	39.65	10.46	43.99	45	11.01

(*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

Figura 6: Distribuição nas fases do ciclo celular analisada por citometria de fluxo em linfócitos irradiados com 2 Gy de raios gama sob duas TD distintas: 0,5 e 2,0 Gy/min. Os tempos de coleta foram 2h (A), 6h (B), 24h (C) e 48h (D) após a irradiação. Os dados são referentes a quatro doadores distintos.

Perfil de expressão gênica por microarranjos de cDNA em fibroblastos

Os dados de hibridação obtidos nos vários experimentos realizados em fibroblastos irradiados foram submetidos ao programa estatístico SAM e uma lista de

genes modulados foi obtida para um $FDR < 0,05$. A comparação realizada entre células irradiadas e não irradiadas indicou 94 genes significativamente induzidos nos fibroblastos irradiados com a menor TD (Tabela 3). Por outro lado, nas células irradiadas com a maior TD, apenas 4 genes foram significativamente induzidos e 30 genes foram reprimidos para um $FDR < 0,05$ (Tabela 4).

O grupo de genes induzidos nas células irradiadas com a menor TD corresponde a 16.78% do total de genes depositados na membrana. Os principais processos biológicos associados a esses genes foram metabolismo celular, metabolismo de biopolímeros e de fósforo, reparo do DNA, apoptose, resposta ao estresse e controle do ciclo celular. Os valores de fold-change (FC) apresentaram uma grande faixa de variação para três classes: apoptose (1.13 a 13.28), metabolismo (1.11 a 36.53), e controle do ciclo celular (1.23 a 49.84), ao passo que baixos valores de FC (1.10 a 5.10) foram encontrados para outras classes: reparo do DNA, metabolismo de proteínas, transdução de sinais, resposta ao estresse e transcrição (Figura 7).

Categorias gênicas cujos valores de expressão foram estatisticamente diferentes ($P < 0.05$) de todas as outras presentes na membrana foram obtidas utilizando-se o teste Exato de Fisher para os genes de cada categoria (Tabela 5). As classes gênicas associadas ao metabolismo de fósforo, metabolismo de biopolímeros e reparo do DNA apresentaram uma significância maior que as demais (morte celular programada, metabolismo de macromoléculas, metabolismo de proteínas, controle de apoptose, controle do ciclo celular, meiose e regulação positiva de processos fisiológicos celulares).

Foram encontrados 11 genes envolvidos em processos de reparo do DNA (*NEIL2*, *ERCC1*, *ERCC3 (XPB)*, *POLK*, *ERCC4 (XPF)*, *TREX1*, *RAD51L3*, *RAD54B*, *MLH1*, *MLH3* e *DDB2*), 6 genes relacionados à sinalização de apoptose (*PDE1B*, *PHLDA2*, *TRAF2*, *FAS*, *ACP5* e *PDCD2*) e diversos genes envolvidos na resposta ao estresse (*TRAP1*, *STK25*, *GSTT1*, *FLJ20245*, *ALS2CR2*, *HSPA14*, *SGK3*, *TAOK2*, *PRKAA1*, *MGST3* e *ADORA1*) (Tabela 3).

Os 34 genes modulados nas células irradiadas com a maior TD (2,0 Gy/min) (Tabela 3) correspondem a 6,07 % dos genes depositados nas membranas, sendo que os principais processos biológicos associados aos genes induzidos foram apoptose e processos fisiológicos celulares. Entre os genes reprimidos, os principais processos biológicos modulados foram aqueles relacionados ao metabolismo, reparo

do DNA, duplicação do DNA e resposta ao estresse (Tabela 6). Os valores de fold-change apresentaram uma baixa variação de 0,57 a 2,48 (Figura 8).

Esses dados refletem a modulação diferenciada, para cada TD, de diversas classes gênicas em células irradiadas, e as principais classes associadas a respostas transcricionais identificadas em fibroblastos irradiados incluindo vários grupos de genes pertencentes a classes conhecidamente relacionadas à resposta à radiação gama, tais como reparo do DNA, resposta ao estresse, controle do ciclo celular e apoptose; entretanto, verificou-se que uma grande parte dos genes participa do metabolismo geral (fósforo, biopolímeros e proteínas).

Tabela 3: Genes significativamente induzidos, selecionados pelo teste estatístico SAM com FDR<0.05, em fibroblastos humanos irradiados com 4 Gy sob a taxa de dose de 0,5 Gy/min, analisados 6 h após a irradiação.

Nome	Símbolo	Clone ID	Fold-change	q-value (%)
Apoptose				
Phosphodiesterase 1B, calmodulin-dependent	PDE1B	IMAGE:179617	1,13	2,37
Pleckstrin homology-like domain, family A, member 2	PHLDA2	IMAGE:143558	1,17	1,67
TNF receptor-associated factor 2	TRAF2	IMAGE:46372	1,67	0
Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	FAS	IMAGE:222568	8,13	0
Acid phosphatase 5, tartrate resistant	ACP5	IMAGE:251256	9,63	4,02
Programmed cell death 2	PDCD2	IMAGE:263071	13,28	1,79
Metabolismo				
ATPase, Ca++ transporting, ubiquitous	ATP2A3	IMAGE:179935	1,11	2,68
Spastic paraplegia 7, paraplegin (pure and complicated autosomal recessive)	SPG7	IMAGE:44566	1,13	2,41
Oxidase (cytochrome c) assembly 1-like	OXA1L	IMAGE:186556	1,22	2,54
Serine/threonine/tyrosine interacting protein	STYX	IMAGE:174879	1,26	3,2
EPH receptor B6	EPHB6	IMAGE:172982	1,27	4,02
Threonyl-tRNA synthetase	TARS	IMAGE:141910	1,31	2,8
GC-rich promoter binding protein 1	GPBP1	IMAGE:148960	1,31	3,65
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 59	DDX59	IMAGE:188350	1,42	2,98
Protein tyrosine phosphatase-like (proline instead of catalytic arginine)	PTPLA	IMAGE:267085	1,53	4,39
Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, alpha	PIP5K1A	IMAGE:143470	1,53	5,01
Major histocompatibility complex, class II, DR beta 4	HLA-DRB1	IMAGE:186767	1,54	0
Fibroblast growth factor 12	FGF12B	IMAGE:176904	1,63	2,15
Oculocerebrorenal syndrome of Lowe	OCRL	IMAGE:220670	1,65	3,07
Tight junction protein 2 (zona occludens 2)	TJP2	IMAGE:154735	1,8	2,36
Kinase suppressor of rās	KSR1	IMAGE:220655	2,09	2,54
Eukaryotic elongation factor-2 kinase	EEF2K	IMAGE:261593	2,2	2,36
Protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A (PR 65), beta isoform	PPP2R1B	IMAGE:263846	2,21	3,65
Kinesin family member 1 ^a	ATSV	IMAGE:221828	2,43	3,2
ATPase, H+ transporting, lysosomal 70kDa, V1 subunit A	ATP6A1	IMAGE:263040	3,26	5,19
Calcium/calmodulin-dependent protein kinase	CAMK2B	IMAGE:50636	4,76	0

(CaM kinase) II beta				
Protein phosphatase 2C, magnesium-dependent, catalytic subunit	PPM2C	IMAGE:46240	7,99	0
Integrin-linked kinase-2	ILK	IMAGE:147933	11,97	2,36
Protein tyrosine phosphatase, receptor type, F	PTPRF	IMAGE:52773	32,84	3,98
Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase	PECR	IMAGE:249643	36,53	0
Controle do ciclo celular				
Nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1	NOLC1	IMAGE:178191	1,23	2,36
Checkpoint suppressor 1	CHES1	IMAGE:221846	1,33	2,15
Downregulated in ovarian cancer 1	CDK2AP1	IMAGE:144932	1,47	2,36
FYN oncogene related to SRC, FGR, YES	FYN	IMAGE:267431	1,62	3,98
Malignant T cell amplified sequence 1	MCTS1	IMAGE:142586	1,68	2,06
CHK1 checkpoint homolog (S, pombe)	CHEK1	IMAGE:177756	2,08	3,98
Chaperonin containing TCP1, subunit 7 (eta)	CCT7	IMAGE:264885	2,1	2,54
Homeodomain interacting protein kinase 2	HIPK2	IMAGE:222174	3,02	2,37
Mutated in colorectal cancers	MCC	IMAGE:263970	10,1	2,84
Hypothetical protein MGC13096	MGC13096	IMAGE:46310	49,84	2,36
Reparo do DNA				
RAD54 homolog B (S, cerevisiae)	RAD54B	IMAGE:264968	1,11	3,98
Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 3	ERCC3 (XPB)	IMAGE:1655018	1,12	2,36
LIM homeobox 3	DDB2	IMAGE:1471825	1,14	3,06
RAD51-like 3 (S, cerevisiae)	RAD51L3	IMAGE:259579	1,15	2,8
MutL homolog 3 (E, coli)	MLH3	IMAGE:263021	1,19	2,41
Polymerase (DNA directed) kappa	POLK	IMAGE:177635	1,22	1,67
Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1	ERCC1	IMAGE:1585120	1,26	2,2
MutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E, coli)	MLH1	IMAGE:267569	1,54	2,54
Nei like 2 (E, coli)	NEIL2	IMAGE:144172	1,56	3,07
Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 4	ERCC4 (XPF)	IMAGE:5266573	1,68	3,84
Three prime repair exonuclease 1	TREX1	IMAGE:178237	1,79	2,84
Metabolismo de proteínas				
Protein phosphatase 1, regulatory subunit 3D	PPP1R6	IMAGE:251801	1,15	5,01
Dihydroxyacetone kinase 2 homolog (yeast)	DAK	IMAGE:51631	1,17	3,07
DNAJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 13	DNAJC13	IMAGE:260276	1,17	5,01
LIM domain kinase 1	LIMK1	IMAGE:179500	1,22	1,79
Peroxisome biogenesis factor 1	PEX1	IMAGE:175818	1,64	3,45
Zinc finger and BTB domain containing 7A	FBI1	IMAGE:231472	2,24	3,06
Fidgetin	FIGN	IMAGE:264237	2,75	2,25
Transdução de sinais				
Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A	PPP1R1A	IMAGE:154718	1,13	3,06
CD79B antigen (immunoglobulin-associated beta)	CD79B	IMAGE:155717	1,14	5,01
PWP2 periodic tryptophan protein homolog (yeast)	PWP2H	IMAGE:179804	1,15	3,07
Inositol polyphosphate-4-phosphatase, type II, 105kDa	INPP4B	IMAGE:165857	1,18	5,01
Placental protein 6	PL6	IMAGE:263159	1,22	3,06
Ras-associated protein Rap1	RBJ	IMAGE:44081	1,33	2,93
Transcription factor AP-2 alpha (activating enhancer binding protein 2 alpha)	TFAP2A	IMAGE:149884	1,36	2,52
Adrenergic, beta-2-, receptor, surface	ADRB2	IMAGE:187128	1,48	0
Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 12	GNG12	IMAGE:265045	1,5	1,79

Leptin (obesity homolog, mouse)	LEP	IMAGE:181563	1,74	3,06
Neurogranin (protein kinase C substrate, RC3)	NRGN	IMAGE:178825	1,76	2,06
Calcium binding protein 5	CABP5	IMAGE:190291	1,81	2,93
Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1	GRF2	IMAGE:143729	2,03	4,39
Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 13	GNG13	IMAGE:178213	2,18	2,54
Arrestin 3, retinal (X-arrestin)	ARR3	IMAGE:223274	2,26	3,2
Protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), epsilon isoform	PPP2R5E	IMAGE:221897	2,81	0
Resposta ao estresse				
TNF receptor-associated protein 1	TRAP1	IMAGE:143480	1,1	2,8
Serine/threonine kinase 25 (STE20 homolog, yeast)	STK25	IMAGE:267182	1,14	2,36
Glutathione S-transferase theta 1	GSTT1	IMAGE:263014	1,23	2,3
Hypothetical protein FLJ20245	FLJ20245	IMAGE:155459	1,26	0
Amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile) chromosome region, candidate 2	ALS2CR2	IMAGE:261714	1,3	2,01
Heat shock 70kDa protein 14	HSPA14	IMAGE:46120	1,51	3,22
Serum/glucocorticoid regulated kinase family, member 3	SGK3	IMAGE:261609	1,65	3,98
TAO kinase 2	TAOK2	IMAGE:176543	1,8	2,54
Protein kinase, AMP-activated, alpha 1 catalytic subunit	PRKAA1	IMAGE:260234	2	0
Microsomal glutathione S-transferase 3	MGST3	IMAGE:173632	2,9	3,06
Adenosine A1 receptor	ADORA1	IMAGE:51450	5,1	3,06
Transcrição				
Nemo like kinase	NLK	IMAGE:142551	1,11	2,98
Ribosomal protein S7	NSF	IMAGE:251936	1,15	3,84
Zinc finger protein 198	ZNF198	IMAGE:147383	1,19	2,36
Chromodomain helicase DNA binding protein 1	CHD1	IMAGE:262996	1,21	5,01
KH-type splicing regulatory protein (FUSE binding protein 2)	KHSRP	IMAGE:266085	1,81	3,65
Desconhecido				
		IMAGE:191064	1,29	3,07
	KIAA0561	IMAGE:165838	2,33	3,2
Interferon responsive gene 15	IFRG15	IMAGE:147358	8,19	5,01
		IMAGE:149245	27,22	2,54

Tabela 4: Genes significativamente modulados selecionados pelo teste estatístico SAM com FDR<0,05, em fibroblastos humanos irradiados com 4 Gy sob a taxa de dose de 2,0 Gy/min, analisados 6 h após a irradiação.

Gene name	Symbol	Clone ID	Fold-change	q-value (%)
Genes Induzidos				
Defesa contra patógenos				
Chromosome 9 open reading frame 167	C9orf167	IMAGE:155459	2,10241	2,116402
Anti-apoptose				
NLR family, apoptosis inhibitory protein	NAIP	IMAGE:51463	1,744809	2,116402
BCL2-associated athanogene 4	BAG4	IMAGE:51921	1,402945	2,116402
Homeodomain interacting protein kinase 3	HIPK3	IMAGE:149619	2,484002	0

Genes Inibidos

Apoptose				
Protein kinase, AMP-activated, alpha 1 catalytic subunit	PRKAA1	IMAGE:260234	0,576814	2,380952
Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	FAS	IMAGE:222568	0,834234	4,365079
Phosphodiesterase 1B, calmodulin-dependent	PDE1B	IMAGE:179617	0,846629	4,365079
Comunicação celular				
Inositol polyphosphate-5-phosphatase, 40kDa	INPP5A	IMAGE:190709	0,892867	4,365079
Ciclo celular				
In multiple clusters		IMAGE:141428	0,80504	2,539683
U2AF homology motif (UHM) kinase 1	UHMK1	IMAGE:262542	0,8383	2,240897
Nibrin	NBN	IMAGE:261567	0,828478	4,365079
Associação ao DNA				
Ligand dependent nuclear receptor corepressor-like	LCORL	IMAGE:144994	0,737148	2,539683
Reparo do DNA				
RAD51-like 3 (S. cerevisiae)	RAD51L3	IMAGE:259579	0,759882	4,365079
Three prime repair exonuclease 1	TREX1	IMAGE:178237	0,8166	4,365079
Polymerase (DNA directed) kappa	POLK	IMAGE:177635	0,879509	4,365079
Fator de Crescimento				
Glia maturation factor, beta	GMFB	IMAGE:173228	0,748376	2,380952
Metabolismo				
Cyclin-dependent kinase 2-interacting protein	CINP	IMAGE:267635	0,710031	2,539683
In multiple clusters		IMAGE:179384	0,663923	2,539683
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 59	DDX59	IMAGE:188350	0,820618	2,240897
Chromosome 9 open reading frame 102	C9orf102	IMAGE:259134	0,747101	2,821869
6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 2	PFKFB2	IMAGE:259089	0,741747	4,365079
N-acetylglucosamine kinase	NAGK	IMAGE:165781	0,889377	4,855276
Cytidylate kinase	CMPK	IMAGE:266241	0,598138	0
3-phosphoinositide dependent protein kinase-1	PDPK1	IMAGE:266720	0,804878	4,365079
Calpain 5	CAPN5	IMAGE:186922	0,866631	4,855276
Transdução de sinal				
Src kinase associated phosphoprotein 2	SKAP2	IMAGE:265551	0,844056	2,539683
Beta-transducin repeat containing	BTRC	IMAGE:268524	0,908453	4,365079
Desconhecido				
Transcribed locus		IMAGE:148415	0,449793	0
In multiple clusters		IMAGE:266819	0,650032	2,539683
Transcribed locus, moderately similar to XP_530363.1 hypothetical protein XP_530363 [Pan troglodytes]		IMAGE:148579	0,650972	2,821869
Data not found		IMAGE:265388	0,810581	4,365079
In multiple clusters		IMAGE:147358	0,855306	4,365079
Transcribed locus, moderately similar to XP_001111392.1 similar to CHK1 checkpoint homolog isoform 2 [Macaca mulatta]		IMAGE:177756	0,862648	4,365079
Programmed cell death protein 6-like	LOC728613	IMAGE:179003	0,891479	4,365079

Figura 7: Variação de fold-change (FC) calculados pelo SAM para genes estatisticamente significativos participantes de diversos processos biológicos. Comparações entre células irradiadas e não irradiadas foram realizadas para a determinação de genes modulados após a irradiação dos fibroblastos com 4 Gy. Para demonstrar a variação dos FC entre os processos biológicos, as médias dos FC para grupos de genes foram calculadas para cada processo. As barras representam os valores máximos e mínimos de FC para cada grupo. A) Processos biológicos com grande variação de FC. B) Processos biológicos com baixa variação de FC.

Figura 8: Variação de fold-change (FC) calculados pelo SAM para genes estatisticamente significativos participantes de diversos processos biológicos. Comparações entre células irradiadas e não irradiadas foram realizadas para a determinação de genes modulados após a irradiação dos fibroblastos com 4 Gy sob a taxa de dose de 2,0 Gy/min. Para demonstrar a variação dos FC entre os processos biológicos, as médias dos FC para grupos de genes foram plotados para cada processo. As barras representam os valores máximos e mínimos de FC para cada grupo.

Tabela 5: Processos biológicos estatisticamente modulados ($p < 0.05$) em células irradiadas com a dose de 4 Gy sob uma TD de 0,5 Gy/min, 6 h após a irradiação. As categorias gênicas observadas para genes significativamente modulados ($q \leq 0.05$) foram analisadas em comparação com as 560 sequências depositadas na membrana dos micro-arranjos. Os valores P foram obtidos através do teste estatístico Exato de Fisher para os genes modulados em cada categoria.

Processo Biológico (nível 4)	%	Valor P
Metabolismo de fósforo	23,53%	0,0000001
Metabolismo de biopolímeros	41,18%	0,0000002
Reparo do DNA	11,76%	0,0000025
Morte celular programada	11,76%	0,0020115
Metabolismo celular de macromoléculas	34,12%	0,0020672

Tabela 6: Processos biológicos estatisticamente modulados ($p < 0.05$) em células irradiadas com a dose de 4 Gy sob uma TD de 2,0 Gy/min, 6 h após a irradiação. As categorias gênicas observadas para genes significativamente modulados ($q \leq 0.05$) foram analisadas em comparação com as 560 sequências depositadas na membrana dos micro-arranjos. Os valores P foram obtidos através do teste estatístico Modified Fisher Exact p-value para os genes modulados em cada categoria.

Processo Biológico	%	Valor P
Genes induzidos		
Controle de morte celular programada	75,00%	0,0020135
Morte celular programada	75,00%	0,0049488
Controle negativo de processos fisiológicos celulares	75,00%	0,0064783
Genes reprimidos		
Metabolismo de macromoléculas	61,90%	0,0001825
Reparo do DNA	19,05%	0,0015140
Resposta a estímulos de danos no DNA	19,05%	0,0020222
Resposta a estímulos endógenos	19,05%	0,0024221
Metabolismo primário	66,67%	0,0054825
Metabolismo de biopolímeros	38,10%	0,0156125
Metabolismo	66,67%	0,0173854
Duplicação do DNA	14,29%	0,0174466
Resposta ao estresse	23,81%	0,0214937
Controle negativo de processos fisiológicos celulares	19,05%	0,0251322
Controle negativo de processos fisiológicos	19,05%	0,0276203
Metabolismo do DNA	19,05%	0,0282627
Controle negativo de processos celulares	19,05%	0,0326375
Controle negativo de processos biológicos	19,05%	0,0393920
Comunicação celular	38,10%	0,0423592
Metabolismo celular de carboidratos	14,29%	0,0493161

Expressão gênica transcricional avaliada por qPCR em linfócitos e fibroblastos irradiados

Linfócitos

A expressão de vários genes de reparo (*ERCC1*, *ERCC3*, *XPA*, *XPF*, *FEN1* e *ATM*) foi analisada em dois tempos, 2 e 6 h após a irradiação das células.

Nos experimentos realizados em linfócitos, 2 h após a irradiação, as células irradiadas com a menor TD apresentaram indução dos genes *ERCC3*, *XPF*, *FEN1* e *ATM*, enquanto *XPA* sofreu uma leve repressão, *ERCC1* praticamente não sofreu modulação (Tabela 7, Figura 9 A). Entretanto, as células irradiadas sob a maior TD mostraram uma repressão de *ERCC1* e uma indução de *XPA*, diferentemente do resultado observado para a menor TD, sendo que os demais genes se expressaram de forma semelhante em ambas as situações experimentais.

Adicionalmente, no tempo de 6 h após a irradiação, os resultados foram semelhantes, mas com a exceção de *XPF* (que não sofreu alteração no nível de expressão nos linfócitos irradiados sob a menor TD) e *XPA*. Este último sofreu repressão nas células irradiadas sob a maior TD (Tabela 8, Figura 9 B).

Fibroblastos primários

Nos experimentos realizados em fibroblastos, as células foram irradiadas em estado de confluência e analisadas 2 e 6 h após a irradiação. Para a menor TD, 2 h após a irradiação, o gene *ERCC1* não apresentou alteração no nível de expressão, enquanto que *ERCC3*, *XPF*, *XPA*, *FEN1* e *ATM* se mostraram induzidos, embora em baixo grau (FCs variando de 1,07 a 1,54) (Tabela 9, Figura 10 A), comparativamente aos resultados observados nos fibroblastos irradiados sob a maior TD. Nestes, com a exceção de *ERCC1*, todos os genes sofreram uma considerável indução, sendo que *ATM* (FC=7,10) apresentou o maior nível de expressão.

Adicionalmente, nas células irradiadas sob a menor TD, todos os genes se mostraram induzidos num tempo de colheita mais tardio (6 h após a irradiação), embora em intensidades variáveis, sendo que um maior nível de indução foi observado para os genes *ERCC3* (FC=2,04) e *ATM* (FC=3,46), comparativamente ao observado no tempo de 2 h após a irradiação. Nas células irradiadas sob a maior TD, os genes *ERCC1*, *XPA*, *XPF* e *FEN1* apresentaram uma leve repressão, enquanto *ERCC3* e *ATM* foram induzidos. Nota-se que nesse tempo de 6 h pós-irradiação, o nível de indução de *ATM* caiu consideravelmente em relação ao

observado em 2 h (Tabela 10, Figura 10 B), o que é esperado para um gene sensor de quebras duplas.

Na Tabela 11 pode ser observado o padrão de modulação dos genes estudados em ambos os tipos celulares.

Tabela 7: Valores dos CT de cada amostra e de expressão dos genes analisados por qPCR em linfócitos 2 h após a irradiação.

	Grupo	C _T	C _T <i>ACTB</i>	ΔC_T	$\Delta\Delta C_T$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$ (FC)	Log2
Co	<i>ERCC1</i>	20,43±0,44	12,20±0,32	8,23	0,00	1,00	0,00
	<i>ERCC3</i>	23,51±0,75	12,05±0,30	11,46	0,00	1,00	0,00
	<i>XPF</i>	25,74±0,50	12,20±0,32	13,55	0,00	1,00	0,00
	<i>XPA</i>	20,73±0,52	12,27±0,29	8,47	0,00	1,00	0,00
	<i>FEN1</i>	20,60±0,51	12,05±0,51	8,55	0,00	1,00	0,00
	<i>ATM</i>	25,18±0,83	12,27±0,29	12,91	0,00	1,00	0,00
0,5 Gy/min	<i>ERCC1</i>	20,48±0,30	12,28±0,12	8,20	-0,03	1,02	0,03
	<i>ERCC3</i>	22,96±0,04	11,77±0,22	11,19	-0,27	1,20	0,27
	<i>XPF</i>	25,52±0,42	12,28±0,12	13,24	-0,31	1,24	0,31
	<i>XPA</i>	20,70±0,24	12,18±0,19	8,52	0,05	0,96	-0,05
	<i>FEN1</i>	20,15±0,06	11,77±0,22	8,38	-0,17	1,12	0,17
	<i>ATM</i>	24,62±0,31	12,18±0,19	12,43	-0,48	1,39	0,48
2,0 Gy/min	<i>ERCC1</i>	20,79±0,19	12,26±0,21	8,53	0,30	0,81	-0,30
	<i>ERCC3</i>	22,78±0,25	11,81±0,19	10,97	-0,48	1,40	0,48
	<i>XPF</i>	25,35±0,48	12,26±0,21	13,09	-0,46	1,37	0,46
	<i>XPA</i>	20,44±0,29	12,26±0,21	8,18	-0,29	1,22	0,29
	<i>FEN1</i>	20,23±0,20	11,81±0,19	8,42	-0,13	1,10	0,13
	<i>ATM</i>	24,66±0,37	12,26±0,21	12,40	-0,51	1,43	0,51

Tabela 8: Valores dos CT de cada amostra e de expressão dos genes analisados por qPCR em linfócitos 6 h após a irradiação.

	Grupo	C _T	C _T <i>ACTB</i>	ΔC_T	$\Delta\Delta C_T$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$ (FC)	Log2
Co	<i>ERCC1</i>	20,14±0,33	11,83±0,32	8,32	0,00	1,00	0,00
	<i>ERCC3</i>	23,14±0,82	13,44±0,25	9,71	0,00	1,00	0,00
	<i>XPF</i>	25,4±0,23	11,83±0,32	13,58	0,00	1,00	0,00
	<i>XPA</i>	20,82±0,24	11,76±0,36	9,06	0,00	1,00	0,00
	<i>FEN1</i>	20,87±0,62	13,44±0,25	7,44	0,00	1,00	0,00
	<i>ATM</i>	24,92±0,95	11,76±0,36	13,16	0,00	1,00	0,00
0,5 Gy/min	<i>ERCC1</i>	20,43±0,26	12,24±0,52	8,19	-0,13	1,09	0,13
	<i>ERCC3</i>	22,59±0,09	13,31±0,16	9,28	-0,42	1,34	0,42
	<i>XPF</i>	25,87±0,20	12,24±0,52	13,62	0,05	0,97	-0,05
	<i>XPA</i>	21,44±0,30	12,13±0,15	9,31	0,25	0,84	-0,25
	<i>FEN1</i>	20,49±0,13	13,31±0,16	7,18	-0,25	1,19	0,25
	<i>ATM</i>	24,89±0,58	12,13±0,15	12,77	-0,39	1,31	0,39
2,0 Gy/min	<i>ERCC1</i>	20,99±1,37	11,54±0,12	9,45	1,14	0,45	-1,14
	<i>ERCC3</i>	22,61±0,34	13,36±0,19	9,25	-0,45	1,37	0,45
	<i>XPF</i>	24,88±0,27	11,54±0,12	13,35	-0,23	1,17	0,23
	<i>XPA</i>	21,03±0,22	11,73±0,17	9,31	0,24	0,84	-0,24
	<i>FEN1</i>	20,51±0,27	13,36±0,19	7,16	-0,28	1,21	0,28
	<i>ATM</i>	24,03±0,40	11,73±0,17	12,31	-0,85	1,81	0,85

Figura 9. Perfis de expressão gênica analisados por PCR quantitativa em tempo real para os genes *ERCC1*, *ERCC3*, *XPF*, *XPA*, *FEN1* e *ATM* em linfócitos irradiados com 2 Gy de raios-gama sob as taxas de dose de 0,5 e 2,0 Gy/min e analisados 2 (A) e 6 h (B) após a irradiação.

Tabela 9: Valores dos CT de cada amostra e de expressão dos genes analisados por qPCR em fibroblastos 2 h após a irradiação.

	Grupo	C _T	C _T <i>ACTB</i>	ΔC_T	$\Delta\Delta C_T$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$ (FC)	Log2
Co	<i>ERCC1</i>	25.05±0.88	19.76±1.00	5,29	0,00	1,00	0,00
	<i>ERCC3</i>	28.46±0.58	19.76±1.01	8,70	0,00	1,00	0,00
	<i>XPF</i>	28.84±0.91	17.89±1.12	10,95	0,00	1,00	0,00
	<i>XPA</i>	23.21±0.45	17.46±1.10	5,74	0,00	1,00	0,00
	<i>FEN1</i>	29.10±0.88	17.89±1.12	11,22	0,00	1,00	0,00
	<i>ATM</i>	29.82±1.75	17.46±1.10	12,36	0,00	1,00	0,00
0,5 Gy/min	<i>ERCC1</i>	24.95±0.28	19.65±0.36	5,3	0,01	0,99	-0,01
	<i>ERCC3</i>	27.73±0.26	19.65±0.36	8,08	-0,62	1,54	0,62
	<i>XPF</i>	29.05±0.73	18.20±0.65	10,85	-0,10	1,07	0,10
	<i>XPA</i>	23.08±0.64	17.58±0.73	5,50	-0,24	1,18	0,24
	<i>FEN1</i>	29.17±0.86	18.20±0.65	10,96	-0,26	1,20	0,26
	<i>ATM</i>	29.67±1.33	17.58±0.73	12,09	-0,27	1,21	0,27
2,0 Gy/min	<i>ERCC1</i>	27.38±0.85	23.13±0.90	4,25	-0,09	1,06	0,09
	<i>ERCC3</i>	31.19±0.10	23.13±0.90	8,05	-1,22833	2,34	1,23
	<i>XPF</i>	31.43±0.12	23.13±0.90	9,67	-1,66	3,17	1,66
	<i>XPA</i>	27.41±1.37	23.13±0.90	4,28	-0,99	1,99	0,99
	<i>FEN1</i>	31.98±0.53	23.23±0.97	8,75	-0,78	1,71	0,78
	<i>ATM</i>	33,72	23.23±0.97	10,49	-2,83	7,10	2,83

Tabela 10: Valores dos CT de cada amostra e de expressão dos genes analisados por qPCR em fibroblastos 6 h após a irradiação.

	Grupo	C _T	C _T <i>ACTB</i>	ΔC_T	$\Delta\Delta C_T$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$ (FC)	Log2
Co	<i>ERCC1</i>	21,87±0,77	15,36±0,33	6,51	0,00	1,00	0,00
	<i>ERCC3</i>	23,59±2,15	14,96±0,26	8,63	0,00	1,00	0,00
	<i>XPF</i>	26,39±1,64	14,34±0,72	12,05	0,00	1,00	0,00
	<i>XPA</i>	22,37±1,10	14,14±0,74	8,23	0,00	1,00	0,00
	<i>FEN1</i>	22,26±1,03	14,97±0,27	7,29	0,00	1,00	0,00
	<i>ATM</i>	26,74±2,84	15,36±0,33	11,38	0,00	1,00	0,00
0,5 Gy/min	<i>ERCC1</i>	21,63±0,25	15,32±0,44	6,31	-0,20	1,15	0,20
	<i>ERCC3</i>	22,20±0,09	14,83±0,036	7,37	-1,26	2,40	1,26
	<i>XPF</i>	25,84±0,31	14,10±0,61	11,74	-0,31	1,24	0,31
	<i>XPA</i>	22,37±0,26	14,28±0,6	8,08	-0,15	1,11	0,15
	<i>FEN1</i>	21,68±0,43	14,83±0,33	6,85	-0,44	1,36	0,44
	<i>ATM</i>	24,91±0,21	15,32±0,44	9,59	-1,79	3,46	1,79
2,0 Gy/min	<i>ERCC1</i>	22,27±0,52	15,65±0,80	6,63	0,12	0,92	-0,12
	<i>ERCC3</i>	22,34±0,12	14,87±0,18	7,47	-1,16	2,23	1,16
	<i>XPF</i>	26,15±0,32	14,03±0,45	12,12	0,07	0,95	-0,07
	<i>XPA</i>	22,94±0,58	14,23±0,28	8,70	0,48	0,72	-0,48
	<i>FEN1</i>	22,53±1,23	15,19±0,5	7,34	0,05	0,97	-0,05
	<i>ATM</i>	26,48±1,9	15,65±0,8	10,83	-0,55	1,46	0,55

Figura 10. Perfis de expressão gênica analisados por PCR quantitativa em tempo real para os genes *ERCC1*, *ERCC3*, *XPF*, *XPA*, *FEN1* e *ATM* em fibroblastos humanos normais irradiados com 4 Gy de raios-gama sob as taxas de dose de 0,5 e 2,0 Gy/min e analisados 2 (A) e 6 h (B) após a irradiação.

Tabela 11: Modulação gênica transcricional em fibroblastos e linfócitos humanos analisada por PCR quantitativa em tempo real 2 e 6 horas após a irradiação das células com raios gama. As doses utilizadas foram 2 e 4 Gy para linfócitos e fibroblastos, respectivamente, ambas com as taxas de dose de 0,5 e 2,0 Gy/min. (0. gene não modulado; ↑- gene induzido; ↓- gene reprimido).

Taxa de dose (Gy/min)	Fibroblastos 2h		Fibroblastos 6 h		Linfócitos 2 h		Linfócitos 6 h	
	0,5	2,0	0,5	2,0	0,5	2,0	0,5	2,0
ERCC1	0	↑	↑	↓	↑	↓	↑	↓
ERCC3	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
XPF	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↓	↑
XPA	↑	↑	↑	↓	↓	↑	↓	↓
FEN1	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↑	↑
ATM	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑

Expressão protéica

Os níveis de expressão protéica foram avaliados para algumas proteínas, sendo a quantificação destas efetuada por densitometria de pixels.

A expressão dos genes *ERCC2*, *XPA*, *TFIIH* (participantes do NER), *H2AX* (envolvida no reparo de quebras duplas), *CHK1* (controle do ciclo celular), e *XRCC1* (participante do BER), foi analisada ao nível protéico por Western blot, tanto em linfócitos quanto em fibroblastos humanos irradiados, em amostras coletadas nos mesmos experimentos em que se avaliou a expressão transcricional.

Além dos citados produtos gênicos, foram ainda analisadas as proteínas FEN1 (participante do BER) em linfócitos e PCNA (envolvida na duplicação do DNA) em fibroblastos. A proteína actina- β (ACTB) foi utilizada como controle endógeno em todos os ensaios. As proteínas ERCC2, XPA, TFIIH, CHK1 e XRCC1 não foram detectadas por Western blot, tanto nas células irradiadas quanto nas não irradiadas.

Nos experimentos realizados em linfócitos, FEN-1 mostrou-se expressa, tanto nas células irradiadas, quanto nas não irradiadas, sob ambas as TDs, embora com uma certa diferença entre os tempos analisados (Figura 11). Com relação à H2AX, os níveis desta foram maiores para as células analisadas no tempo de 2 h após a irradiação, sendo que após 6 h, os níveis de expressão dessa proteína se mostraram próximos aos observados para as células não irradiadas (Figura 12). Entretanto, não houve diferenças nas respostas às diferentes TD.

Em fibroblastos, a proteína PCNA se mostrou induzida (cerca de duas vezes) nas células irradiadas com a menor TD (0,5 Gy/min), mas nas células irradiadas com a maior TD (2,0 Gy/min), os níveis desta foram reduzidos em ambos os tempos de 2 e 6 h após a irradiação (Figura 13). Esses resultados indicaram claramente um efeito diferencial das taxas de dose quanto à expressão de PCNA.

Figura 11: Detecção da proteína FEN1 por Western blot. FEN-1 (A) em amostras de linfócitos humanos de sangue periférico, 2 e 6 h após a irradiação com 2 Gy de radiação gama sob as TD de 0,5 e 2,0 Gy/min. A intensidade das bandas correspondentes à proteína FEN-1 no Western blot mostrado em (B) foi determinada por densitometria de pixels com o software Scion Imaging (Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA).

Figura 12: Detecção da proteína γ H2AX por Western blot. γ H2AX (A) em amostras de linfócitos humanos de sangue periférico, 2 e 6 h após a irradiação com 2 Gy de radiação gama sob as TD de 0,5 e 2,0 Gy/min. A intensidade das bandas correspondentes à proteína γ H2AX no Western blot mostrado em (B) foi determinada por densitometria de pixels com o software Scion Imaging (Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA).

Figura 13: Detecção da proteína PCNA por Western blot. PCNA (A) em amostras de fibroblastos humanos, 2 e 6 h após a irradiação com 4 Gy de radiação gama sob as TD de 0,5 e 2,0 Gy/min. A intensidade das bandas correspondentes à proteína PCNA no Western blot mostrado em (B) foi determinada por densitometria de pixels com o software Scion Imaging (Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA).

DISCUSSÃO

Perfis de expressão gênica em fibroblastos primários (método de microarranjos de cDNA)

As respostas celulares às radiações ionizantes são complexas e reguladas por diversas vias moleculares (Amundson *et al.*, 2001; Khanna *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2005; Sakamoto-Hojo *et al.*, 2006). Estudos realizados em células imortalizadas de camundongos revelaram que as respostas celulares à radiação dependem também da taxa de dose, sendo que as respostas variaram dependeram das taxas de dose, que variaram de 0,1 a 1,0 cGy/h e 5 cGy/h (Sugihara *et al.*, 2004), mas existem poucos dados que realmente demonstram os efeitos da TD ao nível de respostas transcricionais. Em linfócitos de sangue periférico humano, uma significativa diminuição na mortalidade reprodutiva foi observada sob uma TD mais baixa quando comparada com uma alta (Meijer *et al.*, 1999). Por meio de estudos de expressão gênica, Amundson *et al.* (2003) mostraram que uma redução na TD em três ordens de magnitude (0.28; 2.4; 29.0 cGy/min.) causou uma proteção contra a indução de apoptose em uma linhagem de células leucêmicas (linhagem ML-1). Os autores indicaram um grupo de genes induzidos dependente da TD, sendo que a maioria desses genes foi relacionada à regulação do processo de apoptose. Entretanto, a literatura continua escassa no que diz respeito aos efeitos da TD em diferentes tipos celulares, especialmente em termos de níveis de expressão gênica. Neste trabalho, estes foram estudados em culturas de fibroblastos irradiados em estado de confluência com 4 Gy sob duas TD distintas, 0,5 Gy/min (dose moderada) e 2,0 Gy/min (dose alta), sendo que as análises foram efetuadas após o sub-cultivo dos fibroblastos, em amostras de RNA coletadas no tempo de 6 h após a irradiação.

As células irradiadas com a menor TD apresentaram um perfil transcricional significativamente modulado para 94 genes. Esse grupo de genes foi induzido 6 h após a irradiação, considerando-se $FDR < 0.05$. Entre os 27 genes de reparo do DNA que estavam presentes na membrana, 11 foram induzidos pela irradiação sob a menor TD, correspondendo a uma fração de 11.76% do total de genes induzidos. Os genes *ERCC1*, *ERCC3* e *ERCC4* participam do mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos (NER). A indução de genes do NER em fibroblastos irradiados provavelmente deve resultar da indução de danos oxidativos pela radiação gama. Alguns estudos anteriores também mostraram que genes do NER foram modulados após a irradiação, como por exemplo *DDB2* e *XPC* (Amundson *et al.*, 2000), *DDB2* e

GADD45A (DNA excision repair/cell cycle arrest) (Jen & Cheung, 2003), e *DDB2*, *XPC*, *GADD45* e *PCNA* (Tusher *et al.*, 2001), sugerindo que as proteínas do NER podem participar das resposta às radiações gama. Entretanto, foi relatado que a indução de genes do NER provavelmente está associada ao reparo de *cross-links* induzidos pelas radiações e não ao reparo formal de quebras duplas geradas por estas (Murray & Rosenberg, 1996). Assim, a natureza das lesões associadas às vias de reparo é um fator importante a ser considerado.

Genes de outras vias de reparo do DNA, como *MLH1*, *MLH3* e *TREX1*, os quais participam do MMR, também foram induzidos nos fibroblastos irradiados com a menor TD. *MLH3* codifica uma proteína do *mismatch repair* que interage com *MLH1*. O MMR é de fundamental importância para a manutenção da integridade genômica. Foi relatado que as células deficientes para a proteína *MLH3* exibem instabilidade em regiões de microsatélites (Lipkin *et al.*, 2001). Erros de pareamento ocorrem no DNA como resultados de erros de duplicação, especialmente em regiões microsatélites contendo repetições principalmente de dinucleotídeos. Algumas evidências indicam que o MMR também está envolvido no reparo de pareamentos 8-oxoG:A, tipo de lesão reparada principalmente pela via BER (Ni *et al.*, 1999; Colussi *et al.*, 2002; Gu *et al.*, 2002; Mazurek *et al.*, 2002). Essa evidência é corroborada pelo fato de que os níveis de 8-oxoG induzidos por H₂O₂ foram aumentados em fibroblastos embriônicos *msh2*^{-/-} de ratos (Colussi *et al.*, 2002). Portanto, provavelmente a indução de genes do MMR sugere a ativação dessa via para o reparo de danos oxidativos induzidos por espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas pela irradiação sob a menor TD. A presença de danos oxidativos também pode explicar a indução de *NEIL2*, uma glicosilase que inicia a primeira etapa do reparo por excisão de base através da clivagem de bases danificadas por ROS (Bandaru *et al.*, 2002).

Os genes *RAD51L3* e *RAD54B* codificam proteínas envolvidas no reparo de DSBs pela via do reparo homólogo (HR). Estes também foram induzidos em fibroblastos irradiados com a menor TD, 6 h após a irradiação, momento em que as células provavelmente estavam na fase G1 do ciclo, visto que estas foram irradiadas em confluência (G0).

A ativação de genes do NHEJ não foi observada, o que seria esperado, considerando que o NHEJ atua predominantemente 30-120 minutos após a irradiação (Rothkamm *et al.*, 2003). Embora seja importante em todas as fases do ciclo, o NHEJ repara a maioria das quebras nas fases G0 e G1 (Valerie *et al.*, 2003).

Resultados similares foram observados por Rieger & Chu (2004), que também observaram a ativação de genes do NER e de *RAD51C* (HR), bem como a ausência da modulação de genes do NHEJ em linhagens linfoblastóides estabelecidas de diferentes indivíduos, irradiadas com 5 Gy.

Genes responsáveis pelo controle da apoptose, como *PHLDA2*, *TRAF2*, *ALS2CR2*, *HIPK2*, *FAS*, e *PDE1B*, também foram induzidos nas células irradiadas com a menor TD. A modulação do gene *ALS2CR2* reflete a ativação da via JNK de resposta ao estresse (Sanna *et al.*, 2002). A proteína PHLDA2 está implicada na via de apoptose mediada por FAS, e a sequência desse gene é similar à do *TDAG51*, que é essencial para a expressão de FAS e para a susceptibilidade à apoptose em linfócitos T (Qian *et al.*, 1997).

Tem sido relatado que as radiações ionizantes são capazes de ativar mecanismos de apoptose por mais de uma via (Norbury & Hickson, 2001; Schmidt-Ullrich *et al.*, 2003), dependendo do tipo celular e das condições experimentais. Embora os dados de expressão gênica possam sugerir que a radiação gama apresenta o potencial de promover a apoptose nas células irradiadas, foi relatado que fibroblastos normais cultivados *in vitro* são resistentes à apoptose induzida por radiação gama (Enns *et al.*, 1998; Kohli & Jorgensen, 1999). Um estudo anterior conduzido no presente laboratório também mostrou que fibroblastos normais primários em cultura não sofreram apoptose após serem irradiados com doses de 4.0 – 4.5 Gy (com a TD de 2.18 Gy/min), 18 a 48 h após a irradiação (Savoldi-Barbosa & Sakamoto-Hojo, 2001). Essa aparente discordância entre os dados de expressão gênica e de apoptose pode estar relacionada a requerimentos adicionais às condições de cultivo, conforme demonstrado por Fluck *et al.* (1998). Os autores observaram que fibroblastos normais primários crescendo *in vitro* sobre uma matriz tridimensional de colágeno foram mais susceptíveis à apoptose quando comparados com fibroblastos crescendo em monocamadas (culturas convencionais). Esses dados demonstram a existência de fatores exógenos capazes de influenciar a resposta celular em termos de apoptose.

No contexto de uma resposta celular global, a resposta final da célula a lesões no DNA depende de um balanço entre as vias de *checkpoints*, reparo e apoptose (Iliakis *et al.*, 2003; Bree *et al.*, 2004). Se os níveis de lesões induzidas no DNA são suficientes para ativar os mecanismos de *checkpoints* e sinalizar em direção a vias de reparo, é plausível supor que a predominância de sinalização molecular seja em grande parte, direcionada ao reparo e sobrevivência. Nossos

resultados corroboram essa suposição, baseado no grande número de genes induzidos participantes de mecanismos de reparo do DNA, controle do ciclo celular e resposta ao estresse. Além disso, os resultados são compatíveis com a moderada redução nos níveis de sobrevivência dos fibroblastos irradiados com 4 Gy sob a menor TD. Doses e taxas de dose elevadas provavelmente devem provocar respostas diferentes. As análises de dados de expressão têm indicado que as respostas fisiológicas a danos induzidos no DNA dependem da extensão das lesões, além do balanço entre checkpoint, reparo e apoptose, culminando finalmente com a determinação da resposta celular (Bernstein *et al.*, 2002; Iliakis *et al.*, 2003). A decisão em direção à sobrevivência pela a ativação de mecanismos de reparo se contrapõe à indução de apoptose, embora o tipo celular e o *background* genético sejam cruciais para o resultado final. Além disso, os níveis de dose são também importantes.

De acordo com Ding *et al.* (2005), as principais respostas biológicas para altas doses (4 Gy) detectadas em fibroblatos normais foram apoptose e proliferação celular, em contraste a respostas para baixa dose (2 cGy), que estimulou outras classes gênicas, como sinalização célula-célula, resposta a dano no DNA, desenvolvimento e transdução de sinais. No presente estudo, houve um grande número de genes modulados pertencentes a mecanismos de reparo do DNA e resposta ao estresse, embora com pequenas variações nos valores de fold-change. Baixos valores de FC (menor que 2) também foram relatados para esses processos biológicos em resposta à irradiação (Amundson *et al.*, 2003; Rieger *et al.*, 2004; Kis *et al.*, 2006). Para três classes gênicas, metabolismo (FC= 1.11 a 36.53), apoptose (FC= 1.13 a 13.28) e controle do ciclo celular (FC= 1.23 a 49.84), uma grande amplitude de variação foi observada, embora apenas alguns genes tenham apresentado valores de FC elevados (Figura 7).

Outros importantes processos biológicos associados a genes significativamente modulados nas células irradiadas sob a menor TD foram metabolismo de fósforo e de biopolímeros, os quais foram recentemente associados com a resposta ao estresse e a danos no DNA em mamíferos (Rieger *et al.*, 2004; Ding *et al.*, 2005; Kis *et al.*, 2006). O metabolismo de biopolímeros (DNA, RNA, proteínas e polissacarídeos) foi aumentado em ratos submetidos a estímulos de estresse diários (Sharaev *et al.*, 1987). Esses dados demonstram a vasta amplitude das cascatas genéticas que controlam as respostas a danos induzidos no DNA e de resposta ao estresse. Não obstante, para baixas doses (2 cGy) de radiação testadas

em linhagens linfoblastóides, os principais processos biológicos foram também associados à síntese protéica e metabolismo, conforme demonstrado por Coleman et al. (2005), mas nesse estudo, os genes do metabolismo foram reprimidos.

As células irradiadas com a maior TD apresentaram uma lista de 34 genes com perfis transcricionais significativamente modulados ($FDR < 0,05$), sendo 4 induzidos e 30 reprimidos. Entre os genes induzidos, *NAIP*, *BAG4* e *HIPK3* codificam proteínas anti-apoptóticas. Embora o gene *NAIP* não tenha sido previamente associado à resposta às radiações, Liston et al. (1996) demonstraram que a expressão de *NAIP* em células de mamíferos inibiu a indução de apoptose por uma variedade de outros estímulos. A proteína codificada por *BAG4* é membro da família *BAG1*. *BAG1* é uma proteína anti-apoptótica que atua pela interação com uma variedade de proteínas relacionadas à apoptose e ao crescimento, incluindo *BCL-2*, Raf-protein kinase, receptores de hormônios esteróides, receptores de fatores de crescimento e membros da família HSP (heat shock protein 70 kDa) (Takayama et al., 1999). Pode-se notar, desta forma, uma tentativa das células evitarem o processo de apoptose por meio da indução de genes anti-apoptóticos, mesmo nas células irradiadas com a maior TD.

Entre os genes reprimidos, houve uma predominância de genes de metabolismo, além de genes de controle do ciclo celular (*UHMK1* e *NBN*), reparo do DNA (*RAD51L3*, *TREX1* e *POLK*), e controle de apoptose (*PRKAA1*, *FAS* e *PDE1B*), entre outros (Tabela 4).

A repressão de genes de controle do ciclo celular (*UHMK1* e *NBN*) sugere a ocorrência de um bloqueio no ciclo, provavelmente devido à maior quantidade de lesões induzidas no DNA pela irradiação com uma TD mais elevada. O gene *RAD51L3* tem sido associado ao mecanismo de reparo homólogo, o qual atua durante a fase S (síntese) do ciclo celular, devido à necessidade de acesso livre às fitas de DNA. Da mesma forma, *TREX1* atua no reparo do tipo *mismatch* além de participar do processo de recombinação. *POLK* atua na duplicação e no reparo do DNA. A atividade da exonuclease 3'-5' da *POLK* durante a duplicação do DNA auxilia na prevenção do bloqueio da maquinaria de duplicação (Lone et al., 2007). A repressão de genes do ciclo celular associada à repressão de genes responsáveis pelo reparo e duplicação do DNA observada nos experimentos com a TD de 2 Gy/min pode estar relacionada a um possível bloqueio no ciclo celular para a tentativa de correção dos danos no DNA.

Os dados mostram que houve uma indução de genes de reparo do DNA mais pronunciada nas células irradiadas com a menor TD em comparação com as células irradiadas com a mesma dose mas sob uma maior TD. Alguns trabalhos demonstraram que a parada do replissomo e da maquinaria de transcrição são, por si só, sinais para a indução de mecanismos capazes de reparar lesões no DNA. Apesar disso, se o nível de danos causados nas células irradiadas sob a maior taxa de dose impediu o início da síntese ou bloqueou de maneira transitória as maquinarias de duplicação e transcrição, antes que estas fossem capazes de sinalizar para o reparo. É possível que a sinalização para esses mecanismos tenha sido mais pronunciada nas células irradiadas sob a menor TD, visto as diferenças observadas nos níveis de expressão sob ambas as situações experimentais.

PRKAA1 codifica uma proteína anti-apoptótica e atua em resposta a estresses que provocam diminuição nos níveis de ATP, inativando cascatas que consomem muito ATP (Hardie, 1999). A inibição de *PDE1B* e *PDE4* provocou a indução de apoptose em células humanas leucêmicas (Jiang et al., 1996). *FAS* codifica uma proteína que interage com seu ligante FASL induzindo o processo de apoptose via caspase 8 (Brunner et al., 1995; Hueber, 2000). Podemos observar nesses dados que a irradiação sob a maior TD provocou a modulação de muitos genes relacionados ao processo de apoptose. Uma vez que irradiações em TDs mais elevadas talvez possam provocar maior quantidade de lesões no DNA, é de se esperar que o processo de apoptose seja requisitado em algum momento. Entretanto, como já foi discutido anteriormente, fibroblastos primários são resistentes à indução de apoptose por radiação gama. Esse fato pode ser corroborado com os dados de expressão gênica, uma vez que foram observados a indução de genes anti-apoptóticos (*NAIP*, *BAG4* e *HIPK3*) e a inibição de um gene pró-apoptótico (*FAS*). Também foi observada a inibição de dois genes anti-apoptóticos (*PRKAA1* e *PDE1B*), o que contribuiria para vias de sinalização pró-apoptóticas. Entretanto, de acordo com Bernstein et al. (2002) e Iliakis et al. (2003), a resposta final das células às lesões no DNA depende de um balanço entre as vias de “checkpoints”, reparo e apoptose.

Segundo diversos estudos da literatura, uma considerável variação de respostas transcricionais às radiações ionizantes já foi observada, havendo um consenso a respeito dos fatores responsáveis por essas variações qualitativas e quantitativas nos perfis transcricionais, como diferenças entre espécies e tecidos, condições experimentais (dose, condições de cultivo das células, tempo de coleta e

protocolos experimentais) e genes depositados na membrana do arrays (Amundson *et al.*, 1999; Ding *et al.*, 2005; Tachiiri *et al.*, 2006). Os dados obtidos nesse trabalho mostram que, adicionalmente, a TD também é um importante fator a ser considerado, uma vez que é capaz de alterar a resposta celular, embora a dose final seja a mesma. Apesar disso, alguns genes ou famílias gênicas são consideradas comuns na resposta à radiação em diferentes tipos celulares. Entretanto, a direção da modulação (indução ou repressão) pode ser diferente, provavelmente devido aos fatores mencionados anteriormente. Portanto, esse panorama sobre perfis de expressão gênica estudados por microarranjos de DNA, enfatiza a complexa natureza da resposta às radiações em células de mamíferos.

Os resultados obtidos em fibroblastos primários irradiados sob diferentes TDs fornecem uma visão biológica qualitativa e quantitativa dos processos envolvidos na resposta ao estresse gerado pela irradiação de células em estado de confluência, às quais foram permitidas proliferar durante 6 h antes da análise dos perfis transcricionais. Estes resultados fornecem informações úteis que contribuem para esclarecer aspectos importantes das respostas celulares dos fibroblastos primários irradiados, que são ainda pouco compreendidas em radiobiologia.

Expressão transcricional analisada por qPCR em fibroblastos e linfócitos

No presente trabalho, vários genes de reparo do DNA (*ERCC1*, *ERCC3* (ou *XPB*), *XPF*, *XPA*, *FEN1*) e *ATM* foram estudados com o objetivo de verificar a ocorrência de respostas diferenciais sob a influência de duas TD distintas, moderada e alta, em linfócitos e fibroblastos irradiados, sendo que a análise da expressão foi realizada 2 e 6 h após a irradiação. O gene *ERCC3* foi induzido nas duas TD testadas em ambos os tipos celulares. A proteína ERCC3 é uma helicase 3'-5' dependente de ATP, sendo componente do *core* da proteína TFIIH, envolvida no reparo por excisão de nucleotídeos (NER) (Guzder *et al.*, 1994). Weeda *et al.* (1997) apresentaram evidências de que tanto ERCC3 quanto XPD apresentam papéis duplos, desempenhando atividades em dois processos metabólicos distintos: reparo do DNA e transcrição. O gene *ERCC3* está diretamente relacionado a mecanismos de transcrição e reparo do DNA, fato que pode explicar a sua modulação logo após a indução de lesões no DNA pela irradiação das células.

A expressão de *FEN1*, um gene representante do mecanismo BER, também foi estudada, sendo que este se mostrou transcricionalmente induzido em ambas as TD, mas somente em linfócitos (não em fibroblastos). Realmente, verificou-se que a

proteína FEN1 não foi detectada em fibroblastos irradiados com a maior TD. FEN1 remove as extremidades 5' do DNA no mecanismo de reparo do DNA e a porção final 5' dos fragmentos de Okazaki na fita *lagging* durante a duplicação do DNA (Tishkoff *et al.*, 1997). *FEN1* codifica uma endonuclease denominada Flap, capaz de atuar em mais de um mecanismo de reparo. Essa enzima realiza excisões em processos de reparo por excisão de bases, além de participar também do reparo de quebras duplas (DSBs). O estresse oxidativo gerado pelas radiações e pelo metabolismo oxidativo geram danos de base, além de quebras no DNA. Danos de base são causados indiretamente pelas espécies reativas do oxigênio (ROS) como, por exemplo, O₂(.-) (radical superóxido), OH. (radical hidroxil) e H₂O₂ (peróxido de hidrogênio). O BER é a principal via de reparo de danos oxidativos de base, sendo que o TCR e o *Mismatch Repair* (MMR) constituem importantes vias de *backup* para o reparo de fitas transcritas e duplicadas, respectivamente (Slupphaug *et al.*, 2003).

Em geral, sob condições de irradiação com a menor TD (0,5 Gy/min) houve predominantemente um padrão de indução para os genes analisados, tanto no tempo de 2 h quanto 6 h após a irradiação. As exceções foram os genes XPA (2 e 6 h) e XPF (6 h) em linfócitos, bem como o gene ERCC1 em fibroblastos. Este último não sofreu modulação sob a menor TD no tempo de 2 h (Tabela 11).

Nas células irradiadas com a maior TD (2,0 Gy/min) também houve a indução de alguns genes. Entretanto, principalmente 6 h após a irradiação, alguns genes mostraram-se reprimidos em relação ao controle, tais como ERCC1 e XPA (em linfócitos e fibroblastos) e FEN1 e XPF (6 h após a irradiação em fibroblastos) (Tabela 11).

De uma forma geral, em linfócitos (irradiados com a dose de 2 Gy) houve maior número de genes do NER reprimidos quando comparados com fibroblastos (irradiados com a dose de 4 Gy), principalmente quando se consideram as células analisadas 2 h após a irradiação. Os perfis de repressão de alguns genes do NER em linfócitos irradiados sob a menor TD sugerem vias alternativas de reparo, possivelmente para lesões do tipo quebra dupla. Uma vez que os linfócitos aparentam ser mais radio-sensíveis comparados aos fibroblastos, esse fato provavelmente pode explicar em parte, a modulação diferenciada (em termos de expressão gênica) entre os dois tipos celulares, mas a radio-sensibilidade inerente ao tipo celular deve ser também considerada.

O gene *ATM* (sensor de danos) mostrou-se induzido em ambas as TD nos dois tipos celulares estudados e também nos dois tempos, 2 e 6 h, indicando a

manutenção da sua expressão nesse período. Em mamíferos, ATM desempenha um papel crítico como sensor na etapa de reconhecimento do dano e na transdução de sinais em todos os *checkpoints* do ciclo celular: G1/S, intra S e G2/M em resposta a danos radio-induzidos (Abraham, 2001; Sancar *et al.*, 2004; Shiloh, 2006). A proteína ATM é ativada em resposta à radiação ionizante e fosforila diversas proteínas, incluindo TP53, H2AX, CHK2, RPA e BRCA1 (Shiloh, 2001; Iliakis *et al.*, 2003; Riballo *et al.*, 2004), levando à iniciação e manutenção do bloqueio do ciclo celular nas fases G1/S (Iliakis *et al.*, 2003; Sancar *et al.*, 2004). Em resposta à radiação, ATM ativa a proteína TP53 que é responsável pelo controle do ciclo celular e pode sinalizar para o reparo do DNA, o bloqueio no ciclo e apoptose (Levine, 1997; Li *et al.*, 2001; Iliakis *et al.*, 2003). Portanto, essa proteína é um componente central na sinalização de resposta a DSBs induzidas por radiação ionizante.

Em fibroblastos pode-se observar que a indução de *ATM* foi maior nas células irradiadas com a maior TD no tempo de 2 h, o que é compatível com a resposta de reparo das DSBs induzidas pelas radiações, cujo pico de ação foi demonstrado ocorrer entre 30-120 min após a indução das lesões (Rothkamm *et al.*, 2003). Entretanto, 6 h após a irradiação, o nível de indução de *ATM* nas células irradiadas sob a maior TD já se mostrou levemente abaixo daquele encontrado nas células irradiadas sob a menor TD. Nos linfócitos, a indução de *ATM* permaneceu mais elevada nas células irradiadas com a maior TD (mesmo 6 h após a irradiação), fato que talvez possa ser explicado pela maior sensibilidade dos linfócitos em relação aos fibroblastos, além do próprio *background* genético. Portanto, foi confirmado que *ATM* é um gene essencial na resposta às radiações e a sua modulação mostrou-se dependente da TD em linfócitos e fibroblastos humanos.

Análise de expressão protéica

Além do estudo de expressão transcricional, foi realizado também um estudo em nível protéico para vários produtos gênicos: ERCC2, XPA, TFIIH, H2AX, CHK1 e XRCC1, em amostras de fibroblastos e linfócitos. Além destes, foram ainda analisadas as proteínas FEN1 em linfócitos e PCNA em fibroblastos. As proteínas ERCC2, XPA, TFIIH, CHK1 e XRCC1 não foram detectadas em ambos os tipos celulares, embora o controle endógeno (ACT β) tenha sido detectado em todas as marcações.

Nos experimentos realizados em fibroblastos, a proteína PCNA mostrou-se induzida nas células irradiadas sob a TD de 0,5 Gy/min e reprimida nas células

irradiadas sob a TD de 2,0 Gy/min, tanto 2 quanto 6 h após a irradiação (Figura 13). Essa proteína é auxiliar da DNA polimerase δ (delta) e está envolvida no controle da duplicação do DNA em eucariotos, aumentando a eficiência da polimerase durante a elongação da fita *leading* do DNA. Hasan et al. (2001) demonstraram que PCNA também desempenha um papel no reparo do DNA pela sua interação com a proteína p300; tanto *in vitro* quanto *in vivo*, p300 forma um complexo com PCNA independente da fase S do ciclo celular. Essas proteínas se co-localizam no núcleo e o complexo p300-PCNA estimula a síntese de DNA *in vitro*. Experimentos de imunoprecipitação indicaram que p300 se associa com o DNA recém-sintetizado após irradiação UV, sugerindo que esta possa participar no remodelamento da cromatina nos sítios de lesão, facilitando a atuação de PCNA no processo de reparo do mesmo (Hasan et al., 2001).

Portanto a indução de PCNA após a irradiação dos fibroblastos sob a TD de 0,5 Gy/min reflete a ocorrência de reparo das lesões provocadas no DNA pela irradiação. Por outro lado, a falta de expressão desta após a irradiação das células sob a maior TD (2,0 Gy/min), embora para uma mesma dose de 4 Gy, sugere um possível bloqueio no ciclo celular sob essa condição. PCNA é um marcador de células com potencial proliferativo, sendo pois correlacionado com o estágio celular proliferativo (Jaskulski et al., 1988; Tsurimoto, 1999; Wullimann & Puelles, 1999; Rankin et al., 2004). A quantidade de lesões no DNA é provavelmente maior sob irradiação com TD elevada (visto que a irradiação é processada num tempo mais curto), além do que as células irradiadas sob baixa TD já iniciam o reparo das lesões durante o próprio período de irradiação, proporcionando o reparo de danos sub-letais, conforme demonstrado em ensaios de sobrevivência (Hall, 2000). Portanto, a irradiação com a TD de 2,0 Gy/min pode ter levado as células à promoção de um bloqueio no ciclo celular para tentativa de reparo das lesões, o que é compatível com a diminuição da expressão de PCNA. Por outro lado, sob TD mais baixa, a detecção de PCNA nas células irradiadas indica a continuidade da progressão do ciclo celular e indução de reparo, mesmo para uma mesma dose testada. Assim, esses resultados indicam que a proteína PCNA apresentou potencial como um bom indicador dos efeitos de TDs diferentes em fibroblastos irradiados.

No estudo realizado em linfócitos, um dado interessante foi obtido quanto à expressão da proteína γ H2AX (fosforilada na serina 139). Esta foi induzida em ambas as TD no tempo de 2 h após a irradiação (Figura 12). Rogakou et al. (1998) relataram que a produção de DSBs após a irradiação conduz à rápida fosforilação

de H2AX, uma forma variante da histona H2A. Após a indução das DSBs, as histonas são extensivamente fosforiladas cobrindo grandes regiões do cromossomo adjacentes a cada sítio de quebra. A detecção de *foci* nuclear de H2AX fosforilada (γ H2AX) representa um meio de visualização individual de cada DSB, podendo essa metodologia ser utilizada para a quantificação de DSBs (Rogakou *et al.*, 1999). Em resposta aos danos induzidos no DNA, a fosforilação de H2AX é dependente da atividade de PI3KKs, ATM, DNA-PK e ATR e o sítio fosforilado reside no C-terminal (serina 139) (Paull *et al.*, 2000; Burma *et al.*, 2001; Ward & Chen, 2001; Bassing & Alt, 2004; Stiff *et al.*, 2004).

Portanto, a indução de γ H2AX nos linfócitos 2 h após a irradiação representa a sinalização celular para o reparo das quebras duplas induzidas no DNA. Conforme avaliado no tempo de 6 h após a irradiação, os níveis de H2AX já se apresentaram próximos aos níveis das células não irradiadas, revelando que após 6 h, os linfócitos já efetuaram o reparo das DSBs rádio-induzidas no DNA. Há evidências de que o pico de ação das enzimas de reparo de quebras duplas no DNA ocorra em 30 a 120 min. após a indução das lesões (Rothkamm *et al.*, 2003), o que é compatível com os dados obtidos.

Em linfócitos, também foi detectada a expressão da proteína FEN1 participante do mecanismo de reparo do DNA por excisão de bases (BER) (Figura 11). Cerca de 70% das lesões no DNA induzidas por radiação ionizante são provocadas pelos radicais provenientes da radiólise das moléculas de água (Ward, 1988). Os radicais hidroxila formados produzem quebras de fita dupla, quebras de fita simples além de danos de base, como por exemplo, perdas de base (Breen & Murphy, 1995), as quais são reparadas pelo mecanismo de reparo por excisão de bases (Wallace, 1998; Wallace, 2002). Danos induzidos por radicais livres são reconhecidos por uma classe de enzimas denominadas DNA glicosilases. Após a eliminação da base, o sítio AP resultante é processado por uma sequência de reações similares. Essas fases podem ocorrer tanto pela via curta do BER, que envolve a remoção apenas do nucleotídeo danificado, quanto pela via longa, que envolve a remoção de cerca de 2-13 nucleotídeos (Jagannathan *et al.*, 2006). XRCC1 atua na via curta e FEN1 na via longa do BER, entretanto, apenas a FEN1 foi detectada nas amostras estudadas, evidenciando a ocorrência da via longa do BER como mecanismo de reparo preferencial, em relação à via curta, para danos oxidativos nos tipos celulares estudados. Essa proteína se mostrou induzida, tanto no controle quanto nas células irradiadas para ambas as TD. Esse fato pode refletir

a existência de um *pool* de proteínas nas células, em nível basal, não exigindo, pelo menos de imediato, a tradução de proteínas para o reparo de eventuais lesões provocadas por agentes oxidativos, uma vez que a quantidade de destas provocadas espontaneamente pelo metabolismo celular chega a 10000 lesões por dia (Seeberg *et al.*, 1995). Estudos realizados em uma linhagem limfoblastoide (TK6) também sugerem que proteínas do BER não são induzidas em resposta a baixa-moderada dose (1cGy a 2Gy) de radiação ionizante (Inoue *et al.*, 2004).

O presente estudo realizado em dois tipos celulares mostrou claramente que a taxa de dose é capaz de alterar as respostas moleculares das células irradiadas, respostas essas que envolvem uma complexa cascata de sinalização e transdução de sinais, com a participação de múltiplas classes de genes, incluindo-se os genes de reparo do DNA e de resposta ao estresse. Portanto, a TD é um fator importante a ser considerado no campo da radiobiologia, especialmente em radioterapia. Além disso, esses resultados abrem novas perspectivas para investigar a contribuição de vias distintas de reparo das diferentes lesões induzidas pelas radiações, sendo que os danos oxidativos, sem dúvida, constituem uma considerável fração das lesões induzidas, visto a evidência sobre a modulação de genes das vias NER e BER, que são muito importantes no reparo do dano oxidativo, segundo uma vasta literatura.

CONCLUSÕES

A comparação entre os resultados obtidos sob as duas situações (taxas de dose distintas para uma mesma dose total administrada) demonstrou algumas diferenças entre as vias ativadas para cada TD. A modulação de genes que atuam na repressão da transcrição e da duplicação foi observada de maneira marcante apenas na taxa de dose de 2,0 Gy/min. Por outro lado, alguns genes de reparo foram modulados apenas em 0,5 Gy/min.

Em fibroblastos, a modulação transcricional de vários genes do NER em resposta à irradiação sugere que essa via de reparo do DNA ocorre de forma substancial em resposta à indução de danos oxidativos induzidos pelos raios-gama.

Em linfócitos (irradiados com a dose de 2 Gy) houve um maior número de genes do NER reprimidos quando comparados com fibroblastos (irradiados com a dose de 4 Gy), principalmente quando se consideram as células analisadas 2 h após a irradiação. Os perfis de repressão de alguns genes do NER em linfócitos irradiados sob a menor TD sugerem vias alternativas de reparo, possivelmente para lesões do tipo quebra dupla.

A repressão de PCNA após a irradiação das células sob a maior TD (2,0 Gy/min), embora para uma mesma dose de 4 Gy, sugere um possível bloqueio no ciclo celular sob essa condição, provavelmente devido ao aumento nas lesões do DNA, evidenciando portanto, uma resposta diferenciada dependendo da TD. Tais resultados indicam o potencial de PCNA como biomarcador de exposição às radiações.

A indução de γ H2AX nos linfócitos 2 h após a irradiação não sofreu influência da TD, entretanto, representa a sinalização celular para o reparo das quebras duplas no DNA. Conforme avaliado no tempo de 6 h após a irradiação, os níveis de H2AX já se apresentaram próximos aos níveis das células não irradiadas, revelando que nesse tempo, os linfócitos já efetuaram o reparo dos danos no DNA.

Os resultados sugerem que a variação da taxa de dose em células irradiadas com os raios-gama pode provocar respostas biológicas diferentes pela modulação

direta de genes e proteínas participantes da cascata de sinalização e resposta ao estresse induzido pelas radiações ionizantes. Os dados obtidos nesse trabalho mostram que a TD é um importante fator a ser considerado em estudos ou procedimentos que envolvam a utilização de radiações do tipo gama, uma vez que a mesma é capaz de alterar as respostas ao nível molecular.

Os resultados obtidos fornecem uma contribuição relevante sobre as vias distintas de reparo das diferentes lesões induzidas pelas radiações, sendo que os danos oxidativos, sem dúvida, constituem uma considerável fração das lesões induzidas, além das quebras na cadeia do DNA, conforme sugerido pela modulação de genes das vias NER e BER, que são muito importantes no reparo do dano oxidativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham RT. 2001. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* 1517: 2177-2196.
- Ahn JY, Schwarz JK, Piwnica-Worms H and Canman CE. 2000. Threonine 68 phosphorylation by ataxia telangiectasia mutated is required for efficient activation of Chk2 in response to ionizing radiation. *Cancer Res* 6021: 5934-5936.
- Ahnesorg P, Smith P and Jackson SP. 2006. XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell* 1242: 301-313.
- Alarcon-Vargas D and Ronai Z. 2002. p53-Mdm2--the affair that never ends. *Carcinogenesis* 234: 541-547.
- Amundson SA, Bittner M, Chen Y, Trent J, Meltzer P and Fornace AJ, Jr. 1999. Fluorescent cDNA microarray hybridization reveals complexity and heterogeneity of cellular genotoxic stress responses. *Oncogene* 1824: 3666-3672.
- Amundson SA, Bittner M, Meltzer P, Trent J and Fornace AJ, Jr. 2001. Physiological function as regulation of large transcriptional programs: the cellular response to genotoxic stress. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 1294: 703-710.
- Amundson SA, Do KT, Shahab S, Bittner M, Meltzer P, Trent J and Fornace AJ, Jr. 2000. Identification of potential mRNA biomarkers in peripheral blood lymphocytes for human exposure to ionizing radiation. *Radiat Res* 1543: 342-346.
- Amundson SA, Lee RA, Koch-Paiz CA, Bittner ML, Meltzer P, Trent JM and Fornace AJ, Jr. 2003. Differential responses of stress genes to low dose-rate gamma irradiation. *Mol Cancer Res* 16: 445-452.
- Andegeko Y, Moyal L, Mittelman L, Tsarfaty I, Shiloh Y and Rotman G. 2001. Nuclear retention of ATM at sites of DNA double strand breaks. *J Biol Chem* 27641: 38224-38230.
- Appella E and Anderson CW. 2000. Signaling to p53: breaking the posttranslational modification code. *Pathol Biol (Paris)* 483: 227-245.
- Balajee AS and Bohr VA. 2000. Genomic heterogeneity of nucleotide excision repair. *Gene* 2501-2: 15-30.
- Bandaru V, Sunkara S, Wallace SS and Bond JP. 2002. A novel human DNA glycosylase that removes oxidative DNA damage and is homologous to Escherichia coli endonuclease VIII. *DNA Repair (Amst)* 17: 517-529.
- Bao S, Tibbetts RS, Brumbaugh KM, Fang Y, Richardson DA, Ali A, Chen SM, Abraham RT and Wang XF. 2001. ATR/ATM-mediated phosphorylation of human Rad17 is required for genotoxic stress responses. *Nature* 4116840: 969-974.
- Bartek J, Lukas C and Lukas J. 2004. Checking on DNA damage in S phase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 510: 792-804.
- Bassing CH and Alt FW. 2004. H2AX may function as an anchor to hold broken chromosomal DNA ends in close proximity. *Cell Cycle* 32: 149-153.
- Beard WA and Wilson SH. 2000. Structural design of a eukaryotic DNA repair polymerase: DNA polymerase beta. *Mutat Res* 4603-4: 231-244.

- Belli M, Sapora O and Tabocchini MA. 2002. Molecular targets in cellular response to ionizing radiation and implications in space radiation protection. *J Radiat Res (Tokyo)* 43 Suppl: S13-19.
- Bernstein C, Bernstein H, Payne CM and Garewal H. 2002. DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutat Res* 5112: 145-178.
- Bohr VA and Dianov GL. 1999. Oxidative DNA damage processing in nuclear and mitochondrial DNA. *Biochimie* 811-2: 155-160.
- Bohr VA, Smith CA, Okumoto DS and Hanawalt PC. 1985. DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell* 402: 359-369.
- Bree RT, Neary C, Samali A and Lowndes NF. 2004. The switch from survival responses to apoptosis after chromosomal breaks. *DNA Repair (Amst)* 38-9: 989-995.
- Breen AP and Murphy JA. 1995. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med* 186: 1033-1077.
- Brown AL, Lee CH, Schwarz JK, Mitiku N, Piwnica-Worms H and Chung JH. 1999. A human Cds1-related kinase that functions downstream of ATM protein in the cellular response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 967: 3745-3750.
- Brugmans L, Kanaar R and Essers J. 2007. Analysis of DNA double-strand break repair pathways in mice. *Mutat Res* 6141-2: 95-108.
- Brunner T, Mogil RJ, LaFace D, Yoo NJ, Mahboubi A, Echeverri F, Martin SJ, Force WR, Lynch DH, Ware CF and et al. 1995. Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* 3736513: 441-444.
- Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A and Chen DJ. 2001. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 27645: 42462-42467.
- Chehab NH, Malikzay A, Appel M and Halazonetis TD. 2000. Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev* 143: 278-288.
- Chen X, Ko LJ, Jayaraman L and Prives C. 1996. p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev* 1019: 2438-2451.
- Cleaver JE. 1968. Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. *Nature* 2185142: 652-656.
- Coleman MA, Yin E, Peterson LE, Nelson D, Sorensen K, Tucker JD and Wyrobek AJ. 2005. Low-dose irradiation alters the transcript profiles of human lymphoblastoid cells including genes associated with cytogenetic radioadaptive response. *Radiat Res* 1644 Pt 1: 369-382.
- Collis SJ, Schwaninger JM, Ntambi AJ, Keller TW, Nelson WG, Dillehay LE and Deweese TL. 2004. Evasion of early cellular response mechanisms following low level radiation-induced DNA damage. *J Biol Chem* 27948: 49624-49632.
- Colussi C, Parlanti E, Degan P, Aquilina G, Barnes D, Macpherson P, Karran P, Crescenzi M, Dogliotti E and Bignami M. 2002. The mammalian mismatch repair pathway removes DNA 8-oxodGMP incorporated from the oxidized dNTP pool. *Curr Biol* 1211: 912-918.
- Dainiak N. 2002. Hematologic consequences of exposure to ionizing radiation. *Exp Hematol* 306: 513-528.

- Dennis G, Jr., Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC and Lempicki RA. 2003. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* 45: P3.
- Ding LH, Shingyoji M, Chen F, Hwang JJ, Burma S, Lee C, Cheng JF and Chen DJ. 2005. Gene expression profiles of normal human fibroblasts after exposure to ionizing radiation: a comparative study of low and high doses. *Radiat Res* 1641: 17-26.
- Drablos F, Feyzi E, Aas PA, Vaagbo CB, Kavli B, Bratlie MS, Pena-Diaz J, Otterlei M, Slupphaug G and Krokan HE. 2004. Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair (Amst)* 311: 1389-1407.
- Durocher D and Jackson SP. 2001. DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? *Curr Opin Cell Biol* 132: 225-231.
- Egly JM. 2001. The 14th Datta Lecture. TFIIH: from transcription to clinic. *FEBS Lett* 4982-3: 124-128.
- Eguchi Y, Shimizu S and Tsujimoto Y. 1997. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res* 5710: 1835-1840.
- Enns L, Barley RD, Paterson MC and Mirzayans R. 1998. Radiosensitivity in ataxia telangiectasia fibroblasts is not associated with deregulated apoptosis. *Radiat Res* 1501: 11-16.
- Evans AR, Limp-Foster M and Kelley MR. 2000. Going APE over ref-1. *Mutat Res* 4612: 83-108.
- Evans E, Moggs JG, Hwang JR, Egly JM and Wood RD. 1997. Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. *Embo J* 1621: 6559-6573.
- Falck J, Mailand N, Syljuasen RG, Bartek J and Lukas J. 2001. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* 4106830: 842-847.
- Fluck J, Querfeld C, Cremer A, Niland S, Krieg T and Sollberg S. 1998. Normal human primary fibroblasts undergo apoptosis in three-dimensional contractile collagen gels. *J Invest Dermatol* 1102: 153-157.
- Foray N, Marot D, Gabriel A, Randrianarison V, Carr AM, Perricaudet M, Ashworth A and Jeggo P. 2003. A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. *Embo J* 2211: 2860-2871.
- Friedberg EC. 1996. Relationships between DNA repair and transcription. *Annu Rev Biochem* 65: 15-42.
- Frosina G, Fortini P, Rossi O, Carrozzino F, Raspaglio G, Cox LS, Lane DP, Abbondandolo A and Dogliotti E. 1996. Two pathways for base excision repair in mammalian cells. *J Biol Chem* 27116: 9573-9578.
- Girard PM, Riballo E, Begg AC, Waugh A and Jeggo PA. 2002. Nbs1 promotes ATM dependent phosphorylation events including those required for G1/S arrest. *Oncogene* 2127: 4191-4199.
- Gu Y, Parker A, Wilson TM, Bai H, Chang DY and Lu AL. 2002. Human MutY homolog, a DNA glycosylase involved in base excision repair, physically and functionally interacts with mismatch repair proteins human MutS homolog 2/human MutS homolog 6. *J Biol Chem* 27713: 11135-11142.

- Guzder SN, Sung P, Bailly V, Prakash L and Prakash S. 1994. RAD25 is a DNA helicase required for DNA repair and RNA polymerase II transcription. *Nature* 369: 578-581.
- Ha HC and Snyder SH. 1999. Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 13978-13982.
- Haber JE, Ira G, Malkova A and Sugawara N. 2004. Repairing a double-strand chromosome break by homologous recombination: revisiting Robin Holliday's model. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359: 79-86.
- Hall EJ. 2000. *Radiobiology for the radiologist*. 5th edn. Philadelphia, PA, Lippincott Williams & Wilkins.
- Hall EJ. 2000. *Radiobiology for the radiologist*. 5th. Philadelphia, PA, Lippincott Williams & Wilkins.
- Hammond EM, Denko NC, Dorie MJ, Abraham RT and Giaccia AJ. 2002. Hypoxia links ATR and p53 through replication arrest. *Mol Cell Biol* 22: 1834-1843.
- Hammond EM, Dorie MJ and Giaccia AJ. 2003. ATR/ATM targets are phosphorylated by ATR in response to hypoxia and ATM in response to reoxygenation. *J Biol Chem* 278: 12207-12213.
- Han Z, Chatterjee D, He DM, Early J, Pantazis P, Wyche JH and Hendrickson EA. 1995. Evidence for a G2 checkpoint in p53-independent apoptosis induction by X-irradiation. *Mol Cell Biol* 15: 5849-5857.
- Hanawalt PC. 2002. Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene* 21: 8949-8956.
- Hannan MA, Hellani A, Al-Khodairy FM, Kunhi M, Siddiqui Y, Al-Yussef N, Pangué-Cruz N, Siewertsen M, Al-Ahdal MN and Aboussekhra A. 2002. Deficiency in the repair of UV-induced DNA damage in human skin fibroblasts compromised for the ATM gene. *Carcinogenesis* 23: 1617-1624.
- Hasan S, Hassa PO, Imhof R and Hottiger MO. 2001. Transcription coactivator p300 binds PCNA and may have a role in DNA repair synthesis. *Nature* 410: 387-391.
- Heffernan TP, Simpson DA, Frank AR, Heinloth AN, Paules RS, Cordeiro-Stone M and Kaufmann WK. 2002. An ATR- and Chk1-dependent S checkpoint inhibits replicon initiation following UVC-induced DNA damage. *Mol Cell Biol* 22: 8552-8561.
- Hekmat-Nejad M, You Z, Yee MC, Newport JW and Cimprich KA. 2000. Xenopus ATR is a replication-dependent chromatin-binding protein required for the DNA replication checkpoint. *Curr Biol* 10: 1565-1573.
- Hirao A, Kong YY, Matsuoka S, Wakeham A, Ruland J, Yoshida H, Liu D, Elledge SJ and Mak TW. 2000. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* 287: 1824-1827.
- Hirose Y, Berger MS and Pieper RO. 2001. p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells. *Cancer Res* 61: 1957-1963.
- Hueber AO. 2000. CD95: more than just a death factor? *Nat Cell Biol* 2: E23-25.
- Iliakis G, Wang Y, Guan J and Wang H. 2003. DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene* 22: 5834-5847.
- Inoue M, Shen GP, Chaudhry MA, Galick H, Blaisdell JO and Wallace SS. 2004. Expression of the oxidative base excision repair enzymes is not induced in TK6 human lymphoblastoid cells after low doses of ionizing radiation. *Radiat Res* 161: 409-417.

- Jagannathan I, Cole HA and Hayes JJ. 2006. Base excision repair in nucleosome substrates. *Chromosome Res* 141: 27-37.
- Jaskulski D, deRiel JK, Mercer WE, Calabretta B and Baserga R. 1988. Inhibition of cellular proliferation by antisense oligodeoxynucleotides to PCNA cyclin. *Science* 2404858: 1544-1546.
- Jen KY and Cheung VG. 2003. Transcriptional response of lymphoblastoid cells to ionizing radiation. *Genome Res* 139: 2092-2100.
- Jiang X, Li J, Paskind M and Epstein PM. 1996. Inhibition of calmodulin-dependent phosphodiesterase induces apoptosis in human leukemic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 9320: 11236-11241.
- Karran P. 2000. DNA double strand break repair in mammalian cells. *Curr Opin Genet Dev* 102: 144-150.
- Khanna KK and Jackson SP. 2001. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 273: 247-254.
- Kis E, Szatmari T, Keszei M, Farkas R, Esik O, Lumniczky K, Falus A and Safrany G. 2006. Microarray analysis of radiation response genes in primary human fibroblasts. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 665: 1506-1514.
- Klungland A and Lindahl T. 1997. Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *Embo J* 1611: 3341-3348.
- Kohli M and Jorgensen TJ. 1999. The influence of SV40 immortalization of human fibroblasts on p53-dependent radiation responses. *Biochem Biophys Res Commun* 2571: 168-176.
- Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV and Kastan MB. 1992. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 8916: 7491-7495.
- Lassus P, Ferlin M, Piette J and Hibner U. 1996. Anti-apoptotic activity of low levels of wild-type p53. *Embo J* 1517: 4566-4573.
- Lee SM, Youn B, Kim CS, Kim CS, Kang C and Kim J. 2005. Gamma-irradiation and doxorubicin treatment of normal human cells cause cell cycle arrest via different pathways. *Mol Cells* 203: 331-338.
- Lees-Miller SP and Meek K. 2003. Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining. *Biochimie* 8511: 1161-1173.
- Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S and Nicotera P. 1997. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 1858: 1481-1486.
- Levine AJ. 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 883: 323-331.
- Li L, Story M and Legerski RJ. 2001. Cellular responses to ionizing radiation damage. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 494: 1157-1162.
- Lindahl T, Karran P and Wood RD. 1997. DNA excision repair pathways. *Curr Opin Genet Dev* 72: 158-169.
- Lipkin SM, Wang V, Stoler DL, Anderson GR, Kirsch I, Hadley D, Lynch HT and Collins FS. 2001. Germline and somatic mutation analyses in the DNA mismatch repair gene MLH3: Evidence for somatic mutation in colorectal cancers. *Hum Mutat* 175: 389-396.

- Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton-Horvat G, Farahani R, McLean M, Ikeda JE, MacKenzie A and Korneluk RG. 1996. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 379: 349-353.
- Little JB. 2000. Radiation carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21: 397-404.
- Liu Q, Guntuku S, Cui XS, Matsuoka S, Cortez D, Tamai K, Luo G, Carattini-Rivera S, DeMayo F, Bradley A, Donehower LA and Elledge SJ. 2000. Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev* 14: 1448-1459.
- Livak KJ and Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408.
- Lone S, Townson SA, Uljon SN, Johnson RE, Brahma A, Nair DT, Prakash S, Prakash L and Aggarwal AK. 2007. Human DNA polymerase kappa encircles DNA: implications for mismatch extension and lesion bypass. *Mol Cell* 25: 601-614.
- Lowndes NF and Murguia JR. 2000. Sensing and responding to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev* 10: 17-25.
- Magae J, Hoshi Y, Furukawa C, Kawakami Y and Ogata H. 2003. Quantitative analysis of biological responses to ionizing radiation, including dose, irradiation time, and dose rate. *Radiat Res* 160: 543-548.
- Marchenko ND, Zaika A and Moll UM. 2000. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem* 275: 16202-16212.
- Matsumoto Y and Kim K. 1995. Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair. *Science* 269: 699-702.
- Matsuoka S, Rotman G, Ogawa A, Shiloh Y, Tamai K and Elledge SJ. 2000. Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10389-10394.
- Mazurek A, Berardini M and Fishel R. 2002. Activation of human MutS homologs by 8-oxo-guanine DNA damage. *J Biol Chem* 277: 8260-8266.
- McCullough AK, Dodson ML and Lloyd RS. 1999. Initiation of base excision repair: glycosylase mechanisms and structures. *Annu Rev Biochem* 68: 255-285.
- Meijer AE, Saeidi AB, Zelenskaya A, Czene S, Granath F and Harms-Ringdahl M. 1999. Influence of dose-rate, post-irradiation incubation time and growth factors on interphase cell death by apoptosis and clonogenic survival of human peripheral lymphocytes. *Int J Radiat Biol* 75: 1265-1273.
- Mellon I and Hanawalt PC. 1989. Induction of the Escherichia coli lactose operon selectively increases repair of its transcribed DNA strand. *Nature* 342: 95-98.
- Mellon I, Spivak G and Hanawalt PC. 1987. Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. *Cell* 51: 241-249.
- Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P and Moll UM. 2003. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* 11: 577-590.
- Mu D, Hsu DS and Sancar A. 1996. Reaction mechanism of human DNA repair excision nuclease. *J Biol Chem* 271: 8285-8294.

- Mu D, Park CH, Matsunaga T, Hsu DS, Reardon JT and Sancar A. 1995. Reconstitution of human DNA repair excision nuclease in a highly defined system. *J Biol Chem* 270: 2415-2418.
- Mu D, Wakasugi M, Hsu DS and Sancar A. 1997. Characterization of reaction intermediates of human excision repair nuclease. *J Biol Chem* 272: 28971-28979.
- Murray D and Rosenberg E. 1996. The importance of the ERCC1/ERCC4[XPF] complex for hypoxic-cell radioresistance does not appear to derive from its participation in the nucleotide excision repair pathway. *Mutat Res* 364: 217-226.
- Natarajan AT, Darroudi F, Jha AN, Meijers M and Zdzienicka MZ. 1993. Ionizing radiation induced DNA lesions which lead to chromosomal aberrations. *Mutat Res* 299: 297-303.
- Ni TT, Marsischky GT and Kolodner RD. 1999. MSH2 and MSH6 are required for removal of adenine misincorporated opposite 8-oxo-guanine in *S. cerevisiae*. *Mol Cell* 4: 439-444.
- Norbury CJ and Hickson ID. 2001. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 367-401.
- Norbury CJ and Zhivotovsky B. 2004. DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* 23: 2797-2808.
- Pandita TK, Lieberman HB, Lim DS, Dhar S, Zheng W, Taya Y and Kastan MB. 2000. Ionizing radiation activates the ATM kinase throughout the cell cycle. *Oncogene* 19: 1386-1391.
- Pastwa E and Blasiak J. 2003. Non-homologous DNA end joining. *Acta Biochim Pol* 50: 891-908.
- Paull TT and Gellert M. 1999. Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. *Genes Dev* 13: 1276-1288.
- Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M and Bonner WM. 2000. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol* 10: 886-895.
- Pellegrini L, Yu DS, Lo T, Anand S, Lee M, Blundell TL and Venkitaraman AR. 2002. Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. *Nature* 420: 287-293.
- Plumb MA, Smith GC, Cunniffe SM, Jackson SP and O'Neill P. 1999. DNA-PK activation by ionizing radiation-induced DNA single-strand breaks. *Int J Radiat Biol* 75: 553-561.
- Prasad R, Dianov GL, Bohr VA and Wilson SH. 2000. FEN1 stimulation of DNA polymerase beta mediates an excision step in mammalian long patch base excision repair. *J Biol Chem* 275: 4460-4466.
- Qian N, Frank D, O'Keefe D, Dao D, Zhao L, Yuan L, Wang Q, Keating M, Walsh C and Tycko B. 1997. The IPL gene on chromosome 11p15.5 is imprinted in humans and mice and is similar to TDAG51, implicated in Fas expression and apoptosis. *Hum Mol Genet* 6: 2021-2029.
- Rankin SL, Partlow GD, McCurdy RD, Giles ED and Fisher KR. 2004. The use of proliferating cell nuclear antigen immunohistochemistry with a unique functional marker to detect postnatal neurogenesis in paraffin-embedded sections of the mature pig brain. *Brain Res Brain Res Protoc* 13: 69-75.

- Rappold I, Iwabuchi K, Date T and Chen J. 2001. Tumor suppressor p53 binding protein 1 (53BP1) is involved in DNA damage-signaling pathways. *J Cell Biol* 1533: 613-620.
- Riballo E, Kuhne M, Rief N, Doherty A, Smith GC, Recio MJ, Reis C, Dahm K, Fricke A, Krempler A, Parker AR, Jackson SP, Gennery A, Jeggo PA and Lobrich M. 2004. A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. *Mol Cell* 165: 715-724.
- Rieger KE and Chu G. 2004. Portrait of transcriptional responses to ultraviolet and ionizing radiation in human cells. *Nucleic Acids Res* 3216: 4786-4803.
- Rogakou EP, Boon C, Redon C and Bonner WM. 1999. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* 1465: 905-916.
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS and Bonner WM. 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 27310: 5858-5868.
- Rothkamm K, Kruger I, Thompson LH and Lobrich M. 2003. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol* 2316: 5706-5715.
- Rotman G and Shiloh Y. 1999. ATM: a mediator of multiple responses to genotoxic stress. *Oncogene* 1845: 6135-6144.
- Sakamoto-Hojo ET, Mello SS, Bassi CL, Merchi IM, Carminati PO, Fachin AL, Donadi EA and Passos GAS. 2006. Genomic instability: Signaling Pathways Orchestrating the responses to ionizing radiation and cisplatin. in: Dirk-Henner, L. *Genome Dynamics and Stability*. 1 Heidelberg, Springer-Verlag. 1: 423-452.
- Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K and Linn S. 2004. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 73: 39-85.
- Sanna MG, da Silva Correia J, Luo Y, Chuang B, Paulson LM, Nguyen B, Deveraux QL and Ulevitch RJ. 2002. ILPIP, a novel anti-apoptotic protein that enhances XIAP-mediated activation of JNK1 and protection against apoptosis. *J Biol Chem* 27734: 30454-30462.
- Savoldi-Barbosa M and Sakamoto-Hojo ET. 2001. Influence of interferon-gamma on radiation-induced apoptosis in normal and ataxia-telangiectasia fibroblast cell lines. *Teratog Carcinog Mutagen* 216: 417-429.
- Schmidt-Ullrich RK, Contessa JN, Lammering G, Amorino G and Lin PS. 2003. ERBB receptor tyrosine kinases and cellular radiation responses. *Oncogene* 2237: 5855-5865.
- Scott SP and Pandita TK. 2006. The cellular control of DNA double-strand breaks. *J Cell Biochem* 996: 1463-1475.
- Seeberg E, Eide L and Bjoras M. 1995. The base excision repair pathway. *Trends Biochem Sci* 2010: 391-397.
- Sengupta S and Harris CC. 2005. p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol* 61: 44-55.
- Sharaev PN, Pishkov VN, Butolin EG and Ivanov VG. 1987. [Indices of biopolymer metabolism in connective tissue during repeated stress]. *Ukr Biokhim Zh* 593: 85-87.
- Shiloh Y. 2001. ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev* 111: 71-77.
- Shiloh Y. 2003. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 33: 155-168.

- Shiloh Y. 2006. The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends Biochem Sci* 317: 402-410.
- Slupphaug G, Kavli B and Krokan HE. 2003. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res* 5311-2: 231-251.
- Stiff T, O'Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Lobrich M and Jeggo PA. 2004. ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res* 647: 2390-2396.
- Sugihara T, Magae J, Wadhwa R, Kaul SC, Kawakami Y, Matsumoto T and Tanaka K. 2004. Dose and dose-rate effects of low-dose ionizing radiation on activation of Trp53 in immortalized murine cells. *Radiat Res* 1623: 296-307.
- Tachiiri S, Katagiri T, Tsunoda T, Oya N, Hiraoka M and Nakamura Y. 2006. Analysis of gene-expression profiles after gamma irradiation of normal human fibroblasts. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* 641: 272.
- Takayama S, Xie Z and Reed JC. 1999. An evolutionarily conserved family of Hsp70/Hsc70 molecular chaperone regulators. *J Biol Chem* 2742: 781-786.
- Thompson LH and Schild D. 2001. Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability. *Mutat Res* 4771-2: 131-153.
- Tibbetts RS, Cortez D, Brumbaugh KM, Scully R, Livingston D, Elledge SJ and Abraham RT. 2000. Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. *Genes Dev* 1423: 2989-3002.
- Tishkoff DX, Filosi N, Gaida GM and Kolodner RD. 1997. A novel mutation avoidance mechanism dependent on *S. cerevisiae* RAD27 is distinct from DNA mismatch repair. *Cell* 882: 253-263.
- Tlsty TD, Briot A, Gualberto A, Hall I, Hess S, Hixon M, Kuppuswamy D, Romanov S, Sage M and White A. 1995. Genomic instability and cancer. *Mutat Res* 3371: 1-7.
- Trujillo KM, Yuan SS, Lee EY and Sung P. 1998. Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors Rad50, Mre11, and p95. *J Biol Chem* 27334: 21447-21450.
- Tsurimoto T. 1999. PCNA binding proteins. *Front Biosci* 4: D849-858.
- Tusher VG, Tibshirani R and Chu G. 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 989: 5116-5121.
- Ullrich RL and Ponnaiya B. 1998. Radiation-induced instability and its relation to radiation carcinogenesis. *Int J Radiat Biol* 746: 747-754.
- Valerie K and Povirk LF. 2003. Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene* 2237: 5792-5812.
- Venema J, Mullenders LH, Natarajan AT, van Zeeland AA and Mayne LV. 1990. The genetic defect in Cockayne syndrome is associated with a defect in repair of UV-induced DNA damage in transcriptionally active DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 8712: 4707-4711.
- Wakasugi M and Sancar A. 1998. Assembly, subunit composition, and footprint of human DNA repair excision nuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 9512: 6669-6674.
- Wakasugi M and Sancar A. 1999. Order of assembly of human DNA repair excision nuclease. *J Biol Chem* 27426: 18759-18768.
- Wallace SS. 1998. Enzymatic processing of radiation-induced free radical damage in DNA. *Radiat Res* 1505 Suppl: S60-79.

- Wallace SS. 2002. Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. *Free Radic Biol Med* 331: 1-14.
- Ward IM and Chen J. 2001. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem* 27651: 47759-47762.
- Ward JF. 1988. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 35: 95-125.
- Watters DJ. 2003. Oxidative stress in ataxia telangiectasia. *Redox Rep* 81: 23-29.
- Weeda G, Eveno E, Donker I, Vermeulen W, Chevallier-Lagente O, Taieb A, Stary A, Hoeijmakers JH, Mezzina M and Sarasin A. 1997. A mutation in the XPB/ERCC3 DNA repair transcription gene, associated with trichothiodystrophy. *Am J Hum Genet* 602: 320-329.
- West SC. 2003. Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 46: 435-445.
- Weterings E and van Gent DC. 2004. The mechanism of non-homologous end-joining: a synopsis of synapsis. *DNA Repair (Amst)* 311: 1425-1435.
- Wilson DM, 3rd, Sofinowski TM and McNeill DR. 2003. Repair mechanisms for oxidative DNA damage. *Front Biosci* 8: d963-981.
- Wright JA, Keegan KS, Herendeen DR, Bentley NJ, Carr AM, Hoekstra MF and Concannon P. 1998. Protein kinase mutants of human ATR increase sensitivity to UV and ionizing radiation and abrogate cell cycle checkpoint control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 9513: 7445-7450.
- Wu X, Ranganathan V, Weisman DS, Heine WF, Ciccone DN, O'Neill TB, Crick KE, Pierce KA, Lane WS, Rathbun G, Livingston DM and Weaver DT. 2000. ATM phosphorylation of Nijmegen breakage syndrome protein is required in a DNA damage response. *Nature* 4056785: 477-482.
- Wullimann MF and Puelles L. 1999. Postembryonic neural proliferation in the zebrafish forebrain and its relationship to prosomeric domains. *Anat Embryol (Berl)* 1994: 329-348.
- Xiao Z, Chen Z, Gunasekera AH, Sowin TJ, Rosenberg SH, Fesik S and Zhang H. 2003. Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents. *J Biol Chem* 27824: 21767-21773.
- Xu B, O'Donnell AH, Kim ST and Kastan MB. 2002. Phosphorylation of serine 1387 in Brcal is specifically required for the Atm-mediated S-phase checkpoint after ionizing irradiation. *Cancer Res* 6216: 4588-4591.
- Yang J, Yu Y, Hamrick HE and Duerksen-Hughes PJ. 2003. ATM, ATR and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses. *Carcinogenesis* 2410: 1571-1580.
- Zhang Y, Cho YY, Petersen BL, Bode AM, Zhu F and Dong Z. 2003. Ataxia telangiectasia mutated proteins, MAPKs, and RSK2 are involved in the phosphorylation of STAT3. *J Biol Chem* 27815: 12650-12659.
- Zhang Y, Ma WY, Kaji A, Bode AM and Dong Z. 2002. Requirement of ATM in UVA-induced signaling and apoptosis. *J Biol Chem* 2775: 3124-3131.
- Zhao H and Piwnicka-Worms H. 2001. ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol Cell Biol* 2113: 4129-4139.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
Campus Universitário Monte Alegre - Fone: 3602-3082
CEP 14026-524 RIBEIRÃO PRETO - SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA: MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO TRANSCRICIONAL E PROTÉICA DE GENES DE REPARO DO DNA EM CÉLULAS HUMANAS IRRADIADAS COM RAIOS GAMA SOB DIFERENTES TAXAS DE DOSE.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Igor Magela Merchi

Prezado(a) doador(a), este trabalho de pesquisa tem como finalidade estudar os efeitos das radiações nos linfócitos do sangue colhido de pessoas adultas, sadias, idade entre 20 e 30 anos, e assim verificar se as radiações (raios-X e raios-gama) causam danos ou efeitos não desejáveis à saúde humana. Estas são muito usadas em exames médicos e também no tratamento de doenças (como o câncer, por exemplo). Além disso, existem casos em que as pessoas são expostas por acidente. Deste modo, pretende-se neste trabalho, coletar o sangue de vários indivíduos e aplicar métodos e aparelhos modernos que serão capazes de analisar os efeitos e danos causados pelas radiações.

Caso concorde em contribuir com este estudo serão retirados 20 ml de sangue, o mesmo será colhido pelo pessoal treinado para tal fim, utilizando material descartável, sendo que uma picadinha de agulha é o único desconforto a que será submetida. O material será guardado em tubos rotulados sem nomes, de modo que nenhum doador possa ser identificado, mantendo o caráter confidencial da informação, sendo simplesmente um número de identificação o único citado em tese ou trabalhos científicos produzidos por esta pesquisa. Uma vez acabada a investigação, ou caso de não continuar participando da mesma, o material será descartado, não podendo ser utilizado para nenhum outro fim. Em todo momento, a informação obtida estará disponível caso o(a) doador(a) queira ter os resultados da análise.

Sua participação não será remunerada nem terá nenhum gasto pelo mesmo, estando livre para retirar seu consentimento a qualquer momento, deixando de participar da pesquisa.

Igor Magela Merchi
PESQUISADOR RESPONSÁVEL

EU _____

_____ R.G. nº: _____, abaixo assinado, tendo recebido as informações acima, e ciente dos meus direitos abaixo relacionados, concordo em participar.

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos, riscos e benefícios e outros relacionados com a pesquisa e tratamento a que serei submetido;
2. A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo;
3. A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com a minha privacidade;
4. O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar minha vontade de continuar participando;
5. A disponibilidade de tratamento médico e a indenização que legalmente teria direito, por parte da Instituição à Saúde, em caso de danos que a justifiquem, diretamente causados pela pesquisa e;
6. Que se existirem gastos adicionais estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Tenho ciência do exposto acima

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____.

Assinatura do doador