

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM GENÉTICA

**AVALIAÇÃO DA TRANSLOCAÇÃO T(14;18) MBR EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS
A BAIXAS DOSES DE RADIAÇÃO DE ¹³⁷CsCl EM GOIÂNIA, GOIÁS, BRASIL**

HUGO FREIRE NUNES

GOIÂNIA

2011

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM GENÉTICA

**AVALIAÇÃO DA TRANSLOCAÇÃO T(14;18) MBR EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS
A BAIXAS DOSES DE RADIAÇÃO DE ¹³⁷CsCI EM GOIÂNIA, GOIÁS, BRASIL**

Dissertação apresentada no Mestrado em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, sob orientação do Prof. Aparecido Divino da Cruz, PhD, como requisito parcial para conclusão do curso de Mestrado em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

MESTRANDO: HUGO FREIRE NUNES, BSc.

ORIENTADOR: PROF. APARECIDO DIVINO DA CRUZ, PhD.

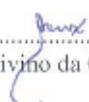
CO ORIENTADORA: PROF^a. Dra. DANIELA DE MELO E SILVA

GOIÂNIA

2011


TRABALHO REALIZADO JUNTO AO MESTRADO EM GENÉTICA DA
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS, SOB ORIENTAÇÃO
DO PROF. DOUTOR APARECIDO DIVINO DA CRUZ, PhD

BANCA EXAMINADORA


.....
Dr. Aparecido Divino da Cruz, PhD – MGene / PUC Goiás


.....
Dr. Cláudio Carlos da Silva – MGene / PUC Goiás


.....
Dr.ª Daniela de Melo e Silva - MGene / PUC Goiás


.....
Dr.ª Ângela Adamski da Silva Reis - UFG

Goiânia, 11 de fevereiro de 2011

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisas CNPQ, pela concessão e auxílio a este e a outros projetos do laboratório.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES, pelo auxílio a este trabalho por meio do Programa Nacional de Cooperação Acadêmica, PROCAD cujo incentivo possibilitou a cooperação da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, instituição na qual foram efetuadas diversas etapas deste trabalho.

Ao Núcleo de Pesquisas REPLICON, por proporcionar a boa infraestrutura para pesquisas diversas.

Ao programa de Mestrado em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

Ao professor Aparecido Divino da Cruz, pela orientação e ensinamentos e por ter me oferecido a oportunidade de trabalhar neste projeto.

À Dr^a. Daniela de Melo e Silva, pela co-orientação e ensinamentos Obrigado pelo incentivo e por sempre ter me encorajado a crescer

Ao Dr. José Andrés, por ter me recebido em seu laboratório, pelos ensinamentos e pelo apoio em vários momentos.

Ao doutorando Ângelo, pela disponibilidade, sugestões e críticas na produção deste trabalho.

À professora Ângela Adamski da Silva Reis e aos professores Cláudio Carlos da Silva, Paulo Roberto de Melo Reis e José Andrés Yunes pela participação na banca de avaliação deste trabalho.

Aos pesquisadores, funcionários e alunos do Centro Infantil Boldrini pela intensa troca de experiências e pelas sugestões.

Aos colegas Ana Luiza, Cris, Carol, Márcia e Cristiano por estarem sempre dispostos a ajudar e por possibilitarem que toda parte prática do trabalho fosse executada.

À Dr^a Marcela Araújo, que carinhosamente contribuiu em diversos momentos neste trabalho, obrigado pelo apoio e carinho.

Aos amigos, Patrícia, André, Jaíra, Mônica, Aninha, Emilia, Fernandas e Caróis, pela ótima companhia e carinho que compartilhamos no decorrer dos anos.

À Letícia, que esteve sempre ao meu lado e me apoiou em todos os momentos.

A todos os meus familiares e aos meus pais, Jussara e Raul, meus maiores incentivadores, por todo seu amor e esforço em proporcionar as melhores condições para minha educação. Obrigada por sempre acreditarem no meu futuro profissional.

RESUMO

Indivíduos radioexpostos saudáveis que receberam acidentalmente baixas doses de radiação ionizante de Césio -137 no acidente ocorrido em Goiânia em 1987 e familiares, foram testados neste trabalho para a presença de células B em sangue periférico apresentando a translocação t(14;18) MBR. Da mesma maneira foram testados voluntários sem histórico de exposição à radiação ionizante, componentes de um grupo controle. Foi utilizado um método de PCR quantitativo em tempo real muito sensível. A translocação cromossômica t(14;18)(q31; q21) é característica de Linfomas Foliculares e é uma anormalidade freqüente em outros Linfomas não Hodgkin. Esta translocação acarreta em uma ativação constitutiva do oncogene BCL2 por uma região do gene de imunoglobulina de cadeia pesada. A ocorrência da translocação é considerada um evento marcante e inicial para o desenvolvimento de Linfoma Folicular. Em indivíduos saudáveis a mesma translocação pode ser encontrada em pequenas frações dentre os linfócitos de sangue periférico. As células translocadas são importantes referências para exposição ambiental à carcinógenos e possivelmente podem ser correlacionadas ao risco acumulativo de desenvolvimento de Linfoma não Hodgkin t(14;18) positivo. Oito radio expostos, cinco familiares e quatro voluntários não expostos foram testados para a detecção desta translocação cromossômica. Não foram encontradas células t(14;18) MBR nos radioexpostos e familiares. Apenas um indivíduo não exposto pertencente ao grupo controle apresentou o rearranjo BCL2/J_H, assim foi possível determinar com o estudo que os radioexpostos e familiares não apresentam freqüência da célula B t(14;18) similares das encontradas em média no sangue periférico de indivíduos com Linfoma Folicular antes do tratamento segundo outros estudos, entretanto apenas testando maiores quantidades de DNA de cada indivíduo será possível determinar abstenção total de células portando o rearranjo BCL2/J_H

Palavras chave: Césio-137, translocação, Linfoma.

ABSTRACT

Healthy radio-exposed individuals, who received low levels of Cesium-137 radiation, during the accident that happened in Goiania, in 1987 and their familiars were tested for the detection of t(14;18) rearranged B cells in peripheral blood, using a high sensitive real-time quantitative PCR method. Also were tested a control group comprised of healthy non exposed age matched men. The chromosomal translocation t(14;18)(q32;q21) is characteristic of Follicular Lymphoma and it is a frequent abnormality in other types of non-Hodgkin lymphoma. This translocation leads to constitutive activation of the BCL2 oncogene by the enhancers of the immunoglobulin heavy chain loco. T(14;18) translocation constitute the genetic hallmark and early initiating event of Follicular Lymphoma. In healthy individuals, the same translocation may also be found in a small fraction of peripheral blood lymphocytes and positive cells might serve as an indicator for environmental exposure to carcinogens and possibly correlate with the cumulative risk of developing t(14;18)-positive non-Hodgkin lymphoma. Eight healthy radio-exposed, five relatives including three children, and four not exposed healthy men were tested for the detection of this translocation. Only one unexposed individual from the control group was positive for the chromosomal translocation, healthy radio-exposed individuals presented lower levels of cells bearing the BCL-2/J_H rearrangement when compared to the levels of the patients with Follicular Lymphoma before treatment, however, test more cells would be required to confirm the total absence of circulating cells bearing the rearrangement BCL2/J_H.

Keywords: Cesium-137; translocation; Lymphoma

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Estrutura do gene BCL-2	8
Figura 2. Mecanismo de recombinação da região de quebra da t(14;18).....	9
Figura 3. O caminho intrínseco da apoptose	11
Figura 4. Amplicons de KRAS e t(14;18) MBR em gel de agarose 2%	17
Figura 5. Curva padrão do ensaio de quantificação das amostras	18
Figura 6. Curva padrão do ensaio para detectar a t(14;18) MBR.....	22

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
Tabela 1. Formas e sintomas da Síndrome aguda da Radiação.....	2
Tabela 2. Tipos de mutações cromossômicas.....	6
Tabela 3. Hábitos e idade dos radioexpostos e relacionados	15
Tabela 4. Lista dos <i>primers</i> utilizados para a amplificação da translocação t(14;18) em linfócitos B	16
Tabela 5. Relação das quantidades de células testadas de cada indivíduo	20

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHQ – *Black hole quencher*TM.

Bq – Béquerel

Bax – *BCL2-associated X protein* (proteína X associada a BCL2)

Bak – *BCL2 associated K protein* (proteína K associada a BCL2)

Bcl-2 – *B cell lymphoma* (linfoma de célula B)

BH – *B cell homology* (homologia a célula B)

Cs – Césio.

CsCl – Cloreto de Césio.

Ct – *Threshold cycle* (ciclo limiar de emissão de fluorescência).

FAM – 6 – *Carboxy-fluorescein*.

Gy – Gray.

HPRT – *hypoxanthine phosphoribosyltransferase* (hipoxantina-fosforibosil-transferase)

Ig – Imunoglobulina.

K-ras – *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (Oncogene homólogo ao de sarcoma de Kirsten em rato)

LF – Linfoma folicular.

LNH – Linfoma não Hodgkin.

MBR – *Major breakpoint region* (região de maior ocorrência de quebra).

NCBI – National Center for Biotechnology Information.

Pb – Pares de base.

PCR – *Polimerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase).

Rad – *Radiation absorbed dose* (dose de radiação absorvida).

RI – Radiação ionizante.

UTR – *Untranslated region* (região não traduzida).

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	IV
RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	X
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Histórico do acidente	1
1.2 Dosimetria por ocasião do acidente	2
1.3 Mutação	5
1.4 A translocação t(14;18).....	7
2 JUSTIFICATIVA	12
3 OBJETIVOS	13
3.1 Objetivo geral	13
3.2 Objetivos específicos	13
4 MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 População estudada e coleta das amostras	14
4.2 Extração, purificação e quantificação das amostras de DNA	15
4.3 Análises moleculares	16
5 RESULTADOS	18
5.1 Quantificação das amostras e validação do método	18
5.2 Frequências do rearranjo BCL-2/J _H	21
6 DISCUSSÃO	23
7 CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
ANEXOS	34

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico do acidente

O acidente radiológico de Goiânia que ocorreu em 1987 resultou em um grave episódio de exposição humana, animal, vegetal e ambiental à radiação ionizante de um elemento radioativo que ocorreu no Brasil Central. O acidente começou quando dois sucateiros adentraram as antigas instalações do Instituto Goiano de Radioterapia e encontraram abandonado um aparelho de radioterapia que continha uma cápsula de césio-137. O aparelho foi levado das premissas com a ajuda de um carrinho de mão. Interessados em vender as partes de metal e de chumbo do aparelho para algum ferro-velho, romperam o cabeçote com marteladas, provocando a liberação da cápsula que continha um sal radioativo (da Cruz *et al.*, 1994; da Cruz, *et al.*, 1996).

No período durante e subsequente a desmontagem da máquina, pessoas e ambientes foram expostos a 19,26g de cloreto de césio-137 ($^{137}\text{CsCl}$), que gerou um rastro de contaminação em uma dezena de focos espalhados pela região metropolitana de Goiânia.

O cloreto de césio é um sal que se apresenta como um pó branco semelhante ao sal de cozinha. Porém no escuro o sal radioativo brilha com um espectro de cor azul. Alguns dias depois, o aparelho foi vendido a um proprietário de um ferro-velho que relatou ter se admirado do brilho azulado emitido pelo conteúdo da cápsula. Maravilhado, o comerciante recebeu várias pessoas em sua casa, incluindo, amigos, vizinhos e parentes, para conhecer o pó brilhante, acreditando estar diante de algo sobrenatural (Ramalho, *et al.*, 1988; da Cruz, *et al.*, 1997).

Algumas horas após o contato com a substância, as pessoas desenvolviam alguns sintomas de contaminação e/ou exposição aguda à radiação ionizante. Os sintomas mais comuns incluíam vômitos, náuseas, diarreia e tonturas. Em consequência da exposição acidental, um grande número de pessoas procurou auxílio de hospitais e farmácias locais. Os radioacidentados eram medicados como se fossem portadores de uma doença contagiosa devido ao sombreamento dos sintomas nestas condições médicas. Posteriormente, descobriu-se que os sintomas foram identificados como referentes à Síndrome Aguda de Radiação (Tabela 1). Somente 2 semanas após o rompimento do cabeçote, no dia 29 de setembro de 1987 que os sintomas foram clinicamente qualificados como contaminação radioativa.

O acidente goiano foi o maior acidente radioativo do Brasil e o maior do mundo ocorrido fora de usinas nucleares. Como consequência, foram expostas e contaminadas

centenas de pessoas, sobretudo parentes e vizinhos, daqueles imediatamente envolvidos com a manipulação do cabeçote de radioterapia. Do total, foram identificadas 249 pessoas que provavelmente receberam uma exposição significativa à radiação ionizante de Césio-137, resultando em quatro mortes. Dos expostos, cerca de 130 exibiram contaminação externa e/ou interna, 50 necessitaram de acompanhamento médico e 14 tiveram contaminação interna comprovada e foram encaminhados a uma unidade especializada de tratamento localizada no Rio de Janeiro (da Cruz *et al.*, 1997; da Silva, 2000). Além da população, membros do corpo de Bombeiros e da Polícia Militar foram acionados para a remoção dos rejeitos radioativos, lavagem de asfalto e isolamento dos locais atingidos. A exposição acidental à RI de Césio-137 ocorrida em Goiânia afetou seriamente a saúde física e emocional de grande parte da população exposta (Flores, 2008).

Tabela 1. Formas e sintomas da Síndrome aguda de Radiação.

FORMA	DOSE ABSORVIDA	SINTOMAS
Infraclínica	Inferior a 1 Gy	Ausência de sintomatologia na maioria dos indivíduos
Reações gerais leves	1-2 Gy	Astenia, náuseas, vômitos (3 a 6 horas após a exposição)
Hematopoiética leve	2-4 Gy	Função medular atingida: linfopenia, leucopenia, trombopenia, anemia
Hematopoiética grave	4-6 Gy	Função medular gravemente atingida
Gastrointestinal	6-7 Gy	Diarréia, vômitos, hemorragias (morte em 5 ou 6 dias)
Pulmonar	8-9 Gy	Insuficiência respiratória aguda, coma e morte entre 14 e 36 horas
Cerebral	Superior a 10 Gy	Morte em poucas horas por colapso de órgãos

Fonte: Okuno, 1998.

1.2 Dosimetria por ocasião do acidente

A radiação corresponde a um tipo de energia emitida por uma fonte, que se propaga de um ponto a outro na forma de partículas, com ou sem carga elétrica, ou na forma de ondas eletromagnéticas. Quando a radiação, mediante interação com a matéria, possui energia suficiente para reverter elétrons de átomos e de moléculas e formar os pares iônicos (íons⁺ e

íons-) ela é chamada de radiação ionizante. A energia radioativa ionizante pode ser emitida de material particulado, como as partículas α , β , prótons, nêutrons e as partículas subatômicas, e por ondas eletromagnéticas, como os raios-X e γ (Flakus, 1995).

A exposição individual à radiação ionizante pode provocar alterações no sistema celular, com variados graus de comprometimento do sistema exposto. Estas alterações induzidas e, conseqüentemente, os efeitos da radiação nos tecidos vitais podem variar dentro de limites extremamente amplos, devido as diferentes condições físicas, químicas e biológicas. Os efeitos da exposição celular à radiação ionizante dependerão do comprimento da onda, da quantidade, duração e intensidade de exposição à energia radioativa, da idade do indivíduo e da sua sensibilidade do tecido exposto à energia radioativa (da Cruz *et al.*, 1997).

Os efeitos biológicos da exposição à radiação ionizante podem ser queimaduras e danos à pele. Em outros casos, em um ambiente celular, a energia da radiação é transmitida a moléculas intermediárias da célula, na maioria das vezes, para moléculas de água, provocando a radio hidrólise, gerando radicais livres que interagem ou atacam outras biomoléculas, como o DNA, causando-lhes sérios danos e que podem acarretar doenças genéticas como o câncer (Brenner *et al.*, 2003). Dois efeitos principais da exposição à radiação são conhecidos, os classificados como determinísticos – associados a morte celular, como as queimaduras por radiação; e os estocásticos – associados a alterações genéticas e cromossômicas, capazes de aumentar a taxa de mutação nas próximas gerações, podendo gerar câncer e outras desordens genéticas (Flakus, 1995; da Silva, 2000).

A RI é um dos componentes ambientais que mais causam estresse celular em organismos complexos. Pois, a exposição celular à RI induz nos ácidos nucléicos, principalmente no DNA, quebras de fita dupla, quebra de fita simples, danos às bases e ligações cruzadas com as proteínas. Vários estudos têm demonstrado que a instabilidade no genoma decorrente de mutações puntiformes, aberrações cromossômicas, formação de micronúcleos e mutações em microssatélites, que em conseqüência podem promover ou retardar a morte celular, são comumente relatadas em células de mamíferos expostos à radiação ionizante. A alteração na fisiologia celular induzida pela exposição à RI é considerada como o principal fator de risco em humanos (Toyokuni, *et al.*, 2009; Suzuki, *et al.*, 2009; Sutherland, *et al.*, 2000; Barber *et al.*, 2006).

O radioisótopo Césio-137 é freqüentemente usado em aparelhos de radioterapia. O Césio é um metal pesado, que quando ingerido ou inalado provoca danos biológicos. O isótopo radioativo emite comumente os raios γ e, numa extensão menor, partículas β . Ambos capazes de depositar na matéria alta energia radioativa na forma de RI. Os raios β são mais

radiotóxicos para o genoma que os raios γ (Bandazhevsky, 2003). As partículas β possuem uma pequena massa, e sua trajetória têm um alcance de até 1,5 cm no tecido humano, podendo ser blindadas por folhas de alumínio de poucos milímetros de espessura. Os raios γ , que provêm do núcleo atômico, são ondas com intenso poder de penetração, podendo atingir 7,2 cm de profundidade no tecido humano. Estes raios são blindados por materiais densos, como o chumbo, o concreto, o aço e o ferro (Okuno, 1988). O acidente de Goiânia envolveu uma fonte radioativa que continha Césio-137. A exposição externa ocorre devido ao compartilhamento do ambiente radioativo pelos indivíduos. Ela geralmente cessa ao se remover o indivíduo do local da exposição. Por outro lado, a exposição interna ocorre subsequente ao contato individual com o elemento radioativo. Para o césio-137, a ingestão ou inalação do radioisótopo é a forma mais comum de contaminação (Xavier, *et al.*, 2006).

O Césio-137 é um metal alcalino, produzido pela fissão de urânio, altamente eletropositivo, que não existe livre na natureza, devido a sua grande atividade química. Esse radionuclídeo tem ponto de fusão a 26°C e ponto de ebulição a 670°C. O césio decai por emissão de partículas β . Isótopos com massas menores que a do isótopo estável, Césio-133, decaem por emissão de partículas β positivas. Para massas nucleares maiores que a do isótopo estável, como é o caso do césio-137, o decaimento se dá através de partículas β negativas. A meia-vida do césio-137 é de 30 anos. Do decaimento do césio se origina o bário (Ba) com a mesma massa nuclear (Collins *et al.*, 1988).

Para se entender os efeitos relacionados a exposição à radiação ionizante é necessário se conhecer as grandezas físicas utilizadas para quantificá-la. Para medir a energia depositada por um feixe de fótons de alta energia (raios X ou raios gama) em um tecido biológico e os seus efeitos sobre este tecido, existe a grandeza "dose absorvida". A dose absorvida de radiação é a energia depositada por quilograma de tecido e é expressa em rad (*radiation absorbed dose* - dose de radiação absorvida). Pelo Sistema Internacional de Medidas utiliza-se a unidade Gy (Gray), que equivale a 100 rad. Gray é uma unidade adotada para qualquer tipo de radiação ionizante (Biral, 2002).

A estimativa de dose absorvida é um dos parâmetros mais importantes para o prognóstico e tratamento adequado de indivíduos expostos à RI em acidentes radiológicos. No entanto, devido à natureza do acidente, estimativas precisas representaram um grande desafio, pois a exposição individual foi muito diversificada, e em alguns casos, de caráter fracionado. A maioria dos pacientes recebeu uma dose de radiação de corpo inteiro e localizada. Alguns apresentaram contaminação interna e externa pelo radionuclídeo. Todas estas peculiaridades na medida de radiação podem dificultar a estimativa de dose para a população exposta. No

entanto, várias técnicas de dosimetria foram utilizadas para avaliar o nível de exposição e para fornecer informações iniciais sobre os indivíduos potencialmente expostos (da Cruz *et al.*, 1997; da Silva, 2000).

As principais abordagens usadas para estimar a dose para a população exposta em Goiânia foram: dosimetria interna, avaliada pela análise de excrementos biológicos e por um contador de corpo inteiro com um nível de detecção de 9.1 KBq, com 95% de confiança; dosimetria externa, que avaliou as propriedades radioativas de radionuclídeos, as taxas de dose e reconstrução dos eventos que levam à exposição. Para a população exposta em Goiânia a dosimetria externa foi complicada pela mistura complexa de contaminação, irradiação externa, e os fatores de tempo preciso (da Cruz *et al.*, 1997). E, finalmente, a dosimetria biológica, que foi utilizada para se estimar a dose média de corpo inteiro recebida por um indivíduo exposto à radiação ionizante, com base na frequência das aberrações cromossômicas. A análise de aberrações cromossômicas é um método biológico bastante sensível para se estimar a exposição aguda e recente às radiações ionizantes, sendo capaz de estimar doses absorvidas na ordem de 0,1 Gy (da Silva, 2000).

1.3 Mutação

Uma mutação é definida como qualquer alteração herdável e permanente na seqüência do DNA (Niwa, 2006). O ácido desoxirribonucléico (DNA) pode incorporar mutações ao longo da vida do ser humano, causadas por erros durante a replicação na divisão celular. As mutações podem ser espontâneas, sendo a frequência de ocorrência dependente do organismo, ou ainda, induzida, podendo ser ocasionadas pela exposição a agentes mutagênicos. A mutagenicidade de um agente químico, físico ou biológico pode ser avaliada de acordo com o aumento da frequência de mutações induzidas em relação à frequência basal de mutações (Westman, 2006).

Nos organismos multicelulares, as mutações podem ocorrer em qualquer célula e em qualquer estágio do ciclo celular, portanto ser divididas em mutações somáticas e germinativas. As somáticas são as que não serão transmitidas à descendência. Já as mutações em células germinativas, serão transmitidas à geração filial (Watson *et al.*, 2007).

As mutações envolvem mutações cromossômicas e mutações gênicas. As mutações cromossômicas resultam em alterações na morfofisiologia dos cromossomos. Podem afetar desde uma determinada região até um cromossomo inteiro e traduzem-se em alterações estruturais (Tabela 2), englobando as translocações, deleções e inversões, ou numéricas, como

é o caso das euploidias e aneuploidias (Watson *et al.*, 2007). A aberração cromossômica é umas das ferramentas mais importantes no biomonitoramento de populações acidentalmente e ocupacionalmente exposta à radiação ionizante (da Silva, 2000).

Tabela 2. Tipos de mutações cromossômicas

Mutações Cromossômicas	Tipos	Função
Estruturais	Deleção	Perda de uma região do cromossomo.
	Duplicação	Uma região do cromossomo é duplicada, acarretando uma dupla leitura de genes.
	Translocação	Transferência de segmentos entre cromossomos não homólogos.
	Inversão	Remoção de um segmento de DNA e inserção numa posição invertida num outro local do cromossomo.
Numéricas	Euploidias	Envolve a alteração completa do genoma.
	Aneuploidias	Perda ou adição de cromossomos inteiros

Fonte: Griffiths 2001.

Mutações gênicas são alterações nas seqüências de nucleotídeos do DNA. Podem se originar por erros incorporados durante o processo de replicação do DNA ou por falha no sistema reparo do DNA, resultando em alterações em genes individuais (Watson *et al.*, 2007).

As mutações ocorrem em todos os seres vivos, sendo de fundamental importância para a evolução e diversidade das espécies. Após várias divisões, é possível que uma célula acumule mutações em um número elevado, acarretando a perda de controle da divisão celular. Portanto, eventos mutacionais podem estar associados ao aparecimento de câncer nas células, o que pode resultar no surgimento de neoplasias nas populações (Griffiths 2001).

Os seres humanos têm um complexo sistema de reparo do DNA. As razões que levam os genes reguladores do ciclo celular a perderem sua função são complexas e multifatoriais (Gu *et al.*, 2009). As predisposições genéticas e a exposição a agentes físicos, químicos e biológicos estão entre as principais razões que resultam no descontrole do ciclo celular, subjacente ao desenvolvimento neoplásico. As radiações ionizantes são exemplos de agentes físicos e mutagênicos que podem levar ao comprometimento dos mecanismos de reparo celular e ao desenvolvimento de diversos tipos de câncer, incluindo os tumores de tireóide, pulmão, mama, leucemia, dentre outros (Baverstock *et al.*, 2006).

O câncer é uma doença multifatorial que resulta do complexo de interações entre os fatores genéticos e ambientais. Vários estudos epidemiológicos em populações expostas à radiação confirmam a estimativa de risco elevado de câncer nessas populações (Rothkamm *et al.*, 2003; Ivanov *et al.*, 2004). Portanto, avaliar os efeitos biológicos da radiação ionizante, em células somáticas e germinativas, com conseqüente determinação da taxa de mutações radioinduzidas, é extremamente importante para a estimativa de riscos genéticos, principalmente em populações expostas à radiação. Desde o acidente em 1987 até os dias de hoje têm sido realizados vários estudos sobre a saúde genética dos radioacidentados goianos. Um dos primeiros testes de biomonitoramento das populações expostas à RI do Césio-137 foi o teste de micronúcleo, que relatou um aumento na freqüência de micronúcleos das pessoas envolvidas direta ou indiretamente no acidente (da Cruz *et al.*, 1994). Outros estudos que se destacaram foram o de análise dos níveis de mutação *in vivo* utilizando o parâmetro da expansão clonal do gene *HPRT* para avaliar a eficácia e a eficiência do sistema de reparo do DNA dos indivíduos expostos à radiação (da Cruz *et al.*, 1997), análise de aberrações cromossômicas e análise de mutações germinativas usando marcadores STR de indivíduos acidentalmente e ocupacionalmente expostos à RI (da Cruz *et al.*, 1994; da Cruz *et al.*, 1996; da Cruz *et al.*, 1997; da Silva, 2000).

1.4 A translocação t(14;18)

A translocação t(14;18) é extensivamente investigada em nível molecular. Aproximadamente 70% das translocações ocorrem em um segmento de 150pb na região 3' não traduzida ao final do éxon 3 do gene BCL-2, denominada região de maior ocorrência de quebra ou *major breakpoint region* (MBR) (Figura 1) (Cleary and Sklar, 1985; Tsujimoto *et al.*, 1985; Cleary *et al.*, 1986).

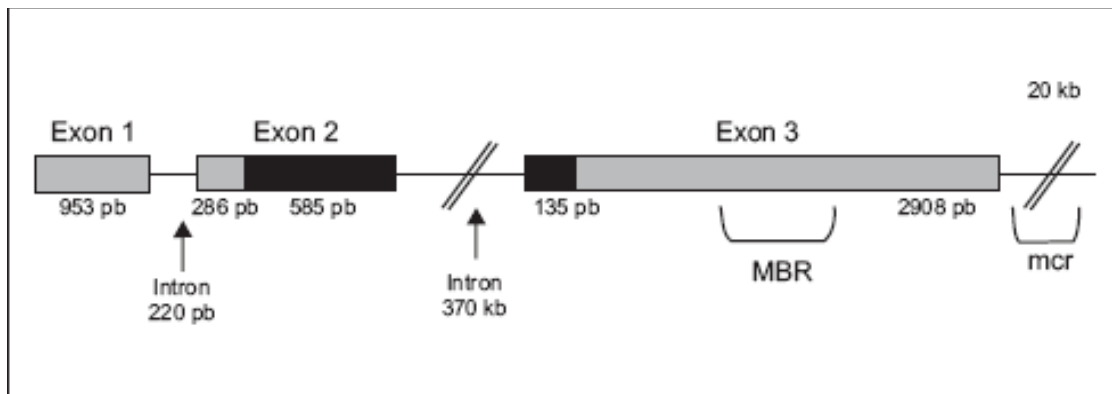


Figura 1. Estrutura do gene BCL-2.

Fonte: Montovani *et al.*, 2010.

Translocações cromossômicas que desregulem a expressão de oncogenes ou que alterem sua constituição são mutações marcantes em neoplasias hematopoiéticas malignas. Um importante exemplo é a $t(14;18)(q32;q21)$, uma translocação entre os cromossomos 14 e 18 que produz uma ativação constitutiva do oncogene BCL-2 (Figura 2). O ponto de quebra do cromossomo derivativo $der(14)$ ocorre em um segmento J, enquanto que $der(18)$ envolve um segmento D, esta descoberta argumenta que a translocação ocorre quando recombinases de Ig geram clivagens em segmentos D e J. Em células progenitoras de linfoma folicular os segmentos ilegitimamente se recombinam com uma quebra de fita dupla do DNA na região MBR do gene BCL-2 no éxon 3 na região 18q21.

Um elemento da cadeia pesada de imunoglobulinas presente no cromossomo 14 torna-se promotor do oncogene levando à sua super expressão. Esta translocação cromossômica é tipicamente encontrada em células tumorais de linfomas foliculares e também é encontrada em outros linfomas não Hodgkin (LNHs). Os linfomas não Hodgkin são repetidamente, mas não consistentemente associados à exposição individual aos pesticidas (Blair *et al.*, 1992; Dreiherr & Kordysh, 2006). Todavia a $t(14;18)$ é frequentemente encontrada em sangue periférico de indivíduos saudáveis (Lipens *et al.*, 1995; Dolken *et al.*, 1996; Roulland *et al.*, 2003).

A RI pode induzir translocações cromossômicas em células humanas *in vitro*, são exemplos a $t(9;22)$ e a $t(8;21)$ (Deininger *et al.*, 1998). Considerando esta observação estudos foram iniciados para investigar se a exposição a baixas doses de radiação poderia influenciar a freqüência e o número total de células $t(14;18)$ circulantes em indivíduos saudáveis (Dolken *et al.*, 2002).

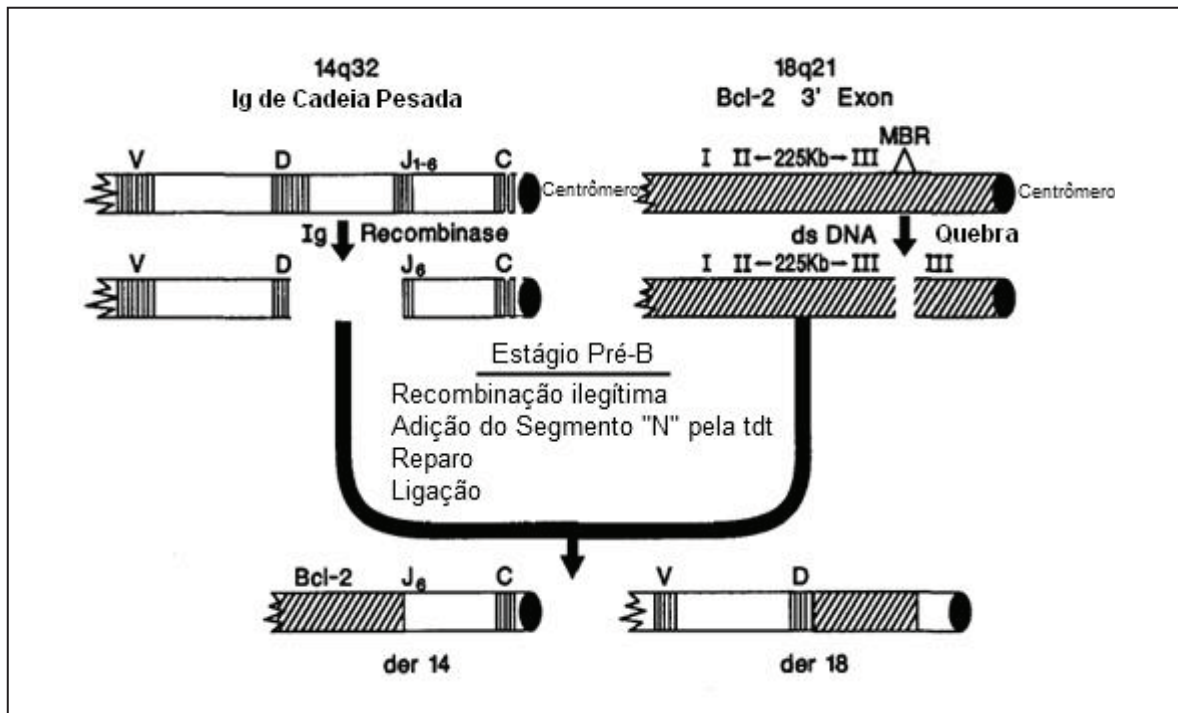


Figura 2. Mecanismo da recombinação da região de quebra da t(14;18).
Fonte: Korsmeyer, 1992.

A translocação t(14;18) tem sido detectada citogeneticamente em cerca de 90% dos linfomas foliculares e 20%-30% linfomas difusos de grandes células. Esta translocação é a aberração genética mais comum em neoplasias malignas linfóides, todavia é de reconhecimento geral que apenas a alteração na expressão do BCL-2 não é suficiente para o desenvolvimento de linfomas de células B. Experimentos de transfecção gênica e estudos em camundongos portadores da translocação t(14;18) demonstraram que eventos genéticos adicionais são necessários para o desenvolvimento de linfomas malignos de células B (Vaux *et al.*, 1988, McDonnell *et al.*, 1989). Estudos *in vitro* e *in vivo* relatam que a exposição a radiações ionizantes induz as células somáticas a sofrerem mutações (Brenner *et al.*, 2003; Sutherland *et al.*, 2000) e estas têm sido consideradas como o principal fator de risco genético em humanos (Barber *et al.*, 2006; Belloni *et al.*, 2009). O uso de técnicas de reação em cadeia de polimerase (PCR), muito sensíveis, permite detectar células circulantes apresentando a translocação t(14;18) em 60% de indivíduos saudáveis sendo elas indistinguíveis das células observadas em linfomas foliculares (Lipens *et al.*, 1991; Shuler *et al.*, 2003).

O gene BCL-2 foi inicialmente descoberto devido ao seu envolvimento na translocação BCL-2/J_H entre os cromossomos 14 e 18, predominantemente encontrada em

linfomas não Hodgkin de células B. Sua proteína é um supressor da morte celular programada, forma homodímeros quando associada a semelhantes ou heterodímeros quando associada a proteínas homólogas BAX e BAK, promotoras da morte celular (Oltvai *et al.*, 1993; Chittenden *et al.*, 1995). A morte celular programada atua como um importante fator em uma grande variedade de processos fisiológicos como, por exemplo, durante o desenvolvimento removendo células redundantes, eliminando linfócitos autorreativos e erradicando células senis e diferenciadas de tecidos regeneráveis em adultos. Suas implicações abrangem uma grande diversidade de doenças humanas tais como câncer, doenças neurodegenerativas e auto-imunes (Green *et al.*, 1992). Existem duas vias principais que levam a apoptose, uma extrínseca e outra intrínseca. A via extrínseca está conectada a ativação de receptores de morte presentes na superfície celular. A via intrínseca ocorre devido a interação entre proteínas pró e anti apoptóticas pertencentes a família *Bcl-2*. Cinco principais proteínas foram reconhecidas como anti apoptóticas, BCL-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1 e A1, elas restringem as proteínas pró apoptóticas BAX e BAK, propulsoras da destruição das mitocôndrias o que leva a liberação do citocromo *c* e outros fatores apoptogênicos, fato que precede o destino final de cada célula. Existe ainda o terceiro grupo denominado BH3 exclusivo, composto por proteínas que se comunicam com BAK e BAX por um mecanismo de sinalização ainda não reconhecido, configurando um assunto de contínuo debate (Figura 3) (Willis *et al.*, 2007; Youle, 2007).

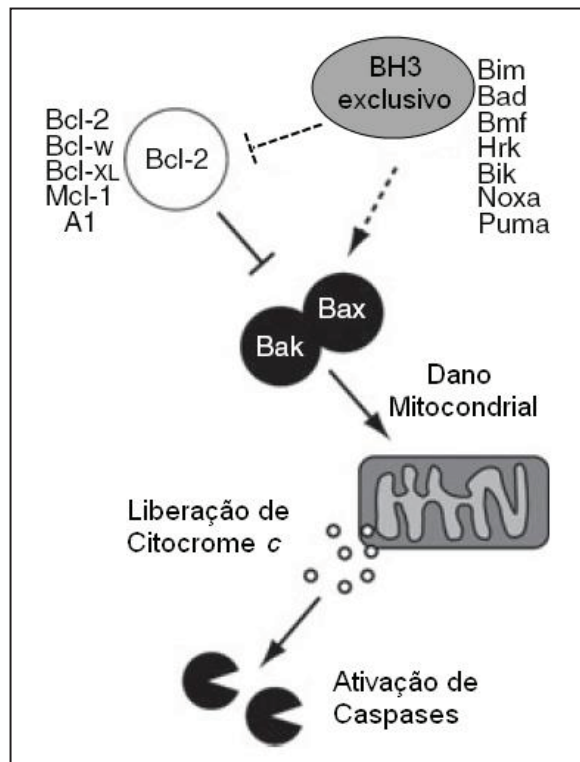


Figura 3. O caminho intrínseco da apoptose.
Fonte: Kile, 2009.

A translocação BCL-2/IgH acontece em um restrito período no desenvolvimento das células B, estando sujeito à ocorrência de dois mecanismos distintos para que aconteça. Uma quebra cromossômica durante o rearranjo V(D)J, da cadeia pesada de imunoglobulinas é o primeiro acontecimento necessário, o outro evento com o mecanismo não definido, é a quebra no cromossomo 18. Este evento também deve acontecer para que um dos segmentos gênicos dentre os 6 diferentes éxons do segmento J, ou algum do D, se encontre com a 5' UTR do éxon 3 no gene BCL-2 (Jager *et al.*, 2000).

Em indivíduos expostos a agentes mutagênicos como pesticidas foi demonstrado um dramático acréscimo de células apresentando a translocação t(14;18) proveniente de uma expansão clonal destas células ativadas (Agopian *et al.*, 2009). Desta forma, a população exposta à radiação gama do céσιο-137, durante o acidente radioativo de Goiânia, oferece uma oportunidade única para se compreender os efeitos biológicos da radiação em células do sangue periférico além de contribuir para o monitoramento a longo prazo da saúde genética dos radioexpostos e seus familiares.

2 JUSTIFICATIVA

Um dos principais temas de estudo envolvendo radiação ionizante é o da carcinogênese humana. Os efeitos biológicos da exposição aguda à radiação podem ser queimaduras e danos à pele. Já os efeitos da exposição crônica, podem acarretar danos ao DNA, resultando em doenças genéticas como o câncer (Brenner *et al.*, 2003).

Translocações cromossômicas são eventos moleculares críticos no desenvolvimento de neoplasias malignas hematopoiéticas. Um melhor entendimento da biologia especial da t(14;18) em indivíduos saudáveis deverá aumentar o conhecimento a respeito do seu envolvimento potencial como precursor tumoral, que pode, em algumas situações, se tornar fundadores clonogênicos dos LNH (Rabkin *et al.*, 2008). Assim conhecer o número de células t(14;18) circulantes poderá servir como um indicador de exposição ambiental a carcinógenos gerando a possibilidade de correlacioná-las com o risco acumulativo de desenvolvimento de LNH positivo para a t(14;18) (Fusco *et al.*, 1996).

A reação em cadeia da polimerase, em tempo real permite estimar a quantidade destas células translocadas no sangue periférico de rádio expostos, sendo o aumento deste tipo celular, em relação ao controle, considerado como de risco associado ao desenvolvimento de linfomas foliculares e outras neoplasias hematopoiéticas.

Estudos relacionando o risco de desenvolvimento de neoplasias e a exposição acidental e ocupacional a agentes físicos e químicos, no município de Goiânia, e no restante do país ainda são escassos. Portanto, pesquisas que verificam mutações presentes nos linfócitos B desses indivíduos, que possam estar associadas ao desenvolvimento de câncer, tornam este trabalho bastante relevante. Durante os últimos vinte anos após a exposição à RI, vários projetos de pesquisas de acompanhamento da saúde genética a longo prazo dos radio acidentados tem sido realizados. Portanto, vale ressaltar a importância do monitoramento genético a longo prazo da população exposta acidentalmente ao Césio-137. Dessa forma, nossos resultados poderão ampliar e indicar marcadores genéticos que também possam ser analisados, o que justifica plenamente a realização do presente estudo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estimar a presença de linfócitos B, portando a translocação t(14;18), em sangue periférico, de indivíduos expostos acidentalmente a baixas doses de radiação ionizante de Césio-137 durante o acidente de 1987 em Goiânia.

3.2 Objetivos específicos

Determinar a frequência das células B t(14;18) MBR em sangue periférico dos radio expostos.

Comparar as frequências das células translocadas em sangue periférico dos radio expostos com um grupo controle.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 População estudada e coleta das amostras

Este estudo envolveu um número total de 8 indivíduos (média de idade = $39,7 \pm 16,6$), expostos à radiação do Césio-137, no acidente 1987 em Goiânia, município localizado no Brasil Central. As amostras de sangue foram coletadas nos anos de 2008 a 2009. Também foram analisados 5 indivíduos relacionados aos expostos, incluindo esposa, filho e marido (média de idade = $25,6 \pm 18,5$). O grupo controle foi composto por 4 voluntários, sem histórico de exposição e pertencentes a mesma região dos radioexpostos estudados. A média de idade do grupo controle foi igual ou aproximada da média do grupo exposto (média de idade = $37,8 \pm 10,6$). Somando-se o grupo exposto e seus relacionados com o grupo controle foram estudados um total de 17 indivíduos, quanto à presença de células t(14;18), em sangue periférico. Um questionário (Anexo 1) foi respondido por todos os indivíduos, possibilitando acessar os dados demográficos (idade, gênero etc.), assim como também obter informações sobre questões médicas e estilo de vida (consumo de álcool, tabagismo) e a ocupação na ocasião da coleta. Todos os radioexpostos analisados neste estudo foram considerados na época do acidente como tendo recebido doses inferiores a 0,2 Gy. Dentre os indivíduos que foram classificados como recebendo pequenas doses de radiação ($\leq 0,2$ Gy) na época do acidente, apenas uma pequena parcela concordou em participar desta e de outras pesquisas que visaram acessar e estudar a saúde genética dos radioacidentados. Informações resumidas a respeito dos hábitos e idade, que são considerados como relacionados ao aumento da frequência de células t(14;18), dos indivíduos expostos e relacionados são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Hábitos e idade dos radioexpostos e relacionados.

Idade no acidente	Expostos	Familiares
≤15	4	4
≥16	4	1
Gênero		
Masculino	4	3
Feminino	4	2
Tabagismo		
Sim	2	
Ex- fumante	1	
Nunca	5	5
Idade		
0 a 20		3
21 a 35	4	1
≥36	4	1

Todas as coletas ocorreram em períodos próximos para todos os grupos. As amostras biológicas foram coletadas por punção venosa de sangue periférico (10 mL) para análise posterior. Para cada amostra biológica, foram separadas alíquotas de plasma, anel leucocitário e hemácias, sendo armazenadas a -20°C. O anel leucocitário foi usado subsequentemente para extração e purificação do DNA genômico. O material restante foi armazenado para estudos futuros (nos termos da Resolução CNS 340/2004 e 347/2005). No momento da coleta os participantes voluntariamente responderam a um questionário (Anexo 1) e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2).

O presente estudo foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) em julho de 2004, conforme parecer contido no ofício n. 982 CONEP/CNS/MS. O número de registro do processo na CONEP foi 10301 e o número do processo foi 205000.073183/2004-45 (Anexo 3).

4.2 Extração, purificação e quantificação das amostras de DNA

O DNA genômico foi purificado a partir de 100 µL de sangue total utilizando-se um *kit* comercial de extração de DNA (*Easy[®] DNA Purification Kit*, Invitrogen, EUA), de acordo

com instruções do fabricante. A concentração de DNA (ng/ μ L) existente em cada amostra foi quantificada por espectrofotometria (GeneQuantTM Amersham Biosciences, EUA).

4.3 Análises moleculares

A reação em cadeia da polimerase foi efetuada no Sistema de Detecção de Sequências ABI PRISM 7500 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Foram utilizados *primers* e sondas (Sigma AldrichTM), nos quais continham em seu final 3' o *quencher* BHQ (Black Hole QuencherTM), e na extremidade 5' a fluorescência repórter FAM (6-carboxy-fluorescein). Os PCRs foram efetuados para o rearranjo BCL-2/J_H, juntamente ao gene de referência endógeno KRAS que permitiu quantificar cada amostra na reação. A Tabela 3 apresenta as seqüências de cada *primer* e a sonda para o gene referência e para o rearranjo. A reação apresentou um volume final de 20 μ L nos quais foram incorporados o TaqMan® Universal Master Mix (PE Applied Biosystems), 300nmol/L de *primers* e 150nmol/L de sonda. Foram utilizados 100ng de DNA dos indivíduos nas reações de quantificação com o gene endógeno e 400ng para o ensaio que visou encontrar o rearranjo.

Tabela 4. Lista dos *primers* utilizados para a amplificação da translocação t(14;18) em linfócitos B.

<i>Primer</i>	Sequência (5'-3')
BCL-2 direto	5'-TGGTGGTTTGACCTTTAGAGA-3'
J _H reverso	5'-ACCTGAGGAGACGGTGAC-3'
BCL-2 sonda	5'-CTCTGGGTGGGTCTGTGTTGAAACA-3'
K-ras direto	5'-CTTGTGGTAGTTGGAGCT-3'
K-ras reverso	5'-ATCAAAGAATGGTCCTGC-3'
K-ras sonda	5'--AAGAGTGCCTTGACGATACAG-3'

O procedimento de PCR foi efetuado em 50 ciclos incluindo desnaturação a 95 °C durante 15 segundos acompanhados de 60 segundos a 61 °C para anelamento e extensão. As curvas padrão foram construídas com o DNA genômico da célula de linhagem imortalizada KARPAS 422 (gentilmente fornecida pelo Dr. Martin Dreyling, CCG-Leukemia, Munich), célula portadora da translocação t(14;18)MBR. O DNA da KARPAS 422 foi diluído em frações decimais gerando padrões de 0,1 até 10³ ng de DNA. Estas diluições permitiram gerar

curvas padrão para o rearranjo BCL-2/J_H e para o gene endógeno KRAS. A quantidade de ambos os produtos amplificados nas amostras derivam então de onde estes se encontram em relação a curva padrão. O procedimento padrão para o ensaio consistiu em duas replicatas para a amostra dos indivíduos, contendo cada uma 0,4µg de DNA quando testados para a detecção do rearranjo BCL-2/J_H, a reação com o gene endógeno também foi efetuada em duas replicatas, sendo que todas as amostras testadas tiveram o DNA genômico quantificado de maneira idêntica e no mesmo procedimento de reação. Para cada ponto da curva padrão três replicatas foram utilizadas. O Anexo 4 representa em detalhes os procedimentos de determinação da curva padrão e dos ensaios de quantificação e teste para detecção da translocação t(14;18) nos quais as amostras foram submetidas

5 RESULTADOS

5.1 Quantificação das amostras e validação do método

A célula KARPAS 422 positiva para a translocação t(14;18) foi utilizada para gerar as curvas padrão para o PCR em tempo real do rearranjo BCL-2/J_H e do gene endógeno KRAS. O tamanho dos fragmentos foi confirmado em eletroforese em gel de agarose a 2%, submetida a 100mA e 115mV durante 25 minutos. A amplificação do gene endógeno (Figura 4, amostras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8), cujo fragmento de 145pb é exatamente o esperado quando observada a posição dos *primers* devido as suas seqüências em relação à seqüência fornecida pela NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) para o gene em humanos. Para determinação da translocação t(14;18) da célula de linhagem KARPAS 422, cujo tamanho aproximou-se de 200pb (Figura 4, amostras 9, 10, 11, 12,), o mesmo procedimento foi efetuado, e a referência utilizada (M) foi o *Ladder* de 1Kb Plus™ (Invitrogen, EUA).

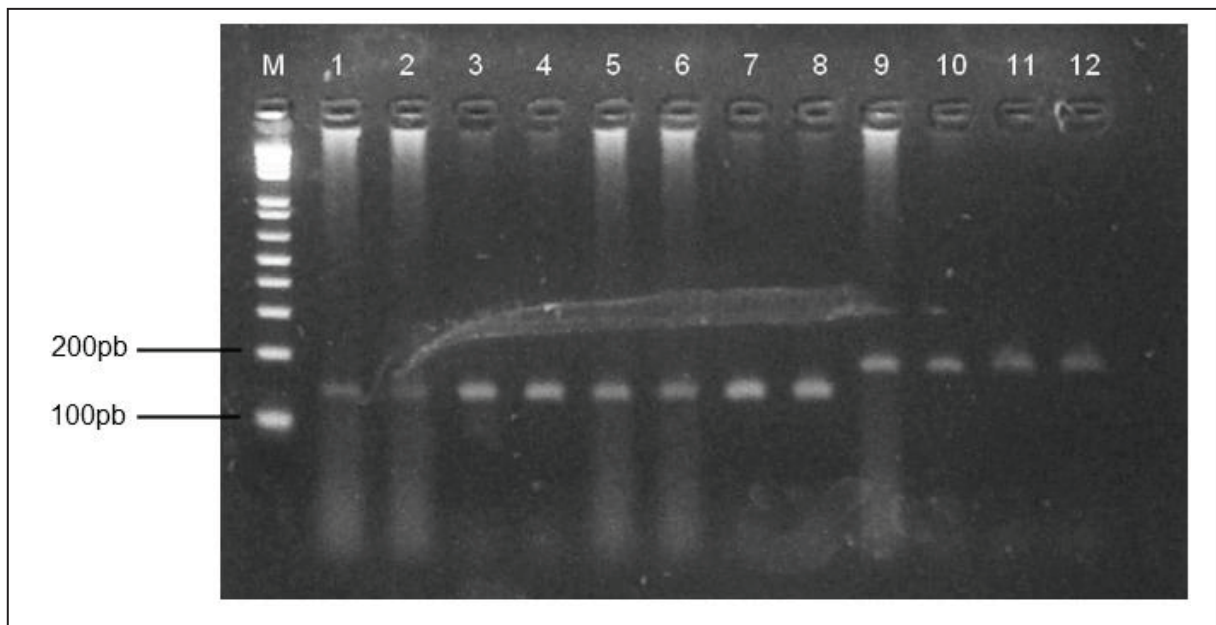


Figura 4. Amplicons de KRAS e t(14;18) MBR em gel de agarose 2%.

Na Figura 5, o valor da inclinação da curva padrão representa o número de ciclos correspondente a um registro de diferença em relação ao número inicial de cópias. Cada amostra teve sua quantidade de DNA viável determinada utilizando-se o gene endógeno KRAS. E este método permite observar a integridade do DNA, o qual está sujeito a degradação por diversos fatores, como tempo e oscilações da temperatura. As diferenças entre a quantificação com o gene referência e a quantificação espectrofotométrica representa que o

DNA até o momento do ensaio esteve sob ação dos fatores que o degradam. Cada reação de quantificação utilizou 100ng do DNA dos indivíduos do estudo, considerando a quantificação espectrofotométrica específica para DNA na qual é calculada a média entre três quantificações. Observou-se que algumas amostras apresentaram-se parcialmente degradadas, resultado esperado considerando-se que as amostras estiveram armazenadas por até 2 anos até a data dos ensaios e neste período foram descongeladas em diversas ocasiões. A Figura 5 apresenta o ensaio com o gene endógeno no qual todas as amostras referidas neste trabalho foram quantificadas.

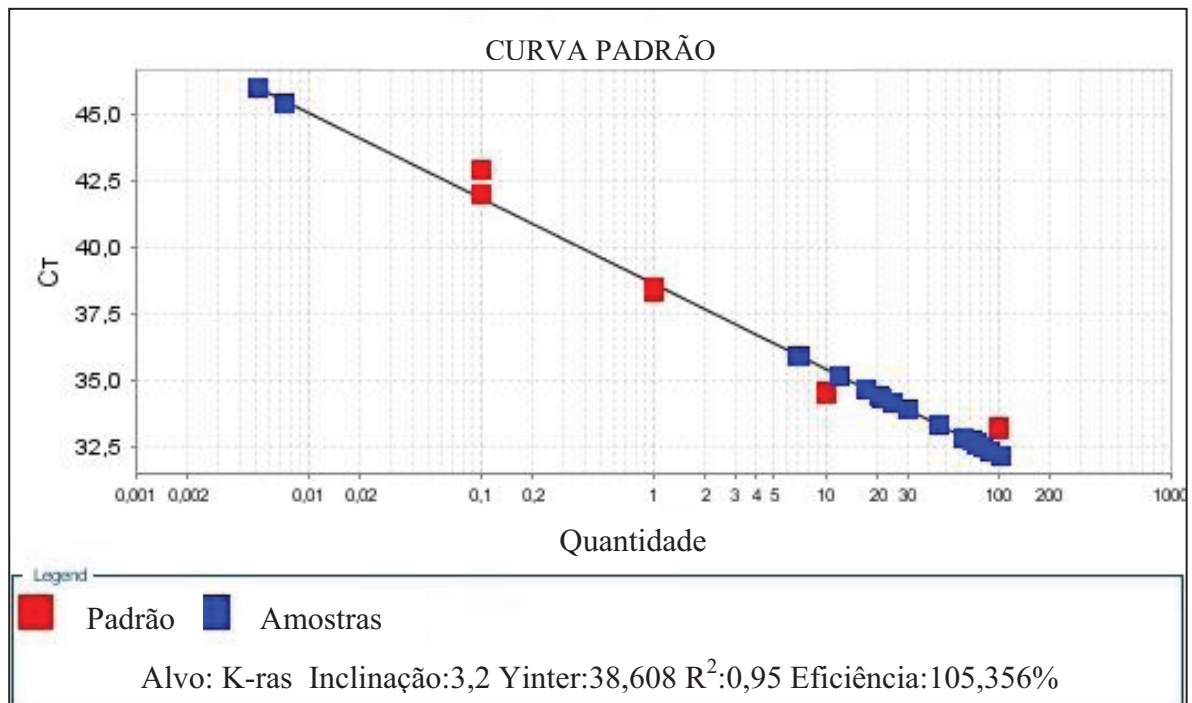


Figura 5. Curva padrão de quantificação das amostras.

Tabela 5. Relação das quantidades de células testadas de cada indivíduo.

Indivíduos	Quantifica- -ção (Pg)	Nº. de Células	Quantidade total de DNA testado (Pg)	Total de células testadas
Expostos				
BSF2001	12839,28	2139	102714,2	17119
GGD1101	37395,04	6232	299160,3	49860
CRS11;0604	34433,02	5738	275464,2	45910
RBG1102	85643,96	14273	685151,7	114191
SNF1201	102372,2	17062	818977,6	136496
MCF231302	15312,99	2552	122503,9	20417
OAD11M	71632,15	11938	573057,2	95509
ERS0903	26938,81	4489	215510,5	35918
Familiares				
JFCN1404	69974,24	11662	559793,9	93298
ASB1203	85205,36	14200	681642,9	113607
JSB0704	52538,43	8756	420307,4	70051
YNB1202	59550,18	9925	476401,4	79400
TGE1802	32500,26	5416	260002,1	43333
Controles				
9C	102974,5	17162	823796	137299
17C	90632,3	12947	725058,4	10357
14C	34114,31	4873	272914,5	38987
4C	48143,66	6877	385149,3	55021

A Tabela 5 apresenta as médias das quantificações das replicatas das amostras de cada indivíduo para o ensaio que utilizou como referência o gene endógeno nas diluições seriadas do DNA da célula KARPAS422 obtida pelo método de quantificação fornecida pelo programa do aparelho de PCR em tempo real (ABI PRISM 7500). Esse programa reconhece os pontos das diluições seriadas e compara os ciclos limiares de emissão de fluorescência ou CT. Para validação do experimento é necessário que as eficiências da reação sejam reconhecidamente válidas, ou seja, estejam dentro do intervalo de 90% a 110% de eficiência. A partir da quantificação com o gene endógeno inferiu-se uma quantidade 4x superior para cada ensaio que pretendia determinar a frequência do rearranjo BCL-2/J_H nos indivíduos. A reação para detectar a t(14;18) foi efetuada em replicata e conteve 400ng de DNA de cada indivíduo por repetição, em relação a quantificação espectrofotométrica. Na tabela 5 é

fornecida a quantidade real de DNA testada para detecção da t(14;18) nos indivíduos, utilizando como referência o ensaio de qPCR para quantificação com o gene endógeno. Foi quantificada apenas uma quantidade esperada, de acordo com a espectrofotometria, de 100ng visando preservar as pequenas quantidades de DNA disponíveis na ocasião do experimento. Adicionalmente foi considerada a quantidade de células testadas na reação, visando determinar a frequência de translocações t(14;18) em sangue periférico dos radioexpostos, familiares e grupo controle.

5.2 Frequências do rearranjo BCL-2/J_H

Dentre as 17 amostras testadas para a detecção da translocação t(14;18), em células de sangue periférico, apenas uma amostra pertencente a um indivíduo, dentre os utilizado como controle, apresentou a translocação BCL-2/J_H MBR (Figura 6). Neste indivíduo a translocação foi detectada em duplicata. A quantificação estipulada, fornecida pela referência da curva padrão teve como média entre as duas replicatas o valor de 0,067ng, o equivalente a 1 em 4637 células para este indivíduo. Observando-se que existem 2 cópias da translocação em cada célula de linhagem KARPAS422, foi verificado que as curvas de amplificação se comportaram diferentemente para os genes de referência KRAS e BCL-2/J_H MBR, possivelmente devido a diferença entre o tamanho dos amplicons.

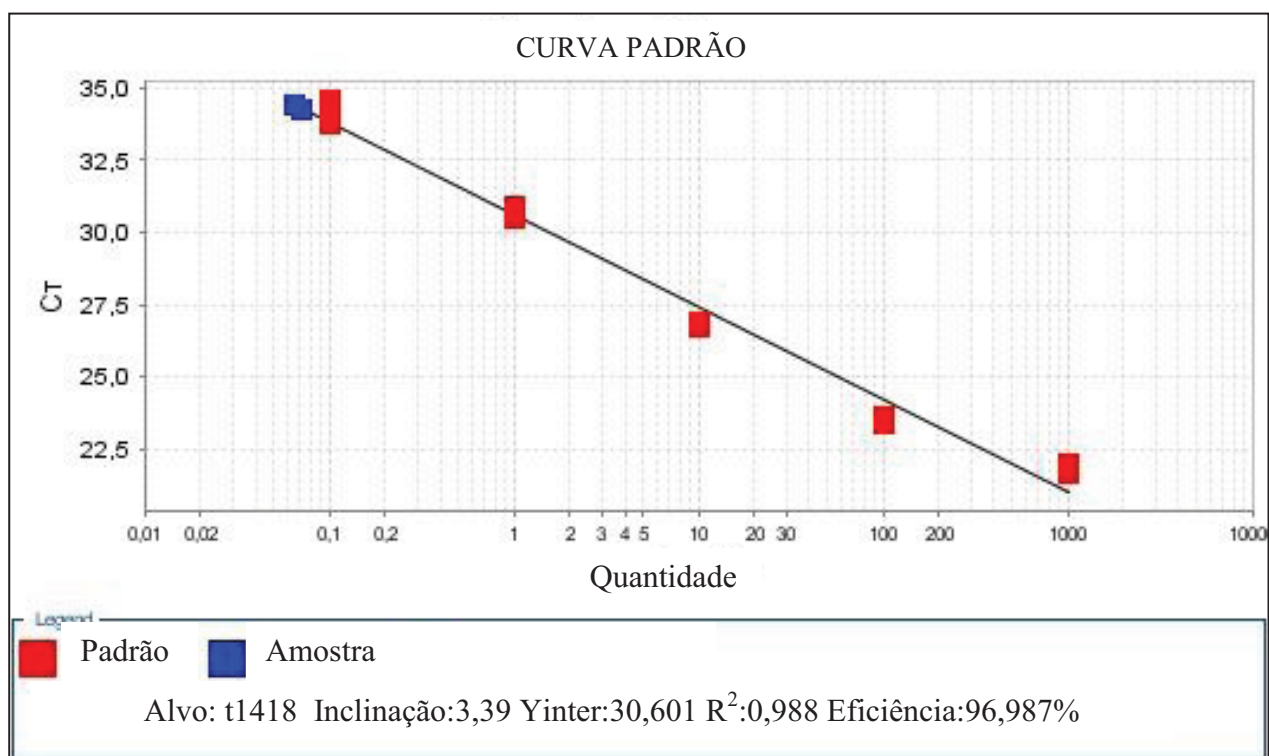


Figura 6. Curva padrão do ensaio para detectar a $t(14;18)$ MBR.

6 DISCUSSÃO

Numerosos estudos têm avaliado os efeitos adversos da saúde humana em populações que foram diretamente expostas à RI (Dubrova *et al.*, 2005). Recentemente, os resultados de estudos *in vitro* demonstraram que as taxas de mutação induzida em células germinativas permaneceram elevadas durante um considerável período de tempo após a exposição inicial, uma característica comum associada com a instabilidade genômica, refletindo um aumento no risco de câncer (Barber e Dubrova, 2006).

O rearranjo BCL-2/J_H pode ser detectado em sangue periférico de indivíduos saudáveis assim como em Linfomas Foliculares não Hodgkin, por sensíveis reações de PCR, constituindo um marcador informativo e com diversas implicações. A correlação entre pequenas doses de RI e a frequência de rearranjos BCL-2/J_H em células B de sangue periférico não é determinada (Dolken *et al.*, 2002).

As quantidades de células testadas para cada um dos 17 indivíduos deste estudo não foi a mesma, o ensaio teste para a translocação t(14;18) com o menor número de células, com referencia na reação de quantificação com o gene endógeno, continha 8559 células (Tabela 5, indivíduo exposto BSF2001), o que indica que caso esses pacientes fossem portadores da translocação t(14;18), a quantidade de células translocadas seria inferior a da frequência média encontrada em portadores de Linfoma Folicular não Hodgkin (LFNH), t(14;18) positivo, não tratados, a qual é numericamente três ordens de magnitude acima da encontrada em indivíduos saudáveis (1 em 100 para 1 em 200000), de acordo com Schuler *et al.*, 2003 ou 263 translocações t(14;18) em $7,5 \times 10^4$ células de sangue periférico, o equivalente a 10 células t(14;18) MBR em 2851 células, de acordo com Mandigers *et al.*, 2001. A média total, entre os 17 indivíduos, de células testadas foi de $7,6 \times 10^4$. Em dois indivíduos foi avaliado um número considerável de células ($6,8 \times 10^4$ células por reação). Desta maneira, esta análise representa uma importante observação para o monitoramento da saúde genética de cada radioacidentado.

A porcentagem de indivíduos saudáveis detectados com a translocação em nosso estudo está abaixo da observada em outros estudos (Dolken *et al.*, 1996; Fuscoe *et al.* 1996; Johnson *et al.*, 1999; Ji *et al.*, 1995; Mahfouz *et al.*, 2006) provavelmente devido a pouca quantidade de DNA testada de cada indivíduo.

Ainda não é bem elucidada a relação de risco elevado de desenvolvimento de LF de células B t(14;18) e o número elevado destas, ou de múltiplos clones positivos t(14;18) em sangue periférico. No momento, ainda permanece difícil relacionar as células B positivas para a translocação t(14;18) em indivíduos saudáveis e o risco de desenvolvimento de células LF,

assim como a natureza do subconjunto de células B que possuem tal translocação (Dolken *et al.*, 2008). Adicionalmente, nada é conhecido sobre o destino e evolução destas células t(14;18) além da persistência clonal a longo prazo e a dependência da relação com a idade.

Todavia, clones positivos de t(14;18) que são especialmente aumentados em agricultores expostos a pesticidas, apresentam-se bem categorizados como precursores de LF, constantes em vários estágios de progressão tumoral. (Agopian *et al.*, 2009). Desta forma, há uma relação entre a exposição a pesticidas e o aumento no risco de desenvolvimento de LNH t(14;18) (Chiu *et al.*, 2006; Agopian *et al.*, 2009)

Estudos anteriores demonstraram um aumento da incidência do rearranjo BCL-2/J_H relacionada a idade o que sugere uma relação entre a incidência de LF e a ocorrência do rearranjo BCL-2/J_H (Dolken *et al.*, 2008).

Na população do Reino Unido foi observada a correlação entre a frequência da translocação e registros de luz solar (Benthan *et al.*, 1999; Cartwright *et al.*, 1994; Adami *et al.*, 1999). Alguns pesquisadores postularam que a prevalência e/ou a frequência de células positivas para a translocação t(14;18) está relacionada a exposição ambiental a carcinógenos (Ji *et al.*, 1995), pesticidas (Roulland *et al.*, 2004; Agopian *et al.*, 2009) e tabagismo (Bell *et al.*, 1995). Adicionalmente, o aumento no risco de desenvolver LNH em portadores de t(14;18) foi encontrado em agricultores que utilizavam herbicidas, pesticidas e fumigantes (Chiu *et al.*, 2006; Schroeder *et al.*, 2001).

Em diferentes populações humanas, a média de células t(14;18) em sangue periférico possui relação com a incidência e desenvolvimento de LF t(14;18) (Mahfouz *et al.*, 2006; Yasukawua *et al.*, 2001). Em japoneses, a frequência da translocação é elevada por volta dos 20 anos (Yasukawua *et al.*, 2001), diferentemente do observado em populações caucasianas nas quais este acréscimo está relacionado ao aumento de idade (Liu *et al.*, 1994; Ji *et al.*, 1995).

Este estudo faz parte do monitoramento genético dos indivíduos expostos à RI do ¹³⁷CsCl em Goiânia, assim como também é efetuado em sua descendência. Entretanto, poucos radioexpostos aceitam participar de estudos voltados à saúde genética, em pesquisas como esta, e em outras, do nosso grupo, que avaliam, inclusive, mutações em regiões STR da geração parental (exposta) e da prole (da Cruz *et al.* 2008). Ensaios de detecção de micronúcleos e de determinação da frequência de mutações no gene *hprt* também foram efetuados, nos indivíduos expostos ao Césio, meses e poucos anos após o acidente (da Cruz *et al.* 1997; 1994). Embora baixas doses de radiação não apresentem relação significativa com o aumento das frequências de células t(14;18) (Dolken *et al.*, 2002), nem sejam considerados

responsáveis por uma nova alteração genética, necessária ao desenvolvimento neoplásico. Outros fatores ambientais como, idade avançada, tabagismo e exposição a pesticidas, foram capazes de elevar a frequência das células portadoras da translocação. Por outro lado, a exposição de sistemas biológicos a doses discretas de RI aparentemente estimula o sistema de reparo, que se comporta de maneira mais eficiente (da Cruz et. al., 1997) o que também pode estar relacionado à ausência das células t(14;18). De acordo com os prontuários dos pacientes analisados, não há registro de tumores ou quaisquer outras doenças genético-moleculares que possam estar associadas à exposição a baixas doses de RI ou a fatores sócio-ambientais, como estilo de vida, tabagismo e etilismo. Nesse contexto, a ausência de células precursoras de LF, nesses pacientes, corrobora os resultados desse estudo.

Assim, não foi encontrada relação entre a exposição a baixas doses de radiação e o aumento da frequência, em relação a um grupo controle de mesma idade e região, do rearranjo BCL-2/J_H em células de sangue periférico, o que também foi observado em outro estudo (Dolken *et al.*, 2002), apesar da radiação ionizante comprovadamente induzir mutações. Entender os riscos da exposição a baixas doses de radiação tem importância biopsicosocial, principalmente para o monitoramento genético de populações humanas, como no caso dos indivíduos testados nesse estudo.

7 CONCLUSÃO

A análise do DNA das células de sangue periférico de pessoas expostas, durante o acidente de 1987 em Goiânia, à radiação ionizante do Césio-137, possibilitou as seguintes conclusões:

A translocação t(14;18) não foi detectada no grupo exposto analisado, no qual foram testadas, em média, $6,4 \times 10^4$ células por indivíduo.

A translocação t(14;18) também não foi detectada no núcleo familiar do grupo exposto analisado, no qual foram testadas, em média, $7,9 \times 10^4$ células por indivíduo.

Em 01 dos 04 indivíduos do grupo controle testados foram detectadas 1 célula t(14;18) MBR em 4708 células analisadas.

No grupo exposto a baixas doses de radiação ionizante do Césio-137, caso exista, o número de células portadoras do rearranjo BCL2/J_H MBR B está inferior à média observada no sangue periférico de indivíduos LNH positivos.

Portanto, vale ressaltar a importância do monitoramento genético à longo prazo da população exposta acidentalmente ao Césio-137. Dessa forma, nossos resultados mostraram a necessidade de se ampliar e indicar marcadores genéticos que também podem ser analisados, o que justifica plenamente a realização do presente estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMI, J., GRIDLEY, G., NYRÉN, O., DOSEMECI, M., LINET, M., GLIMELIUS, B., EKBOM, A. AND ZAHM, S.H., Sunlight and non-Hodgkins lymphoma: a population-based cohort study in Sweden. **Int. J. Cancer** n. 80.1999. p. 641-645 .
2. AGOPIAN, J.; NAVARRO, J. M.; GAC, A. C.; LECLUSE, Y.; BRIAND, B.; GRENOT, P.; GAUDUCHON, P.; RUMINY, P.; LEBAILLY, P.; NADEL, B.; ROULLAND, S. Agricultural pesticide exposure and the molecular connection to lymphomagenesis. **Journal of Experimental Medicine**. v. 206 n. 7. Nova York: The Rockefeller University Press, 2009. p. 1473-1483.
3. BANDAZHEVSKY, Y. I. Chronic Cs-137 incorporation in children's organs. **Swiss Medical Weekly**. n. 133. Basiléia, Suíça: EMH Swiss Medical Publishers Ltd., 2003. p. 488-490.
4. BARBER, R. C.; DUBROVA, Y. E. The offspring of irradiated parents, are they stable? **Mutation Research**. n. 598. Amsterdã: Elsevier, 2006. p. 50-60.
5. BAVERSTOCK, K.; WILIAM, D. The Chernobyl accident 20 years on: an assessment of the health consequences and the international response. **Environmental Health Perspectives**. n. 114, v. 9. Research Triangle Park, North Carolina, EUA: National Institute of Environmental Health Sciences, 2006. p. 1312-1317.
6. BELL, D. A., LIU, Y., CORTOPASSI, G. A. Occurrence of bcl-2 oncogene translocation with increased frequency in the peripheral blood of heavy smokers. **J. Natl Cancer Inst**. n. 87. 1995. p. 223-224.
7. BELLONI, P.; PEPE, G.; PALITTI, F. Effect of storage conditions of blood on radiation-induced chromosomal aberrations and apoptosis in human lymphocytes. **Proceedings of the national academy of sciences of United States of America**. October, v. 102, n. 40. Washington, DC: National Academy of Sciences, 2009. p. 14127-14128.
8. BENTHAM, G.; WOLFREYS, A. M.; LIU, Y.; CORTOPASSI, G.; GREEN, M. H. L.; ARLETT, C. F.; COLE, J. Frequencies of hprt(-) mutations and BCL-2 translocations in circulating human lymphocytes are correlated with United Kingdom sunlight records. **Mutagenesis**. v. 14. n. 6. Oxford: Environmental Mutagen Society/Oxford University Press, 1999. p. 527-532.
9. BIRAL, A. R. **Radiações ionizantes para médicos, físicos e leigos**. 1. ed. Florianópolis: Insular, 2002. 232 p.
10. BLAIR, A.; ZAHM S. H.; PEARCE, N. E.; HEINEMAN, E. F.; FRAUMENI, J. F. Clues to cancer etiology from studies of farmers. **Scandinavian Journal of Work, Environment & Health**. n. 18. Helsinque, 1992. p. 209-215.
11. BRENNER, D. J. *et al.* Cancer risk attributable to low doses of ionizing radiation: assessing what we really know. **Proceedings of the national academy of sciences of**

- United States of America.** n. 100, v. 24. Washington, DC: National Academy of Sciences, 2003. p. 13761-13766.
12. BRENNER, J. D. *et al.* Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: assessing what we really know. **Proceedings of the national academy of sciences of United States of America.** November 25, v. 100, n. 4. Washington, DC: National Academy of Sciences, 2003. p. 13761-13766.
 13. CARTWRIGHT, R.; McNALLY, R.; STAINES, A. The increasing incidence of non-Hodgkin's lymphoma (NHL): the possible role of sunlight. **Leukemia & Lymphoma.** v. 14. n. 5-6. Londres: Informa Healthcare, 1994. p. 387-394.
 14. CHITTENDEN, T.; HARRINGTON, E. A. O'CONNOR, R. *et al.* Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. **Nature.** v. 374. Londres: Nature Publishing Group, 1995. p. 733-736.
 15. CHIU, B. C.; DAVE, B. J.; BLAIR, A.; GAPSTUR, S. M.; ZAHM, S. H.; WEISENBURGER, D. D. Agricultural pesticide use and risk of t(14;18)-defined subtypes of non-Hodgkin lymphoma. **Blood.** v. 108 n. 4. Washington, DC: American Society of Hematology, 2006. p. 1363-1369.
 16. CLEARY, M. L.; SKLAR, J. Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. **Proceedings of the national academy of sciences of United States of America.** n. 82. v. 21. Washington, DC: National Academy of Sciences, 1985. p. 7439-7443.
 17. CLEARY, M. L.; SMITH, S. D.; SKLAR, J. Cloning and structural analysis of cDNAs for BCL-2 and a hybrid BCL-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. **Cell.** v. 47. Cambridge: Elsevier, 1986. p. 19-28.
 18. COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. O que é césio? **Química nova.** n. 11, v. 2. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 1988. p. 169-178.
 19. DA CRUZ, A. D.; CURRY, J.; CURADO, M.P.; GLICKMAN, B. W. Monitoring *hprt* mutant frequency over time in T-lymphocytes of people accidentally exposed to high doses of ionizing radiation. **Environmental and Molecular Mutagenesis.** n. 27. Nova York: Wiley-Liss, 1996. p. 165-175.
 20. DA CRUZ, A. D.; McARTHUR, A. G.; SILVA, C. C.; CURADO, M.P.; GLICKMAN, B. W. Human micronucleus counts are correlated with age, smoking, and cesium-137 dose in the Goiânia (Brazil) radiological accident. **Mutation research.** n. 313. Amsterdã: Elsevier, 1994. p. 57-68.
 21. DA CRUZ, A. D.; VOLPE, J. P.; SADDI, V.; CURRY, J.; CURADO, M. P.; GLICKMAN, B. W. Radiation risk estimation in human populations: lessons from the radiological accident in Brazil. **Mutation research.** n. 373. Amsterdã: Elsevier, 1997. p. 207-214.
 22. DA CRUZ, A. D., SILVA, D. M., DA SILVA C. C., NELSON R. J., RIBEIRO L. C., PEDROSA, E L., JAIME, J. C., CURADO, M. P. Microsatellite mutations in the offspring

- of irradiated parents 19 years after the Cesium-137 accident. **Mutation Research**. n. 652. Amsterdã: Elsevier, 2008. p. 175–179.
23. DA SILVA, C. C. **Avaliação citogenética de indivíduos expostos acidentalmente à radiação ionizante de céσιο-137 em Goiânia (Brasil)**. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2000.
 24. DEININGER, M. W.; BOSE, S.; GORA-TYBOR, J.; YAN, X. H.; GOLDMAN, J. M.; MELO, J. V. Selective induction of leukemia-associated fusion genes by high-dose ionizing radiation. **Cancer Research**. v. 58. Philadelphia, PA, EUA: American Association for Cancer Research, 1998. p. 421-425.
 25. DOLKEN, G.; DOLKEN, L.; HIRT, C.; FUSH, C.; RABKIN, C. S.; SCHULER, F. Age-dependent prevalence and frequency of circulating t(14;18)-positive cells in the peripheral blood of healthy individuals. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**. n. 39. Oxford: Oxford University Press, 2008. p. 44-47.
 26. DOLKEN, G.; ILLERHAUS, G.; HIRT, C.; MERTELSMANN, R. BCL-2/JH rearrangements in circulating B cells of healthy blood donors and patients with nonmalignant diseases. **Journal of Clinical Oncology**. v. 14, n. 4. Alexandria, VA, EUA: American Society of Clinical Oncology Publications, 1996. p. 1333-1344.
 27. DOLKEN, L.; SCHULER, F.; DOLKEN, G. Frequency of BCL-2/J_H translocation in healthy males exposed to low-level radiation in comparison to age-matched healthy controls. **Blood**. v. 100. Washington, DC: American Society of Hematology, 2002. p. 1513-1514.
 28. DREIHER, J.; KORDYSH, E. Non-Hodgkin lymphoma and pesticide exposure: 25 years of research. **Acta Haematologica**. n. 3, v. 116. Basileia, Suíça: Karger, 2006. p. 153-164.
 29. DUBROVA, Y. E. Radiation-induced mutation at tandem repeat DNA loci in the mouse germline: spectra and doubling doses. **Radiation Research**. 163(2): 2005. p. 200.
 30. FLAKUS, F. N. Radiation in perspective: Improving comprehension of risk. IAEA Bulletin. **Quarterly Journal of the International Atomic Energy Agency**. n. 37 v. 2, Viena: IAEA, 1995. p. 7-11.
 31. FLORES, B. C. **Monitoramento genético retrospectivo de população ocupacionalmente exposta à radiação ionizante utilizando marcadores moleculares**. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Goiânia, 2008.
 32. FUSCOE, J. C.; SETZER, R. W.; COLLARD, D. D.; MOORE, M. M. Quantification of t(14;18) in the lymphocytes of healthy adult humans as a possible biomarker for environmental exposure to carcinogens. **Carcinogenesis**. v. 17, n. 5. Oxford: Oxford University Press, 1996. p. 1013-1020.
 33. GREEN, D. R.; BISSONNETTE, R. P.; GLYNN, J. M.; SHY, Y. Activation-induced apoptosis in lymphoid systems. **Seminars in Immunology**. v. 4, n. 6. Amsterdã: Elsevier, 1992. p. 379-388.

34. GU, D.; WANG, M.; WANG M.; ZHANG, Z.; CHEN J. The DNA repair gene *APE1* T1349G polymorphism and cancer risk: a meta-analysis of 27 case-control studies. **Mutagenesis**. n. 24 v. 6. Oxford: Oxford University Press, 2009. p. 507-512.
35. IVANOV, V.; ILYIN, L.; GORSKI, A.; TUKOV, A.; NAUMENKO, R. Radiation and epidemiological analysis for solid cancer incidence among nuclear works participated in recovery operations following the accident at the Chernobyl NPP. **Journal of Radiation Research**. n. 1, v. 45. Chiba, Japan: The Japan Radiation Research Society, 2004. p. 41-44.
36. JAGER, U.; BOCSKOR, S.; LE, T.; MITTERBAUER, G.; BOLZ, I.; CHOTT, A.; KNEBA, M.; MANNHALTER, C.; NADEL, B. Follicular lymphomas' BCL-2/IgH junctions contain templated nucleotide insertions: novel insights into the mechanism of t(14;18) translocation. **Blood**. v. 95, n. 11. Washington, DC: American Society of Hematology, 2000.
37. JI, W.; QU, G. Z.; YE, P.; ZHANG, X. Y.; HALABI, S.; EHRLICH, M. Frequent detection of BCL-2/J_H translocations in human blood and organ samples by a quantitative polymerase chain reaction assay. **Cancer Research**. v. 55. Philadelphia, PA, EUA: American Association for Cancer Research, 1995. p. 2876-2882.
38. JOHNSON, P. W. M.; SWINBANK, K.; McLENNAN, S.; COLOMER, D.; DEBUIRE B.; DISS, T.; GABERT, J.; GUPTA, R. K.; HAYNES, A.; KNEBA, M.; LEE, M. S.; MACINTYRE, E.; MENSINK, E.; MOOS, M.; MORGAN, G. J.; NERI, A.; JOHNSON A.; REATO, G.; SALLES, G.; VAN'T VEER, M. B.; ZEHNDER, J. L.; ZUCCA, E.; SELBY, P. J.; COTTEL, F. E. Variability of quantitative polymerase chain reaction detection of the BCL-2-JH translocation in an international multicenter study. **Annals of Oncology**. v. 10: 1999. p. 1349-1354.
39. KILE, B. T. The role of the intrinsic apoptosis pathway in platelet life and death. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**. v. 7. Carrboro, NC, EUA: International Society on Thrombosis and Haemostasis, 2009. p. 214-217.
40. KORSMEYER, S. J. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. **Blood**. v. 80. Washington, DC: American Society of Hematology, 1992. p. 879-886.
41. LIMPENS, J.; DE JONG, D.; VAN KRIEKEN, J. H. J. M. *et al.* Bcl-2/J_H rearrangements in benign lymphoid tissues with follicular hyperplasia. **Oncogene**. v. 6. Londres: Nature Publishing Group, 1991. p. 2271-2276.
42. LIMPENS, J.; STAD, R.; VOS, C.; DE VLAAM, C.; DE JONG, D.; VAN OMMEN, G. J.; SCHUURING, E.; KLUIN, P. M. Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals. **Blood**. v. 85, n. 9. Washington, DC: American Society of Hematology, 1995. p. 2528-2536.
43. LIU, Y.; HERNANDEZ, A. M.; SHIBATA, D.; CORTOPASSI, G. A. BCL-2 translocation frequency rises with age in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v. 91. n. 19. Washington, DC: National Academy of Sciences, 1994. p. 8910-8914
44. MAHFOUZ, R.; SHAMMAA, D.; TAWIL, A.; ZAATARI, G. Molecular frequency of BCL-2/J_H t(14;18) using PCR among lebanese patients with follicular lymphoma: another

- piece of the geographical map revealed. **Molecular Biology Reports**. v. 34. n. 4. Dordrecht, Holanda: Springer Science+Business Media B. V., 2007. p. 271-274.
45. MANDIGERS, C. M. P. W.; MEIJERINK, J. P. P.; MENSINK, E. J. B. M.; TÖNNISSEN, E. L. R. T. M.; HEBEDA, K. M.; BOGMAN, M. J. J. T.; RAEMAEEKERS, J. M. M. Lack of correlation between numbers of circulating t(14;18)-positive cells and response to first-line treatment in follicular lymphoma. **Blood**. v. 98. n. 4. Washington, DC: American Society of Hematology, 2001. p. 940-944.
46. McDONNELL, T. J.; DEANE, N.; PLATT, F. M. *et al.* Bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. **Cell**. v. 57. Amsterdã: Elsevier, 1989. p. 79-88.
47. MONTOVANI, J.; SALES, M. M.; PARDINI, M. I. M. C. Detecção do rearranjo da proteína BCL2/JH em carcinomas epidermóides de boca e faringe. **Arquivos Internacionais de Otorrinolaringologia**. v. 14, n. 3. São Paulo: Fundação Otorrinolaringologia e da Societas Oto-Rhino-Laryngologica Latina, 2010.
48. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NC_000012?report=fasta&from=25358180&to=25403854&strand=true>. Acesso: 20 dez. 2010.
49. NIWA, O. Indirect mechanisms of genomic instability and the biological significance of mutations at tandem repeat loci. **Mutation research**. n. 598. Amsterdã: Elsevier, 2006. p. 61-72.
50. OKUNO, E. **Radiação: efeitos, riscos e benefícios**. São Paulo: Editora Harbra, 1998.
51. OLTVAI, Z. N.; MILLIMAN, C. L.; KORSMEYER, S. J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. **Cell**. v. 74. Amsterdã: Elsevier, 1993. p. 609-19.
52. RABKIN, C. S.; HIRT, C.; JAZEN, S.; DOLKEN, G. t(14;18) Translocations and risk of follicular lymphoma. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**. n. 39. Oxford: Oxford University Press, 2008. p. 48-51.
53. RAMALHO, A. T.; NASCIMENTO, A. C. H.; NATARAJAN, A. T. Dose assessments by cytogenetic analysis in the Goiânia (Brazil) radiation accident. **Radiation Protect Dosimetry**. n. 25. Oxford: Oxford University Press, 1988. p. 97-100.
54. ROTHKAMM, K; LÖBRICH, M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. **Proceedings of the national academy of sciences of United States of America**. n. 100 v. 9. Washington, DC: National Academy of Sciences, 2003. p. 5057-5062.
55. ROULLAND, S.; LEBAILLY P.; ROUSSEL, G.; BRIAND M.; CAPPELLEN D.; POTTIER, D.; HARDOUIN, A.; TROUSSARD, X.; BASTARD, C.; HENRY-AMAR, M.; GAUDUCHON, P. BCL-2/J_H translocation in peripheral blood lymphocytes of unexposed individuals: lack of seasonal variations in frequency and molecular features. **International Journal of Cancer**. v. 104. Heidelberg, Alemanha: German Cancer Research Center, 2003. p. 695-698.

56. ROULLAND, S.; LEBAILLY, P.; LECLUSE, Y.; BRIAND, M.; POTTIER, D.; GAUDUCHON, P. Characterization of the t(14;18) BCL-2-IGH translocation in farmers occupationally exposed to pesticides. **Cancer Research**. v. 6. Philadelphia, PA, EUA: American Association for Cancer Research, 2004. p. 2264-2269.
57. SCHROEDER, J. C.; OLSHAN, A. F.; BARIC, R.; DENT, G. A.; WEINBERG, C. R.; YOUNT, B.; CERHAN, J. R.; LYNCH, C. H.; SHUMAN, L. M.; TOLBERT, P. E.; ROTHMAN, N.; CANTOR, K. P.; BLAIR, A. Agricultural risk factors for t(14;18) subtypes of non-Hodgkin's lymphoma. **Epidemiology**. v. 12. Boston: International Society for Environmental Epidemiology; Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 701-709.
58. SCHÜLER, F.; HIRT, C.; DÖLKEN, G. Chromosomal translocation t(14;18) in healthy individuals. **Seminars in Cancer Biology**. v. 13. Amsterdã: Elsevier, 2003. p. 203-209.
59. SUTHERLAND M. B. *et al.* Clustered DNA damages induced in isolated DNA and in human cells by low doses of ionizing radiation. **Proceedings of the national academy of sciences of United States of America**. January 4, v. 97, n. 1. Washington, DC: National Academy of Sciences, 2000. p. 103-108.
60. SUTHERLAND, B. M.; BENNETT, P. V.; SIDORKINA, O.; LAVAL, J. Clustered DNA damages induced in isolated DNA and in human cells by low doses of ionizing radiation. **Proceedings of the national academy of sciences of United States of America**. n. 97, Washington, DC: National Academy of Sciences, 2000. p. 103-108.
61. SUZUKI, M.; TSURUKA, C.; UCHIHORI, Y.; KITAMURA, H.; LIU, C. H. Radiation-quality dependent cellular response in mutation induction in normal cells. **J. Radiation Research**. n. 50. Lawrence, EUA: Radiation Research Society, 2009. p. 395-399.
62. TOYOKUNI, H.; MARUO, A.; SUZUKI, B. K.; WATANABE, M. The contribution of radiation-induced large deletion of the genome to chromosomal instability. **Radiation Research**. n. 171. Lawrence, EUA: Radiation Research Society, 2009. p. 198-203.
63. TSUJIMOTO, Y.; COSSMAN, J.; JAFFE, E.; CROCE, C. M. Involvement of the BCL-2 gene in human follicular lymphoma. **Science**. n. 228. Washington, DC: American Association for the Advancement of Science, 1985. p. 1440-1443.
64. VAUX, D. L.; CORY, S.; ADAMS, J. M. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. **Nature**. v. 335. Londres: Nature Publishing Group, 1988. p. 440-442.
65. WATSON, J. D. *et al.* **Recombinant DNA: Genes and genomes: a short course**. 3rd ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2007.
66. WESTMAN, J. A. **Genética médica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2006.
67. WILLIS, S. N.; FLETCHER, J. I.; KAUFMANN, T.; VAN DELFT, M. F.; CHEN, L.; CZABOTAR, P. E.; IERINO, H.; LEE, E. F.; FAIRLIE, W. D.; BOUILLET, P.; STRASSER, A.; KLUCK, R. M.; ADAMS, J. M.; HUANG, D. C. S. Apoptosis initiated

- when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. **Science**. v. 315. n. 5813. Washington, DC: American Association for the Advancement of Science, 2007. p. 856-859.
68. XAVIER, A. M.; MORO, J. T.; HEILBRON, P. F. **Princípios básicos de segurança e proteção radiológica**. 3. ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.
69. YASUKAWA, M.; BANDO, S.; DÖLKEN, G.; SADA, E.; YAKUSHIJIN, Y.; FUJITA, S.; MAKINO, H. Low frequency of BCL-2/J_H translocation in peripheral blood lymphocytes of healthy japanese individuals. **Blood**. v. 98. n. 2. Washington, DC: American Society of Hematology, 2001. p. 486-488.
70. YOULE, R. J. Cell biology: cellular demolition and the rules of engagement. **Science**. v. 315. n. 5813. Washington, DC: American Association for the Advancement of Science, 2007. p. 776-777.

ANEXOS

Anexo 1. Questionário para o monitoramento dos indivíduos radioacidentados do césio-137 (grupo 2).

Família nº: _____

Iniciais: _____

DADOS

Nome: _____

Data de nascimento: ____/____/____ Idade: ____ Sexo: _____

Documento de Identidade: _____ Org. Exp. _____

CPF: _____ Profissão: _____

Estado Civil: _____

Cônjuge: _____ Grupo: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ Estado: _____

CEP: _____ Telefone: _____ Celular: _____

Naturalidade: _____ Nacionalidade: _____

Filiação:

Pai: _____ Grupo: _____

Mãe: _____ Grupo: _____

1. Foi contaminado (a) pela fonte de radiação do Césio-137 ou dos rejeitos radioativos?

() Sim Não ()

Por quanto tempo? _____

Como se aproximou? _____

Observação:

2. Possui filhos: () Sim () Não Quantos? _____

Antes ou depois do acidente? _____

Com quantas mulheres ou homens? _____

Nome(s) do filho(s):

1. _____ Grupo: _____

2. _____ Grupo: _____

3. _____ Grupo: _____

4. _____ Grupo: _____

3. Seu(s) filho(s) apresentou (apresentaram) distúrbio(s) de saúde?

() Sim () Não

Se sim, qual ditúrbio? _____

4. É fumante?

() Sim () Não

Por quanto tempo? _____

Já fumou?

() Sim () Não

Se sim, por quanto tempo fumou? _____

Por quanto tempo parou de fumar? _____

5. Utiliza bebida alcoólica?

Sim Não Quanto tempo? _____

Já utilizou?

Sim Não

Se sim, qual a frequência? Diariamente Socialmente Ocasionalmente

6. Usa algum medicamento?

Sim Não Por quanto tempo? _____

Já usou?

Sim Não Por quanto tempo? _____

7. Possuía alguma doença antes do acidente?

Sim Não Qual (is)? _____

Usou medicamentos antes do acidente?

Sim Não Qual (is) ? _____

8. Possui alguma doença depois do acidente?

Sim Não Qual (is)? _____

Em caso afirmativo, utiliza algum medicamento?

Sim Não Qual (is)? _____

9. Já usou outras substâncias incomuns:

Sim Não

Se sim qual e a quanto tempo? _____

10. Trabalha:

sim não

Se sim, há quanto tempo e qual profissão? _____

Anexo 2. Termo de consentimento livre e esclarecido.**Dados de identificação**

Título do Projeto: Avaliação da translocação t(14;18) MBR em indivíduos expostos a baixos níveis de radiação de $^{137}\text{CsCl}$ em Goiânia, Goiás, Brasil.

Pesquisadores Responsáveis: Aparecido Divino da Cruz, Daniela de Melo e Silva e Cláudio Carlos da Silva

Nome do voluntário: _____

Telefone: _____ Celular: _____

Idade: _____ anos R.G. _____

Responsável legal (quando for o caso): _____

Grau de parentesco: _____

R.G. Responsável legal: _____

1. Este projeto tem o objetivo de avaliar e monitorar a saúde genética dos radioacidentados do Césio-137.
2. Para tanto será necessário realizar os seguintes procedimentos:
 - responder um questionário
 - doação de 10 mL de amostra de sangue periférico
3. Os procedimentos da pesquisa oferecem risco mínimo de ocorrência de algum dano imediato ou tardio para o paciente (hematomas locais após a coleta).
4. Caso você apresente algum problema em seus resultados da pesquisa, você será acompanhado(a) e encaminhado(a) para o tratamento adequado ao tipo de doença.
5. A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional.

6. Você será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.

O(s) pesquisador(es) irá(ão) tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo e as informações colhidas serão utilizadas somente para fins científicos. Os resultados da pesquisa serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

Eu, _____,
 RG nº _____ declaro ter sido suficientemente esclarecido sobre os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Estou ciente de que todas as informações prestadas durante a entrevista serão de caráter confidencial e os dados colhidos serão utilizados somente para fins científicos. Concordo voluntariamente em participar desta consulta, sendo que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido durante o atendimento neste Serviço.







Ou,
 Eu, _____,
 RG nº _____, responsável legal por _____
 _____ RG nº _____ declaro ter sido informado e concordo com a sua participação, como voluntário, no projeto de pesquisa acima descrito.

Goiânia, ____ de _____ de _____

 Nome e assinatura do paciente ou seu responsável legal

 Nome e assinatura do responsável por obter o consentimento


Anexo 3: Parecer comitê de ética em pesquisa e seres humanos.

					
<small>Sua Saúde é o nosso compromisso</small>					
Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos – "Dr. Henrique Santilo"					
Of. Circular nº 028/04-CEP/SULEIDE/SES			Goiânia, 03 de agosto 2004.		
DO	:	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA E SERES HUMANOS/SULEIDE/SES			
PARA	:	Pesquisador			
	:	Dr. Aparecido Divino da Cruz			
ASSUNTO	:	Parecer Consubstanciado Projeto "Efeitos da radiação ionizante na primeira geração nascida da população exposta ao Césio-137, durante o acidente radiológico de Goiânia"			

Senhor Pesquisador,

Por deliberação da Coordenadora do CEP, encaminho para conhecimento e atendimento das recomendações, o parecer nº1256/2004 da CONEP, sobre o projeto: "Efeitos da radiação ionizante na primeira geração nascida da população exposta ao Césio-137, durante o acidente radiológico de Goiânia" nos encaminhando as alterações feitas bem como os relatórios com os andamentos da pesquisa mencionados no parecer consubstanciado do CEP.

Atenciosamente,



Prof. Hildete Pereira de Oliveira Sousa
Membro e Secretário do CEP/Suleide/SES

Rua 16-A, nº 792 – Setor Aeroporto Fone: (062) 224-8493 e 223-8460 CEP. 74.075-150
Goiânia - Goiás

Anexo 4: Fluxograma do procedimento da obtenção da curva padrão e da reação de qPCR.

