



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

**O PAPEL DAS DUPLICAÇÕES SEGMENTARES NA
FORMAÇÃO DE VARIAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS *de
novo* APÓS A EXPOSIÇÃO PARENTAL A DOSES BAIXAS DE
RADIAÇÃO IONIZANTE OBSERVADAS NA GERAÇÃO F1
DE INDIVÍDUOS ACIDENTALMENTE EXPOSTOS AO
CÉSIO-137**

Goiânia – GO

©2018

LORRAYNNE GUIMARÃES OLIVEIRA

**O PAPEL DAS DUPLICAÇÕES SEGMENTARES NA
FORMAÇÃO DE VARIAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS *de
novo* APÓS A EXPOSIÇÃO PARENTAL A DOSES BAIXAS DE
RADIAÇÃO IONIZANTE OBSERVADAS NA GERAÇÃO F1
DE INDIVÍDUOS ACIDENTALMENTE EXPOSTOS AO
CÉSIO-137**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Mestrado em Genética – MGene da Pontifícia Universidade
Católica, como parte das exigências para a obtenção do título de
Mestre em Genética

Orientador: Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz

Co-Orientador: Dr. Alex Silva da Cruz

Goiânia – GO

©2018

O48p

Oliveira, Lorryayne Guimarães

O papel das duplicações segmentares na formação de variação do número de cópias de novo após a exposição parental a doses baixas de radiação ionizante observadas na geração F1 de indivíduos acidentalmente expostos ao Césio-137[recurso eletrônico]/ Lorryayne Guimarães Oliveira.-- 2018.

--f.; il.

Texto em português com resumo em inglês

Dissertação (mestrado) - Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Genética, Goiânia, 2018

Inclui referências

1. Césio. 2. Acidentes radioativos - (subd. geog.).
3. Radiação - Goiânia (GO). 4. Mutação (Biologia).
I.Cruz, Aparecido Divino da. II.Pontifícia Universidade Católica de Goiás. III. Título.

CDU: 614.876(817.3)(043)


ATA COMPLEMENTAR Nº 139/2018

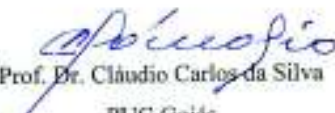
MESTRADO EM GENÉTICA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
DISCENTE: LORRAYNNE GUIMARÃES OLIVEIRA


DEFENDIDA EM 08 de março de 2018 e Aprovada COM CONCEITO A

O título foi alterado (não () sim _____

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. João Aparecido Divino da Cruz
PUC Goiás (Presidente)


Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva
PUC Goiás


Profª. Dra. Eliane Eugênia dos Santos
Centro Regional de Ciência Nuclear-CNEN

*Dedico este estudo aos meus pais, Luiz de Souza
Oliveira e Vicentina Barbosa Guimarães, por
todo ensinamento, por todo amor e toda
dedicação*

Agradecimento

Primeiramente a Deus que me deu força e sabedoria para trilhar esse caminho, que foi meu guia e me orientou nas minhas decisões e colocou pessoas iluminadas em meu caminho.

A todos que contribuíram com este estudo que foi gerado pelo esforço de uma equipe. Sou grata pela dedicação, contribuição, tempo e disponibilidade de todos.

Aos meus pais Luiz de Souza Oliveira e Vicentina Barbosa Guimarães que me apoiaram em todos os meus sonhos e planos, sem medir esforços com muita paciência e acima de tudo, muito amor. À minha avó Jandira Barbosa dos Santos e meu irmão Paulo Henrique de Souza Oliveira por todo apoio e incentivo. Aos meus tios e primos por sempre estarem ao meu lado. Amo todos e sou grata por uma família tão unida e entusiasmada e que sempre me recebe com muito amor.

Aos professores Aparecido Divino da Cruz, Alex Silva da Cruz, Damiana Miriam da Cruz Cunha, por terem me acolhido não apenas como estudante, mas como amiga, e contribuírem não só na minha formação acadêmica, mas também na minha formação pessoal. Com vocês eu aprendi a ser uma pessoa melhor. Vocês sempre me incentivaram, acreditaram na minha capacidade e sempre foram muito carinhosos. Sou muito grata de ter vocês na minha vida.

À professora Emília de Oliveira Alves Costa e à doutoranda Irene Plaza Pinto, por suas contribuições fundamentais para o desenvolvimento do estudo, por sempre estarem disponíveis, pela amizade e pelos ensinamentos. Vocês também fizeram diferença na minha vida.

Ao professor Cláudio Carlos da Silva, pelos ensinamentos e dedicação e pela contribuição na minha formação acadêmica.

A todos do Núcleo de Pesquisas Replicon e Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular (LaGene), que considero uma família, pelos momentos de risadas, conversas e aprendizado. Vocês fazem cada dia ser especial e único.

À professora Caroline Oliveira de Melo pelas tardes de estudos para a seleção de mestrado, por ter tirado um tempo do seu dia para nos ajudar.

Ao doutorando Macks Wendhell Gonçalves pela sua contribuição neste estudo e disponibilidade.

Às amigas Lilian de Souza Teodoro, Nayara Lopes de Souza e Samara Socorro Silva Pereira pelo companheirismo durante o mestrado, pelos dias de estudos na casa uma da outra, pela amizade, pelo amor, pelas risadas, pelas brincadeiras, pela paciência e até pelas brigas, com vocês eu aprendi e sou muito grata por serem parte da minha vida.

Aos amigos da minha turma de mestrado, Andreyra Gonçalves Costa Motta, Flavia de Castro Santana e Marcus Simão que mesmo cansados deixavam as aulas mais leves com brincadeiras e perguntas. Sou grata por ter conhecido vocês e por todo conhecimento compartilhados e aprendido juntos.

Ao Antonio Elizandro Dias de Oliveira por todo amor, companheirismo, amizade, paciência, por me dar forças e por acreditar tanto em mim. Meu maior incentivador.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação Mestrado em Genética, pela contribuição em minha formação.

À secretária do Programa de Pós-Graduação Mestrado em Genética, Alessandra Malta, pela paciência e disponibilidade.

À Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), à FAPEG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás) e à ExeGenS (Rede de Excelência em Genética e Genética Molecular Aplicada à Saúde Humana) pelo auxílio financeiro.

Às famílias que doaram voluntariamente as amostras, a gentileza e disponibilidade de vocês possibilitaram esse estudo e minha formação.

A todos os amigos que não foram mencionados, mas que estão no meu coração e pensamento sempre.

Sumário

Tabelas, Quadros e Figuras.....	viii
Resumo.....	x
Abstract.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1. Césio 137.....	15
2.2. Radiação.....	15
2.2.1 Radiação não ionizante.....	16
2.2.2 Radiação Ionizante.....	16
2.2.3 A interação da radiação ionizante com o tecido vivo.....	16
2.2.4 Dosimetria Biológica.....	19
2.3. Mutação.....	20
2.3.1 Mecanismo de reparo.....	22
2.3.2 Recombinação Homóloga Não Alélica (NAHR).....	23
2.3.3 Junção de extremidade não homóloga (NHEJ).....	25
2.3.4 BIR Mediada por Microhomologia (MMBIR).....	27
2.4. Variação do Número de Cópias (CNV).....	29
2.5. Repetições de Poucas Cópias (LCR).....	30
2.6. O acidente radiológico de Goiânia.....	33
2.7. SNP array.....	36
3 OBJETIVOS.....	38
3.1. Objetivo Geral.....	38
3.2. Objetivos Específicos.....	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1. Grupo Amostral.....	39
4.2. Obtenção e preparo das amostras.....	39
4.3. Extração e quantificação das amostras de DNA.....	39
4.4. Análise Cromossômicas Por Microarranjos.....	40
4.5. Descrição do método de genotipagem <i>array</i>	40
4.6. Tratamento e análise dos dados obtidos na genotipagem dos SNPs.....	41

4.7.	Estimativa da taxa de mutação germinativa em CNVs (TM_{CNV}).....	41
4.8.	Análise de LCRs.....	42
4.9.	Taxa de Erro Mendeliano.....	43
4.10.	Análise Estatística.....	44
4.11.	Monitoramento.....	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
6	CONCLUSÃO.....	62
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
8	ANEXO.....	76
	ANEXO I	76
	ANEXO II	79
	ANEXO III	82
	ANEXO IV	85
	ANEXO V	92
	ANEXO VI	94

Tabelas, Quadros e Figuras

Tabelas

Tabela 1. Dados gerais dos grupos caso e controle para as gerações parental e F1 incluídos no estudo sobre a indução de mutação germinativa na prole de indivíduos expostos acidentalmente a doses baixas de radiação ionizante de céσιο-137.....	48
Tabela 2. Dados descritivos dos grupos caso e controle para as gerações parental e F1 e da prole de indivíduos expostos acidentalmente a doses baixas de radiação ionizante de céσιο-137 considerando a ocorrência de LCRs flanqueando as CNVs <i>de novo</i>	49
Tabela 3. Distribuição das CNVs com LCR circundando-a entre casos e controles para o estudo do impacto da exposição acidental a doses baixas de RI na frequência de mutações germinativas na progênie de pessoas expostas à radiação ionizante de Cs ¹³⁷	50
Tabela 4. Comparação da frequência de CNVs flanqueadas por LCR da progênie de controles e casos expostos a doses muito baixas de radiação ionizante de céσιο-137 em Goiânia (Brasil). Teste de Qui-Quadrado de Pearson.	51
Tabela 5. Comparação da frequência de LCR de acordo com CNV de ganho e perda da progênie de controles e casos expostos a doses muito baixas de radiação ionizante de céσιο-137 em Goiânia (Brasil). Teste de Qui-Quadrado.	51
Tabela 6. Análise das Frequências das CNVs e LCRs em disposição a origem do cromossomo em relação ao controle e a exposição parental a doses muito baixas de radiação ionizante de céσιο-137 em Goiânia (Brasil).	57
Tabela 7. Comparação da frequência de LCR em cada cromossomo da progênie de controles e casos expostos a doses muito baixas de radiação ionizante de céσιο-137 em Goiânia (Brasil). Teste de Qui-Quadrado.	60

Quadros

Quadro 1. Descrição dos sintomas da Síndrome de Irradiação Aguda de acordo com a dose absorvida em Gray e sua forma clínica.....	17
Quadro 2. Categorização em Grupos, segundo a exposição e a dosimetria citogenética da população exposta acidental e ocupacionalmente à radiação ionizante de Céσιο-137 em Goiânia (Brasil).....	34
Quadro 3. Apresentação dos estudos realizados nos indivíduos expostos acidentalmente e ocupacionalmente à radiação ionizante de céσιο-137 e os testes empregado.....	46

Figura

Figura 1. Representação esquemática de duplicações e deleções resultante da Recombinação Homóloga Não Alélica (NAHR), em diferentes cenários, considerando a mediação de LCR em orientação direta. Os cromossomos são mostrados em preto. As setas cinzas representam LCRs. As letras adjacentes às cromátides referem-se à sequência única flanqueadora. A NAHR Intercromossômica e Intracromossômica entre LCRs em orientação direta resulta em duplicação e deleção, enquanto a NAHR Intracromática resulta em deleções. Fonte: Adaptado de GU et al., 2008.	25
---	----

Figura 2. Após o dano no DNA e a detecção de quebra na dupla fita de DNA sem homologia entre si. As quebras de cadeia dupla (DSBs) são criadas entre as duas sequências representadas como um quadrado	
---	--

verde e vermelho sem homologia entre si. O sistema NHEJ modifica e reúnem as duas extremidades, resultando na exclusão do segmento entre as duas cadeias. Fonte: Adaptado por GU et al., 2008..... 26

Figura 3. Replicação induzida por ruptura mediada por microhomologia (MMBIR): a forquilha de replicação encontra um nick (descontinuidade que, permite a liberação de torsão necessária na cadeia durante a replicação do DNA), resultando no boqueio da replicação. A extremidade 5' da molécula quebrada está retraída da ruptura, expondo a extremidade 3' que pode reformular para qualquer DNA de uma única fita que compartilhe a microhomologia retomando a replicação por meio de um novo modelo (uma forquilha próxima pode fornecer o ssDNA necessário). A extensão e replicação da polimerase inicial é realizada por uma polimerase de baixa processabilidade que pode permitir rodadas múltiplas, ou iterações, de desengate e troca de modelo até que uma replicação completamente processável seja estabelecida até o final do cromossomo ou replicação. Adaptado por CARVALHO et al., 2011..... 28

Figura 4. Esquema demonstrando Recombinação Homóloga Não Alélica (NAHR) em diversas situações e suas consequência A: NAHR entre repetições orientadas diretamente gera deleções e duplicações. B: NAHR entre repetições invertidos gera a inversão do segmento entre as repetições. Fonte: Adaptado de CARVALHO E LUPSKI, 2016..... 32

Figura 5. Imagem da descontaminação do local do acidente e do armazenamento do lixo radioativo. A: Retroescavadeira demolindo o pavimento contaminado com Césio-137 da Rua 57. B: Resíduo radioativo armazenado em contêineres. C: Área de armazenamento dos resíduos radioativos em Abadia de Goiás (Brasil). D: Acondicionamento dos contêineres metálicos com resíduos radioativos em plataformas de concreto. Fonte: C.A.R.A..... 36

Figura 6. Análise da distribuição do tamanho da CNV de acordo com a presença ou ausência de CNV flanqueada por LCR da progênie de controles e casos expostos a doses muito baixas de radiação ionizante de césio-137 em Goiânia (Brasil). Teste de ANOVA fatorial..... 54

Figura 7. Correlação de Spearman entre o número de meioses à concepção e a taxa de mutações em CNV de controles e casos expostos a doses muito baixas de radiação ionizante de césio-137 em Goiânia (Brasil)..... 55

Figura 8. Comparação do tamanho da CNV de acordo com a presença ou ausência de LCR entre os grupos caso e controle à doses muito baixas de radiação ionizante de césio-137 em Goiânia (Brasil). Teste de Kruskal Wallis. 57

Resumo

No final de 1987 houve um dos mais graves acidentes radiológicos da história, ocorrido em Goiânia-Goiás-Brasil, ocasionando a contaminação do ambiente, sucedendo na irradiação externa e a contaminação interna de várias pessoas. Os efeitos diretos e indiretos da radiação iniciam uma série de eventos de sinalização bioquímica e molecular que podem reparar o dano ou culminar em mudanças fisiológicas permanentes ou morte celular. As células de mamíferos integraram sistemas de resposta que detectam danos no DNA, ativam cascatas de sinalização e efetuam o reparo. Os rearranjos cromossômicos induzidos pela exposição à radiação ionizante podem ocorrer por quebras na dupla fita do DNA (DSB). O principal mecanismo de reparo do DNA, responsável pela reparação de DSBs é a Recombinação Homóloga Não Alélica (NAHR). Através do processo de NAHR, as Repetições de poucas cópias conhecidas também com Duplicações Segmentares (LCRs / SDs) podem levar a rearranjos de DNA, como: deleções, duplicações, inversões e translocações. A análise Cromossômica em Microarranjos (CMA) baseada em SNP *array*, fundamenta-se na identificação de Variação no Número de Cópias (CNV), incluindo ganhos e perdas. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da presença de LCR na formação de CNVs novas observadas na prole de indivíduos expostos a baixas doses de RI de Césio-137. O grupo exposto foi constituído por 12 famílias, dos quais pelo menos um dos progenitores foi diretamente exposto à RI de Césio-137, incluindo um total de 40 indivíduos (12 casais e 16 filhos nascidos após o acidente). A dose absorvida para os indivíduos expostos foi estimada em $\leq 0,2$ Gray. Um grupo com 8 famílias, de indivíduos não-expostos à radiação ionizante foi usado como controle. Os testes estatísticos utilizados foram Qui-Quadrado, Qui-Quadrado de Pearson, ANOVA, Correlação de Spearman, Kruskal Wallis, Razão de verossimilhança e Associação Linear por Linear. Todas as análises foram realizadas com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Identificamos 50 (10,6%) e 23 (9,7%) CNVs que estavam sendo flanqueadas por LCRs, para os grupos caso e controle, respectivamente. O teste não demonstrou diferença significativa. A comparação de CNVs de ganho e perda flanqueadas por LCRs mostrou diferença significativa onde LCRs estavam significativamente mais associadas as CNVs de ganhos. A presença de LCRs esteve associada frequentemente em CNVs mais longas, sugerindo que CNVs originadas a partir de NAHR tendem a ser maiores. As taxas de mutações de CNV e a meiose paterna na geração F1 dos grupos caso e controle demonstram diferença significativa. Homens expostos à RI transmitem mais CNVs *de novo* pequenas quando comparado com a transmissão em função da exposição materna e entre controles. A estimativa da taxa de mutação em CNVs mediadas por LCRs analisada na geração F1 e em seus pais biológicos foi um biomarcador útil na avaliação retrospectiva de exposição parental à RI em populações humanas, sobretudo para a estimativa da taxa de mutação de *Burden*.

Palavras Chaves: Mutação. SNP Array. Transgeracional. Radiação.

Abstract

At the end of 1987 was one of the most serious radiological accidents in history, occurred in Goiânia-Goiás-Brazil, causing the contamination of the environment, succeeding in the external irradiation and the internal contamination of several people. The direct and indirect effects of radiation initiate a series of biochemical and molecular signaling events that can repair the damage or culminate in permanent physiological changes or cell death. Mammalian cells have integrated response systems that detect DNA damage, activate signaling cascades, and realize repair. Chromosomal rearrangements induced by exposure to ionizing radiation can occur by Double Strand Break in the DNA (DSB). The main DNA repair mechanism responsible for the repair of DSBs is Nonallelic Homologous Recombination (NAHR). Through the NAHR process, the Low Copy Repeats known also with Segmental Duplications (LCRs / SDs) can lead to DNA rearrangements, such: deletions, duplications, inversions and translocations. Chromosomal Microarray Analysis (CMA) based on SNP array, is established on the identification of Copy Number Variation (CNV), including gains and losses. The goal of this study was to investigate the effect of the presence of LCRs in the formation of new CNVs observed in the offspring of individuals exposed to low doses of IR of Cesium-137. The exposed group consisted of 12 families, of which at least one parent was directly exposed to IR Césio-137, including a total of 40 individuals (12 couples and 16 children born after the accident). The absorbed dose for the exposed individuals was estimated at ≤ 0.2 Gray. A group with 8 families of individuals not exposed to IR was used as control. The statistical tests used were Chi-Square, Pearson's Chi-Square, ANOVA, Spearman's Correlation, Kruskal Wallis, Likelihood Ratio and Linear Linear Association. All analyzes were performed with a significance level of 5% ($p < 0.05$). We identified 50 (10.6%) and 23 (9.7%) CNVs that were being flanked by LCRs for the case and control groups, respectively. The test showed no significant difference. The comparison of gain and loss CNVs flanked by LCRs showed a significant difference where LCRs were significantly more associated with gain CNVs. The presence of LCRs was often associated with more longer CNVs, suggesting that CNVs originating from NAHR tend to be bigger. The CNV rates mutation and paternal meiosis in F1 generation of the case and control groups showed a significant difference. Men exposed to IR transmit more CNVs again small when compared to transmission based on maternal exposure and between controls. The estimation of rate mutation in LCR-mediated CNVs analyzed in F1 generation and in their biological parents was a useful biomarker in the retrospective evaluation of parental exposure to IR in human populations, especially for Burden mutation rate estimation.

Keywords: Mutation. SNP Array. Transgenerational. Radiation.

1. Introdução

Em 1987, ocorreu um acidente radiológico em Goiânia, Goiás (Brasil). Durante o acidente, mais de uma centena de indivíduos foi exposta a raios gama de uma fonte de teleterapia contendo cloreto de césio - 137. A estimativa das doses absorvidas foi realizada com dosimetria biológica, que é uma ferramenta importante para determinar a dose de radiação recebida por um indivíduo quando a dosimetria física não está disponível. Também pode complementar a dosimetria física, fornecendo informações independentes e diretas sobre a dose. É uma ferramenta essencial no gerenciamento médico de indivíduos ou populações após a irradiação aguda por atos acidentais, ocupacionais e/ou intencionais envolvendo fontes radiológicas (NATARAJAN et al., 1998; ROMM et al., 2011).

A frequência de cromossomos dicêntricos é o marcador de exposição de preferência desde a década de 1960. A metodologia é sensível, permitindo estimar doses tão baixas quanto 0,1 Gy. Este ensaio é visto como o método mais eficaz para a dosimetria biológica na faixa de doses de radiação que ocorre em acidentes em massa, sendo a técnica usada para a estimativa das doses absorvidas no acidente em Goiânia (ROMM et al., 2011).

Acidentes envolvendo Césio-137, decorrentes do seu uso em indústrias, medicina ou pesquisas são raros. Existem alguns casos de intensa exposição a esse radionuclídeo, sendo que em dois casos foi usado para fins suicidas. Em outro caso um trabalhador que inadvertidamente colocou uma fonte industrial radiográfica nos bolsos da calça, sofreu lesões graves nas duas coxas, com radionecrose das artérias femorais, sendo necessária a amputação das duas pernas. E o último caso antes do acidente em Goiânia, foi de uma criança exposta deliberadamente a uma fonte industrial por seu pai, o que resultou em radiolesões severas em várias partes de seu corpo (OLIVEIRA et al., 1991).

Os primeiros efeitos biológicos produzidos pela exposição à radiação ocorrem em um período de poucas horas até algumas semanas após a exposição e são conhecidos como efeitos imediatos. Os que surgem depois de anos ou mesmo décadas são denominados de efeitos tardios. Não é possível, por enquanto, usar critérios clínicos para estimar o dano causado pela radiação porque, quando as pessoas apresentam os sintomas, o grau de dano propiciado já pode ser severo, irreparável e até letal. Por enquanto, utilizam-se hipóteses estabelecidas sobre critérios físicos, extrapolações matemáticas e probabilísticas para se estimar o dano celular potencial decorrente da exposição humana a energia radioativa (TAUHATA et al., 2013).

O processo de avaliação dos riscos para a saúde humana associada à exposição a radiação é multifacetado e incorpora três componentes principais: 1) identificação de perigo: para confirmar que a radiação é capaz, sujeito a circunstâncias apropriadas, de causar um efeito adverso em seres humanos; 2) avaliação dose-resposta: estabelecer a relação quantitativa entre dose e efeito em seres humanos e 3) avaliação da exposição: para identificar e definir as exposições que ocorrem, ou se antever, nas populações humanas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1993).

A consequência da exposição de um sistema biológico à radiação ionizante não é apenas a morte celular, como a que resulta nas radiolesões. Um evento mutacional pode ocorrer em qualquer célula do organismo. Em células somáticas ocorre durante a replicação do DNA que precede uma divisão mitótica, sendo o câncer o efeito estocástico mais comum decorrente da exposição individual à energia radioativa. Na linhagem germinativa as mutações podem ocorrer durante a replicação do DNA que precede a meiose (KODAIRA et al., 2004). As mutações fixadas no genoma das células germinativas podem ser transmitidas ao longo das gerações (DA CRUZ et al., 1997). Os efeitos mutagênicos sobre a linhagem germinativa são particularmente preocupantes, pois resultam no acúmulo de mutações na prole de pessoas expostas à radiação ionizante (ADEWOYE et al., 2015).

Atualmente, foi estabelecido que a análise cromossômica em microarranjos (do inglês, *Chromosomal Microarray Analysis - CMA*) é uma ferramenta importante para a detecção de ganhos e perdas em um amplo espectro de regiões do genoma humano (PINTO, 2015). A CMA caracteriza-se por ser um método de investigação citogenômica que utiliza painéis de SNPs (do inglês, *Single-Nucleotide Polymorphism*) e para determinar CNVs (do inglês, *Copy Number Variantion*). Os *arrays* atuais possuem alta densidade de marcadores, que promovem ampla cobertura de todo o genoma humano de interesse médico (STANKIEWICZ et al., 2007).

As CNV resultam em variações do número de cópias de segmentos de DNA. As variantes do número de cópia podem ser benignas, patogênicas ou de significado clínico incerto. Vários fatores como localização, tamanho, conteúdo genético e relatos prévios afetam a classificação das CNV (WAPNER et al., 2012).

Os rearranjos cromossômicos induzidos pela exposição à radiação ionizante podem ocorrer por quebras na dupla fita do DNA (do inglês, *Double Strand Break – DSB*). As DSBs

podem ser induzidas por agentes ambientais (como a radiação ionizante) ou resultantes de processos celulares normais (SANKARANARAYANAN e WASSOM, 2005; STANKIEWICZ; LUPSKI, 2010). O principal mecanismo de reparo do DNA, responsável pela reparação de DSBs é a Recombinação Homóloga Não Alélica (do inglês, *Nonallelic Homologous Recombination* - NAHR). A NAHR repara a fita de DNA quebrada por meio da recombinação entre repetições de poucas cópias (do inglês, *Low Copy Repeats* - LCRs), constituem mais de 5% do genoma humano, sendo definidas como segmentos com pelo menos 1 kb de comprimento e 90% de identidade de sequência, presentes em mais de uma cópia (GU et al., 2008; KOSZUL e FISCHER, 2009; CAMPBELL et al., 2014).

A arquitetura do genoma, ou seja, a organização local da repetição e outras sequências, incluindo sua orientação relativa, tamanho, densidade e distribuição é uma característica chave que ajuda a prever o tipo de variantes estruturais, susceptibilidade ao rearranjo e potencial mecanismo subjacente à variação em um *locus* específico (CARVALHO e LUPSKI, 2016).

No presente estudo, sugerimos a investigação de CNVs flanqueadas por LCRs nos pontos de quebra da recombinação. A proposta é inovadora e pioneira no estudo do impacto das LCRs sobre a formação de CNVs *de novo* induzidas em consequência da exposição à radiação ionizante em populações humanas e na determinação da frequência de mutações germinativas induzidas pela exposição parental.

2. Referencial teórico

2.1 Césio 137

O césio é um metal alcalino com número atômico 55, e massa atômica 132,9. É o 45º elemento mais abundante na crosta terrestre, com uma média de 2,6 gramas por tonelada. Césio é o elemento mais eletropositivo na tabela periódica, localizada na família 1A. Não existente no estado elementar no ambiente, é dominante na atmosfera, principalmente sob a forma de aerossóis ou de óxido de hidróxido de sódio. Muito solúvel e altamente reativo a água. Adicionalmente, o Césio tem uma elevada afinidade para minerais, especialmente argilas (LESTAEVEL et al., 2010; VIEIRA, 2013).

O césio possui 31 isótopos, dentre eles, apenas o isótopo 133 é estável e naturalmente presente em dois minérios, polucita e rhodizite. Todos os outros isótopos são radioativos. Césio 137 (Cs^{137}) é um radionuclídeo antropogênico e foi descoberto em 1860 por Robert Wilhelm Bunsen e Gustave Robert Kirchhoff na água mineral de Durkheim na Alemanha por espectroscopia de emissão da luz azul e daí seu nome a derivado do latim *caesium*, céu azul. Em um reator nuclear, isótopos radioativos de césio podem ser produzidos por fissão de urânio 235 e plutônio 239. O período de decaimento radioativo dos radionuclídeos de Césio é variável, para o isótopo 134 (2,2 anos), 135 (29.000.000 anos) e 137 (30,2 anos). A radiação ionizante emitida por Cs^{137} é usada para fins médicos em teleterapia (LESTAEVEL et al., 2010; VIEIRA, 2013).

Nos seres humanos, a exposição aguda ao Cs^{137} conduz, na maioria dos casos, a carência de medula óssea caracterizada por uma diminuição de células brancas do sangue e deficiência imune, como foi relatado no acidente em Goiânia. A exposição a doses elevadas de Cs^{137} é, portanto, caracterizada pelo vetor de síndrome de mielossupressão observada após irradiação com radiação ionizante aguda (LESTAEVEL et al., 2010).

2.2 Radiação

A radiação é uma forma de energia que se propaga em ondas e/ou partículas. A teoria dos *quantas* correlaciona partícula com onda, segundo a qual uma onda eletromagnética é emitida e propaga-se em forma de pequenos pacotes de energia chamados fótons. O corpo humano recebe radiação eletromagnética de todo espectro. As células do corpo reagem de forma diferente à radiação eletromagnética segundo seu espectro de comprimento de onda (SARTORI et al., 2008; OKUNO e YOSHIMURA, 2010; OKUNO, 2013).

Segundo diversos autores (SARTORI et al., 2008; OKUNO e YOSHIMURA, 2010) para a radiação penetrar em tecido com alto teor de água, como o músculo, a frequência da onda precisa ser curta, em torno de 1 MHz. Em tecido com baixo teor de água, como o osso, a frequência deve estar em torno de 100 MHz. Qualquer tipo de radiação interage com a matéria, inclusive com o corpo humano, depositando sua energia. As radiações são classificadas, dependendo da sua capacidade de ionizar a matéria sobre a qual incidem, em como ionizantes e não ionizantes.

2.2.1 Radiação não ionizante

A radiação não ionizante é uma radiação eletromagnética de baixa energia. Portanto, não é suficientemente poderosa para causar a ionização (ou remoção de elétrons) de moléculas. Os efeitos sobre a saúde das radiações não ionizantes devem estar relacionados com a dose recebida, isto é, seria esperado que fossem maiores para pessoas expostas a níveis mais altos ou por períodos mais longos. Os efeitos sobre a saúde também dependerão de muitos outros fatores, incluindo a frequência da onda, a mudança nos campos elétricos e magnéticos ao longo do tempo e espaço, e até mesmo a forma das ondas que são geradas (GORMAN, 2014).

2.2.2 Radiação Ionizante

Radiação ionizante é quando a radiação possui energia suficiente para remover um elétron de um átomo ou de uma molécula, ao qual ele está ligado por força elétrica. Ao retirar, aleatoriamente, elétrons das camadas eletrônicas de átomos, as radiações ionizantes auxiliam para romper, mesmo que provisoriamente, o equilíbrio entre as cargas positivas e negativas do átomo. A inserção de cargas elétricas livres em um meio irradiado, segue-se um rearranjo eletrônico que pode abranger elétrons de outros átomos e moléculas. Este rearranjo de elétrons tem como resultado o restabelecimento do equilíbrio perdido (FRY e FRY, 1990; NOUAILHETAS, 2005).

2.2.3 A interação da radiação ionizante com o tecido vivo

A absorção de radiação ionizante por células vivas pode interromper diretamente as estruturas atômicas, produzindo mudanças químicas e biológicas. Os efeitos diretos e indiretos da radiação iniciam uma série de eventos de sinalização bioquímica e molecular que podem reparar o dano ou culminar em mudanças fisiológicas permanentes ou morte celular. As modificações bioquímicas iniciais, que ocorrem durante ou logo após a exposição à radiação, foram consideradas responsáveis pela maioria dos efeitos das radiações ionizantes em células de mamíferos (FRY e FRY, 1990; AZZAM, 2012).

A exposição com feixes externos de radiação e, em alguns casos, com contaminação interna por radionuclídeos, pode resultar em valores elevados de dose absorvida, envolvendo partes do corpo ou todo o corpo. Como resultado destas exposições o organismo humano desenvolve reações biológicas que podem se manifestar sob a forma de sintomas indicativos de alterações profundas provocadas pela radiação, conhecidos como Síndrome de Irradiação Aguda ou Síndrome de Radiação Aguda (Quadro 1) (TAUHATA et al., 2013).

Quadro 1. Descrição dos sintomas da Síndrome de Irradiação Aguda de acordo com a dose absorvida em Gray e sua forma clínica.

Forma	Dose Absorvida (Gray)	Sintomas
Infra-clínica	< 1	Ausência de sintomas, na maioria dos indivíduos
Reações leves generalizadas	1 a 2	Astenia, náuseas e vômitos de 3 a 6 horas após a exposição. Efeitos desaparecendo em 24 horas
Síndrome Hematopoiética Leve	2 a 4	Depressão da função medular (linfopenia, leucopenia, trombopenia, anemia). Máximo em 3 semanas após a exposição e voltando ao normal em 4 a 6 meses.
Síndrome Hematopoiética Grave	4 a 6	Depressão severa da função medular
Síndrome do Sistema Gastrointestinal	6 a 7	Diarreia, vômitos, hemorragias
Síndrome Pulmonar	7 a 10	Insuficiência respiratória aguda
Síndrome do Sistema Nervoso Central	>10	Coma e morte. Horas após a exposição.

Fonte: (TAUHATA et al., 2013).

O efeito direto resulta da interação da radiação com biomoléculas importantes, como quando ela atua sobre o DNA, causando alterações na sua estrutura química e induzindo rompimentos de ligações que lesam o material genético. O efeito indireto é quando a radiação quebra a molécula da água formando assim radicais livres, que podem afetar outras moléculas importantes. Para que de fato se tenha os efeitos biológicos resultantes da radiação ionizante, é necessário que ocorra uma transferência da energia da partícula ou do fóton incidente para os átomos. Cada tecido possui sensibilidade diferente em relação à interação da radiação ionizante e essa sensibilidade varia proporcionalmente à atividade reprodutiva das células, e de maneira inversa com relação ao grau de diferenciação celular (BARBOSA, 2003). Segundo os critérios de dosimetria citogenética, as doses menores que 0,15 Gy são

classificadas como muito baixas; de 0,15 a 0,3 Gy de baixas doses; de 0,31 a 0,9 de doses médias e $\geq 1,0$ Gy são classificadas como altas doses (IAEA, 2011).

A Radiação Ionizante pode induzir eventos mutacionais não apenas dentro de núcleos direcionados, mas também dentro de núcleos intactos não direcionados quando o citoplasma celular é percorrido. Além disso, uma memória da lesão de radiação inicial é mantida nas células filhas irradiadas na forma de um fenótipo alterado que favorece a instabilidade genômica; evidências repetidas sugerem que um fenótipo semelhante pode ser desencadeado no embrião concebido a partir de células geradas irradiadas e conservado no adulto (WRIGHT, 2010; ILNYTSKYY, e KOVALCHUK, 2011; KADHIM et al., 2012).

Em camundongos fêmeas, os oócitos imaturos são extremamente sensíveis a morte por consequência da radiação. Em fêmeas de mamíferos, a menos que a concepção ocorra logo após a exposição à radiação, os oócitos imaturos (que estariam em estágio de repouso no momento da irradiação) contribuem para a geração da prole (NAKAMURA et al., 2013).

De acordo com NAKAMURA et al. (2013), após uma exposição de células germinais masculinas pós-meióticas em camundongos, mutações genéticas, malformações e mutações letais dominantes (morte de embriões ou fetos) são induzidas, enquanto o rendimento das malformações é claramente menor após a irradiação de células de espermatogônia pré-meiótica. Assim, a meiose é uma barreira natural que seleciona negativamente as células germinativas mutadas.

Mosse (2012) relatou que a radiação pode danificar genes e cromossomos, e a exposição dos pais à radiação pode produzir um aumento da incidência de doenças hereditárias nos filhos dos indivíduos expostos, sendo que as alterações cromossômicas ocorreram mais frequentemente em células somáticas de pessoas que foram expostas à radiação. Neste estudo, a análise da mortalidade e da morbidade entre os filhos de pais irradiados não proporcionou resultados positivos ou negativos na indução da mutação germinativa por radiação ionizante.

Apesar de inúmeros esforços, pouco se sabe sobre os efeitos genéticos da exposição à radiação em seres humanos e a maioria da evidência definitiva para a indução da mutação germinativa *in vivo* em mamíferos vem da extrapolação de estudos com camundongos. A falta de dados genômicos que descrevem o padrão de indução de mutação por radiação ionizante ou outros agentes mutagênicos também impede uma extrapolação adicional dos resultados de estudos de camundongos sobre o excesso previsto de síndromes genéticas entre os descendentes de pais expostos. Os avanços recentes nas tecnologias genéticas forneceram novas ferramentas baseadas em microarray e de sequenciamento de nova geração para a

análise genômica da variação genética, que tem o potencial de caracterizar a mutação da linhagem germinativa em humanos e camundongos (ADEWOYE et al., 2015).

2.2.4 Dosimetria Biológica

A maioria dos agentes químicos e diferentes tipos de radiação têm múltiplos efeitos no nível molecular, celular e cromossômico, que podem ocorrer simultaneamente e em diferentes extensões dependendo da dose. As fontes de informação de diagnóstico podem vir de diversos biomarcadores de radiação baseados em fontes biológicas, bem como os sinais e sintomas clínicos que as pessoas podem exibir, e também a partir de medições físicas com as pessoas irradiadas. A informação de testemunhas e pacientes sobre o tempo, localidade e a distância da fonte de radiação, também podem auxiliar no cálculo da dose. Todas essas fontes de informação podem ser combinadas com dosimetria biológica para obter uma avaliação mais precisa (INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 2011; FENECH, 2007; BLAKELY et al., 2005).

Um biomarcador foi definido como "qualquer medida que reflita uma interação entre um sistema biológico e um agente ambiental, que pode ser químico, físico ou biológico". Os biomarcadores podem ser utilizados para múltiplos propósitos na investigação epidemiológica, incluindo (1) estimativa ou validação da dose recebida, melhorando assim a validade de uma correlação entre exposição e respostas biológicas; (2) investigação de susceptibilidade individual e (3) detecção precoce de um efeito de saúde induzido por radiação. Embora as amplas aplicações sejam encorajadas, muitos biomarcadores são mal caracterizados, e deve ser dada atenção à definição detalhada das propriedades (PERNOT et al., 2012; GRANDJEAN, 1995).

Pernot et al. (2012) definiu os biomarcadores em quatro categorias, relacionadas aos parâmetros temporais:

- Biomarcadores de exposição: estes estão disponíveis em algum ponto após a exposição e são adequados para estimar a dose recebida. Os exemplos incluem aberrações cromossômicas. Eles podem ser de curta duração (cromossomos dicêntricos) ou prolongados (translocações estáveis);
- Biomarcadores de susceptibilidade: podem estar disponíveis antes, durante ou após a exposição e podem prever um risco aumentado de efeitos induzidos pela radiação na saúde. Os biomarcadores de susceptibilidade deveriam permanecer constantes ao longo da vida de um indivíduo. No entanto, certos perfis de expressão de genes e proteínas podem variar com a idade ou com a exposição;

- Biomarcadores de efeitos tardios: podem ser usados para avaliar os efeitos na saúde que estão presentes há muito tempo após a exposição, antes da detecção clínica da doença induzida por radiação ou a morte;
- Biomarcadores de efeitos persistentes permitem que a avaliação dos efeitos de radiação represente um longo período de tempo após a exposição.

O componente de avaliação da exposição do processo de análise de risco é uma tentativa de fornecer estimativas qualitativas e quantitativas da exposição humana através do uso de medidas e modelos. Os biomarcadores de exposição ampliam medidas das exposições reais experimentadas pelo indivíduo ou população na avaliação da exposição no campo dos dados que fornecem a evidência mais direta de exposição humana a um determinado agente e à dose absorvida (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1993).

Com o tempo houve grandes melhorias, trazendo a técnica a um ponto em que a análise de dicêntricos tornou-se um componente de rotina dos programas de proteção contra radiação de muitos países. Os cromossomos dicêntricos são mais fáceis de reconhecer, mas sua frequência diminui com o tempo após a exposição. No entanto, existe uma série de outros parâmetros biológicos: micronúcleos, translocações e aberrações em cromossomos condensados prematuramente, que também podem ser testados em linfócitos, além de tecnologias que medem a quebra do DNA, mudanças na regulação de alguns genes ou a presença de biomarcadores de proteínas sendo detectados dentro das células (WEIER et al., 1991; BLAKELY et al., 2005; WILKINS et al., 2008; INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 2011).

A dosimetria biológica pode ser o único meio de quantificar a dose recebida e é muito importante para o médico orientar a pessoa irradiada sobre os riscos e consequências daquela dose e planejamento de terapia (INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 2001; WILKINS et al., 2008; INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 2011).

2.3 Mutações

Entendem-se como mutação, quaisquer alterações que ocorrem e são fixadas na estrutura do DNA e não são reparadas. O efeito fenotípico favorável ou desfavorável de uma mutação decorre do local do genoma e do ambiente fisiológico envolvidos. Com o decorrer do tempo, o DNA pode apresentar mutações espontâneas produzidas por erros durante a replicação na divisão celular, que não foram corrigidos pelo sistema de reparo (ARRUDA, 2008).

Mutações em células somáticas ficam restritas a célula afetada e suas descendentes. Embora causem dano no funcionamento do organismo, não o afetam como um todo. Em algumas situações as mutações somáticas podem lesar as proteínas reguladoras que controlam a divisão celular e conseqüentemente provocar câncer no tecido afetado (GRIFFITHS et al., 2013).

Se esses erros ocorrerem na linhagem das células germinativas humanas (isto é, nas espermatogônias e nos ovogônias), as mutações poderiam ser transmitidas para a prole. Algumas dessas novas variantes genéticas serão deletérias para o organismo. Outras variantes serão vantajosas e servirão como substratos para seleção positiva promovendo variabilidade entre células ou indivíduos (CAMPBELL e EICHLER, 2013).

Estudos sugerem variações consideráveis nas taxas de mutação da linhagem germinativa masculina e feminina dentro e entre as famílias. A idade materna está associada à ocorrência de alterações cromossômicas, enquanto a idade paterna está associada a deleções terminais e intersticiais *de novo*, substituições básicas e mutações pontuais. A idade paterna é frequentemente associada com o aumento de mutações de linhagem germinativa que afetam a prole. Esta observação é apoiada pela presença de um aumento na carga de mutação dos espermatozoides dependente da idade do homem (BUIZER-VOSKAMP et al., 2013).

Em contraste com as espontâneas, aquelas mutações que resultam de fatores exógenos são classificadas como mutações induzidas. Essas mutações podem ser provocadas por agentes naturais ou artificiais, conhecidos como agentes mutagênicos que possui o potencial para danificar o DNA e causar mutações. Os organismos desenvolveram uma variedade de mecanismos elaborados de reparo do DNA agredido, que restaura tanto danos espontâneos quanto aos induzidos, mantendo a integridade genômica (KLUG et al., 2009).

Os mecanismos de reparo do DNA, em sua grande maioria, evoluíram na premissa de que as lesões afetassem principalmente apenas uma das fitas de DNA. A indução de dano complexo do DNA com eficiência relativamente alta é uma característica única da radiação ionizante, que danifica o DNA, ao transmitir energia em formas capazes de causar a ionização. O dano complexo do DNA pode ser altamente diversificado. Pode incluir combinações aleatórias em diferentes números de quebras de fita, várias formas de dano de base e danos na ribose para gerar um espectro altamente complexo de lesões compostas que apresentam um problema não apenas para os sistemas de reparo celular, mas também para qualquer um que tente sua classificação sistemática. (MLADENOV E ILIAKIS, 2011).

2.3.1 Mecanismo de reparo

Evolutivamente, os sistemas biológicos de eucariotos e procariotos aprimoraram vias de reparação de dano no DNA que agem para prevenir os efeitos deletérios das mutações, ao mesmo tempo preservando a possibilidade de promover variações nos genomas, que são subjacentes ao processo evolutivo (HARPER et al., 2010). As células de mamíferos integraram sistemas de resposta que detectam danos no DNA, ativam cascatas de sinalização e efetuam o reparo. Defeitos nestes sistemas levam à instabilidade do genoma e predisõem ao câncer e outras doenças (Shrivastava et al., 2009). Em células de mamíferos, está bem estabelecido que os compostos que inibem a replicação são potentes indutores da troca de cromátides irmãs, amplificação de genes e recombinação homóloga (do inglês, *Homologous Recombination* - HR) (Lundin et al., 2002).

Os efeitos das mutações não são apenas deletérios, pois os genomas são dinâmicos. A amplificação de genes mostrou ser um mecanismo recorrente pelo qual as células de mamíferos desenvolvem resistência química ou uma manifestação da progressão da tumorigênese (FLORES et al., 2007).

Os rearranjos cromossômicos requerem a geração de uma ou mais extremidades de DNA, que podem posteriormente se tornar substratos para uma variedade de processos. Tais extremidades de DNA podem emergir de uma gama de estruturas de DNA, incluindo DSBs, forquilhas de replicação colapsados e telômeros disfuncionais. As DSBs têm sido reconhecidas como iniciadoras e intermediárias de uma ampla gama de rearranjos cromossômicos (KASPAREK e HUMPHREY, 2011).

Alguns dos rearranjos podem prejudicar a sobrevivência da célula, levando à sua morte. Outros podem ser fisiologicamente neutros e, portanto, devem ser encontrados na população em uma proporção relacionada à taxa de geração do rearranjo e ao tempo de vida da linhagem celular, entre outros fatores. É concebível que certos rearranjos possam tornar algumas células mais adequadas para certas funções dentro de uma população de células em mosaico. Finalmente, alguns rearranjos podem resultar em células com uma vantagem reprodutiva (FLORES et al., 2007).

A forquilha de replicação do DNA quando encontra lesões na sequência de DNA podem bloquear ou colapsar o complexo de replicação. Tais eventos, por sua vez, levam à formação de extremidades de DNA e outras lesões reconhecidas pelas proteínas de reparo do DNA.

Várias vias de reparo foram implicadas na reativação de forquilha de replicação paralisada. Em particular, há evidências crescentes de que a recombinação genética desempenha um papel crucial neste processo. O estresse de replicação em combinação com pontos de controle de replicação defeituosos pode desencadear rearranjos genômicos complexo (ARNAUDEAU et al., 2001; LUNDIN et al., 2002; MANI E CHINNAIYAN, 2011).

Três tipos principais de mecanismos conhecidos podem causar variação estruturais, NAHR, NEHJ e MMBIR. NAHR é o mecanismo de reparo do DNA mais comum e geralmente pode produzir variações grandes quando envolvido com LCRs. NHEJ é um mecanismo de reparo que não requer replicação e não é necessária nenhuma homologia e, ocasionalmente, pode gerar microhomologias ou inserções pequenas no ponto de interrupção. Para rearranjos complexos, descreveu-se um mecanismo de replicação chamado Replicação induzida pela quebra de DNA por homologia (do inglês, Fork stalling and template switching - FoSTeS), que posteriormente foi generalizado para Parada da forquilha de replicação e mudança de molde de DNA (do inglês, *Microhomology-Mediated Break-Induced Replication* – MMBIR) que pode resultar em inversão, duplicação em tandem, translocação ou rearranjos mais complexos (GU et al., 2008; HASTINGS et al., 2009; ZHANG et al., 2009; YANG et al., 2013).

2.3.2 Recombinação Homóloga Não Alélica (NAHR)

Com base na existência da ampla variação genômica estrutural em desordem genômicas humanas, pode-se inferir que o genoma humano está sujeito a rearranjos cromossômicos recorrentes. Além disso, em vários casos, demonstrou-se que o mesmo tipo de variação genômica estrutural pode ocorrer em indivíduos não aparentados. Um mecanismo que foi proposto como causa de alguns desses rearranjos recorrentes no genoma humano é a Recombinação Homóloga Não Alélica (do inglês, *Nonallelic Homologous Recombination* – NAHR). Na NAHR, sequências não alélicas repetidas que apresentando elevada homologia de sequência orientam a recombinação, produzindo diferentes tipos de rearranjos, incluindo deleções, duplicações, inversões e translocações de segmentos do DNA. O tipo de rearranjo derivado de NAHR depende da localização e orientação relativa das sequências repetidas que estão envolvidas no evento de recombinação (FLORES et al., 2007).

O mecanismo patogênico predominante para as desordens genômicas associados a deleções e duplicações é o número de cópias alteradas de genes sensíveis à dosagem. Além do

seu papel em desordem genômicas, a NAHR é um dos principais mecanismos que contribuem para a variação estrutural não patogênica no genoma humano. Os pontos de interrupções dos rearranjos causados pela NAHR mostraram-se agrupar em *hotspots* definidos dentro de sequências duplicadas, em uma maneira semelhante à dos pontos críticos de recombinação alélica (TURNER et al., 2008).

Pesquisas recentes revelam os fatores necessários para facilitar a NAHR, apontando para a possibilidade de uma melhor previsão de *hotspots* de NAHR no genoma humano, ou mesmo em genomas pessoais. Embora um papel para a arquitetura genômica das repetições diretas esteja agora firmemente estabelecido no mecanismo de NAHR, a importância das repetições invertidas na susceptibilidade a rearranjos genômicos humanos está apenas começando a ser revelada (LIU et al., 2012).

Um modelo de NAHR sugere que a recombinação entre sequências duplicadas (paralogas) pode ocorrer de uma das três maneiras: (1) na mesma cromátide, (2) em cromátides irmãs ou (3) no cromossomo homólogo. NAHR intercromossômico e intracromossômico pode produzir deleções e duplicações, enquanto a NAHR intracromatídico só pode produzir deleções (Figura 1). De acordo com este modelo de NAHR, as taxas relativas de deleção e duplicação serão determinadas pela contribuição relativa do rearranjo envolvido no NAHR (TURNER et al., 2008).

NAHR mediadas pelas LCRs podem levar a rearranjos na molécula de DNA resultando em deleções, duplicações, inversões e em raros casos, translocações. NAHR entre LCRs resulta em desordem genômicas, quando os genes sensíveis à dosagem estão localizados dentro dos fragmentos genômicos rearranjados. O processo de NAHR mediado por LCR não representa eventos aleatórios, mas sim reflete a arquitetura local do genoma. Os reordenamentos de DNA resultantes da NAHR foram observados dependendo de características estruturais genômicas que incluem o comprimento, grau de homologia, distância e orientação em relação de um ao outro das LCRs, e o número de eventos subsequentes de recombinação. Além disso, o número de eventos NAHR determina a taxa do produto desse rearranjo genômico (STANKIEWICZ e LUPSKI, 2002).

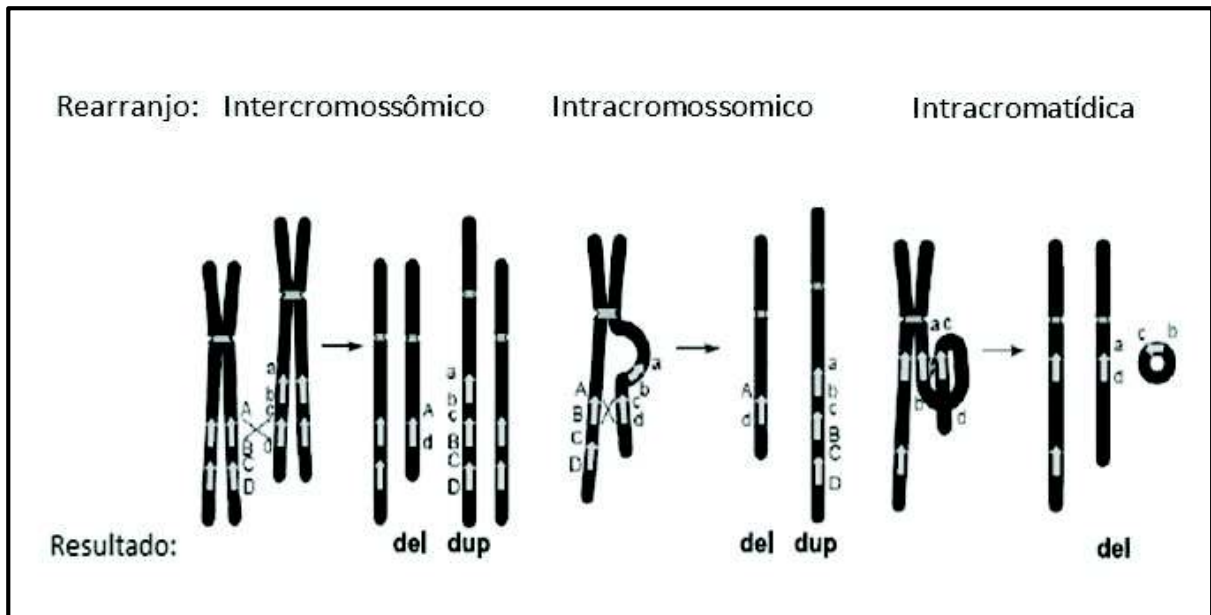


Figura 1. Representação esquemática de duplicações e deleções resultante da Recombinação Homóloga Não Alélica (NAHR), em diferentes cenários, considerando a mediação de LCR em orientação direta. Os cromossomos são mostrados em preto. As setas cinzas representam LCRs. As letras adjacentes às cromátides referem-se à seqüência única flanqueadora. A NAHR Intercromossômica e Intracromossômica entre LCRs em orientação direta resulta em duplicação e deleção, enquanto a NAHR Intracromatídica resulta em deleções. Fonte: Adaptado de GU et al., 2008.

Os passos adotados para NAHR são: a ocorrência de uma DSB para iniciar o processo, a interação de substratos de seqüência em LCR para recombinação e a resolução de intermediários de recombinação com a formação de novos produtos de recombinação. Estudos de pontos de interrupção dos rearranjos originados através do mecanismo LCR/NAHR suportam a visão de que, apesar dos grandes trechos de identidade de seqüência, existem "hotspots" para a maioria dos crossovers que ocorrem dentro das LCRs (SANKARANARAYANAN, 2006).

2.3.3 Junção de extremidade não homóloga (NHEJ)

Um dos modos pelos quais os eucariotos conseguem ligar novamente as extremidades bifilamentares quebradas no DNA é pela NHEJ. Como em outros mecanismos de reparo, a primeira etapa na via NHEJ é o reconhecimento do dano. A via NHEJ é iniciada quando duas proteínas, KU70 e KU80, ligam-se às extremidades rompidas, formando um heterodímero que serve a duas funções: (1) impede outros danos às extremidades e, (2) recruta outras proteínas que aparam as extremidades do filamento para gerar as extremidades 5'-P e 3'-OH, necessárias para a ligação. A DNA ligase IV, então, liga as duas extremidades (Figura 2) (GRIFFITHS et al., 2013).

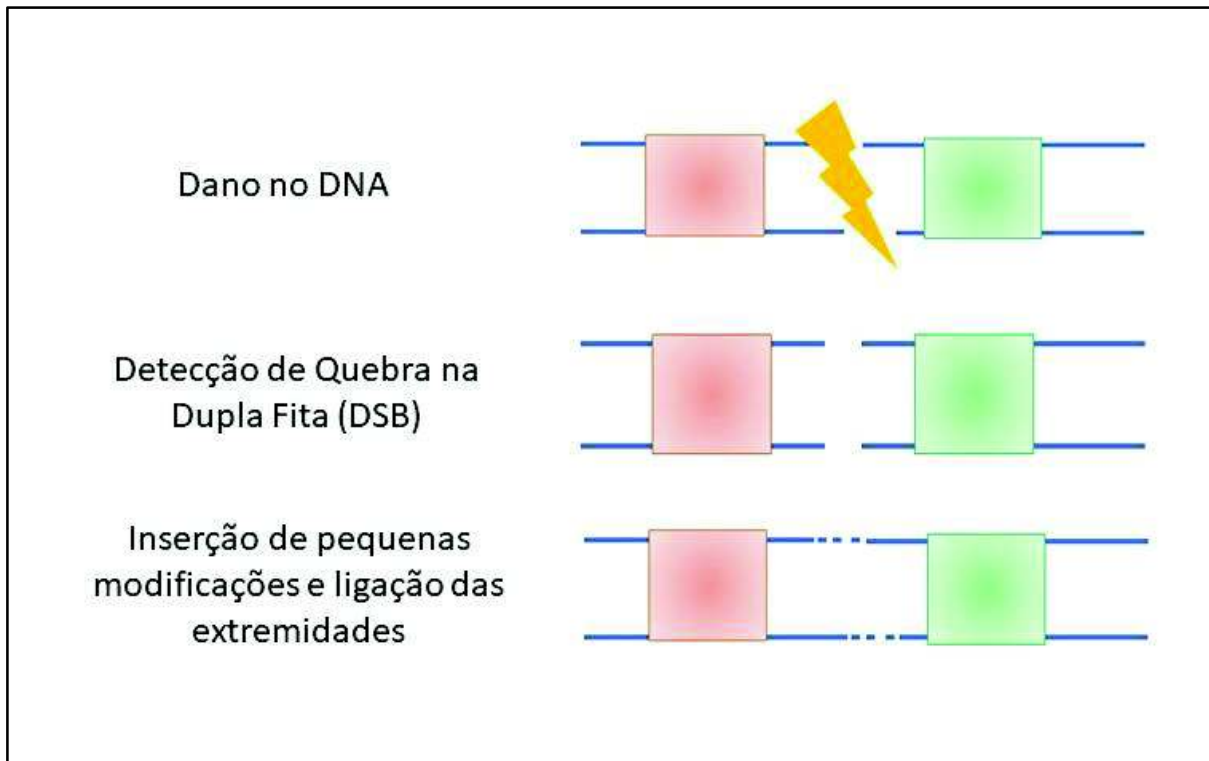


Figura 2. Após o dano no DNA e a detecção de quebra na dupla fita de DNA sem homologia entre si. As quebras de cadeia dupla (DSBs) são criadas entre as duas seqüências representadas como um quadrado verde e vermelho sem homologia entre si. O sistema NHEJ modifica e reúne as duas extremidades, resultando na exclusão do segmento entre as duas cadeias. Fonte: Adaptado por GU et al., 2008.

Dos vários tipos de lesões de DNA induzidas por radiação ionizante, as DSBs são consideradas as mais relevantes do ponto de vista dos efeitos biológicos, isto é, a falta de reparo ou mau funcionamento das DSBs estão subjacentes aos efeitos, como a morte celular, mutações e aberrações cromossômicas (SANKARANARAYANAN, 2006; COSTES et al., 2010; WRIGHT, 2010).

As DSBs são produzidas por fatores exógenos e endógenos, como radiação ionizante (IR) e nucleases, respectivamente. As DSBs são lesões que podem originar a perda de heterozigidade ou translocações cromossômicas, que eventualmente podem levar a câncer ou morte celular. Os eucariotos desenvolveram pelo menos duas vias de reparação diferentes que podem lidar com essas lesões, HR e NHEJ. A recombinação homóloga precisa de um modelo homólogo para orientar o processo de reparação, enquanto o NHEJ usa pouca ou nenhuma homologia para reparar DSBs (Mari et al., 2006; SHRIVASTAVA et al., 2009; HARPER et al., 2010).

Embora os estudos bioquímicos tenham esclarecido vários aspectos do mecanismo de reação do NHEJ, menos se conhece sobre o NHEJ nas células vivas, principalmente por causa da incapacidade de visualizar a localização das proteínas de reparação do NHEJ no dano do

DNA. A Radiação Ionizante induz DSBs no núcleo e as proteínas NHEJ se acumulam nas áreas irradiadas (Mari et al., 2006).

2.3.4 Replicação induzida pela quebra de DNA por homologia (MMBIR)

Em células de mamíferos, há uma via de reparo de DSB mediada por microhomologia surpreendentemente eficiente. A maioria das pesquisas experimentais sobre o reparo DSB mediado por microhomologia foi realizada com quebras induzidas por nucleases. Esta via recentemente descrita foi caracterizada em eventos de recombinação induzidos por nucleases em células deficientes em NHEJ clássico e em células cancerosas. As nucleases geram quebras de duas extremidades aleatoriamente em relação às forquilha de replicação em curso. No entanto, Replicação Induzida por Quebra (do inglês, *Break - Induced Replication* – BIR) atua em circunstâncias em que o reparo de DSB, incluindo o NHEJ, não é uma opção, porque após a quebra da forquilha de replicação, há apenas uma única extremidade sem uma segunda extremidade na qual a única extremidade pode ser refeita ou ligada (HASTINGS et al., 2009).

O dano espontâneo ao DNA ocorre predominantemente durante a replicação, de modo que os mecanismos que reparam as extremidades do DNA único são mais apropriadamente invocados para danos espontâneos do que os mecanismos que atuam em DSB de duas extremidades. Neste contexto, a via da parada da forquilha de replicação e mudança de molde de DNA (do inglês, *Microhomology-Mediated Break-Induced Replication* – MMBIR) torna-se a via de escolha para reparar as extremidades de uma única fita dupla quando os trechos de DNA de cadeia simples estão disponíveis e compartilham microhomologia com a extremidade 3' de uma única fita na forquilha colabada (CICCIA e ELLEDGE, 2010).

A habilidade de qualquer região de DNA de cadeia simples que compartilha microhomologia com a extremidade de cadeia simples 3' para participar nos eventos explicaria por que o MMBIR é inexato e propenso a mudanças estruturais cromossômicas. Dependendo da posição relativa da outra forquilha de replicação no cromossomo e da natureza iterativa do processo, o produto resultante pode ser acompanhado por deleções, duplicações, inversões e / ou rearranjos cromossômicos complexos (Figura 3). Além de reiniciar forquilhas de replicação paralisadas e quebradas, o BIR tem sido considerado para desempenhar um papel importante na manutenção do comprimento do telômero através de um mecanismo de "rolo e propagação", no caso de encurtamento excessivo de telômeros ou

interrupções na função das proteínas de ligação ao telômeros (HASTINGS et al., 2009; CHEN et al., 2010; ZHANG et al., 2010; MANI E CHINNAIYAN, 2010; CARVALHO et al., 2011).

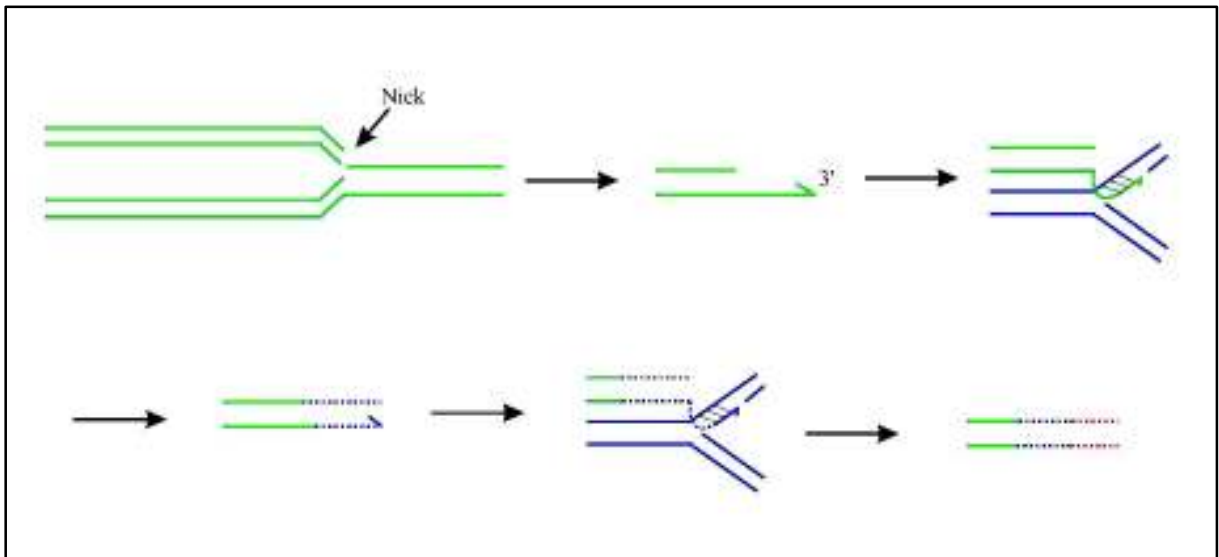


Figura 3. Replicação induzida por ruptura mediada por microhomologia (MMBIR): a forquilha de replicação encontra um nick (descontinuidade que, permite a liberação de torsão necessária na cadeia durante a replicação do DNA), resultando no bloqueio da replicação. A extremidade 5' da molécula quebrada está retraída da ruptura, expondo a extremidade 3' que pode reformular para qualquer DNA de uma única fita que compartilhe a microhomologia retomando a replicação por meio de um novo modelo (uma forquilha próxima pode fornecer o ssDNA necessário). A extensão e replicação da polimerase inicial é realizada por uma polimerase de baixa processabilidade que pode permitir rodadas múltiplas, ou iterações, de desengate e troca de modelo até que uma replicação completamente processável seja estabelecida até o final do cromossomo ou replicação. Adaptado por CARVALHO et al., 2011.

A homologia muito curta não deve ser uma barreira ao reinício da replicação porque a DNA polimerase que participa no reparo de DSB em vertebrados é eficiente para iniciar a nova síntese de DNA a partir de primers incompatíveis e até mesmo iniciadores tão pequenos quanto 2-3 pb. A clara distinção entre NHEJ e MMBIR é que, em segunda instância, as junções de microhomologia são seguidas por extensões mais curtas ou mais longas de sequência de DNA derivadas de outros lugares. De 10% a 20% das junções não-homólogas em células de mamíferos têm sequência inserida na junção. Alguns eventos que anteriormente foram interpretados como ocorrendo por um mecanismo NHEJ podem ter ocorrido pelo MMBIR com uma única modificação. Além disso, os episódios que pareciam ser simples eventos de junção final podem ter sido mais complexos e esta complexidade não foi revelada pelas limitações técnicas em uso, quando tais eventos foram discutidos (HASTINGS et al., 2009).

Comparado com NAHR, BIR produz apenas duplicações não recíprocas, deleções, repetições invertidas e translocações. As mutações resultantes de BIR são indistinguíveis de

suas contrapartes por NAHR. Assim, alguns dos eventos patogênicos que foram considerados pela NAHR podem, de fato, resultar da BIR (CHEN et al., 2010).

2.4 Variação do Número de Cópias (CNV)

Diversos estudos têm investigado o papel da variação estrutural do genoma que possuem tamanho intermediário, reconhecida como Variação do Número de Cópias (do inglês, *Copy Number Variants* - CNV), que envolve rearranjos variáveis de ganhos e/ou perdas do conteúdo de DNA. CNVs são definidos operacionalmente como perdas e ganhos que variam de tamanho de 50 pb a kilobases (CAMPBELL e EICHLER, 2013; ZARREI et al., 2015).

Consideram-se que as CNVs influenciam tanto na variação normal como na ocorrência de doenças. Têm sido propostos pelo menos dois modelos distintos, mas não exclusivos, de associações de fenótipos com CNVs. Um modelo envolve polimorfismos de números de cópias comuns (do inglês, *Copy Number Polymorphisms* - CNPs), muitas vezes com múltiplos alelos definidos pela variação no número de cópias e/ou estrutura genômica. O outro modelo são as CNVs raras que deletam ou duplicam segmentos genômicos tipicamente maiores e existem em um menor número de alelos. Essas CNVs são altamente penetrantes e de curta duração na população, ocorrendo ou persistindo por apenas algumas gerações dentro de um pedigree (ITSARA et al., 2009).

Itsara et al. (2009) esclareceram que as variantes grandes são individualmente raras (cada uma encontrada em um ou poucos indivíduos), mas coletivamente frequentes (a maioria dos indivíduos carrega uma ou mais CNV grande) em populações humanas e que a NAHR é um contribuidor substancial para CNVs raras e comuns. As análises de tamanho e conteúdo de genes em relação à frequência de alelos indicam que as CNVs são como uma classe sob forte seleção e, portanto, provavelmente podem ser fenotipicamente importantes.

Laboratórios genéticos clínicos estão familiarizados com as mudanças recorrentes de números de cópias mediadas por LCRs. Por outro lado, estudos populacionais sugerem que a grande maioria da variação do número de cópias não é recorrente. Em geral, as variantes do número de cópias são atribuídas as seguintes interpretações (1) Benigna; (2) Variantes de Significância Clínica Incerta (do inglês, *Uncertain Clinical Significance* - VOUS) e (3) Patogênico. Quando as CNVs têm um significado clínico incerto, pode ser informativo

determinar se a CNV foi herdada ou representa uma mutação *de novo* (MILLER et al., 2010; KEARNEY et al., 2011).

Um estudo relado por Arlt et al. (2014) em que células cultivadas expostas ao estresse de replicação causado pela afidicolina (APH) e pela hidroxiuréia (HU) demonstram induzir uma alta frequência de CNVs *de novo* que surgem de uma maneira independente de NHEJ. Existe também uma frequência mensurável de formação de CNV espontânea em células não tratadas, indicando que os erros de replicação produzem essas lesões durante a divisão celular normal. LIANG et al. (2008) relataram que nos seres humanos, as CNVs mostraram ter uma origem meiótica e que recentemente, a comparação de gêmeos monozigóticos identificou CNVs distintas entre os pares, sugerindo que essas alterações do genoma também possam ocorrer durante o desenvolvimento somático.

Arlt et al. (2014) evidenciaram ainda que a exposição à radiação ionizante com altas doses na faixa de 1,5 - 3,0 Gy resulta em um aumento significativo na formação de CNV *de novo* em células irradiadas. As junções do ponto de ruptura de CNVs são caracterizadas por microhomologias, extremidades sem cortes ou pequenas inserções, inserções como as observadas nas CNVs induzidas por estresse espontâneo, replicação e na maioria das CNVs não-recorrentes *in vivo*. Esses dados sugerem que a radiação ionizante de baixa dose induz CNVs por um mecanismo dependente de replicação, em oposição à vias de reparo independente e dependente de quebras de cadeia dupla.

Flatscher-Bader et al. (2011) relatou evidências experimentais que indicam que a descendência de homens mais velhos tem um risco aumentado de CNVs *de novo*. As células germinativas masculinas teriam um risco maior de mutações de erro de cópia em comparação com as células germinativas feminina. A evidência empírica apoiou-se na observação de que tipos particulares de translocações paternas parecem ser mais comuns na prole de homens mais velhos.

2.5 Repetições de Poucas Cópias (LCR)

Aproximadamente, 50% do genoma humano consiste em sequências de repetições, que incluem genes, fragmentos de genes, sequências retrovirais endógenas, elementos móveis, como pseudogenes processados por Alu, repetições de sequências simples, sequências repetidas em *tandem* (que caracterizam os centrômeros, os telômeros, o braço curto dos cromossomos acrocêntricos e os agrupamentos de genes ribossômicos) e Repetições de

poucas cópias (do inglês, *Low-Copy Repeats* - LCRs), também denominadas de Duplicações Segmentares (do inglês, *Segmental Duplications* - SDs). As LCRs/SDs foram definidas computacionalmente como segmentos de DNA que contêm $\geq 90\%$ de identidade de sequência e ≥ 1 kb de comprimento no genoma haplóide de referência e constituem aproximadamente 4-5% do genoma humano (CARVALHO e LUPSKI, 2016).

Estudos sobre a sequência primária e a arquitetura do genoma humano permitiram uma maior caracterização de LCRs conhecidas e a identificação de novas LCRs. As LCRs podem ter uma estrutura complexa, surgindo durante a especiação dos primatas e parecem estar evoluindo ainda, revelando assim a plasticidade dos genomas (STANKIEWICZ e LUPSKI, 2002).

A maioria das LCRs >10 kb consistem em um conjunto de sequências parálogas de origem genômica diversa. A caracterização molecular dessas regiões repetidas no genoma humano revelou uma arquitetura em mosaico, isto é, tais repetições são organizadas em grupos hierárquicos de sequências diretas e inversamente orientadas em oposição intercromossômicos (cruzamento desigual entre os cromossomos homólogos) e intracromossômicos (cromátides homólogos). Os padrões de distribuição genômica de grandes LCR mostram que eles se sobrepõem com regiões que frequentemente se submetem a rearranjos genômicos associados à doença. Esse achado pode ser explicado pelo fato de que as LCRs grandes que flanqueiam uma região genômica única afetam negativamente a estabilidade do genoma, tornando as sequências flanqueadas propensas a rearranjos de DNA via NAHR ou Mecanismos baseados em replicação (do inglês, *Replication based mechanisms* - RBMs). Essas características da sequência genômica podem assim ser usadas para identificar novos *loci* genômicos que são suscetíveis à formação de variantes estruturais (STANKIEWICZ e LUPSKI, 2002; CARVALHO e LUPSKI, 2016).

O desajuste entre cópias não alélicas de LCRs pode ser facilitado pela redução da recombinação genética nessas regiões. A ausência de formação de sinapses cromossômicas/cromátides para ancorar segmentos alélicos pode permitir o alinhamento de segmentos não alélicos, levando a travessia desigual entre LCR não alélicos (STANKIEWICZ e LUPSKI, 2002).

Foi proposto que os cruzamentos desiguais entre LCRs diretamente direcionados em cromossomos homólogos podem produzir dois produtos recíprocos: uma duplicação direta

(em *tandem*) e uma deleção (Figura 4). Algumas LCRs têm estruturas complexas com sequências entre as LCRs orientadas de forma direta, enquanto outras são invertidas (Figura 4). Assim, quando se considera um conjunto específico de LCRs para serem utilizados como substratos de NAHR, a sequência final precisa ser esclarecida para determinar a orientação de substratos de recombinações e para prever as consequências de eventos de recombinações. Além disso, o número de *Crossing-over*, recombinação gênica, subsequentes pode determinar os produtos cromossômicos derivados (STANKIEWICZ e LUPSKI, 2002).

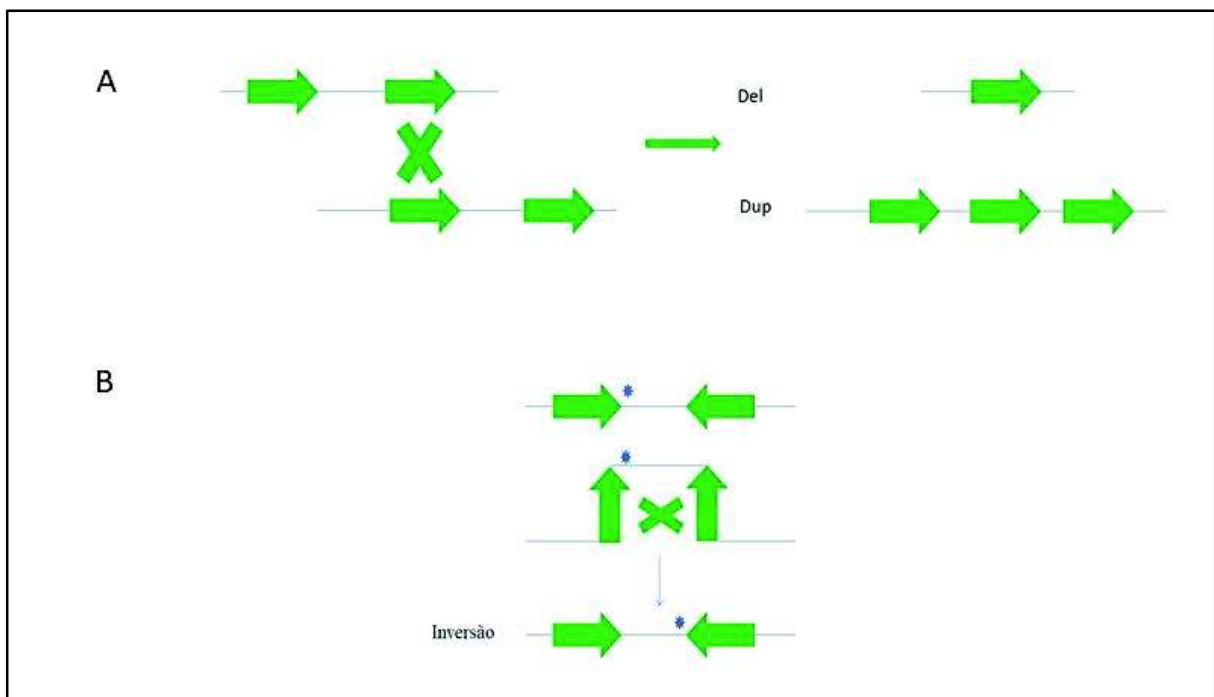


Figura 4. Esquema demonstrando Recombinação Homóloga Não Alélica (NAHR) em diversas situações e suas consequências A: NAHR entre repetições orientadas diretamente gera deleções e duplicações. B: NAHR entre repetições invertidas gera a inversão do segmento entre as repetições. Fonte: Adaptado de CARVALHO E LUPSKI, 2016.

As regiões pericentroméricas e subteloméricas são ricas em LCRs e possuem correlação com Regiões de Variação do Número de Cópias (*Copy number variable regions - CNVRs*). Regiões que contêm pelo menos duas variações de número de cópias que se sobrepõem e que podem ter pontos de interrupção diferentes já foram descritas. Neste contexto, o cromossomo 19 humano mostrou a maior correlação com as duplicações segmentares evolutivamente mais antigas (com homologia de sequência $\geq 90\%$) e o cromossomo 14 humano apresentou a maior correlação com as duplicações segmentares evolutivamente recentes (com alta similaridade de sequência de cerca de 99 %). A sobreposição substancial e associação entre CNVs e LCRs destacam a natureza dinâmica dessas regiões, o que desfigura a distinção entre CNV e

duplicações ancestrais que se presume ser corrigidas em uma população específica (ZARREI et al., 2015).

Foi identificado no estudo de Bailey et al. (2002) que os cromossomos humanos 7, 9, 15, 16, 17, 19, 22 e Y estão significativamente enriquecidos para as duplicações inter e intracromossômicas, enquanto que os cromossomos 2, 3, 4, 5, 8, 14 e 20 aparentam reduzir significativamente o conteúdo de LCRs. Essa variação parece estar correlacionada com a abundância de genes.

2.6 O acidente radiológico de Goiânia

No final do terceiro trimestre de 1985, o Instituto Goiano de Radioterapia em Goiânia, mudou-se para novas instalações. A instalação anterior foi parcialmente demolida, restando somente os escombros. Duas pessoas entraram nesses escombros em 13 de setembro de 1987 e acharam uma unidade de teleterapia contendo 50,9 TBq (1375 Ci) de césio-137. Sem saber o que era a unidade, mas pensando que poderia ter algum valor de sucata, removeram-na do local e a levaram para um ferro-velho ser desmontada e comercializada como sucata (ROBERTS, 1987; INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 1988; ROZENTAL et al., 1989; DA CRUZ et al., 1994; DA CRUZ et al., 1996; DA CRUZ et al., 1997).

No ferro-velho, a cápsula contendo o césio-137 foi rompida e a fonte radioativa, na forma de sal de cloreto de césio altamente solúvel e prontamente dispersável, foi removida da blindagem. O rompimento da cápsula ocasionou a contaminação do ambiente, sucedendo na irradiação externa e a contaminação interna de várias pessoas. Assim, começou um dos mais graves acidentes radiológicos que já ocorreram na história da humanidade (ROBERTS, 1987; INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 1988; ROZENTAL et al., 1989; DA CRUZ et al., 1994; DA CRUZ et al., 1996; DA CRUZ et al., 1997).

O dono do ferro-velho percebeu que o material da cápsula brilhava, com uma coloração azulada no escuro e muitas pessoas ficaram fascinadas com o fenômeno. Durante cinco dias, amigos e parentes viram o fenômeno. E, no fim desse período, várias pessoas apresentavam sintomas gastrointestinais decorrentes da exposição à radiação. Posteriormente, uma das vítimas suspeitou que esses sintomas eram em virtude do pó e levou a cápsula de césio-137 a Vigilância Sanitária de Goiânia. Esta ação iniciou uma série de eventos que levaram à descoberta do acidente (ROBERTS, 1987; INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY

AGENCY, 1988; ROZENTAL et al., 1989; DA CRUZ et al., 1994; DA CRUZ et al., 1996; DA CRUZ et al., 1997).

As pessoas que viviam em locais adjacentes aos focos identificados de contaminação ou que tiveram um tipo de contato com as vítimas foram avaliadas clinicamente e, com o diagnóstico inseguro deram entrada no Hospital de Doenças Tropicais (HDT) e no Hospital Santa Maria. O Estádio Olímpico foi escolhido para abrigar as pessoas desocupadas das suas casas em tendas. As pessoas foram evacuadas para tratamentos clínicos e radiométricos, e de acordo com a gravidade foram enviadas para o Hospital Geral de Goiânia, para a Fundação Estadual para o Bem-estar do Menor (FEBEM), ou para o Albergue Bom Samaritano em Goiânia. As pessoas mais graves foram remanejadas para o Hospital Naval Marcílio Dias, no Rio de Janeiro (INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 1988; ROZENTAL et al., 1989).

Nesta fase inicial, a contaminação ocorreu em 249 pessoas. Entre estes, 120 apresentaram contaminação de roupas e sapatos. Apenas 129 apresentaram contaminação externa e /ou interna a radiações ionizantes para doses tão altas quanto 7 Gy. Portanto, a população diretamente exposta foi colocada sob supervisão médica direta. Alguns dias após o acidente algumas outras pessoas procuraram atendimento médico, entre estes, membros da Polícia Militar, do corpo de Bombeiros ou parentes próximos das vítimas. (INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 1988; ROZENTAL et al., 1989; DA CRUZ et al., 1994; DA CRUZ et al., 1996; DA CRUZ et al., 1997).

Os indivíduos expostos ao césio-137, de acordo com os protocolos da Agência Internacional de Energia Nuclear (IAEA), desde 1987 são monitorados no Centro De Assistência aos Radioacidentados (C.A.R.A.), segundo a forma de contato (contaminação ou irradiação) e dose de exposição (Quadro 2) (C.A.R.A).

Quadro 2. Categorização em Grupos, segundo a exposição e a dosimetria citogenética da população exposta acidental e ocupacionalmente à radiação ionizante de Césio-137 em Goiânia (Brasil).

Grupo	Exposição	Dosimetria Citogenética
I e filhos	Indivíduos com radiodermites e/ou alta contaminação	$\geq 0,2$ Gy e/ou atividade equivalente a $\frac{1}{2}$ Índice da Área Foliar ou 50 μCi

II e filhos	Indivíduos com baixa contaminação	< 0,2 Gy e/ou atividade equivalente a ½ LAI ou 50 µCi)
III	Indivíduos sem contaminação, trabalhadores (soldados, bombeiros militar, médicos, motoristas, técnicos de RX, funcionários da Vigilância Sanitária), vizinhos de focos, parentes das vítimas,	Sem dosimetria ou registro de exposição.

Fonte: C.A.R.A

O incidente em Goiânia foi um dos mais graves acidentes radiológicos ocorridos até o momento fora de uma usina nuclear, resultando em graves consequências para a sociedade. Em decorrência, várias pessoas sofreram lesões por radiação, e dentre essas pessoas, uma sofreu amputação do antebraço, e outros quatro indivíduos foram a óbito durante a fase aguda do acidente. Residências e locais públicos foram contaminados. A descontaminação exigiu a demolição de sete residências e vários outros edifícios, e também, a remoção da camada superficial de grandes áreas. No total foram gerados cerca de 3500 m³ de resíduos radioativos (Figuras 5) (INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 1988; ROZENTAL et al., 1989; OKUNO, 2013).

Os rejeitos radioativos oriundos do acidente radiológico com o Cs-137 estão em Abadia de Goiás em uma Unidade de Conservação Ambiental de 160 hectares. As disposições desses rejeitos se encontram em dois Depósitos Definitivos, que consistem em uma estrutura retangular superficial constituída de concreto, onde os rejeitos foram dispostos em 10 containers de navio, 1463 caixas metálicas e 4600 tambores de 200 litros (figura 5). Esses tambores foram colocados em cilindros de concreto para maior proteção. Os rejeitos foram distribuídos de forma que aqueles de radioatividade mais elevada ficassem na parte de baixo e ao centro, e ao redor deste ficando aqueles de menor radiação possibilitando assim uma auto blindagem. Os Depósitos Definitivos foram inaugurados em 1997 e também nesse período foi implementado um Programa de Monitoração Ambiental com o objetivo de garantir a saúde do homem e do meio ambiente (JAAKKO PÖYRY ENGENHARIA LTDA, 1994).



Figura 5. Imagem da descontaminação do local do acidente e do armazenamento do lixo radioativo. A: Retroscavadeira demolindo o pavimento contaminado com Césio-137 da Rua 57. B: Resíduo radioativo armazenado em contêineres. C: Área de armazenamento dos resíduos radioativos em Abadia de Goiás (Brasil). D: Acondicionamento dos contêineres metálicos com resíduos radioativos em plataformas de concreto. Fonte: C.A.R.A.

2.7 SNP array

Nas duas últimas décadas, a citogenética convencional foi combinada com tecnologias moleculares direcionadas para melhorar a resolução na qual se pode detectar alterações genômicas. Hibridização Fluorescente “*in situ*” (do inglês, *Fluorescent in situ Hybridization* – FISH), Hibridização Genômica Comparativa (do inglês, *Comparative Genomic Hybridization* - CGH), Multiplex-FISH e Cariótipo Espectral (do inglês, *Spectral Karyotyping* - SKY) foram usados para detectar anormalidades complexas ou submicroscópicas adicionais. No entanto, tais tecnologias não são adequadas para exames de genoma completo, porque falta a resolução necessária. A tecnologia de Hibridação Genômica Comparativa Baseada em Array (do inglês, *Array Comparative Genomic Hybridization* - aCGH) tem maior resolução e excelente rendimento quando comparada com a citogenética convencional e molecular (LU et al., 2007; MILLER et al., 2010).

A inicial tecnologia de CGH foi desenvolvida para triagem genômica de rearranjos desequilibrados em uma hibridização dupla. No entanto, a resolução desse CGH cromossômico era apenas de 3-10 Mb comparável ao cariótipo de alta resolução, assim, a CGH foi adaptada para uso em *microarrays*, (MANNING e HUDGINS, 2010; ALFARAWATI et al., 2011). A Análise Cromossômica por Microarranjo (do inglês, *Chromosomal Microarray Analysis – CMA*) baseados em SNPs são capazes de detectar poliploidias e desordens uniparentais. Plataformas puramente baseadas em aCGH não são capazes de identificar tais eventos (ARMENGOL et al., 2012).

Na análise de *microarrays* baseada em SNP, o DNA do paciente é hibridizado com o *microarray* e é comparado pela análise de bancos de dados a um grupo de indivíduos saudáveis e não saudáveis. O DNA do paciente é comparado a um DNA de referência, sendo detectados ganhos ou perdas genômicas. (MCGOWAN-JORDAN et al., 2016).

Além dos dados do número de cópias, o CMA baseado em SNP também produz um conjunto de dados de genótipos gerados pelos SNP apresentado de AA, AB ou BB de acordo com os alelos dos SNPs. Isto, combinado com os dados do número de cópias, permite a detecção de Perda de Heterozigosidade (do inglês, *Loss of Heterozygosity - LOH*) e na condição de LOH com as cópia de números neutros podem ser na forma de Dissomia Uniparental Adquirida (do inglês, *Acquired Uniparental Disomy - aUPD*) ou Longos Trechos Contíguos De Homozigosidade (do inglês, *Long contiguous stretches of homozygosity – LCSH*) causados pela consanguinidade (NOWAK et al., 2009; MCGILLIVRAY et al., 2012; BATTAGLIA et al., 2013).

Devido à alta densidade da cobertura do genoma fornecida por SNP *array* com distâncias medianas inter-SNP de <0,7 kb, sua precisão e resolução do rastreamento do genoma integral para deleções, ampliações, LOH e aUPD representa um grande avanço sobre a citogenética convencional e a CGH cromossômica. As desvantagens da matriz SNP é sua incapacidade de detectar translocações equilibradas, não pode distinguir entre uma trissomia de translocação e uma triploidia padrão e algumas instâncias de mosaïcismo, mas é uma ferramenta forte para a detecção de pontos de interrupção em translocações genômicas não balanceadas (NOWAK et al., 2009; MCGILLIVRAY et al., 2012; HILLMAN et al., 2013).

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Investigar o efeito da presença de LCR na formação de CNVs *de novo* observadas na prole de indivíduos expostos a baixas doses de RI de Césio-137.

3.2 Objetivos específicos

- Detectar a presença de CNVs *de novo* e LCRs;
- Estabelecer a frequência de CNVs *de novo* e LCRs;
- Determinar a taxa de indução de CNVs e LCRs na geração F1 dos radioexpostos;
- Avaliar o potencial de CNVs mediadas por LCRs para servirem como biomarcadores de exposição à radiação ionizante;
- Estabelecer a taxa de frequência de mutação germinativa de CNVs induzida pela exposição parental à radiação ionizante;
- Dar continuidade aos estudos de monitoramento genético da população acidentalmente exposta ao Césio-137 em Goiânia-Goiás, utilizando novas metodologias e novas ferramentas de investigações genômica.

4. Materiais e métodos

4.1 Grupo Amostral

O grupo exposto foi constituído por 12 famílias, dos quais pelo menos um dos progenitores foi diretamente exposto à radiação ionizante de Césio-137, incluindo um total de 40 indivíduos (12/12 pais/mães e 16 filhos nascidos após o acidente). A dose absorvida para os indivíduos expostos foi estimada em 0,2 Gy. Um grupo de indivíduos não-expostos à radiação ionizante foi usado como controle. Esse grupo foi composto por 8 famílias residentes da cidade de Goiânia-Goiás. Os participantes do grupo controle não apresentavam história de exposição acidental ou ocupacional, à radiação.

4.2 Obtenção e preparo das amostras

As amostras biológicas foram constituídas de sangue periférico, sendo coletados 10 mL por punção venosa. 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. Todos os protocolos e condutas no presente estudo seguiu os termos da Resolução CNS Nº 441/11 (Anexo IV). No momento da coleta, os participantes responderam voluntariamente a um questionário (Anexo I) e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo II e III). Todas as coletas foram procedidas nos domicílios dos participantes dos grupos de radioexpostos. Os controles doaram suas amostras voluntariamente no laboratório de genética do Núcleo de Pesquisas Replicon da PUC Goiás. O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-Goiás), registro sob o número CAAE 49338615.2.0000.0037.

4.3 Extração e quantificação das amostras de DNA

Para a extração de DNA foi usado o kit de extração de DNA Illustra Blood GenomicPrep® Mini Kit (GE Healthcare, EUA) (Anexo V). A quantificação da concentração de DNA (ng/μL) existente em cada amostra foi realizada em um espectrofotômetro NanoVue® Plus (GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido). Ambos os procedimentos foram executados de acordo com os protocolos sugeridos pelos fabricantes.

4.4 Análise Cromossômicas Por Microarranjos

A análise cromossômica por microarranjos (CMA) foi conduzida em um GeneChip® CytoScanHDTM (Affymetrix®, Santa Clara, USA), sendo este uma matriz de genotipagem abrangente para o genoma humano. A matriz de genotipagem apresenta ampla cobertura do genoma e maior desempenho para a análise de alterações cromossômicas humanas, sendo capaz de detectar variações genéticas estruturais. O GeneChip® CytoScanHDTM possui mais de 99% de sensibilidade na detecção de CNVs, determinação de perda de heterozigose (LOH) e baixos níveis de mosaicismos. A matriz do chip possui cerca de 2,6 milhões de cópias de marcadores, incluindo aproximadamente 750 mil SNPs e cerca de 2 milhões de sondas não polimórficas. As sondas que integram o chip apresentavam tamanho de 25 pb.

4.5 Descrição do método de genotipagem *array*

A metodologia consiste em um ensaio composto por múltiplas sondas de hibridização alelo-específicas que são complementares às regiões de SNP presentes na fração reduzida do genoma amplificado no ensaio (Anexo VI). As sondas são constituídas de 25 oligonucleotídeos, com o SNP variável localizado no 13º nucleotídeo. Elas são redundantes e espalhadas ao longo do chip, para atenuar quaisquer efeitos da variação devido a localização física na matriz. Cada sonda tem uma localização fixa no arranjo do chip.

A metodologia se iniciou com uma digestão do DNA amostral com uma enzima de restrição (NspI) fornecida pelo fabricante. Este passo requer aproximadamente 250 ng de DNA. Em seguida, o DNA digerido foi ligado a adaptadores específicos e, posteriormente, amplificados por PCR, mediante o uso de primers universais. O DNA fragmentado por digestão enzimática e amplificado foi marcado com biotina e hibridização no GeneChip® CytoScanHD por 18 horas. Após a hibridização, os chips foram digitalizados no GeneChip® Scanner 3.000 7G (Affymetrix®, Estados Unidos da América). Ao final da digitalização, os sinais luminosos foram lidos e capturados pelo software Array GeneChip® Command Console® (AGCC®, Affymetrix®, EUA) gerando arquivos CEL, e as análises dos dados foram realizadas pelo software Chromosome Analysis Suite® 2.0 (ChAS®, Affymetrix®, EUA). Os arquivos CEL obtidos pelo escaneamento dos chips foram usados para estabelecer os genótipos dos SNPs contidos nas CNVs. As duas principais métricas de controle de qualidade do GeneChip® CytoScanHDTM array foram Median Absolute Pairwise Difference (MAPD) e SNP-QC, escores que se aplicam para marcadores de número de cópias e SNP,

respectivamente. Para o cenário do presente estudo foram usados os parâmetros de MAPD ≤ 0.25 e de SNP-QC ≥ 15 .

4.6 Tratamento e análise dos dados obtidos na genotipagem dos SNPs

A grande quantidade de informações disponibilizadas pelo uso do GeneChip® CytoScanHD™ fez com que fossem necessárias análises complexas para o tratamento dos dados. A análise dos resultados foi executada no Software ChAS® que possibilita investigar alterações estruturais ao longo do genoma, tais como variações no número de cópias, como duplicações e deleções de segmentos de DNA de regiões gênicas presentes nas amostras estudadas de modo comparativo, facilitando as interpretações dos resultados. Foram fixados como filtros: 15 marcadores para ganho e 8 marcadores para perda, distribuídos com uma média de distância entre os marcadores de ≤ 2.000 kb, limitando-se a fragmentos ≥ 1 kb. Foram incluídas nas análises subsequentes CNVs que apareceram nos bancos de dados do CytoscanHD (Affymetrix®, EUA) e do DGV (The Database of Genomic Variants).

4.7 Estimativa da taxa de mutação germinativa em CNVs (TM_{CNV})

A taxa de CNVs *de novo* foi estimada para representar a frequência de formação de CNV por *locus* por geração. No presente estudo foram incluídas somente CNVs *de novo*. A TM_{CNV} foi estimada aplicando-se a equação 1 (DA CRUZ et al., 2008; COSTA et al., 2011):

$$\text{Equação 1}$$
$$TM_{CNV} = \frac{\sum T_{CNV}}{\rho! \times a \times tgh}$$

Onde:

$\sum T_{CNV}$: Tamanho total das CNVs (bp)

$\rho!$: número de meioses (2)

a: bialelia (2)

tgh: tamanho do genoma haplóide ($2,9 \times 10^9$), segundo a montagem da sequência humana de referência (GRCh37/hg19).

A Equação 1 foi aplicada para as CNVp e CNVg. Para se avaliar o impacto acumulado dos ganhos e perdas genômicos, foi analisado o *Burden* das CNVs, que correspondeu à TM_{CNV} total, somando-se as taxas individuais de ganho e perda genômicos.

Para estimar o número de meioses paternas para casos e controles em função da idade dos pais à época da concepção da prole foi utilizada a Equação 2:

Equação 2

$$\text{No. } \rho! = (((\text{IP} \times \text{m}) - (\text{tg} + \text{Iad})) \times \text{d/m}) \times \text{tp!d}$$

Onde:

No. $\rho!$: Número de meioses paternas

IP: Idade paterna (anos)

m: meses/ano

tg: tempo de gestação (meses)

Iad: Média de idade do início da produção de espermatozoides na adolescência, que em humanos é de 12 anos (meses)

d/m: Total de dias no mês

tp!d: Número total de médio de meioses estimadas por dia em humano (25×10^6)

4.8 Análise de LCRs

A investigação de LCRs que flanqueavam as CNVs encontradas foi realizada por meio de busca ativa no banco de dados UCSC Genome Browser (<http://www.genome.ucsc.edu>). Para definir as regiões flanqueadoras foi utilizado um aumento de 100 vezes do tamanho da CNV, sendo consideradas as LCRs com similaridade $\geq 90\%$ de suas sequências de nucleotídeos.

Em seguida, pela plataforma Galaxy (<http://usegalaxy.org>) foi gerada uma tabela com todas as LCRs observadas que flaqueavam cada CNV. Para gerar essa tabela no *Galaxy*, aplicou-se os seguintes parâmetros de análise no *genome browser*:

1. www.genome.ucsc.edu
2. No *genome browser*, anotar a posição da CNV (exemplo: chr21:33,031,597-33,041,570)
3. Selecionar o *zoom out* de 100x
4. Copiar a posição gerada pelo *zoom out*.
5. No ícone tools, selecionar o *table browser*

6. Na tabela selecionar: *clade – mammal; genome – human; assembly – Feb. 2009 (GRCh37/hg19); group – repeats; track – segmental dups; table – genomicSuperDups; position* – colocar a posição gerada pelo *zoom out*; *filter – edit* (no item 7 tem as especificações); *output format – selected fields from primary and related tables – send out put to Galaxy*; selecionar *get output* (no item 8 tem as especificações).
7. *Filter* (na tabela selecionar): *chrom (does); chromStart (in range); chromEnd (in range); name (does); strand (does); fracMatch (>= 0.9000); fracMatchIndel (>= 0.9000)*. O restante dos ícones selecionar *doesn't* ou *ignored*.
8. *GetOutPut* (na tabela selecionar): *chrom; chromStart; chromEnd; name; strand; othersize; fracMatch; fracMatchIndel* – ir para *done with selections*
9. Automaticamente abre uma aba direto para a plataforma *Galaxy*, que vai gerar a tabela com todas as LCRs.

Após gerar os dados de LCRs no *Galaxy*, foram selecionadas as que tinham a maior porcentagem de similaridade e a mesma direção.

4.9 Taxa de Erro Mendeliano

Para cada cromossomo que continha CNV *de novo*, foram analisados erros no padrão de herança mendeliano por meio da análise de trio (filho-mãe-pai). Esta investigação consiste na detecção da taxa de erro mendeliano através de análise de comparação entre filho-mãe, filho-pai e entre o trio. Caso o cromossomo do filho não apresente um padrão de herança mendeliano esperado em comparação com o cromossomo de um dos genitores, significa que o filho não herdou o cromossomo daquele genitor e se neste cromossomo estiver presente um rearranjo, a origem deste rearranjo é do genitor que não apresentou o erro mendeliano.

Para obter a informação da origem parental da região do rearranjo, foi utilizada a ferramenta *Graphs Table*, presente no software ChAS®, que usa os marcadores de SNP para construir os genótipos do filho, da mãe e do pai. Nesta ferramenta, os marcadores de SNP são representados pelo alelo A e alelo B, que simboliza duas possibilidades diferentes para cada marcador de SNP, sendo uma cópia originada da mãe e a outra do pai.

A análise da origem parental do cromossomo que apresenta a CNV *de novo* foi realizada utilizando a coordenada da região da CNV. Esta análise foi feita através da

quantificação da taxa de erro mendeliano parental. Assim, cromossomo parental que apresentou maior quantidade de erro não foi o cromossomo que originou a CNV *de novo*.

4.10 Análise Estatística

O teste de Qui-Quadrado (χ^2) é um recurso para a padronização de dados em uma tabela de contingência que correlaciona as frequências reais das células da tabela com as frequências esperadas das mesmas. Neste estudo este teste foi usado para comparar a frequência de CNVs de ganho e perda flanqueadas por LCR considerando a exposição parental e para comparar a frequência de LCRs em cada cromossomo entre os grupos caso e controle. Este teste foi aplicado também para a comparação da frequência de LCR em cada cromossomo da progênie.

O teste Qui-Quadrado de Pearson foi empregado para verificar a comparação da frequência de CNVs flanqueadas por LCR entre os grupos caso e controle, mas, desconsiderando a exposição parental. Este teste estatístico é empregado a dados categóricos para mensurar quão possível, que qualquer diferença observada aconteça ao acaso. É apropriado para amostras não pareadas.

Análise univariada de variância (ANOVA) é uma técnica estatística para determinar, com base em uma medida dependente, se várias amostras são oriundas de populações com médias iguais. É uma ANOVA em que todas as combinações de todos os níveis de todos os fatores são consideradas diz-se ANOVA fatorial. A ANOVA fatorial foi aplicada para verificar se existe correlação entre o tamanho (kb) da CNV e a frequência de LCR circundando-a.

A Correlação de Spearman é uma medida não paramétrica de correlação de postos, ou seja, dependência estatística entre a classificação de duas variáveis e esse método foi usado para verificar o efeito da meiose paterna à época da concepção dos indivíduos acidentalmente expostos a radiação ionizante pela distribuição da taxa de mutações de CNVs circundada por LCRs.

O teste de Kruskal Wallis é um teste não paramétrico usado para comparar três ou mais dados. Ele avalia a hipótese nula de que todas as amostras possuem funções de distribuição iguais contra a hipótese alternativa de que ao menos duas das amostras possuem

finalidades de distribuição diferentes. Este teste foi utilizado para comparar o tamanho da CNV de acordo com a presença ou ausência de LCR entre os grupos caso e controle.

Para analisar as frequências das CNVs e LCRs em disposição a origem do cromossomo em relação ao controle e a exposição parental foram usado os testes de Qui-quadrado de Pearson.

Todas as análises foram realizadas utilizando o pacote estatístico SPSS® 21.0, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4.11 Monitoramento

Este estudo faz parte do monitoramento genético da população acidentalmente exposta ao Césio-137 em Goiânia-Goiás. A primeira pesquisa observando as consequências genéticas dos radioacidentados do Césio-137 foi de Da Cruz et al. (1994). Desde então foi usado diversas tecnologias para continuar o acompanhamento dessa população (Quadro 3). Este estudo usa dados e informações das análises de Costa (2016), considerou que CNVs *de novo* pode ser usado como biomarcadores potenciais de exposição à radiação ionizante, utilizando 8 marcadores para perda e 15 marcadores para ganho, sendo adequado para a estimativa de taxas de mutação em CNVs, quando se usa uma matriz de SNP de alta densidade. Vale ressaltar a importância do monitoramento genético à longo prazo da população exposta acidentalmente ao Césio-137 para ampliar e indicar marcadores genéticos que também podem ser analisados, o que justifica plenamente a realização do presente estudo.

Quadro 3. Apresentação dos estudos realizados nos indivíduos expostos acidentalmente e ocupacionalmente à radiação ionizante de céσιο-137 e os testes empregados.

Autores	Grupo	Teste	Objetivo
DA CRUZ et al., 1994	Radioacidentados	Teste de Micronúcleo	Contabilizou micronúcleos humanos correlacionando com a idade, tabagismo e dose de céσιο-137 com amostras de sangue colhidas 1 ano após o acidente.
DA CRUZ et al., 1996	Radioacidentados	Método Direto	Estimaram o risco relativo para a população diretamente exposta no acidente.
NATARAJAN et al., 1998	Radioacidentados	Hibridização Fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	Analisaram as vítimas do acidente por hibridação fluorescente <i>in situ</i> e estimaram as frequências de translocação e cromossomos dicêntricos nos linfócitos.
DA CRUZ et al., 1999	Radioacidentados	Teste de micronúcleo e estudos a nível molecular, usando o gene <i>hprt</i>	Monitorarou a saúde de pessoas expostas pelo Céσιο – 137 utilizando o teste do micronúcleo e o gene <i>hprt</i> como parâmetro molecular.
SILVA, 2000	Radioacidentados	Citogenética Convencional e FISH	Usou a citogenética para examinar indivíduos expostos acidentalmente à radiação ionizante de céσιο-137.
CAMPAROTO et al., 2003	Radioacidentados	FISH	Realizou FISH nos linfócitos das vítimas do acidentes coletadas 10 anos após a exposição, buscando a presença de translocações cromossômicas, para testar a possibilidade de realizar avaliação de dose retrospectiva (dosimetria retrospectiva), utilizando a curva de calibração obtida para

				análise de translocação em linfócitos irradiados <i>in vitro</i> .
DA CRUZ et al., 2008	Radioacidentados		Microsatélite	Contabilizou micronúcleos humanos correlacionando com a dose de céσιο-137 recebido.
FLORES, 2008	Exposição Ocupacional		Microsatélite	Aplicou as taxas de mutações germinativas em loci STR de 11 famílias com a exposição ocupacional dos bombeiros e policiais militares à radiação ionizante do céσιο-137.
ARRUDA, 2008	Geração F1 de Radioacidentados		Microsatélite	Testou se a radiação ionizante poderia causar mutações genéticas paternas que são transmitidas a prole masculina.
COSTA, 2010	Geração F1 de Radioacidentados		Microsatélite	Testou se a radiação ionizante poderia causar mutações genéticas na linhagem germinativa.
NUNES, 2011	Radioacidentados		PCR em tempo Real	Determinou a frequência de t(14;18).
COSTA, 2016	Geração F1 de Radioacidentados		CMA baseado em SNP <i>array</i>	Investigou a indução de mutação germinativa na prole de indivíduos expostos acidentalmente à radiação ionizante de Céσιο 137 usando a taxa de mutação em CNVs <i>de novo</i> como biomarcadores de exposição.
SILVA, 2016	Geração F1 de trabalhadores ocupacionalmente expostos		CMA baseado em SNP <i>array</i>	Investigou a indução de mutação germinativa na prole de trabalhadores ocupacionalmente expostos à radiação ionizante de Céσιο 137 usando a taxa de mutação em CNVs <i>de novo</i> como biomarcadores de exposição.

5. Resultados e discussão

Considerando caso e controle foram incluídos os resultados de 40 progenitores, e uma prole de 16 filhos (as) nascidos do grupo exposto e 8 filhos da população não exposta. As médias das idades dos progenitores no período da concepção foram 32,3 e 31,4 para os pais e 26,4 e 29,6 para as mães dos grupos caso e controle, respectivamente. A dose absorvida para o grupo exposto foi de $\leq 0,2$ Gy. Para o grupo controle foram usados 8 trios, ou seja, referindo-se a pai e mãe biológicos e uma criança. E para o grupo caso foram usados 16 trios. As médias da idade da geração F1 foram de 14,5 e 12,3 e a proporção entre homens e mulheres foi de 9/7 e 4/4 para casos e controles, respectivamente (tabela 1 e 2).

Tabela 1. Dados gerais dos grupos caso e controle para as gerações parental e F1 incluídos no estudo sobre a indução de mutação germinativa na prole de indivíduos expostos acidentalmente a doses baixas de radiação ionizante de césio-137.

Grupo	Família	Número CNVp	Número CNVg	Idade Paterna	Idade Materna	Origem Exposição	Idade F1	Sexo F1
Controle	CMA001-1F	39	1	40	36	-	9	Feminino
	CMA005-1F	34	1	22	21	-	9	Masculino
	CMA008-1F	20	1	26	26	-	25	Feminino
	CMA009-1F	32	1	30	31	-	10	Feminino
	CMA016-1F	29	2	42	31	-	5	Feminino
	CMA020-1F	24	3	37	35	-	6	Masculino
	CMA025-1F	27	3	47	36	-	9	Masculino
	F09-3F	19	2	19	21	-	25	Masculino
Caso	F04-2F	18	3	27	27	Paterna	20	Masculino
	F06-2F	26	3	35	26	Paterna	9	Masculino
	F07-1F	26	5	54	24	Materna	19	Masculino
	F07-4F	30	2	56	26	Materna	17	Feminino
	F08-2F	13	5	18	20	Materna	8	Masculino
	F09-2F	9	1	24	26	Ambos	20	Feminino
	F10-2F	16	1	21	24	Materna	2	Feminino
	F12-2F	43	3	31	30	Materna	3	Masculino
	F15-2F	26	0	18	27	Paterna	16	Masculino
	F18-2F	36	11	47	30	Paterna	18	Masculino
	F21-2F	18	2	38	27	Materna	20	Feminino
	F22-2F	42	2	29	31	Materna	20	Feminino
	F22-3F	45	2	32	34	Materna	17	Feminino
	F22-4F	25	3	33	35	Materna	16	Masculino
	FAD-24F	29	4	21	19	Paterna	12	Feminino
	FAD-25F	20	4	18	16	Paterna	15	Feminino

CNVp: Perda ; CNVg: Ganho Fonte: COSTA, 2016

Tabela 2. Dados descritivos dos grupos caso e controle para as gerações parental e F1 e da prole de indivíduos expostos acidentalmente a doses baixas de radiação ionizante de céσιο-137 considerando a ocorrência de LCRs flanqueando as CNVs *de novo*.

Geração	Variáveis	Controles	Casos	p	
Parental	n	16	24	Na	
	Faixa etária à época da concepção	16 a 56	19 a 47	Na	
	Média das idades na concepção (\pm DP)	Pais	32,3 (10,1)	31,4 (12,3)	Na
		Mães	29,6 (6,3)	26,4 (5,1)	Na
	Dose (Gy)	0	0,2	Na	
	F1	n	8	16	Na
Faixa etária		5 a 25	2 a 20	Na	
Média das idades (\pm DP)		12,3 (8,0)	14,5 (6,0)	Na	
Proporção entre os sexos (H/M)		4/4	9/7	Na	
Média populacional de $TM_{CNV_{perda/ger}}$		$2,1 \times 10^{-5}$ ($7,6 \times 10^{-6}$)	$2,7 \times 10^{-5}$ ($1,2 \times 10^{-5}$)	0,29	
Média populacional de $TM_{CNV_{ganho/ger}}$		$3,4 \times 10^{-6}$ ($2,5 \times 10^{-6}$)	$7,3 \times 10^{-6}$ ($4,1 \times 10^{-6}$)	0,07	
Média populacional de $TM_{CNV_{\beta}}$		$2,4 \times 10^{-5}$ ($8,8 \times 10^{-6}$)	$3,4 \times 10^{-5}$ ($1,4 \times 10^{-5}$)	0,01	

DP: Desvio Padrão; H: Homens; M: Mulheres; ger: geração; β : *Burden*.; Na; não se aplica

Fonte: COSTA, 2016

A diferença na distribuição das frequências da TM_{CNV} entre casos e controles pelo teste de Kruskal Wallis mostrou-se estatisticamente significativa para o *burden* da taxa de mutação germinativa em CNVs ($TM_{CNV_{\beta}}$). No entanto, para perdas e ganhos não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,29$ e $p= 0,07$ respectivamente). A junção da taxa de mutação em CNVs de ganho e para perdas foi definida como *Burden*.

Ao longo dos últimos anos, tornou-se viável gerar grandes quantidades de dados de sequência, incluindo os genomas dos pais e seus descendentes. Assim, é possível calcular empiricamente uma taxa de mutação de todo o genoma. Muitos estudos concentraram-se na compreensão da taxa das mutações *de novo* em doenças humanas (CAMPBELL e EICHLER, 2013). Este estudo avaliou a contribuição de CNVs pequenas ($\leq 500\text{kb}$) associadas com LCRs na taxa de mutação germinativa/locos/geração da prole de indivíduos expostos à RI e controles de indivíduos não expostos da mesma população. O presente estudo é pioneiro na investigação de pequenas CNVs flanqueadas por LCRs para estimar a taxa de mutação *de novo* germinativa em uma população humana exposta acidentalmente à radiação ionizante de céσιο-137. O aumento de CNVs *de novo* no *Burden* e não nas perdas e nos ganhos já era esperado, em consequência da natureza randômica da exposição de um sistema biológico ao curso da energia radioativa, seja ela particulada ou em ondas eletromagnéticas.

No estudo de Hehir-Kwa et al. (2011) o aumento da taxa de mutação de $3,6 \times 10^{-2}$ por geração foi observada em indivíduos com deficiência intelectual, e que algumas dessas CNVs *de novo* poderiam explicar o desenvolvimento da condição observadas nesses indivíduos. Kong et al. (2012) observou um aumento na taxa de mutação de CNVs *de novo* de acordo com a idade dos pais, correlacionando o aumento da taxa de transmissão de mutações *de novo* na prole com o avanço da idade dos pais. Existem vários estudos (CAMPBELL e EICHLER, 2013; ITSARA et al., 2010) que se dedicam para estimar as taxas de formação de CNVs na população humana.

As distribuições e tamanhos das CNVs entre os grupos podem ser observadas na Tabela 3. Dentre as CNVs encontradas, nenhuma apresentaram tamanho ≥ 500 kb. A menor CNV de ganho observada foi de 6 kb e a maior 91 kb. Para perdas a CNV de menor tamanho foi 1 kb e a maior 147kb. O tamanho total das CNVs de ganho no grupo caso foi de 487 kb e perda 917 kb no grupo caso. No grupo controle o tamanho total das CNVs de ganho foi de 118 kb e perda 320 kb. O teste de Kruskal Wallis não mostrou diferença significativa entre os ganhos e perdas tanto no grupo caso quanto no controle.

Tabela 3. Distribuição das CNVs com LCR circundando-a entre casos e controles para o estudo do impacto da exposição acidental a doses baixas de RI na frequência de mutações germinativas na progênie de pessoas expostas à radiação ionizante de Cs¹³⁷.

Grupo	CNV	Ganhos	Perdas	Total	<i>p</i>
Caso	Intervalo (kb)	6 a 91	1 a 147	1 a 147	na
	n	13	37	50	na
	Média do tamanho da CNV (kb)	37,5 (±26,26)	24,8 (±34,13)	na	0,22
	ΣT_{CNV} (kb)	487	917	1.404	na
	Intervalo (kb)	6 a 64	1 a 85	1 a 85	na
Controle	n	4	19	23	na
	Média do tamanho da CNV (kb)	29,5 (±26,71)	16,9 (±20,13)	na	0,55
	ΣT_{CNV} (kb)	118	320	438	na

ΣT_{CNV} : Tamanho total das CNVs (kb); na: não se aplica; n: número de CNVs flanqueadas por LCRs

A análise dos dados possibilitou a identificação de 473 e 238 CNVs, para os grupos de casos e controles, respectivamente. Destas CNVs, 50 (10,6%) e 23 (9,7%) estavam flanqueadas por LCRs, para os grupos caso e controle, respectivamente. A Frequência de LCR flanqueando CNVs *de novo* entre os grupos pode ser observada na Tabela 4. Todas as CNVs e LCRs observadas nos grupos do presente estudo foram incluídas nas análises estatísticas. O teste Qui-Quadrado de Pearson indicou que a frequência de CNVs flanqueadas por LCR entre os grupos caso e controle não foi significativamente diferente.

Tabela 4. Comparação da frequência de CNVs flanqueadas por LCR da progênie de controles e casos expostos a doses muito baixas de radiação ionizante de césio-137 em Goiânia (Brasil). Teste de Qui-Quadrado de Pearson.

LCR	Grupos n (%)		Total	p
	Controle	Caso		
CNV Perda				
Ausente	205 (91,5)	385 (91,2)	590 (91,3)	0,90
Presente	19 (8,5)	37 (8,8)	56 (8,7)	
CNV Ganho				
Ausente	10 (71,4)	38 (74,5)	48 (73,8)	0,81
Presente	4 (28,6)	13 (25,5)	17 (26,2)	
Total				
Ausente	215 (90,3)	423 (89,4)	638 (89,7)	0,71
Presente	23 (9,7)	50 (10,6)	73 (10,3)	

p= desvio padrão

Entretanto o teste de Qui-Quadrado comparou a frequência de CNVs de ganho e perda flanqueadas por LCR entre os grupos caso e controle e indicou diferença significativa. Estes dados mostram que CNVs de ganhos estavam frequentemente associadas a LCRs do que CNVs de perdas no grupo caso e controle (Tabela 5).

Tabela 5. Comparação da frequência de LCR de acordo com CNV de ganho e perda da progênie de controles e casos expostos a doses muito baixas de radiação ionizante de césio-137 em Goiânia (Brasil). Teste de Qui-Quadrado.

	LCR		Total n (%)	p
	Ausente n (%)	Presente n (%)		
Controle				
Perda	205 (95,3)	19 (82,6)	224 (94,1)	0,03
Ganho	10 (4,7)	4 (17,4)	14 (5,9)	
Caso				
Perda	385 (91,0)	37 (74,0)	422 (89,2)	<0,001
Ganho	38 (9,0)	13 (26,0)	51 (10,8)	
Total				
Perda	590 (92,5)	56 (76,7)	646 (90,9)	<0,001
Ganho	48 (7,5)	17 (23,3)	65 (9,1)	

p= Qui-Quadrado

Segundo Liu et al. (2011) rearranjos complexos, ou seja, aqueles com mais de um ponto de interrupção, são mais prevalentes nos ganhos de número de cópias do que nas perdas de números de cópia, uma observação que apoia uma atribuição para mecanismos replicativos

na formação de rearranjo complexo. NAHR pode ser o mecanismo predominante quando existem LCRs nas proximidades e diferentes pares podem ser utilizados. Os ganhos de número de cópia mostram maior complexidade do que perdas, consistente com uma grande contribuição de mecanismos replicativos para a formação de CNVs. O genoma é provavelmente mais tolerante para duplicações do que para deleções (GIRIRAJAN et al., 2011).

De acordo com vários pesquisadores (SANKARANARAYANAN, 2006; ITSARA et al., 2009; LIU et al., 2011; GIRIRAJAN et al., 2011; CARVALHO et al., 2011; DITTWALD et al., 2013) existem vários modelos baseados em LCR/NARH para explicar origem de rearranjos, que incluem aqueles entre cromossomos homólogos (intercromossômicos), entre cromátides irmãs (intracromossômicas) e dentro de cromátides únicas (intracromatídico). Dependendo do mecanismo e da orientação das LCRs, a NAHR pode resultar em deleções, duplicações ou inversões. A medida que o indivíduo é exposto à radiação ionizante, as células sofrem danos na replicação do DNA e falhas nesses mecanismos de reparo envolvidos nesse processo podem gerar rearranjos. NAHR fornece evidência de ser o mecanismo de reparo mais frequente quando associado com LCRs em nossos resultados e MMBIR e outros rearranjos dependente de replicação podem estar envolvidos no reparo quando a LCR está ausente na CNV.

Zhang e colaboradores (2009) hipotetizaram que MMBIR pode representar um mecanismo contributivo para rearranjos complexos de diferentes escalas (genômicas, genicas e exônicas). Suas observações apoiam que este mecanismo pode ter um papel importante na formação da CNV. Além disso, ao reavaliar outras evidências experimentais como remoção de exons, foram observadas microhomologias nos pontos de interrupção do rearranjo, um achado que pode ser interpretado como consistente com o mecanismo de MMBIR. Diante disso, MMBIR fornece uma perspectiva inovadora para explorar a evolução do gene e do genoma humano.

Os mecanismos mutacionais das CNVs foram investigados com base nas características da sequência das junções do ponto de ruptura. Terminações bruscas nas junções do ponto de interrupção sugeriu o mecanismo NHEJ. Microhomologia de pontos de interrupção sugeriu o mecanismo de MMBIR ou NHEJ. Os rearranjos mediados por Alu-Alu e mediados por LINE podem ser identificados observando as repetições de Alu e LINE pareadas nas extremidades do ponto de interrupção. As junções localizadas em pares de LCR

podem ser causadas por BIR, um mecanismo de recombinação homóloga para reparar DSBs de uma única extremidade em uma forquilha de replicação. Para duplicações em tandem simples, apenas um dos mecanismos acima foi envolvido em um único evento de mutação. No entanto, para duplicações complexas com mais de uma junção de ponto de interrupção, diferentes mecanismos poderiam estar envolvidos em um evento de mutação (ZHANG et al., 2017).

Na pesquisa de Girirajan et al. (2011) apresentaram uma perspectiva evolutiva das LCRs demonstrando uma maior taxa de CNVs recorrentes nas regiões ricas em duplicações segmentares. Um aspecto interessante em relação à evolução humana tem sido a aparente aceleração da duplicação no ancestral comum dos humanos e dos grandes macacos africanos, demonstrando que essas regiões do genoma são altamente dinâmicas. Além disso, vários genes dentro de LCRs mostram fortes evidências de seleção positiva, e esses genes são altamente variáveis de número de cópias em humanos.

Segundo Dittwald et al. (2013) em seu estudo com pacientes com deficiência intelectual, identificaram que as deleções autossômicas ocorrem aproximadamente duas vezes mais vezes que duplicações recíprocas em gametas masculinos. Este estudo notou que a fração de DNA em LCRs orientada diretamente de forma paráloga flanqueando os *hotspots* de NAHR correlaciona-se fortemente com a frequência de duplicação / duplicação *de novo*.

No estudo de Cooper et al. (2011) a presença de LCRs na orientação direta, demonstrou ser uma distinção fundamental entre *hotspots* ativos e inativos. Este estudo também apontou que as LCRs que flanqueiam os pontos ativos são maiores e apresentam maior identidade de sequência em comparação com *hotspots* inativos.

Para identificar essas regiões potenciais onde NAHR é mais frequente, Bailey et al. (2002) compilaram as regiões abrangentes por LCRs que são >95% semelhantes e >10 kb, separadas por 50 kb a 10 Mb de DNA e criaram um mapa do genoma de *hotspots* de rearranjo prováveis. As LCRs que atendem a esses parâmetros são potenciais a gerar instabilidade genômicas mediadas por NAHR.

No presente estudo, a ANOVA fatorial identificou correlação entre o tamanho (kb) da CNV com a presença de LCR circundando-a. A presença de LCRs estava associada mais frequentemente em CNVs mais longas no grupo caso diferentemente do grupo controle, demonstrando que NAHR é componente constituinte no mecanismo de formação dessas

CNVs da progênie de indivíduos expostos a radiação ionizante. Na figura 6, podem-se observar que o intervalo de confiança em verde (que indica presença de LCR) distingue do azul (que indica ausência de LCR) demonstrando que o reparo de lesão induzidos por radiação ionizante leva reorganização genômica de segmentos maiores, diferentemente do reparo de lesões espontâneas.

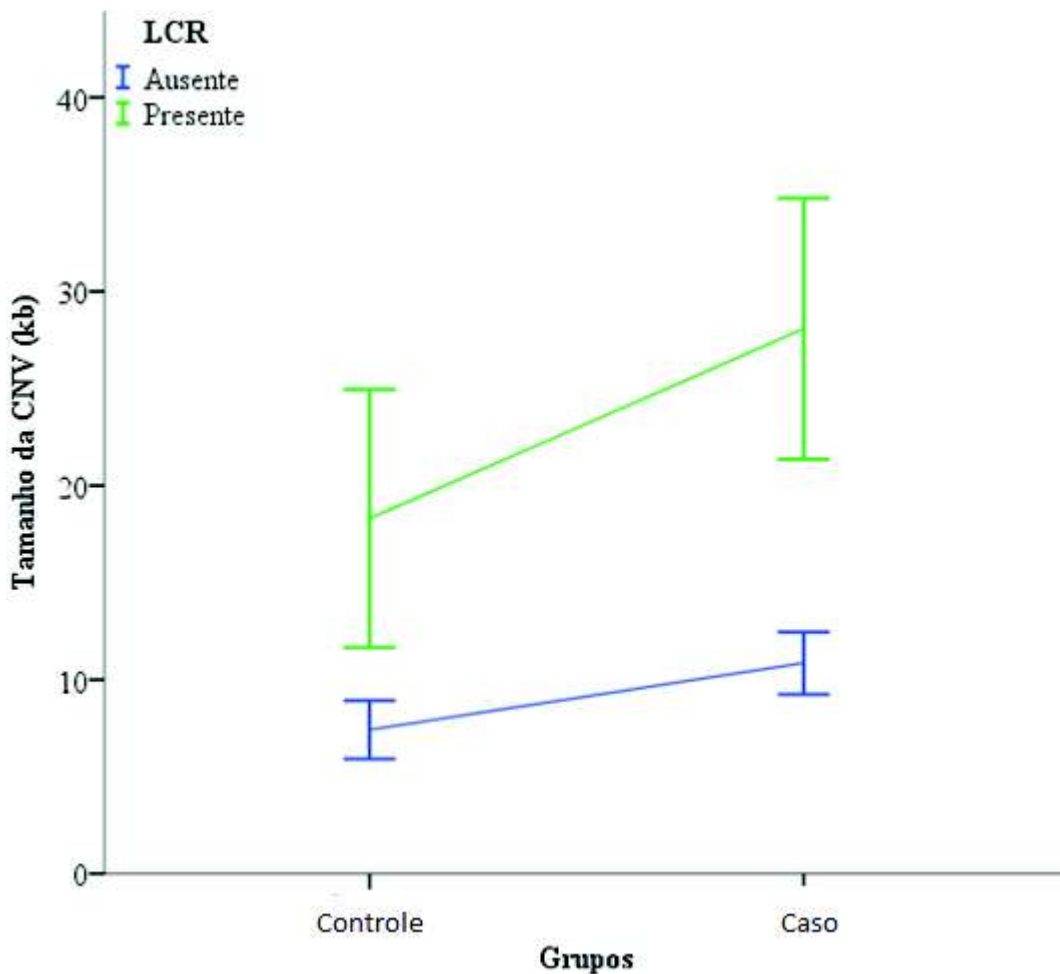


Figura 6. Análise da distribuição do tamanho da CNV de acordo com a presença ou ausência de CNV flanqueada por LCR da progênie de controles e casos expostos a doses muito baixas de radiação ionizante de césio-137 em Goiânia (Brasil). Teste de ANOVA fatorial.

As características particulares das LCRs, como tamanho, porcentagem de identidade de sequência de DNA, orientação, distância entre substratos de reação e mecanismo são fatores importantes que influenciam a "probabilidade" de rearranjo ou instabilidade. LCRs mais longas parecem ser capazes de produzir rearranjos maiores. As LCRs de maior similaridade estão mais frequentemente associadas a CNVs mais longas. NAHR também

parece exigir um tamanho mínimo de identidade de sequência de DNA ininterrupta, isto é, um Segmento de Processamento Eficiente Mínimo (MEPS) para que a recombinação ocorra, provavelmente representando o requisito de homologia mínima para HR (CARVALHO et al., 2011; REDON et al., 2006).

Foi realizado o teste de Correlação de Spearman entre o número de meioses paternas à época da concepção e a taxa de mutação de CNV na geração F1 dos grupos caso e controle (Figura 7). No grupo controle há uma relação positiva entre as taxas de mutações e a meiose paterna, demonstrando que as mutações observadas (58%) na progênie são oriundas da idade paterna. Porém no grupo caso não existe essa analogia, na imagem podemos perceber que a idade paterna explica somente 5% das mutações na progênie. Os homens geralmente contribuem com mutações de ponto e pequenas deleções e duplicações. Este achado pode ser explicado pela dose individual de radiação absorvida pelos pais durante o acidente, que causou a indução de CNVs *de novo* na prole.

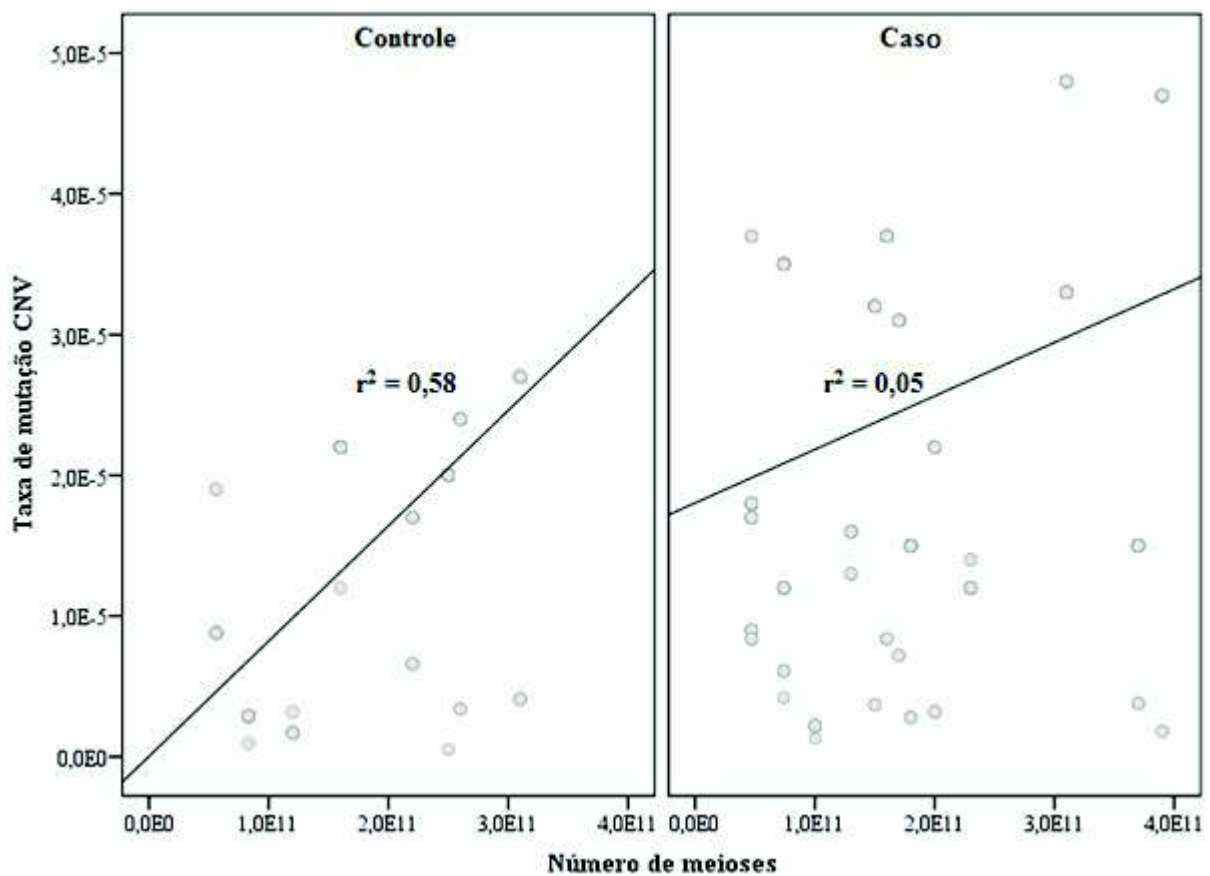


Figura 7. Correlação de Spearman entre o número de meioses à concepção e a taxa de mutações em CNV de controles e casos expostos a doses muito baixas de radiação ionizante de césio-137 em Goiânia (Brasil).

Os estados de células germinativas do ponto de vista dos riscos genéticos de radiação, são as espermatogônias de células estaminais em homens e oócitos imaturos em mulheres. O tempo de ciclo celular para a espermatogonia humana não é conhecido, mas a partir de observações, essas células dividem apenas uma vez por ciclo epitelial germinal de 16 dias, pode-se supor que a duração do ciclo celular pode ser da ordem de cerca de 16 dias. Experimentos com camundongos demonstrou que, a sensibilidade à morte induzida por radiação difere marcadamente entre as células estaminais espermatogonais: as de G0 / G1 são mais sensíveis à morte do que aquelas no modo proliferativo, sugerindo que em altas doses da ordem de alguns Gy (usado na maioria dos experimentos de mutação), as células-tronco proliferantes sobrevivem de forma seletiva. Não se conhece a situação em células espermatogônicas humanas a este respeito (SANKARANARAYANAN, 2006).

Ahmad et al. (2013) analisaram uma população que vive em uma Zona de Radiação Radiação Natural de Alto Nível (HLNRA) ao longo da costa sudoeste de Kerala, Índia. A população deste estudo vive a 20 gerações nesta área recebendo radiação em todos os estágios de desenvolvimento. O resultado mostrou um aumento estatisticamente não significativo na taxa global de mutação das regiões de DNA hipervariável, usando marcadores moleculares microsatélite e minissatélite. Houve um aumento na taxa de mutação na linha germinal paterna em relação a materna, 1,78 vezes maior, embora não estatisticamente significativo. Os marcadores não conduzem a efeitos adversos à saúde em baixas doses de radiação, mas o estudo pode ser de grande importância para melhorar o entendimento do efeito do baixo nível crônico a radiação.

Além da exposição à RI, precisa se levar em conta o envelhecimento natural desta população e hábitos que são prejudiciais à saúde, todos essas situações, aumenta a preocupação e os cuidados no que se refere à prevenção do câncer, diagnóstico precoce e estudos como este, nas gerações futuras desses indivíduos expostos.

A análise das frequências das CNVs e LCRs em disposição a origem do cromossomo em relação ao controle e a exposição parental, usando os testes de Qui-quadrado de Pearson, Razão de verossimilhança e Associação Linear por Linear e não apresentaram diferença significativa (tabela 6). Diante disto foi empregado o teste de Kruskal Wallis para esclarecer quanto de CNVs flanqueadas por LCRs foram transmitidas quando os pais eram expostos a RI comparados ao controle. A transmissão da variação do número de cópias sem LCR flanqueando apresentou diferença significativa contrastando com a presença de LCR.

Realizamos a soma total das CNVs, tanto de perda quanto de ganho, evidenciando que quando o pai foi exposto, o cromossomo paterno foi transmitido com maior frequência em comparação à mãe exposta e ao controle. Quando o cromossomo de origem foi materno, a frequência maior foi do controle e não dos casos. Ao passo que, ambos os pais foram expostos demonstraram uma proporcionalidade entre o cromossomo transmitido paterno e materno (figura 8).

Tabela 6. Análise das Frequências das CNVs e LCRs em disposição a origem do cromossomo em relação ao controle e a exposição parental a doses muito baixas de radiação ionizante de césio-137 em Goiânia (Brasil).

Cromossomo de origem			Exposição parental		
			Controle n (%)	Pai n (%)	Mãe n (%)
Pai	LCR	Ausente	55 (90,2)	62 (87,3)	93 (92,1)
		Presente	6 (9,8)	9 (12,7)	8 (7,9)
		Total	61 (100,0)	71 (100,0)	101 (100,0)
Mãe	LCR	Ausente	66 (91,7)	30 (93,8)	71 (87,7)
		Presente	6 (8,3)	2 (6,3)	10 (12,3)
		Total	72 (100,0)	32 (100,0)	81 (100,0)
Mãe/Pai	LCR	Ausente	94 (92,2)	74 (88,1)	92 (92,9)
		Presente	8 (7,8)	10 (11,9)	7 (7,1)
		Total	102 (100,0)	84 (100,0)	99 (100,0)

Muitos estudos corroboram com este achado, desde o de Haldane em 1930, já se sabe que os pais transmitem mais mutações em comparação com a mãe. O mecanismo de transmissão e o motivo do desequilíbrio da exposição paterna e materna precisa de mais pesquisas.

Um desses estudos é de Adewoye et al. (2015) que encontraram um aumento significativo de oito vezes na frequência de CNVs *de novo* na prole de pais expostos em comparação com descendentes de camundongo controle. Neste estudo foi determinado a origem parental de dez CNVs *de novo* em casos, com todos os que surgiram na linhagem germinativa paterna, demonstrando o aumento da indução de CNV *de novo* por exposição paterna a radiação ionizante. Usando a frequência de CNVs *de novo* encontrados na prole dos pais de controle e irradiados, estimaram a dose de duplicação para a mutação de CNV com 0,45 Gy, um valor próximo dos obtidos em camundongos usando sistemas tradicionais de pontuação de mutação. Entre as 14 mutações de CNV únicas da linhagem germinativa encontradas na prole de machos irradiados, 12 foram deleções e outras 2 foram duplicações.

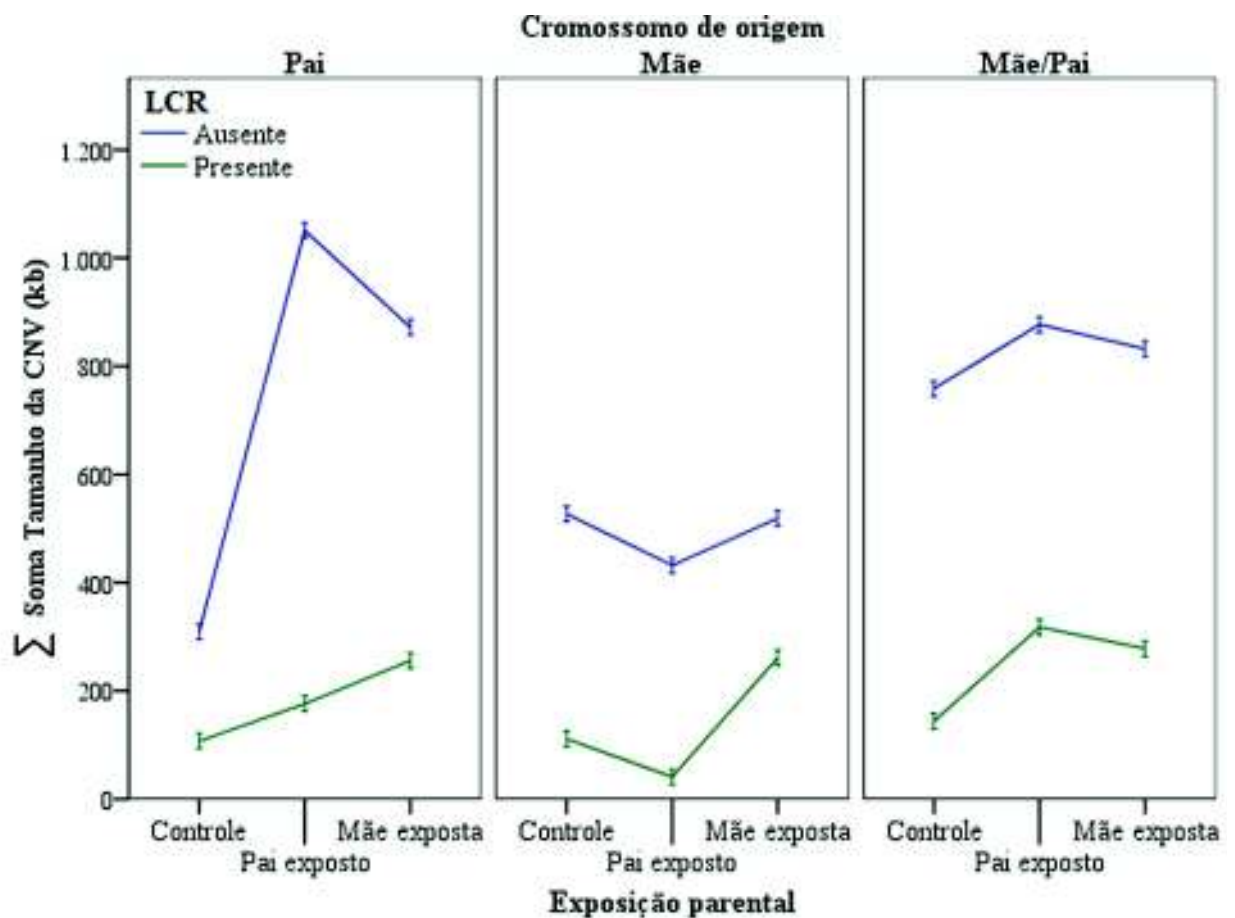


Figura 8. Comparação do tamanho da CNV de acordo com a presença ou ausência de LCR entre os grupos caso e controle à doses muito baixas de radiação ionizante de césio-137 em Goiânia (Brasil). Teste de Kruskal Wallis.

A taxa aumentada de mutação observada na descendência de pai exposto à RI pode ser explicado pelo fenômeno da instabilidade genômica transgeracional. As taxas de mutação na descendência de primeira e segunda geração de camundongos machos expostos a altas doses de RI de todo o corpo são significativamente aumentadas em vários tecidos. Por outro lado, foi relatado também, que na descendência de machos irradiados, a instabilidade transgeracional afeta a frequência de aberrações cromossômicas, bem como mutações em genes codificadores de proteínas e repetição em *tandem* de *loci* de DNA. Em conjunto, esses dados implicam que os efeitos transgeracionais na prole de camundongos irradiados podem ser explicados por uma desestabilização do genoma que se manifesta em muitos, possivelmente em todos os tecidos. Além disso, como os efeitos transgeracionais mostram a segregação não-mendeliana (todos os descendentes nas duas gerações F1 e F2 herdaram o fenótipo de instabilidade), sugeriu-se que esse fenômeno é atribuído a um sinal epigenético que se origina na linhagem germinativa paterna que é transmitida à sua prole (ALI et al.,

2012; KADHIM et al., 2012; ILNYTSKY, e KOVALCHUK. 2011; MERRIFIELD e KOVALCHUK, 2013).

Poucos estudos correlaciona a irradiação materna com a instabilidade transgeracional, o que corrobora com os nossos achados. Ali et al (2012) também confirmou esse achado da sua pesquisa com Repetições de Tandem Simples Expandida (do inglês, *Expanded Simple Tandem Repeat* – ESTR) em camundongos fêmeas, onde demonstraram que, independentemente do estágio de exposição, a irradiada materna não afeta a estabilidade genômica de sua prole. A falta de efeitos transgeracionais da irradiação materna pode ser atribuída a incapacidade das mães passarem o sinal epigenético alterado para a sua prole, pois a exposição *in utero* de machos e fêmeas mostra aumentos aproximadamente semelhantes na taxa de mutação ESTR em sua linhagem germinativa e nos tecidos somáticos, que são principalmente atribuídos à instabilidade genômica em curso que ocorre nos tecidos proliferativos e não há diferenças óbvias nos padrões de indução de mutação na linhagem germinativas de machos e fêmeas irradiadas. A não transmissão da instabilidade genômica das fêmeas expostas, à sua prole pode estar relacionada a eventos iniciais de pós-fertilização, que podem de alguma forma apagar os sinais epigenéticos *de novo* induzidos por radiação.

Ritz et al. (2011) avaliaram camundongos fêmeas expostas a partículas de escape de diesel, antes do período gestacional a vários estágios gestacionais. Neste estudo foram identificados um aumento estatisticamente significativo na taxa de mutação da linhagem germinativa dos machos expostos no útero, mas nenhum efeito sobre as taxas de mutação da linhagem germinativa feminina. Os camundongos F1 foram acasalados com companheiros não expostos para produzir a progênie F2. A descendência dos camundongos machos expostos à radiação no útero exibem instabilidade genética transgeracional, com aumento da mutação germinativa e somáticas. A descendência das fêmeas não apresentou instabilidade genética transgeracional. Os autores justificaram esses resultados pela mutação sem alvo e a mutação não direcionada do alelo feminino que pode resultar de um mecanismo epigenético.

Em conjunto com essas hipóteses a pesquisa de Ilnytsky, e Kovalchuk (2011) apresentaram uma série de estudos que apontam para as origens epigenéticas da instabilidade genômica transgeracional induzida por radiação e predisposição ao câncer. No entanto, os mecanismos exatos permanecem pouco claros. Os autores sugerem que o uso de altas tecnologias como *microarray*, sequenciamento de nova geração e abordagens bioinformáticas

para extrair alterações causais funcionalmente relevantes que influenciam a estabilidade genômica entre gerações.

A idade do parente e o gênero são conhecidos por afetar tanto as substituições de base como a aneuploidia cromossômica. As mutações de substituição de base ocorrem mais frequentemente em homens e mais frequentemente com idade avançada, o que pode ser explicado pelo maior número de divisões celulares pré-meióticas em homens (HEHIR-KWA et al., 2001). Kong et al. (2012) alerta sobre a importância de se levar em consideração a idade paterna para estimar a taxa de mutação mesmo em condições ambientais perigosas

Para comparar a frequência de LCRs em cada cromossomo foi usado o teste de Qui-Quadrado para o grupo casos e controles, e não foi encontrada diferença estatisticamente significativa. Na tabela 7 podemos observar essa comparação e estes dados mostram maior correlação de LCRs nos cromossomos 1, 6, 14, 17 e 19.

Tabela 7. Comparação da frequência de LCR em cada cromossomo da progênie de controles e casos expostos a doses muito baixas de radiação ionizante de césio-137 em Goiânia (Brasil). Teste de Qui-Quadrado.

LCR	Grupos n (%)		p
	Controle	Caso	
Cromossomo 1	4 (21,1)	7 (15,6)	0,59
Cromossomo 2	1 (9,1)	3 (9,1)	0,99
Cromossomo 4	2 (22,2)	2 (8,0)	0,25
Cromossomo 5	1 (7,7)	3 (11,1)	0,74
Cromossomo 6	1 (7,7)	6 (18,2)	0,37
Cromossomo 7	0 (0,0)	1 (3,3)	0,46
Cromossomo 8	1 (5,6)	1 (3,2)	0,69
Cromossomo 9	0 (0,0)	1 (6,7)	0,52
Cromossomo 10	1 (8,3)	1 (3,4)	0,51
Cromossomo 11	0 (0,0)	1 (6,3)	0,38
Cromossomo 12	0 (0,0)	5 (16,1)	0,07
Cromossomo 13	0 (0,0)	2 (10,5)	0,26
Cromossomo 14	2 (20,0)	5 (21,7)	0,91
Cromossomo 15	0 (0,0)	3 (15,8)	0,46
Cromossomo 16	1 (16,7)	1 (9,1)	0,64
Cromossomo 17	4 (44,4)	3 (18,8)	0,17
Cromossomo 19	3 (30,0)	5 (35,7)	0,77
Cromossomo 22	2 (20,0)	0 (0,0)	0,09

p Teste de Qui-Quadrado

Esses achados estão em conformidade com a literatura (IAFRATE et al., 2004; TUZUN et al., 2005; REDON et al., 2006). Foi constatado que a probabilidade de uma LCR

estar associada a uma CNV é maior para as duplicações intracromossômicas do que para as duplicações intercromossômicas e foi altamente correlacionada com o aumento da similaridade de sequência com sua cópia duplicada (TUZUN et al., 2005; REDON et al., 2006). Parece que muitas regiões pericentroméricas, são quiescentes, não mostrando sinais de duplicação recente entre os cromossomos. As regiões subteloméricas também mostram variabilidade no conteúdo de duplicação (BAILEY et al., 2002).

LCRs diretas localizadas em regiões intracromossômicas parecem ter sido responsáveis pelo aumento de ganho genômicos observado neste estudo. Porém mais estudos devem ser realizados para confirmar a localização e região destas LCRs.

A radiação ionizante pode induzir mutações em células somáticas e germinativas de várias espécies estudadas até agora, e, portanto, é improvável que os seres humanos sejam uma exceção. Desde o sequenciamento do genoma humano é conhecido que em indivíduos saudáveis há milhares de polimorfismos de nucleotídeos únicos e numerosas inserções ou deleções que envolvem sequências codificadoras de proteínas. Algumas dessas variações podem ser antigas e neutras ou vantajosas, enquanto outras podem ser bastante novas e podem causar uma carga genética para sua descendência (KODAIRA et al., 2010). Em todo o caso, se entende melhor as consequências da exposição à radiação ionizante quando já se sabe o número de mutações pré-existentes em nosso genoma, e então podemos observar quais foram adicionadas como consequência da exposição à radiação, por isso é interessante notar que observamos esse enriquecimento de CNVs *de novo* flanqueada por LCRs e correlacionamos com o mecanismo de reparo usando a técnica de SNP *array*, fornecendo subsídios para novos estudos e abordagens multicêntricas envolvendo populações humanas expostas aos mais diversos agentes mutagênicos.

6. CONCLUSÃO

A análise do impacto das LCRs sobre a formação de CNVs *de novo* na geração F1 de indivíduos expostos acidentalmente à doses baixas de radiação ionizante de Césio-137 durante o acidente em Goiânia nos permitiram chegar as seguintes conclusões:

- A presença de LCRs esteve associada frequentemente em CNVs mais longa, sugerindo que CNVs originadas a partir de NAHR tendem a ser maiores;
- A Frequência de LCR flanqueando CNVs *de novo* foi 10,6% e 9,7% para os grupos caso e controle respectivamente sugerindo que a exposição do genoma humano a baixas doses de radiação não aumenta significativamente a taxa de reparo mediado por NAHR;
- LCRs estavam significativamente mais associadas as CNVs de ganhos;
- As taxas de mutação germinativa em CNVs da progênie de controles e casos expostos à doses muito baixas de RI foram significativamente diferentes;
- A estimativa da taxa de mutação em CNVs mediadas por LCRs analisada na geração F1 e em seus pais biológicos foi um biomarcador útil na avaliação retrospectiva de exposição parental à RI em populações humanas, sobretudo para a estimativa da taxa de mutação de *Burden*;
- Homens expostos à RI transmitem mais CNVs *de novo* pequenas quando comparado com a transmissão em função da exposição materna e entre controles;
- Os cromossomos 1, 6, 14, 17 e 19 apresentaram uma maior correlação com LCRs;
- O reparo da DSBs no genoma humano parece ser preferencialmente feito pelo mecanismo MMBIR, uma vez que a maioria das CNVs do grupo controle não apresentavam LCRs em sua proximidade. De modo semelhante, a exposição parental a doses baixas de radiação ionizante não alterou significativamente esta relação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEWOYE, A. B.; LINDSAY, S. J.; DUBROVA, Y. E.; & HURLES, M. E. 2015. **The genome-wide effects of ionizing radiation on mutation induction in the mammalian germline.** *Nature communications*, 6, 6684.

AHMAD, S.; KOYA, P. K. M.; SESHADRI, M. 2013. **Effects of chronic low level radiation in the population residing in the high level natural radiation area in Kerala, India: Employing heritable DNA mutation studies.** *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 751(2), 91-95.

ALFARAWATI, S.; FRAGOULI, E.; COLLS, P.; WELLS, D. 2011. **First births after preimplantation genetic diagnosis of structural chromosome abnormalities using comparative genomic hybridization and microarray analysis.** *Human Reproduction*, 26(6), 1560-1574.

ARGUESO, J. L.; WESTMORELAND, J.; MIECZKOWSKI, P. A.; et al. 2008. **Double-strand breaks associated with repetitive DNA can reshape the genome.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(33), 11845-11850.

ALI, H. E. A.; BARBER, R. C.; DUBROVA, Y. E. 2012. **The effects of maternal irradiation during adulthood on mutation induction and transgenerational instability in mice.** *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 732(1), 21-25.

ARLT, M. F.; RAJENDRAN, S.; BIRKELAND, S. R.; et al. 2014. **Copy number variants are produced in response to low-dose ionizing radiation in cultured cells.** *Environmental and molecular mutagenesis*, 55(2), 103-113.

ARMENGOL, L.; NEVADO, J.; SERRA-JUHÉ, C.; et al. 2012. **Clinical utility of chromosomal microarray analysis in invasive prenatal diagnosis.** *Human genetics*, 131(3), 513-523.

ARNAUDEAU, C.; LUNDIN, C.; HELLEDAY, T. 2001. **DNA double-strand breaks associated with replication forks are predominantly repaired by homologous recombination involving an exchange mechanism in mammalian cells.** *Journal of molecular biology*, 307(5), 1235-1245.

- ARRUDA, J. T.; SILVA, D. M.; SILVA, C. C.; et al. 2008. **Homologous recombination between HERVs causes duplications in the AZFa region of men accidentally exposed to cesium-137 in Goiânia.** *Genet Mol Res*, 7(7), 1063-1069.
- AZZAM, E. I.; JAY-GERIN, J. P.; PAIN, D. 2012. **Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury.** *Cancer letters*, 327(1), 48-60.
- BAILEY, J. A.; GU, Z.; CLARK, R. A.; et al. 2002. **Recent segmental duplications in the human genome.** *Science*, 297(5583), 1003-1007.
- BANDAZHEVSKY, Y. I. 2003. **Chronic Cs-137 incorporation in children's organs.** *Swiss Med Wkly*, 133: 488 – 490.
- BARBER, R. C.; HARDWICK, R. J., SHANKS, M. E.; et al. (2009). **The effects of in utero irradiation on mutation induction and transgenerational instability in mice.** *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 664(1), 6-12.
- BARBOSA, Isvânia Maria Serafim da Silva. *Quantificação de micronúcleos em linfócitos de pacientes expostas à radiação gama para a avaliação da dose absorvida.* Dissertação (Mestrado em Tecnologias Energéticas e Nucleares) - Universidade Federal de Pernambuco, 2003.
- BATTAGLIA, A.; DOCCINI, V.; BERNARDINI, L.; et al. 2013. **Confirmation of chromosomal microarray as a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental delay, intellectual disability, autism spectrum disorders and dysmorphic features.** *European Journal of Paediatric Neurology*, 17(6), 589-599.
- BLAKELY, W. F.; MILLER, A. C.; MUDERHWA, J. M.; et al., 2005. **Development and validation of radiation-responsive protein bioassays for biodosimetry applications.** *Armed Forces Radiobiology Research Inst Bethesda Md.*
- BUIZER-VOSKAMP, J. E.; BLAUW, H. M.; BOKS, M. P.; et al. 2013. **Increased paternal age and the influence on burden of genomic copy number variation in the general population.** *Human genetics*, 132(4), 443-450.
- CALLAWAY, E. (2012). **Fathers bequeath more mutations as they age.** *Nature*, 488(7412), 439.

- CAMPAROTO, M. L.; RAMALHO, A. T.; NATARAJAN, A. T.; et al. 2003. **Translocation analysis by the FISH-painting method for retrospective dose reconstruction in individuals exposed to ionizing radiation 10 years after exposure.** *Mutation Research*, 530 1-7.
- CAMPBELL, C. D.; EICHLER, E. E. 2013. **Properties and rates of germline mutations in humans.** *Trends in Genetics*, 29(10), 575-584.
- CAMPBELL, I. M.; GAMBIN, T.; DITTWALD, P.; et al. 2014. **Human endogenous retroviral elements promote genome instability via non-allelic homologous recombination.** *BMC biology*, 12(1), 74.
- CARVALHO, B.; BENGTSSON, H.; SPEED, T. P.; IRIZARRY, R. A. 2006. **Exploration, normalization, and genotype calls of high-density oligonucleotide SNP array data.** *Biostatistics*, 8(2), 485-499.
- CARVALHO, C. M.; ZHANG, F.; LUPSKI, J. R. 2011. **Structural variation of the human genome: mechanisms, assays, and role in male infertility.** *Systems biology in reproductive medicine*, 57(1-2), 3-16.
- CARVALHO, C. M.; LUPSKI, J. R. 2016. **Mechanisms underlying structural variant formation in genomic disorders.** *Nature Reviews. Genetics*, 17(4), 224.
- C.A.R.A. Disponível em < <http://www.cesio137goiania.go.gov.br/>>. Acesso em 16 de Outubro de 2017.
- CHEN, J. M.; COOPER, D. N.; FÉREC, C.; et al. 2010. **Genomic rearrangements in inherited disease and cancer.** *In Seminars in cancer biology* (Vol. 20, No. 4, pp. 222-233). Academic Press.
- CICCIA, A.; ELLEDGE, S. J. 2010. **The DNA damage response: making it safe to play with knives.** *Molecular cell*, 40(2), 179-204.
- COOPER, G. M.; COE, B. P.; GIRIRAJAN, S.; 2011. **A copy number variation morbidity map of developmental delay.** *Nature genetics*, 43(9), 838.
- COSTA, E. O. A; SILVA, D. D. M. E.; Melo, A. V. D; et al. 2010. **The effect of low-dose exposure on germline microsatellite mutation rates in humans accidentally exposed to caesium-137 in Goiânia.** *Mutagenesis*, v. 26, n. 4, p. 651-655.

COSTA, Emília Oliveira Alves. *CNVs de novo como biomarcadores da exposição parental a baixas doses de radiação ionizante de céσιο-137*. Tese (Doutorado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) - Universidade Católica de Brasília, 2016.

COSTES, S. V.; CHIOLO, I.; PLUTH, J. M.; et al. 2010. **Spatiotemporal characterization of ionizing radiation induced DNA damage foci and their relation to chromatin organization**. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 704(1), 78-87.

DA CRUZ, A. D.; MCARTHUR, A. G.; SILVA, C. C.; et al. 1994. **Human micronucleus counts are correlated with age, smoking, and cesium-137 dose in the Goiania (Brazil) radiological accident**. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 313(1), 57-68.

DA CRUZ, A. D.; CURRY, J.; CURADO, M. P.; GLICKMAN, B. W. 1996. **Monitoring *hprt* mutant frequency over time in T-lymphocytes of people accidentally exposed to high doses of ionizing radiation**. *Environmental and molecular mutagenesis*, 27(3), 165-175.

DA CRUZ, A. D.; VOLPE, J. P.; SADDI, V.; et al. 1997. **Radiation risk estimation in human populations: Lessons from the radiological accident in Brazil**. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 373(2), 207-214.

DA CRUZ, A. D.; GLICKMAN, B. W. 1999. **Monitoring the genetic health of humans accidentally exposed to ionizing radiation of cesium-137 in Goiania, Brazil**. (pp. 5705-5705). University of Victoria.

DA CRUZ, A. D.; E SILVA, D. D. M.; DA SILVA, C. C.; et al. 2008. **Microsatellite mutations in the offspring of irradiated parents 19 years after the Cesium-137 accident**. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 652(2), 175-179.

DITTWALD, P.; GAMBIN, T.; SZAFRANSKI, P.; 2013. **NAHR-mediated copy-number variants in a clinical population: mechanistic insights into both genomic disorders and Mendelizing traits**. *Genome research*, 23(9), 1395-1409.

FENECH, M. 2007. **Cytokinesis-block micronucleus cytome assay**. *Nature protocols*, 2(5), 1084-1104.

FLATSCHER-BADER, T.; FOLDI, C. J.; CHONG, S.; et al 2011. **Increased *de novo* copy number variants in the offspring of older males**. *Translational psychiatry*, 1(8), e34.

- FLORES, M.; MORALES, L.; GONZAGA-JAUREGUI, C.; et al. 2007. **Recurrent DNA inversion rearrangements in the human genome.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(15), 6099-6106.
- FLORES, Bráulio Cançado. *Monitoramento genético retrospectivo de população ocupacionalmente exposta à radiação ionizante utilizando marcadores STR.* Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Católica de Goiás, 2008.
- FRY, R. J. M.; FRY, S. A. 1990. **Health effects of ionizing radiation.** *Medical Clinics of North America*, 74(2), 475-488.
- GIRIRAJAN, S.; CAMPBELL, C. D.; EICHLER, E. E. 2011. **Human copy number variation and complex genetic disease.** *Annual review of genetics*, 45, 203-226.
- GORMAN, T.; DROPKIN, J.; KAMEN, J.; et al. 2014. **Controlling health hazards to hospital workers: A reference guide.** *NEW SOLUTIONS: A Journal of Environmental and Occupational Health Policy*, 23(1_suppl), 1-169.
- GRANDJEAN, P. 1995. **Biomarkers in epidemiology.** *Clinical chemistry*, 41(12), 1800-1803.
- GRIFFITHS, A. J.; WESSLER, S. R.; CARROL, S. B.; DOEBLEY, J. **Introdução à genética.** Rio de Janeiro; Guanabara Koogan, 2013.
- GU, W.; ZHANG, F.; LUPSKI, J. R. 2008. **Mechanisms for human genomic rearrangements.** *Pathogenetics*, 1(1), 4.
- HASTINGS, P. J.; IRA, G.; LUPSKI, J. R. (2009). **A microhomology-mediated break-induced replication model for the origin of human copy number variation.** *PLoS genetics*, 5(1), e1000327.
- HARPER, J. V.; ANDERSON, J. A.; O'NEILL, P. 2010. **Radiation induced DNA DSBs: contribution from stalled replication forks?.** *DNA repair*, 9(8), 907-913.
- HEHIR-KWA, J. Y.; RODRÍGUEZ-SANTIAGO, B.; VISSERS, L. E.; et al. 2011. **De novo copy number variants associated with intellectual disability have a paternal origin and age bias.** *Journal of medical genetics*, 48(11), 776-778.

- HILLMAN, S. C.; MCMULLAN, D. J.; HALL, G.; et al. 2013. **Use of prenatal chromosomal microarray: prospective cohort study and systematic review and meta-analysis.** *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 41(6), 610-620.
- HOOD, S. L.; COMAR, C. L. 1953. **Metabolism of cesium-137 in rats and farm animals.** *Archives of biochemistry and biophysics*, 45(2), 423-433.
- IAFRATE, A. J.; FEUK, L.; RIVERA, M. N.; et al 2004. **Detection of large-scale variation in the human genome.** *Nature genetics*, 36(9), 949.
- ILNYTSKYY, Y.; KOVALCHUK, O. 2011. **Non-targeted radiation effects—an epigenetic connection.** *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 714(1), 113-125.
- INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **The Radiological Accident in Goiânia.** Vienna: ©IEAE, 1988.
- INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment. A Manual.** Technical reports series, ISSN 0074–1914 ; no. 405. Vienna: ©IEAE, 2001.
- INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies.** Vienna: ©IEAE, 2011.
- ITSARA, A.; COOPER, G. M.; BAKER, C.; et al. 2009. **Population analysis of large copy number variants and hotspots of human genetic disease.** *The American Journal of Human Genetics*, 84(2), 148-161.
- JAAKKO PÖYRY ENGENHARIA LTDA. 1994. **Depósito Definitivo dos Rejeitos Radioativos oriundos do Acidente Radiológico com 137Cs ocorrido em Goiânia/Goiás - Estudo de Impacto Ambiental.** *EIA/RIMA*, São Paulo.
- KADHIM, M.; SALOMAA, S.; WRIGHT, E.; et al. 2013. **Non-targeted effects of ionising radiation—implications for low dose risk.** *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 752(2), 84-98.
- KASPAREK, T. R.; HUMPHREY, T. C. 2011. **DNA double-strand break repair pathways, chromosomal rearrangements and cancer.** *In Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 22, No. 8, pp. 886-897). Academic Press.

- KEARNEY, H. M.; THORLAND, E. C.; BROWN, K. K.; et al. 2011. **American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants.** *Genetics in Medicine*, 13(7), 680.
- KLUG, W. S.; CUMMINGS, M. R.; SPENCER, C. A.; et al. **Concepts of genetics** (pp. 463-464). Pearson. 2009.
- KODAIRA, M.; IZUMI, S.; TAKAHASHI, N.; NAKAMURA, N. 2004. **No evidence of radiation effect on mutation rates at hypervariable minisatellite loci in the germ cells of atomic bomb survivors.** *Radiation research*, 162(4), 350-356.
- KODAIRA, M.; RYO, H.; KAMADA, N.; et al. 2010. **No evidence of increased mutation rates at microsatellite loci in offspring of A-bomb survivors.** *Radiation research*, 173(2), 205-213.
- KONG, A.; FRIGGE, M. L.; MASSON, G.; et al. 2012. *Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk.* *Nature*, 488(7412), 471.
- KOSZUL, R.; FISCHER, G. 2009. **A prominent role for segmental duplications in modeling eukaryotic genomes.** *Comptes rendus biologiques*, 332(2), 254-266.
- LEGGETT, R.W; WILLIAM, L. R; MELO, D. R; LIPSZTEIN, J. L. 2003. **A physiologically based biokinetic model for cesium in the human body.** *The Science of the Total Environment*, 317, 235–255.
- LESTAEVEL, P.; RACINE, R.; BENSOUSSAN, H.; et al. 2010. **Césium 137: propriétés et effets biologiques après contamination interne.** *Médecine Nucléaire*, 34(2), 108-118.
- LIANG, Q.; CONTE, N.; SKARNES, W. C.; BRADLEY, A. 2008. **Extensive genomic copy number variation in embryonic stem cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(45), 17453-17456.
- LIU, P.; LACARIA, M.; ZHANG, F.; et al., 2011. **Frequency of nonallelic homologous recombination is correlated with length of homology: evidence that ectopic synapsis precedes ectopic crossing-over.** *The American Journal of Human Genetics*, 89(4), 580-588.
- LIU, P.; EREZ, A.; NAGAMANI, S. C. S.; et al. 2011. **Chromosome catastrophes involve replication mechanisms generating complex genomic rearrangements.** *Cell*, 146(6), 889-903.

- LIU, P.; CARVALHO, C. M.; HASTINGS, P. J.; & LUPSKI, J. R. 2012. **Mechanisms for recurrent and complex human genomic rearrangements.** *Current opinion in genetics & development*, 22(3), 211-220.
- LU, X.; SHAW, C. A.; PATEL, A.; et al. 2007. **Clinical implementation of chromosomal microarray analysis: summary of 2513 postnatal cases.** *PLoS One*, 2(3), e327.
- LUNDIN, C.; ERIXON, K.; ARNAUDEAU, C.; et al. 2002. **Different roles for nonhomologous end joining and homologous recombination following replication arrest in mammalian cells.** *Molecular and cellular biology*, 22(16), 5869-5878.
- MANI, R. S.; CHINNAIYAN, A. M. 2010. **Triggers for genomic rearrangements: insights into genomic, cellular and environmental influences.** *Nature Reviews Genetics*, 11(12), 819.
- MANNING, M.; HUDGINS, L. 2010. **Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities.** *Genetics in Medicine*, 12(11), 742.
- MARI, P. O.; FLOREA, B. I.; PERSENGIEV, S. P.; et al. 2006. **Dynamic assembly of end-joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(49), 18597-18602.
- MCGILLIVRAY, G.; ROSENFELD, J. A.; MCKINLAY GARDNER, R. J.; GILLAM, L. H. 2012. **Genetic counselling and ethical issues with chromosome microarray analysis in prenatal testing.** *Prenatal diagnosis*, 32(4), 389-395.
- MCGOWAN-JORDAN, J.; SIMONS, A.; SCHMID, M. 2016. **International System for Human Cytogenomic Nomenclature (ISCN).**
- MERRIFIELD, M.; KOVALCHUK, O. 2013. **Epigenetics in radiation biology: a new research frontier.** *Frontiers in genetics*, 4, 40.
- MILLER, D. T.; ADAM, M. P.; ARADHYA, S.; et al. 2010. **Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies.** *The American Journal of Human Genetics*, 86(5), 749-764.

- MLADENOV, E.; ILIAKIS, G. 2011. **Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways.** *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 711(1), 61-72.
- MOSSE, I. B. 2012. **Genetic effects of ionizing radiation e some questions with no answers.** *Journal of Environmental Radioactivity*. 112, 70e75
- NAKAMURA, N.; SUYAMA, A.; NODA, A.; KODAMA, Y. 2013. **Radiation effects on human heredity.** *Annual review of genetics*, 47, 33-50.
- NATARAJAN, A.T.; SANTOS S.J.; DARROUDI F.; et al. 1998. **¹³⁷Cesium-induced chromosome aberrations analyzed by fluorescence in situ hybridization: eight years follow up of the Goiânia radiation accident victims.** *Mutation Research*. 400 299–312
- NOUAILHETAS, Y. **Radiações Ionizantes e a vida.** Rio de Janeiro: Comissão Nacional de Energia Nuclear. 2005.
- NOWAK, D.; HOFMANN, W. K.; KOEFFLER, H. P. 2009. **Genome-wide mapping of copy number variations using SNP arrays.** *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 36(4), 246-251.
- NUNES, Hugo Freire. *Avaliação da translocação t(14;18) MBR em indivíduos expostos a baixas doses de radiação de ¹³⁷CsCl em Goiânia, Goiás, Brasil.* Dissertação (Mestrado em Genética) - Pontifícia Universidade Católica de Goiás, 2011.
- OKUNO, E. 2013. **Efeitos biológicos das radiações ionizantes: acidente radiológico de Goiânia.** *Estudos Avançados*, 27(77), 185-200.
- OKUNO, E.; YOSHIMURA, E. M. **Física das radiações.** São Paulo: Oficina de Textos, 2016.
- OLIVEIRA, A. R.; BRANDÃO-MELLO, C. E.; VALVERDE, N. J. L.; et al. 1991. **Localized lesions induced by ¹³⁷Cs during the Goiânia accident.** *Health Physics* Vol. 60, No. 1, pp. 25-29.
- PERNOT, E.; HALL, J.; BAATOUT, S.; et al. 2012. **Ionizing radiation biomarkers for potential use in epidemiological studies.** *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 751(2), 258-286.

PINTO, Irene Plaza. *A importância dos resultados do CMA no aconselhamento genético das famílias com probandos apresentando deficiência intelectual*. Dissertação (Mestrado em Genética) - Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2015.

REDON, R.; ISHIKAWA, S.; FITCH, K. R.; et al. 2006. **Global variation in copy number in the human genome**. *Nature*, 444(7118), 444.

RIGGS, E. R.; WAIN, K. E.; RIETHMAIER, D.; et al. 2014. **Chromosomal microarray impacts clinical management**. *Clin Genet*, 85: 147–153.

RITZ, C.; RUMINSKI, W.; HOUGAARD, K. S.; et al. (2011). **Germline mutation rates in mice following in utero exposure to diesel exhaust particles by maternal inhalation**. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 712(1), 55-58.

ROBERTS, L. 1987. **Radiation accident grips Goiania**. *Science*, 238(4830), 1028-1032.

ROMM, H.; WILKINS, R. C.; COLEMAN, C. N.; et al. 2011. **Biological Dosimetry by the Triage Dicentric Chromosome Assay: Potential Implications for Treatment of Acute Radiation Syndrome in Radiological Mass Casualties**. *Radiation Research*, 175, 397–404

ROZENTAL, J. J.; CUNHA, P.; OLIVEIRA, C. A. 1989. **Aspects of the initial and recovery phases of the radiological accident in Goiania**. In *Proc. Int. Symp. Recovery Operations in the Event of a Nuclear Accident or Radiological Emergency*, IAEA, Vienna (pp. 593-597).

RYAN, P. B.; BURKE, T. A.; HUBAL, E. A. C.; et al. 2007. **Using biomarkers to inform cumulative risk assessment**. *Environmental health perspectives*, 115(5), 833.

SANKARANARAYANAN, K.; WASSOM, J. S. 2005. **Ionizing radiation and genetic risks XIV. Potential research directions in the post-genome era based on knowledge of repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in mammalian somatic cells and the origin of deletions associated with human genomic disorders**. *Mutat Res.*, v. 578, n. 1-2, p. 333-370.

SANKARANARAYANAN, K. 2006. **Estimation of the genetic risks of exposure to ionizing radiation in humans: current status and emerging perspectives**. *Journal of radiation research*, 47(Suppl_B), B57-B66.

- SARTORI, P., SEPEL, L., & LORETO, E. **Radiações: Moléculas e Genes-Atividades didático-experimentais**, Ed. *Sociedade Brasileira de Genética*, ISBN, 978-85, 2008.
- SCHAAF, C. P.; WISZNIEWSKA, J.; BEAUDET, A. L. 2011. **Copy number and SNP arrays in clinical diagnostics**. *Annual review of genomics and human genetics*, 12, 25-51.
- SHRIVASTAV, M.; MILLER, C. A.; DE HARO, L. P.; et al. 2009. **DNA-PKcs and ATM co-regulate DNA double-strand break repair**. *DNA repair*, 8(8), 920-929.
- SILVA, Cláudio Carlos da. *Avaliação Citogenética de Indivíduos Expostos Acidentalmente à Radiação Ionizante de Césio-137 em Goiânia (Brasil)*. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Universidade Federal de Goiás, 2000.
- SILVA, Juliana Ferreira da. *Mutações Germinativas na Prole de Pessoas Expostas Ocupacionalmente à Radiação Ionizante de Césio-137*. Dissertação (Mestrado em Genética) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, 2016.
- STANKIEWICZ, P.; LUPSKI, J. R. 2002. **Molecular-evolutionary mechanisms for genomic disorders**. *Current opinion in genetics & development*, 12(3), 312-319.
- STANKIEWICZ, P.; LUPSKI, J. R. 2002. **Genome architecture, rearrangements and genomic disorders**. *TRENDS in Genetics*, 18(2), 74-82.
- STANKIEWICZ, P., BEAUDET, A. L. 2007. **Use of array CGH in the evaluation of dysmorphology, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation**. *Current opinion in genetics & development*, 17(3), 182-192.
- STANKIEWICZ, P.; LUPSKI, J. R. 2010. **Structural Variation in the Human Genome and its Role in Disease**. *Ann. Rev. Med.*, v. 61, p. 437–455.
- TAUHATA, L.; SALATI, I. P. A.; DI PRINZIO, R.; DI PRINZIO, M. A. R. R. Radioproteção e Dosimetria: Fundamentos-9ª revisão novembro/2013-Rio de Janeiro-IRD. CNEN. 345p.
- TURNER, D. J.; MIRETTI, M.; RAJAN, D.; et al. (2008). **The rates of *de novo* meiotic deletions and duplications causing several genomic disorders in the male germline**. *Nature genetics*, 40(1), 90.

- TUZUN, E.; SHARP, A. J.; BAILEY, J. A.; et al 2005. **Fine-scale structural variation of the human genome.** *Nature genetics*, 37(7), 727.
- VIEIRA, S. D. A. 2013. **Césio-137, um drama recontado.** *Estudos Avançados*, 27(77), 217-236.
- WAPNER, R. J.; MARTIN, C. L.; LEVY, B.; et al. 2012. **Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis.** *New England Journal of Medicine*, 367(23), 2175-2184.
- WEIER, H. U. G.; LUCAS, J. N.; POGGENSEE, M.; et al. 1991. **Two-color hybridization with high complexity chromosome-specific probes and a degenerate alpha satellite probe DNA allows unambiguous discrimination between symmetrical and asymmetrical translocations.** *Chromosoma*, 100(6), 371-376.
- WILKINS, R. C.; ROMM, H.; KAO, T. C.; et al. 2008. **Interlaboratory comparison of the dicentric chromosome assay for radiation biodosimetry in mass casualty events.** *Radiation research*, 169(5), 551-560.
- World Health Organization. **Biomarkers and risk assessment: concepts and principles.** Geneva; WHO Library Cataloguing, 1993.
- Wright, E. G. 2010. **Manifestations and mechanisms of non-targeted effects of ionizing radiation.** *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 687(1), 28-33.
- YANG, L.; LUQUETTE, L. J.; GEHLENBORG, N.; et al. 2013. **Diverse mechanisms of somatic structural variations in human cancer genomes.** *Cell*, 153(4), 919-929.
- YASUNARI, T. J.; STOHL, A.; HAYANO, R. S.; et al 2011. **Cesium-137 deposition and contamination of Japanese soils due to the Fukushima nuclear accident.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(49), 19530-19534.
- ZARREI, M.; MACDONALD, J. R.; MERICO, D.; SCHERER, S. W. 2015. **A copy number variation map of the human genome.** *Nature Reviews. Genetics*, 16(3), 172.
- ZHANG, F.; KHAJAVI, M.; CONNOLLY, A. M.; et al. 2009. **The DNA replication FoSTeS/MMBIR mechanism can generate genomic, genic and exonic complex rearrangements in humans.** *Nature genetics*, 41(7), 849.

ZHANG, F.; SEEMAN, P.; LIU, P.; et al. 2010. **Mechanisms for nonrecurrent genomic rearrangements associated with CMT1A or HNPP: rare CNVs as a cause for missing heritability.** *The American Journal of Human Genetics*, 86(6), 892-903.

ZHANG, L.; WANG, J.; ZHANG, C.; et al. 2017. **Efficient CNV breakpoint analysis reveals unexpected structural complexity and correlation of dosage-sensitive genes with clinical severity in genomic disorders.** *Human molecular genetics*, 26(10), 1927-1941.

8. ANEXO

ANEXO I

QUESTIONÁRIO PARA O MONITORAMENTO DOS INDIVÍDUOS ACIDENTALMENTE E OCUPACIONALMENTE EXPOSTOS AO CÉSIO-137

Família n°: _____

Iniciais: _____

DADOS

Nome: _____

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

Documento de Identidade: _____ Org. Exp. _____

CPF: _____ Profissão: _____

Estado Civil: _____

Cônjuge: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ Estado: _____

CEP: _____ Telefone: _____ Celular: _____

Naturalidade: _____ Nacionalidade: _____

Filiação:

Pai: _____

Mãe: _____

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

() Sim Não ()

Por quanto tempo? _____

Como se aproximou?

Obervação:

2. Possui filhos: Sim Não **Quantos?** _____
Antes ou depois do acidente? _____
Com quantas mulheres ou homens? _____

Nome(s) do filho(s):

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____

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

Sim Não

Se sim, qual distúrbio? _____

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 há quanto tempo? _____

10. Trabalha:

sim não

Se sim, há quanto tempo e qual profissão? _____

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA MENORES DE 18 ANOS

Seu filho (a) está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), do Projeto de Pesquisa sob o título **Indução de CNVs na geração F1 de indivíduos expostos ocupacionalmente e acidentalmente à radiação ionizante do Césio-137 avaliada pelo CMA (*Chromosomal Microarray*)**. Meu nome é Aparecido Divino da Cruz, sou o pesquisador responsável, doutor em Biologia Molecular. Após receber os esclarecimentos e as informações a seguir, no caso de aceitar que seu filho(a) possa fazer parte do estudo, este documento deverá ser assinado em duas vias e em todas as páginas, sendo a primeira via de guarda e confidencialidade do Pesquisador responsável e a segunda via ficará sob sua responsabilidade para quaisquer fins. Em caso de recusa, o (a) menor não será penalizado (a) de forma alguma. Em caso de dúvida **sobre a pesquisa**, você poderá entrar em contato com o pesquisador responsável **Aparecido Divino da Cruz**, nos telefones: (62) 3946-1385/ (62) 3946-1443, ou através do e-mail **acruz@pucgoias.edu.br**. Em caso de dúvida **sobre a ética aplicada a pesquisa**, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, telefone: (62) 3946-1512, localizado na Avenida Universitária, N° 1069, Setor Universitário, Goiânia Goiás.

I. Este projeto terá uma duração de 4 anos, com o objetivo de avaliar e monitorar a saúde genética dos indivíduos expostos ao Césio-137, e será feita uma análise das alterações genéticas em diversos genes usando uma técnica de última geração, denominada de Análise Cromossômica por Microarranjo. Não será feito a inclusão dos participantes como grupo controle, pois isto não se aplica ao projeto.

II. A participação do seu filho(a) na pesquisa inclui: a) responder um questionário com perguntas relacionadas ao momento do acidente com o Césio-137 e pós acidente; b) doação de 10 mL de amostra de sangue.

III. A coleta de sangue será realizada no Núcleo de Pesquisas Replicon da PUC-Goiás por profissionais habilitados para essa função.

IV. O sangue coletado será armazenado no laboratório Replicon da PUC-Goiás por um período de 10 anos, na forma de biorepositório (nos termos da Resolução CNS 441/11) para eventuais necessidades de re-testes das amostras quando necessários. Ficarão sob a responsabilidade do pesquisador Aparecido Divino da Cruz e este material poderá ser retirado

a qualquer momento pelo participante do estudo. Caso haja a possibilidade do participante ser incluído em pesquisas futuras, o mesmo deverá assinar um novo TCLE.

V. O descarte do material ocorrerá segundo as normas e regulamento institucional.

VI. Os riscos decorrentes da participação do seu filho(a) na pesquisa são mínimos, próprios de qualquer coleta de sangue, que são, dor no local e possível aparecimento de manchas roxas (hematomas). Caso ocorra qualquer intercorrência devido a coleta de sangue (crise nervosa, com dificuldade respiratória, aumento da pressão arterial, sudorese intensa), o (a) menor será encaminhado imediatamente ao serviço de assistência à saúde gratuita e integral para dano direto ou indireto, imediato ou tardio em decorrência da participação na pesquisa.

VII. Os benefícios referentes à coleta de sangue serão os resultados obtidos após a realização da técnica Análise Cromossômicos por Microarranjo que trará informações importantes na identificação de alterações genéticas após a contaminação com o Césio - 137) nos seus descendentes.

VIII. O senhor (a) tem a opção de tomar conhecimento ou não dos resultados genéticos do seu filho (a). Se for identificada alguma alteração genética, caso você queira, poderá ser encaminhado ao aconselhamento genético, que é um procedimento de assistência gratuita oferecida pela equipe do projeto.

IX. A participação no estudo não acarretará custos para o seu filho (a) e também não haverá nenhuma remuneração financeira. Os gastos necessários para a participação na pesquisa serão assumidos pelos pesquisadores. Fica também garantida indenização em casos de danos comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial (justiça comum).

X. Seu filho (a) será esclarecido (a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Seu filho (a) é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento.

XI. Se depois de consentir com a participação da criança no estudo, o Sr. (a) tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem nenhum prejuízo a sua pessoa ou à criança.

XII. A participação de seu filho(a) 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.

ANEXO III

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), do Projeto de Pesquisa sob o título **Indução de CNVs na geração F1 de indivíduos expostos ocupacionalmente e acidentalmente à radiação ionizante do Césio-137 avaliada pelo CMA (*Chromosomal Microarray*)**. Meu nome é Aparecido Divino da Cruz, sou o pesquisador responsável, doutor em Biologia Molecular. Após receber os esclarecimentos e as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, este documento deverá ser assinado em duas vias e em todas as páginas, sendo a primeira via de guarda e confidencialidade do Pesquisador responsável e a segunda via ficará sob sua responsabilidade para quaisquer fins. Em caso de recusa, você não será penalizado (a) de forma alguma. Em caso de dúvida **sobre a pesquisa**, você poderá entrar em contato com o pesquisador responsável **Aparecido Divino da Cruz**, nos telefones: (62) 3946-1385/ (62) 3946-1443, ou através do e-mail **acruz@pucgoias.edu.br**. Em caso de dúvida **sobre a ética aplicada a pesquisa**, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, telefone: (62) 3946-1512, localizado na Avenida Universitária, N° 1069, Setor Universitário, Goiânia Goiás.

I. Este projeto terá uma duração de 4 anos, com o objetivo de avaliar e monitorar a saúde genética dos indivíduos expostos ao Césio-137, e será feito uma análise das alterações genéticas em diversos genes usando uma técnica de última geração, denominada de Análise Cromossômica por Microarranjo. Não será feito a inclusão dos participantes como grupo controle, pois isto não se aplica ao projeto.

II. A sua participação na pesquisa inclui: a) responder um questionário com perguntas relacionadas ao momento do acidente com o Césio-137 e pós acidente; b) doação de 10 mL de amostra de sangue.

III. A coleta de sangue será realizado no Núcleo de Pesquisas Replicon da PUC-Goiás por profissionais habilitados para essa função.

IV. O sangue coletado será armazenado no laboratório Replicon da PUC-Goiás por um período de 10 anos, na forma de biorepositório (nos termos da Resolução CNS 441/11) para eventuais necessidades de re-testes das amostras quando necessários. Ficarão sob a responsabilidade do pesquisador Aparecido Divino da Cruz e este material poderá ser retirado

a qualquer momento pelo participante do estudo. Caso haja a possibilidade do participante ser incluído em pesquisas futuras, o mesmo deverá assinar um novo TCLE.

V. O descarte do material ocorrerá segundo as normas e regulamento institucional.

VI. Os riscos decorrentes da sua participação na pesquisa são mínimos, próprios de qualquer coleta de sangue, que são, dor no local e possível aparecimento de manchas roxas (hematomas). Caso ocorra qualquer intercorrência devido a coleta de sangue (crise nervosa, com dificuldade respiratória, aumento da pressão arterial, sudorese intensa), o participante será encaminhado imediatamente ao serviço de assistência à saúde gratuita e integral para dano direto ou indireto, imediato ou tardio em decorrência da sua participação na pesquisa.

VII. Os benefícios referentes à coleta de sangue serão os resultados obtidos após a realização da técnica Análise Cromossômicos por Microarranjo que trará informações importantes na identificação de alterações genéticas após a contaminação com o Césio - 137).

VIII. O senhor (a) tem a opção de tomar conhecimento ou não dos resultados genéticos. Se for identificada alguma alteração genética, caso você queira, poderá ser encaminhado ao aconselhamento genético, que é um procedimento de assistência gratuita oferecida pela equipe do projeto.

IX. A participação no estudo não acarretará custos para você e também não haverá nenhuma remuneração financeira. Os gastos necessários para sua participação na pesquisa serão assumidos pelos pesquisadores. Fica também garantida indenização em casos de danos comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial (justiça comum).

X. 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.

XI. 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.

XII. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas a sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Todos os dados que permitam a identificação pessoal serão mantidos em sigilo profissional e científico. Sendo-lhe garantido que todos os resultados obtidos serão utilizados somente para estudos científicos e não irão prejudicar qualquer tratamento que o participante esteja sendo submetido (a).

Anexo IV

RESOLUÇÃO CNS Nº 441, DE 12 DE MAIO DE 2011.

O Plenário do Conselho Nacional de Saúde, em sua Ducentésima Vigésima Primeira Reunião Ordinária, realizada nos dias 11 e 12 de maio de 2011, no uso de suas competências regimentais e atribuições conferidas pela Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, pela Lei nº 8.142, de 28 de dezembro de 1990, e pelo Decreto nº 5.839, de 11 de julho de 2006, e.

Considerando a necessidade de atualizar a complementação da regulamentação da Resolução CNS nº 196/96 no que diz respeito ao armazenamento e à utilização de material biológico humano com finalidade de pesquisa;

Considerando a importância da utilização de material biológico humano para o desenvolvimento das ciências da saúde;

Considerando os subsídios advindos do Sistema EP/CONEP e a experiência acumulada na análise dos projetos de pesquisas que envolvem material biológico humano;

Considerando a necessidade de ser observada a proteção dos Direitos Humanos, das liberdades fundamentais e do respeito à dignidade humana na coleta, depósito, armazenamento, utilização e descarte de material biológico humano, resolve:

Art. 1º Aprovar as seguintes diretrizes para análise ética de projetos de pesquisas que envolvam armazenamento de material biológico humano ou uso de material armazenado em pesquisas anteriores:

1. Para os efeitos desta Resolução, considera-se:

I - Biobanco: coleção organizada de material biológico humano e informações associadas, coletado e armazenado para fins de pesquisa, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade e gerenciamento institucional, sem fins comerciais;

II - Biorrepositório: coleção de material biológico humano, coletado e armazenado ao longo da execução de um projeto de pesquisa específico, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade institucional e sob gerenciamento do pesquisador, sem fins comerciais;

III - Material Biológico Humano: espécimes, amostras e alíquotas de material original e seus componentes fracionados;

IV - Projeto de Pesquisa: documento em que é descrita a pesquisa em seus aspectos fundamentais, incluindo informações relativas ao sujeito da pesquisa, detalhamento a

respeito dos métodos que serão utilizados para a coleta e tratamento das amostras biológicas, qualificação dos pesquisadores e instâncias responsáveis;

V - Protocolo de Desenvolvimento: documento no qual são definidos a constituição de um Biobanco, seus responsáveis e seus aspectos fundamentais, como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) a ser utilizado; as informações relativas ao sujeito e às amostras; e as etapas de coleta, processamento, armazenamento, distribuição e descarte de material biológico humano; e

VI - Sujeito da pesquisa: aquele que, de forma esclarecida, livre e autônoma, consente em participar de pesquisas, atuais ou potenciais, associadas ao armazenamento de material biológico humano em Biorrepositório ou Biobanco.

2. Sempre que houver previsão de armazenamento de material biológico humano, no País ou no exterior, visando à possibilidade de utilização em investigações futuras, além do cumprimento dos requisitos da Resolução CNS no 196/96 e complementares, devem ser apresentados:

I - justificativa quanto à necessidade e oportunidade para utilização futura;

II - consentimento do sujeito da pesquisa, autorizando a coleta, o depósito, o armazenamento e a utilização do material biológico humano;

III - declaração de que toda nova pesquisa a ser realizada com o material armazenado será submetida para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) institucional e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP); e

IV - regulamento aprovado pela instituição depositária destinado à constituição e ao funcionamento do banco de material biológico humano.

3. No caso de Biobanco:

I - o Regulamento corresponde ao seu Protocolo de Desenvolvimento, devendo ser primeiramente analisado pelo CEP institucional ou por CEP indicado pela CONEP e, quando aprovado, ser necessariamente avaliado e receber parecer final da CONEP;

II - o Protocolo de Desenvolvimento é necessário para o credenciamento do Biobanco, devendo ser apresentado no momento de sua proposição e avaliado de acordo com os prazos de tramitação estabelecidos no Sistema CEP/CONEP; e

III - o Biobanco deve conter um sistema seguro de identificação, que garanta o sigilo, o respeito à confidencialidade e à recuperação dos dados dos sujeitos da pesquisa, para fornecimento de informações do interesse destes ou para a obtenção de consentimento específico para utilização em nova pesquisa;

IV - quando houver alteração da titularidade da responsabilidade pelo Biobanco, tal fato deve ser prontamente comunicado ao Sistema CEP/CONEP; e
V - os Biobancos estão sujeitos à inspeção sanitária pelos órgãos competentes.

4. No caso de Biorrepositório, as condições associadas ao armazenamento de material biológico humano devem estar explicitadas no Projeto de Pesquisa respectivo, devendo seu Regulamento ser apreciado pelo CEP institucional ou por CEP indicado pela CONEP e, quando for o caso, pela CONEP, segundo atribuições definidas na Resolução CNS no 196/96 e complementares.

4. O consentimento livre e esclarecido referente à coleta, depósito, armazenamento e utilização de material biológico humano em Biobanco é formalizado através de TCLE, por meio do qual o sujeito da pesquisa deve se manifestar expressamente quanto às seguintes alternativas, excludentes entre si:

I - necessidade de novo consentimento a cada pesquisa; e

II - dispensa de novo consentimento a cada pesquisa.

a) O TCLE deve conter referência aos tipos de informação que poderão ser obtidos nas pesquisas futuras, a partir da utilização do material biológico humano armazenado, para fins de conhecimento e decisão autônoma do sujeito.

b) O TCLE deve conter a garantia expressa da possibilidade de acesso pelo sujeito da pesquisa, inclusive a(s) forma(s) de contato para tal, ao conhecimento dos resultados obtidos com a utilização do seu material biológico e às orientações quanto as suas implicações, incluindo aconselhamento genético quando aplicável, a qualquer tempo.

c) O TCLE pode conter manifestação expressa da vontade do sujeito da pesquisa quanto à cessão dos direitos sobre o material armazenado aos sucessores ou outros por ele indicado, em caso de óbito ou condição incapacitante.

d) O TCLE deve informar ao sujeito que os dados fornecidos, coletados e obtidos a partir de pesquisas poderão ser utilizados nas pesquisas futuras.

e) O TCLE pode conter referência à autorização de descarte do material armazenado e às situações nas quais o mesmo é possível.

6. O consentimento livre e esclarecido referente à coleta, depósito, armazenamento, utilização e descarte de material biológico humano em Biorrepositório é formalizado por meio de TCLE específico para cada pesquisa, conforme preconizado nas resoluções do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

7. A transferência do material biológico humano armazenado entre Biobancos ou Biorrepositórios, da própria ou de outra instituição, deve ser comunicada ao sujeito da pesquisa, sempre que possível ou, na impossibilidade, deve ser apresentada justificativa ao Sistema CEP/CONEP.

8. O sujeito da pesquisa deve ser informado sobre a perda ou destruição de suas amostras biológicas, bem como sobre o encerramento do Biobanco ou do Biorrepositório, quando for o caso.

9. O material biológico humano armazenado em Biobanco ou Biorrepositório é do sujeito da pesquisa, permanecendo sua guarda sob a responsabilidade institucional.

I - O gerenciamento do material biológico humano armazenado em Biobanco cabe à instituição e no caso de Biorrepositório ao pesquisador responsável.

10. O sujeito da pesquisa, ou seu representante legal, a qualquer tempo e sem quaisquer ônus ou prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado em Biobanco ou Biorrepositório, valendo a desistência a partir da data de formalização desta.

I - A retirada do consentimento será formalizada por manifestação, por escrito e assinada, pelo sujeito da pesquisa ou seu representante legal, cabendo-lhe a devolução das amostras existentes.

11. O prazo de armazenamento de material biológico humano em Biobanco é indeterminado, sendo a manutenção de seu credenciamento subordinada ao atendimento das normas vigentes.

I - A cada cinco anos, contados a partir da sua constituição, ou a qualquer tempo, por solicitação da CONEP, a instituição responsável pelo Biobanco deve apresentar relatório de atividades do período ao Sistema CEP/CONEP, constando, obrigatoriamente, o número de sujeitos incluídos no período e a relação de pesquisas que utilizaram amostras armazenadas.

II - O descarte do material biológico humano armazenado em Biobanco pode ocorrer:

- a) pela manifesta vontade do sujeito da pesquisa;
- b) devido à inadequação da amostra por critérios de qualidade;
- c) por iniciativa da instituição; e
- d) pela dissolução do Biobanco.

III - Nas hipóteses previstas nas alíneas “c” e “d”, são obrigatórias:

- a) a oferta formal do material armazenado a, no mínimo, duas instituições de pesquisa

que possuam Biobanco e a apresentação comprovada da recusa; e
b) a submissão da decisão institucional e da destinação do material biológico ao CEP, que as encaminhará para avaliação da CONEP.

12. O prazo de armazenamento de material biológico humano em Biorrepositório deve estar de acordo com o cronograma da pesquisa correspondente e pode ser autorizado por até dez anos.

I - Renovações da autorização de armazenamento são permitidas mediante solicitação do pesquisador responsável, ao CEP, acompanhada de justificativa e relatório das atividades de pesquisa desenvolvidas com o material durante o período.

II - Ao final do período de realização da pesquisa, o material biológico humano armazenado em Biorrepositório pode:

- a) permanecer armazenado, se em conformidade com as normas pertinentes do CNS;
- b) ser transferido formalmente para outro Biorrepositório ou Biobanco, mediante aprovação dos CEP e das instituições envolvidas; e
- c) ser descartado, conforme normas vigentes de órgãos técnicos competentes, e de acordo com o TCLE, respeitando-se a confidencialidade e a autonomia do sujeito da pesquisa.

13. No caso de pesquisa envolvendo mais de uma instituição deve haver acordo firmado entre as instituições participantes, contemplando formas de operacionalização, compartilhamento e utilização do material biológico humano armazenado em Biobanco ou Biorrepositório, inclusive a possibilidade de dissolução futura da parceria e a consequente partilha e destinação dos dados e materiais armazenados, conforme previsto no TCLE.

I - É necessário explicitar o tipo e a quantidade dos materiais compartilhados, informando sua destinação após a utilização.

14. No caso de constituição ou participação em banco de material biológico humano no exterior, devem ser obedecidas as normas nacionais e internacionais para remessa de material e ser apresentado o regulamento da instituição destinatária para análise do Sistema CEP/CONEP quanto ao atendimento dos requisitos desta Resolução.

I - O pesquisador e instituição brasileiros devem ter direito ao acesso e à utilização, em pesquisas futuras, do material biológico humano armazenado no exterior, não necessariamente das amostras por ele depositadas pelo pesquisador, garantida, no mínimo, a proporcionalidade da participação.

II - O direito de acesso e utilização compreende as amostras, informações associadas e resultados incorporados ao banco, obtidos em pesquisas aprovadas pelo Sistema CEP/CONEP.

III - os direitos relativos ao material biológico humano armazenado no exterior não podem ser considerados exclusivos de Estado ou instituição.

IV - A utilização de amostras de brasileiros armazenadas no exterior somente poderá se realizar se observado o art. 5º desta Resolução e com a participação de pesquisador e/ou instituição brasileiros.

V - A instituição destinatária no exterior deve comprometer-se a respeitar a legislação brasileira, em especial a vedação do patenteamento e da utilização comercial de material biológico humano.

15. Sobre a utilização de amostras de material biológico humano armazenado:

I - as amostras armazenadas podem ser utilizadas em novas pesquisas aprovadas pelo CEP e, quando for o caso, pela CONEP;

II - os projetos de pesquisas que pretendam utilizar amostras armazenadas devem incluir:

a) justificativa para utilização do material;

b) cópia do TCLE empregado quando da coleta do material, contendo autorização de armazenamento e possível utilização futura em pesquisa, se o armazenamento ocorreu a partir da homologação da Resolução CNS no 196/96; e

c) TCLE específico para nova pesquisa ou a solicitação de sua dispensa, conforme disposto no art. 5º desta Resolução.

III - quando fundamentada a impossibilidade de obtenção do consentimento específico para a nova pesquisa, mediante opção do sujeito em ser consultado a cada pesquisa, cabe ao CEP autorizar, ou não, a utilização do material biológico humano armazenado em Biobanco ou Biorrepositório.

16. A legislação brasileira veda o patenteamento e a utilização comercial de material biológico humano armazenado em Biobancos e Biorrepositórios.

17. Os Biobancos constituídos a partir da homologação desta Resolução deverão adequar-se à mesma e os constituídos anteriormente terão o prazo de um ano para sua regularização, contado a partir da data de homologação.

I - a regularização prevista no art. 17 será objeto de análise e aprovação pelo Sistema CEP/CONEP.

18. Fica revogada a Resolução CNS no 347, de 13 de janeiro de 2005, publicada no Diário Oficial da União no 47, de 10 de março de 2005.

ALEXANDRE ROCHA SANTOS PADILHA

Presidente do Conselho Nacional de Saúde

Homologo a Resolução CNS no 441, de 12 de maio de 2011, nos termos do Decreto
no 5.839,
de 11 de julho de 2006.

ALEXANDRE ROCHA SANTOS PADILHA

Ministro de Estado da Saúde

ANEXO V

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO/PURIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE 50 – 300 μ L DE SANGUE TOTAL – Illustra™ GE Healthcare:

* PROCEDIMENTO:

1. Pipetar 20 μ L de PROTEINASE K no fundo de um tubo de microcentrífuga (eppendorf) de 1,5 mL;

2. Adicionar até 300 μ L de sangue total ao eppendorf (ideal 200 μ L);

Este protocolo é adequado para 50 – 300 μ L de sangue total, tampão leucocitário e células da medula óssea. A performance ótima é obtida com 200 μ L de sangue total. Quando o volume for menos do que 200 μ L, fazer o volume da amostra ficar até 200 μ L com PBS.

3. Adicionar 400 μ L de Tampão de Lise tipo 10 ao tubo com amostra. Misturar bem no vórtex por 15 segundos.

Para assegurar eficiente lise, é essencial que a amostra e o tampão AL sejam misturados completamente para produzir uma solução homogênea.

4. Incubar à temperatura ambiente por 10 minutos com intermitentes misturas no vórtex para auxiliar a lise.

No final deste estágio a cor da reação terá mudado de vermelho para marrom escuro.

5. Pré-aquecer o Tampão de Eluição tipo 5 no banho-maria à 70 °C.

6. Centrifugar brevemente o eppendorf de 1,5 mL para remover gotas de dentro da tampa.

7. Aplicar, cuidadosamente, a amostra no centro da mini coluna com um tubo coletor fornecido, usando uma pipeta, sem molhar a borda. Feche a tampa da coluna e centrifugar por 1 minuto à 12.000 rpm. Descartar o tubo contendo o filtrado e colocar a mini coluna em um tubo coletor de 2 mL limpo (fornecido).

8. Cuidadosamente abra a mini coluna e adicione 500 μ L de Tampão de Lise tipo 10 à coluna. Centrifugar por 1 minuto à 12.000 rpm. Descartar o tubo contendo o filtrado e colocar a mini coluna em um tubo coletor de 2 mL limpo (fornecido).

Este passo assegura a completa lise das células e desnatura qualquer resíduo de proteína.

9. Cuidadosamente abra a mini coluna e adicione 500 μ L de Tampão de Lavagem tipo 6 à coluna. Centrifugar por 3 minutos à 12.000 rpm. Descartar o tubo coletor contendo o filtrado. Colocar a mini coluna em outro tubo coletor (não fornecido) e centrifugar novamente por 1 minuto à 12.000 rpm.

Se qualquer solução de lavagem vem a ter contato com a coluna, re-centrifugar por 1 minuto. A presença de etanol no DNA genômico eluído pode afetar muitas aplicações. O DNA genômico preso à matrix de sílica está altamente purificado e pronto para a eluição.

10. Colocar a mini coluna em um eppendorf de 1,5 mL (não fornecido). Cuidadosamente abra a mini coluna e adicione 200 µL de Tampão de Eluição tipo 5, pré-aquecido, diretamente no centro da coluna.

Pré-aquecer o Tampão de Eluição tipo 5 à 70 °C ante do uso. O volume atual recuperado será de 80 – 100 % do volume do tampão aplicado na coluna. Mude de ponteira entre as amostras, para reduzir a variação de volume das amostras eluídas.

11. Incubar a coluna por 1 minuto à temperatura ambiente.

Não incubar muito mais do que 1 minuto, para obter um DNA genômico de boa qualidade.

12. Centrifugar por 1 minuto à 12.000 rpm para recuperar o DNA genômico. Armazenar o DNA genômico purificado à – 20 °C.

ANEXO VI

Chromosomal Microarray (CMA) CytoScan™ HD Affymetrix®:

O CMA consiste de 2.696.550 de marcadores genéticos dando cobertura ao genoma humano. Aproximadamente 743.304 dessas sondas são de SNPs (polimorfismo de nucleotídeo único) e 1.953.246 são de sondas de CNV (sondas únicas não polimórficas). O protocolo de CMA CytoScan™ HD Affymetrix® é otimizado para processar de 8 a 24 amostras ao mesmo tempo, para obtenção de informação da variação do número de cópias (CNV) e SNP.

Digestão:

Ligar o termociclador.

Descongelar os reagentes Tampão NspI 10x, BSA 100x e água livre de nuclease do à temperatura ambiente. Fazer um vórtex e um spin e colocar no gelo.

Manter a enzima NspI à – 20°C pronta para uso.

Adicionar 5 µL de DNA da amostra (concentração de 50ng/µL) na placa (de 1 a 6), realizando 2 trios por vez.

Adicionar 5 µL de DNA genômico (7), fornecido pelo kit como controle positivo.

Adicionar 5 µL de água livre de nuclease (8), como controle negativo.

Preparar o máster mix de Digestão, de acordo com a tabela a seguir:

Reagentes	Para 8 amostras
Água livre de nuclease	110,9 µL
Tampão NspI 10X	19,2 µL
BSA 100 x	1,9 µL
NspI	9,6 µL
Volume total	141,6 µL

Manter no gelo

Fazer um vórtex do máster mix de digestão em alta velocidade por 3 vezes (1 segundo cada vez) e fazer um spin.

Adicionar 14,75 µL de máster mix de digestão em cada amostra colocada na placa, de acordo com a tabela:

Amostras	Volume/amostra
DNA genômico (50ng/µL)	5,0 µL (250 ng)
Master mix de digestão	14,75 µL

Manter no gelo

Volume total	19,75 μL
---------------------	--------------------------------

Selar a placa com filme adesivo.

Fazer um vórtex da placa em alta velocidade nos cinco setores da placa, por 1 segundo por setor.

Fazer um spin da placa à 2.000 rpm por 1 minuto.

Colocar a placa no termociclador e rodar o programa *Digestão CytoScan*:

Temperatura	Tempo
--------------------	--------------

37 °C	2 horas
--------------	---------

65 °C	20 minutos
--------------	------------

4 °C	Manter
-------------	--------

Retirar a placa do termociclador, fazer um spin da placa à 2.000 rpm por 1 minuto. Proceder para ligação.

Ligação:

Assegurar que o termociclador esteja pré-aquecido.

Descongelar os reagentes Tampão T4 DNA ligase 10x e Adaptador NspI 50 μ M à temperatura ambiente. Fazer um vórtex para assegurar que qualquer precipitado seja ressuspensionado e o tampão fique claro, e um spin e colocar no gelo.

Manter a enzima T4 DNA ligase à – 20°C pronta para uso.

Preparar o máster mix de Ligação, de acordo com a tabela a seguir:

Reagentes	Para 8 amostras
------------------	------------------------

Tampão T4 DNA ligase	25,0 μ L
-----------------------------	--------------

Manter no gelo

Adaptador NspI 50 μM	7,5 μ L
--	-------------

T4 DNA ligase	20,0 μ L
----------------------	--------------

Volume total	52,5 μL
---------------------	-------------------------------

Fazer um vórtex do máster mix de ligação em alta velocidade por 3 vezes (1 segundo cada vez) e fazer um spin.

Adicionar 5,25 μ L de máster mix de ligação em cada amostra, de acordo com a tabela:

Amostras	Volume/amostra
-----------------	-----------------------

Amostra NspI digerida	19,75 μ L
------------------------------	---------------

Manter no gelo

Master mix de ligação	5,25 μ L
------------------------------	--------------

Volume total	25,0 µL
---------------------	----------------

Selar a placa com filme adesivo.

Fazer um vórtex da placa em alta velocidade nos cinco setores da placa, por 1 segundo por setor.

Fazer um spin da placa à 2.000 rpm por 1 minuto.

Colocar a placa no termociclador e rodar o programa *Ligação CytoScan*:

Temperatura	Tempo
--------------------	--------------

16 °C	3 horas
--------------	---------

70 °C	20 minutos
--------------	------------

4 °C	Overnight
-------------	-----------

Retirar a placa do termociclador, fazer um spin da placa à 2.000 rpm por 1 minuto. Congelar as amostras à - 20°C para no outro dia proceder para a PCR.

PCR:

Assegurar que o termociclador esteja pré-aquecido.

Descongelar as amostras. Assegurar que a placa de ligação está selada. Fazer um spin da placa à 2.000 rpm por 1 minuto.

Diluir as amostras ligadas, de acordo com a tabela:

Amostras	Volume/amostra
-----------------	-----------------------

Amostras ligadas	25 µL
-------------------------	-------

Água livre de nuclease	75 µL
-------------------------------	-------

Manter no gelo

Total	100 µL
--------------	---------------

Selar a placa com fita adesiva.

Fazer um vórtex da placa em alta velocidade nos cinco setores da placa, por 1 segundo por setor. Fazer um spin da placa à 2.000 rpm por 1 minuto.

Transferir 10 µL de cada amostra diluída para quatro pocinhos na placa de PCR.

Descongelar os reagentes: Tampão de PCR Taq TITANIUM™ 10x, mistura de dNTP, Primer 2 de PCR à temperatura ambiente. Fazer um vórtex de todos os reagentes, um spin e colocar imediatamente no gelo.

Manter o reagente GC-Melt e a água livre de nuclease no gelo.

Deixar a enzima DNA Taq Polimerase TITANIUM™ 50x à – 20°C pronta para uso.

Preparar o máster mix de PCR em um tubo de 15 mL, de acordo com a tabela a seguir:

Reagentes	Para 8 amostras
Água livre de nuclease	1453,6 µL
Tampão de PCR Taq TITANINUM™ 10x	368,0 µL
Reagente GC-Melt	736,0 µL
Mistura de dNTP (2,5 mM cada)	515,2 µL
Primer 002 de PCR	165,6 µL
DNA Taq Polimerase TITANIUM™ 50x	73,6 µL
Volume total	3312,0 µL

Manter no gelo

Fazer um vórtex do máster mix de PCR em alta velocidade por 3 vezes (1 segundo cada vez) e fazer um spin.

Adicionar 90,0 µL de máster mix de PCR em cada amostra, de acordo com a tabela:

Amostras	Volume/amostra
Amostra ligada diluída	10,0 µL
Master mix de PCR	90,0 µL
Volume total	100,0 µL

Selar a placa com filme adesivo.

Fazer um vórtex da placa em alta velocidade nos cinco setores da placa, por 1 segundo por setor. Repetir o vórtex mais uma vez.

Fazer um spin da placa à 2.000 rpm por 1 minuto.

Colocar a placa no termociclador e rodar o programa *PCR CytoScan*:

Temperatura	Tempo	Ciclos
94 °C	3 minutos	___
94 °C	30 segundos	30
60 °C	45 segundos	30
68 °C	15 segundos	30
68 °C	7 minutos	___
4 °C	Manter	___

Proceder para a checagem do produto de PCR.

Checagem do produto de PCR:

Preparar um gel de agarose a 2%.

Misturar 3 μL de cada amostra com 5 μL de loading (corante).

Aplicar no primeiro poço do gel 6 μL do ladder de 50-2000 pb, no segundo ao nono poço o volume total da amostra com o corante e no décimo poço 6 μL do ladder de 50-2000 pb.

Correr o gel à 120 V (5V/cm) por 1 hora.

A maioria do produto de PCR deverá estar entre 150 a 2000 pb.

Enquanto o gel está correndo, começar a purificação do produto da PCR.

Purificação do produto da PCR:

Transferir o pool dos 4 produtos de PCR de cada amostra, com exceção do controle negativo, para um microtubo de 1,5 mL. Conferir se todo o volume de cada amostra foi transferido.

Homogeneizar completamente as Beads de Purificação por inversão, até a mistura ficar homogênea.

Adicionar 720 μL da beads de Purificação em cada pool de amostra.

Misturar bem por 10 inversões os tubos.

Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.

Centrifugar os tubos, com as dobradiças voltadas pra cima, por 3 minutos à 12.000 rpm.

Colocar os tubos na raque magnética (MagnaRack™). Deixar os tubos na raque até que o pelete tenha subido completamente. Pipetar o sobrenadante sem encostar-se ao pelete e descartar o sobrenadante.

Adicionar 1000 μL de Tampão de lavagem de Purificação em cada tudo.

Colocar os tubos no adaptador do vórtex e fazer o vórtex por no máximo 2 minutos.

Centrifugar os tubos, com as dobradiças voltadas para cima, por 3 minutos à 12.000 rpm.

Colocar os tubos na raque magnética e deixar os tubos na raque até que o pelete tenha subido completamente. Pipetar o sobrenadante sem encostar-se ao pelete e descarta o sobrenadante.

Centrifugar os tubos, com as dobradiças voltadas para cima, por 30 segundos à 12.000 rpm.

Colocar os tubos na raque magnética e deixar os tubos na raque até que o pelete tenha subido completamente. Com uma micropipeta P20, remover qualquer sobrenadante do tampão de lavagem de purificação de cada tubo.

Colocar os tubos fora da raque magnética, com as tampas abertas, em temperatura ambiente por 10 minutos, para permitir que evapore qualquer remanescente do tampão de lavagem de purificação.

Adicionar 52 μL de Tampão de eluição em cada tubo, dispensando diretamente nas beads.
Colocar os tubos no adaptador do vórtex e fazer o vórtex em alta velocidade por 10 minutos para ressuspender as beads. Se as beads não estiverem totalmente ressuspensas, fazer o vórtex de cada tubo por mais 2 minutos.
Centrifugar os tubos, com as dobradiças voltadas para cima, por 4 minutos à 12.000 rpm.
Colocar os tubos na raque magnética, por 10 minutos, até que todo o pelete tenha subido completamente.
Transferir 47 μL da amostra eluída para cada pocinho da placa.
Selar a placa, fazer um vórtex da placa em alta velocidade nos cinco setores da placa, por 1 segundo por setor e fazer um spin da placa à 2.000 rpm por 1 minuto.
Proceder para a quantificação do produto de PCR purificado.

Quantificação do produto de PCR purificado:

Aliquotar 18 μL de água livre de nuclease em sete microtubos de PCR.
Transferir 2 μL de cada amostra purificada para cada um dos sete microtubos de PCR.
Fazer um vórtex e um spin de cada tubo.
Fazer o branco do NanoDrop[®] usando água livre de nuclease.
Quantificar as amostras no equipamento Nanodrop[®].
Após a quantificação, calcular a concentração não diluída de cada amostra em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$:
(concentração em $\text{ng}/\mu\text{L} \times 10) / 1000$
Congelar as amostras à -20°C para no outro dia proceder para a Fragmentação.

Fragmentação:

Assegurar que o termociclador esteja pré-aquecido.
Assegurar que a centrífuga de placa esteja mantendo a temperatura de 4°C , antes de proceder ao passo da fragmentação.
Descongelar as amostras de produto de PCR purificado. Assegurar que a placa de ligação está selada. Fazer um spin da placa à 2.000 rpm por 1 minuto. Colocar a placa no *cooling block* que está no gelo e deixar esfriar 10 minutos antes do uso.
Colocar os reagentes da fragmentação: água livre de nuclease, tampão de fragmentação 10x no gelo. Fazer um vórtex de todos os reagentes, um spin e voltar imediatamente para o gelo.
Deixar o reagente de fragmentação (enzima DNase) à -20°C pronta para uso.

Preparar o máster mix de fragmentação de acordo com a concentração do reagente de fragmentação de uso:

Reagentes	2.0 ^U /μL	2.25 ^U /μL	2.5 ^U /μL	2.75 ^U /μL	3.0 ^U /μL
Água livre de nuclease	122.4 μL	123.2 μL	123.8 μL	124.4 μL	124.8 μL
Tampão de fragmentação 10x	158.4 μL	158.4 μL	158.4 μL	158.4 μL	158.4 μL
Reagente de fragmentação (DNase)	7.2 μL	6.4 μL	5.8 μL	5.2 μL	4.8 μL
Volume total	288.0 μL	288.0 μL	288.0 μL	288.0 μL	288.0 μL

Manter no gelo

A concentração da enzima de uso é 2.5 U/ μL.

Fazer um vórtex do máster mix de fragmentação em alta velocidade por 3 vezes (1 segundo cada vez) e fazer um spin.

Adicionar 10,0 μL de máster mix de fragmentação em cada amostra, de acordo com a tabela:

Amostras	Volume/amostra
Amostra produto de PCR purificado	45,0 μL
Master mix de fragmentação	10,0 μL
Volume total	55,0 μL

Selar a placa com filme adesivo.

Fazer um vórtex da placa em alta velocidade nos cinco setores da placa, por 1 segundo por setor. Repetir o vórtex mais uma vez.

Levar a placa até a centrífuga no gelo. Fazer um spin da placa à 2.000 rpm por 1 minuto, na centrífuga mantida na temperatura de 4 °C.

Colocar a placa no termociclador e rodar o programa *Fragmentação CytoScan*:

Temperatura	Tempo
37 °C	35 minutos
95 °C	15 minutos
4 °C	Manter

Proceder imediatamente para a checagem no gel da fragmentação.

Checagem da fragmentação:

Preparar um gel de agarose a 4%.

Fazer uma diluição em um tubo de strip com 4 μL de cada amostra e 28 μL de água livre nuclease. Fazer um vórtex e um spin nas amostras diluídas nos strips.

Misturar 8 μL de cada amostra diluída com 5 μL de loading (corante).

Aplicar no primeiro poço do gel 6 μL do ladder de 25 pb, no segundo ao oitavo poço o volume total da amostra com o corante e no nono poço 6 μL do ladder de 25-125 pb.

Correr o gel à 120 V (5V/cm) por 1 hora.

A maioria da amostra fragmentação deverá estar entre 25 a 125 pb.

Enquanto o gel está correndo, começar a marcação.

Marcação (labeling):

Assegurar que o termociclador esteja pré-aquecido.

Descongelar os reagentes da marcação: tampão TdT 5x e Reagente de marcação de DNA 30 mM (biotina) à temperatura ambiente e colocar no gelo. Fazer um vórtex de todos os reagentes, um spin e voltar para o gelo.

Deixar a enzima TdT à -20°C pronta para uso.

Preparar o máster mix de marcação de acordo com a tabela:

Reagentes	Para 8 amostras
Tampão TdT 5x	134.4 μL
Reagente de marcação de DNA 30 mM	19.2 μL
TdT	33.6 μL
Volume total	187.2 μL

Manter no gelo

Fazer um vórtex do máster mix de marcação em alta velocidade por 3 vezes (1 segundo cada vez) e fazer um spin.

Adicionar 19,5 μL de máster mix de marcação em cada amostra, de acordo com a tabela:

Amostras	Volume/amostra
Amostra DNA fragmentado	51,0 μL
Master mix de marcação	19,5 μL
Volume total	70,5 μL

Selar a placa com filme adesivo.

Fazer um vórtex da placa em alta velocidade nos cinco setores da placa, por 1 segundo por setor. Repetir o vórtex mais uma vez.

Fazer um spin da placa à 2.000 rpm por 1 minuto.

Colocar a placa no termociclador e rodar o programa *Label CytoScan*:

Temperatura	Tempo
37 °C	4 horas
95 °C	15 minutos
4 °C	Manter

Proceder para a hibridização.

Hibridização:

Assegurar que o termociclador esteja pré-aquecido.

Desembrulhar os chips e permitir que cheguem à temperatura ambiente para uso. Identificar os chips de cada amostra.

Pré-aquecer o forno de hibridização por pelo menos 1 hora à 50 °C com a rotação ligada.

Fazer o registro dos chips no programa: Quick registration → Inserir código da amostra e o seu respectivo código de barras.

Pegar os reagentes de hibridização na geladeira e colocar no gelo. Fazer um vórtex de todos os reagentes, um spin e voltar para o gelo.

Preparar o máster mix de hibridização em um tubo de 15 mL de acordo com a tabela:

Reagentes	Para 8 amostras
Tampão Hyb parte 1	1584.0 µL
Tampão Hyb parte 2	144.0 µL
Tampão Hyb parte 3	67.2 µL
Tampão Hyb parte 4	9.6 µL
Reagente oligo controle 0100	19.2 µL
Volume total	1824.0 µL

Manter no gelo

Fazer um vórtex do máster mix de hibridização em alta velocidade por 3 vezes (3 segundos cada vez).

Adicionar 190 µL de máster mix de hibridização em cada amostra, de acordo com a tabela:

Amostras	Volume/amostra
-----------------	-----------------------

Amostra DNA marcado	70,5 μ L
Master mix de hibridização	190,0 μ L
Volume total	260,5 μL

Selar a placa com filme adesivo.

Fazer um vórtex da placa em alta velocidade nos cinco setores da placa, por 1 segundo por setor. Repetir o vórtex mais uma vez.

Fazer um spin da placa à 2.000 rpm por 1 minuto.

Colocar a placa no termociclador e rodar o programa *Hyb CytoScan*:

Temperatura	Tempo
95 °C	10 minutos
4 °C	Manter

Permitir que as amostras fiquem incubadas à 49 °C por pelo menos 1 minuto antes de aplicar no chip.

Deixar as amostras no termociclador, aplicar 200 μ L de cada amostra em seu respectivo chip.

Tampar os septos do chip com Tough-Spots® e pressionar firmemente.

Imediatamente após a aplicação das amostras no chip, levá-las para o forno de hibridização, quatro de cada vez.

Hibridizar os chips por 16 a 18 horas à 50 °C e 60 rpm de rotação.

Lavagem, Stain e Scaneamento:

Fazer o prime da estação de lavagem (PRIME 450) uns 40 minutos antes de começar a lavagem.

Aliquotar em microtubos de 1,5 mL os seguintes reagentes para cada chip:

A. 500 μ L solução de Stain Buffer 1 em microtubo âmbar;

B. 500 μ L solução de Stain Buffer 2 em microtubo claro;

A. 800 μ L tampão de Array Holding em microtubo claro;

* Lavagem dos chips:

Carregar a estação fluídica com os tampões de lavagem (Wash A e Wash B), com água miliQ e com as soluções de stain. Selecionar o protocolo fluídico: *CytoScanHD_Array_450*.

Iniciar o protocolo fluídico e deixar os alavancas do cartucho para baixo na posição de ejetar.

Remover as Tough-Spots® de cada chip.

Carregar os chips na estação fluídica.

* Antes do scaneamento:

Quando acabar a lavagem, retirar os chips e verificar se não há bolhas. Se houver bolhas, voltar os chips para estação de lavagem para a retirada de bolhas.

Tampar os septos do chip com Tough-Spots[®] e colocar o chip no scanner.

Scanear os chips de acordo com o *Manual Usuário do Ensaio CytoScan™* (PN703038).

Verificar os controles de qualidade de cada chip:

- mapD < 0.25

- SNPQC > 15

- Waviness < 0.12

Após o scaneamento, fazer as análises de cada amostra no software Chromosome Analysis Suite (ChAS) Affymetrix[®].