

INSTITUTO DE MATEMÁTICA ESTATÍSTICA E FÍSICA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE FÍSICA BACHARELADO

MATHEUS COELHO MORAES

**EFEITOS DAS RADIAÇÕES ELETROMAGNÉTICAS EM CÉLULAS T:
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS VIAS ASSOCIADAS AO MECANISMO DE
MANUTENÇÃO DO GENOMA**

RIO GRANDE / RS

2018

Matheus Coelho Moraes

**EFEITOS DAS RADIAÇÕES ELETROMAGNÉTICAS EM CÉLULAS T:
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS VIAS ASSOCIADAS AO MECANISMO DE
MANUTENÇÃO DO GENOMA**

Universidade Federal do Rio Grande

Orientador: Prof. Dr. Evamberto Garcia de Góes

Rio Grande / RS

2018

RESUMO

Estudos recentes mostram que as radiações ionizantes eletromagnéticas (raios X e gama) podem aumentar a eficiência do tratamento do câncer através da estimulação do sistema imunológico. Isso é observado em baixos valores de dose de radiação e, também, naqueles valores que compõem o intervalo de dose hipofracionada, usualmente utilizado em radioterapia. Entretanto, os mecanismos de modulação imunogênico associados a essas doses não estão completamente elucidados. Em um estudo recente, foram analisados dados de transcriptomas, disponíveis no Banco de Dados Gene Expression Omnibus (GEO), relacionados às células T isoladas do sangue total de 8 doadores e irradiadas com 600 cGy de radiação gama. O objetivo do estudo foi investigar o efeito da radiação na regulação de genes e vias do sistema imune considerando a superfamília de moléculas B7-CD28/CTLA4. Os resultados desse estudo mostraram que a irradiação modulou a resposta desses genes, sinalizando que 600 cGy pode potencializar respostas imunes antitumorais. No presente estudo, utilizou-se esses mesmos dados de transcriptomas (grupo irradiado com n=8; grupo não irradiado com n=8), disponibilizados pelo GEO, com o objetivo de estudar o efeito de 600 cGy no comportamento das vias associadas aos mecanismos de conservação do genoma. A conexão entre genes e vias foi estabelecida através do Banco de Dados Ontocancro. A atividade e a diversidade relativas dessas vias foram calculadas para se estabelecer o efeito dessa dose nos mecanismos de manutenção do genoma. Esses cálculos foram realizados através do software Via Complex. O Método Bootstrap foi usado para testar os efeitos produzidos pela radiação em relação às amostras não irradiadas (n=8), considerando-se um nível de significância de $\alpha = 0,05$. Observou-se que 600 cGy modula as respostas das vias consideradas neste estudo, indicando a preservação de mecanismos associados à conservação do genoma em resposta a esta dose.

Palavras chaves: Mecanismos de manutenção do genoma (GMM), efeitos biológicos das radiações ionizantes, células T

ABSTRACT

Recent studies have shown that ionizing radiation, x-rays and gamma rays can increase the efficiency of cancer treatment through stimulation of the immune system. This is observed in low values of radiation doses and, also, on those values that compound the hypofractionated dose interval, usually used in radiotherapy. However, the modulation mechanisms regarding those doses are not fully elucidated. In a recent study, transcriptome data, available from the Gene Expression Omnibus (GEO) database, related to T cells isolated from the total blood of 8 donors were analyzed and irradiated with 600 cGy of gamma radiation. The objective of the study was to investigate the effect of radiation in the regulation of genes and pathways of the immune system regarding the superfamily of molecules B7-CD28/CTLA4. The results of this study have shown that irradiation modulated those genes, pointing that 600 cGy could potentialize antitumor immune responses. In the present study, the same transcriptome data available from GEO was used (irradiated group with $n = 8$; control group $n = 8$), with the objective to study the effects of 600 cGy on the behavior of those pathways related to the genome maintenance mechanisms. The connection between genes and pathways was established through the Ontocancro database. The relative activity and diversity of those pathways were calculated to establish the effects of those doses on the genome. The calculations were performed using the Via Complex software. The Bootstrap Method was used to test the effects produced by radiation in relation to the un-irradiated samples ($n = 8$), considering a level of significance of $\alpha = 0,05$. It was observed that 600 cGy modulated the responses of the pathways considered in this study, indicating the preservation of mechanisms associated with genome conservation in response to this dose.

Keywords: Genome maintenance Mechanisms (GMM), Biological effects of ionizing radiation, T cells

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do DNA.....	13
Figura 2: Resumo da tradução de proteínas em bactérias.....	15
Figura 3: Imunidade inata e adaptativa com seus respectivos componentes e tempo de resposta.....	18
Figura 4: Tipos de imunidades adaptativas e suas principais funções na defesa do corpo.....	21
Figura 5: Esquematização da hipótese dos dois sinais em uma célula B.....	23
Figura 6: linfócitos T citotóxicos (marrom) infiltrando células residuais de câncer de mama após radioterapia.....	29
Figura 7: Os três caminhos de uma rede de interação de proteínas.....	31
Figura 8: Desenho esquemático do ciclo natural de uma célula, adaptado do endereço virtual, https://www.sobiologia.com.br/conteudos/Citologia2/nucleo11.php	33
Figura 9: Visão geral do protocolo de um GeneChip.....	37
Figura 10: Exemplo do método apresentado mostrando os níveis de expressão de 10 genes quaisquer.....	41

LISTA DE ABREVIÇÃO

ANOVA	Análise de variância
AP1	<i>Activator protein 1 transcription factor</i>
APCs	<i>Antigen presenting cells</i> (células apresentadoras de antígenos)
ATM	<i>Ataxia-telangiectasia mutated</i>
BER	<i>Base-excision repair</i>
CD	<i>Cluster differentiation</i> (diferenciador de grupo)
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4
CTLs	<i>Cytotoxic T lymphocytes</i> (linfócitos T citotóxicos)
DDR	<i>DNA damage response</i> (resposta ao dano celular)
DIE	<i>Death-inducing effects</i>
GCRMA	Média robusta de multichip para GeneChip Affymetrix
GEO	Gene Expression Omnibus
GG-NER	<i>Global Genome NER</i>
GO	<i>Gene Ontology</i> (Ontologia genética)
HGNC	Human Gene Nomenclature Committee
HGP	<i>Human genome Project</i> (projeto genoma humano)
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> (antígeno leucocitário humano)
ICOS	<i>Inducible coestimulator</i> (coestimulador induzível)
IL-2	Interleucina -2
MAS 5.0	<i>Microarray Suite Version 5.0</i> (Microarranjo de suíte versão 5.0)
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade
MM	<i>Mismatch</i> (Incompatível)

NCBI	<i>National center for biotechnology</i>
NER	<i>Nucleotide-excision repair</i>
NK	<i>Natural killer (matadora natural)</i>
PD-1	<i>Programmed death 1 (morte programável 1)</i>
PM	<i>Perfect Match (compatibilidade perfeita)</i>
RMA	<i>Robust Multichip Average (Média robusta de multichip)</i>
SMC1	<i>Structural maintenance of chromosomes protein 1</i>
TCR	<i>T cell receptor (receptor de célula T)</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor: (fator de necrose tumoral)</i>
TNFR	<i>tumor necrosis factor receptor (receptor de necrose tumoral)</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Bancos de dados e seus endereços para consulta online.....	35
Tabela 2: Dados referentes a subvia <i>ATM signaling</i> da via <i>DNA Damage Response</i> considerando as sondas, os genes e os respectivos valores de expressão.....	44
Tabela 3: Dados referentes a subvia <i>Nucleotide Excision Repair</i> da via <i>DNA Damage Response</i> considerando as sondas, os genes e os respectivos valores de expressão.....	45
Tabela 4: Dados referentes a subvia <i>Cell Cycle Checkpoints</i> da via <i>Cell Cycle</i> considerando as sondas, os genes e os respectivos valores de expressão.....	46
Tabela 5: Dados referentes a via <i>Regulation of DNA Replication</i> da via <i>Cell Cycle</i> considerando as sondas, os genes e os respectivos valores de expressão.....	46
Tabela 6: Dados referentes a subvia <i>S phase</i> da via <i>Cell Cycle</i> considerando as sondas, os genes e os respectivos valores de expressão.....	47
Tabela 7: Dados referentes a subvia <i>Apoptosis – homo sapiens (AP1)</i> da via <i>Apoptosis (AP17)</i> considerando as sondas, os genes e os respectivos valores de expressão....	48
Tabela 8: Dados referentes a subvia <i>Apoptosis - AP17</i> da via <i>Apoptosis</i> considerando as sondas, os genes e os respectivos valores de expressão.....	48
Tabela 9: Resultados da análise associada a atividade relativa das 7 subvias consideradas neste estudo.....	50
Tabela 10: Resultados da análise associada a diversidade relativa das 7 subvias consideradas neste estudo.....	51

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	DESENVOLVIMENTO TEÓRICO	13
2.1	Estrutura do DNA	13
2.2	Sistema Imunológico	17
2.2.1	Células do Sistema Imune	17
2.2.2	Ativação dos Linfócitos T	22
2.3	Efeitos Biológicos das Radiações	24
2.3.1	Efeitos Biológicos das Radiações sobre o Sistema imune	26
2.4	Redes Biológicas	29
2.5	Mecanismos de Manutenção do Genoma	31
2.6	Bancos de Dados	34
2.7	Técnica de Microarranjo	35
2.8	Métodos de Normalização	38
2.9	Análise de Dados de Expressão de Vias e Genes	38
3	METODOLOGIA	42
3.1	Seleção das Amostras de Microarranjo	42
3.2	Seleção de Vias Associadas ao Sistema Imunológico	43
3.3	Análise da Resposta de Vias em Função da Irradiação	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5	CONCLUSÕES	53
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1 INTRODUÇÃO

As radiações ionizantes eletromagnéticas, raios X e gama, são usadas na medicina há mais de um século com o objetivo de tratar pacientes com câncer. Em 1959, Bergonié e Tribondeau (BERGONIÉ & TRIBONDEAU, 1959) demonstraram, através de experimentos, que as células cancerosas são mais sensíveis à radiação em relação às aquelas que constituem os tecidos normais. Atualmente, a maximização do efeito biológico produzido pela radiação nas células cancerosas e a minimização dos efeitos indesejáveis por ela produzidos nas outras células estão associados ao conceito dos 5Rs da radiobiologia, o qual é constituído pela reparação ao dano, redistribuição no ciclo celular, repovoamento acelerado, reoxigenação e radiosensibilidade intrínseca (FOMENTI & DEMARIA, 2009).

Os efeitos das radiações ionizantes são capazes de perturbar as cadeias polinucleotídicas do DNA e, conseqüentemente, causar a destruição ou modificação dos genes responsáveis pelas diversas funções biológicas e características fenotípicas das células do corpo. A modificação de um gene pode representar sua ativação através do aumento de sua expressão em proteínas e uma modificação do fenótipo pode emergir dessa mudança (SMIRNOV *et al*, 2012). Estudos apontaram que a radiosensibilidade dos tumores *in vivo* é influenciada pelo sistema imune do hospedeiro e que o estresse sofrido pelas células irradiadas faz gerar uma sinalização para o sistema imune atuar no local e promover um tipo de morte celular, chamada morte celular imunogênica (FOMENTI & MARTA, 2014; DEMARIA, 2009).

Os mecanismos de sinalização associada à resposta imunológica induzida pela radiação não estão completamente elucidados. Estudos recentes têm sugerido a existência de uma relação direta através da qual a radiação ionizante estimula o sistema imune e, por sua vez, também contribui para a morte das células tumorais (LEE, *et al.*, 2009). Além disso, tem-se sugerido a hipótese que células irradiadas podem sobreviver um limitado período de tempo e que durante este período podem gerar uma sinalização que induz uma super expressão de genes específicos, relacionados a expressão de fatores de crescimento, citocinas e receptores de superfície celular (OHUCHIDA *et al*, 2004). Usando amostras de transcriptomas

associadas às células T irradiadas com 600 cGy, disponibilizados pelo Banco de Dados Gene Expression Omnibus (GEO), Silveira e colaboradores observaram que a irradiação aumentou a expressão dos genes relacionados aos sinais co-estimulatórios: CD28, CD80, CD86 e ICOSLG (SILVEIRA, 2017). Além disso, ele também observou que essa dose aumentou a expressão dos genes relacionados às citocinas que induzem ativação, diferenciação e proliferação de linfócitos. Dessa forma, esse autor concluiu que 600 cGy produz uma estimulação da resposta associada ao sistema imune.

Com base nos mesmos dados de transcriptomas considerados no estudo desenvolvido por Silveira, este trabalho tem como objetivo analisar os efeitos produzidos pela dose de 600 cGy nos mecanismos de manutenção do genoma considerando-se as seguintes vias e subvias:

- 1) Via *Cell Cycle* com as subvias *Cell Cycle Checkpoints, Regulation of DNA Replication* e *S phase*;
- 2) Via *DNA Damage Response (DDR)* com a subvia *ATM signaling* e *Nucleotide Excision Repair*;
- 3) Via *Apoptosis* com as subvias *Apoptosis – homo sapiens (AP1)* e *Apoptosis (AP17)*;

2. DESENVOLVIMENTO TEÓRICO

Nesta seção será descrito as partes associadas a física, biologia, estatística e informática ao qual esse estudo se refere.

2.1 ESTRUTURA DO DNA

Todas as células do corpo humano seguem um código genético que estrutura seu funcionamento adequado. Essa informação genética, seguindo o modelo de Watson e Crick, fica armazenada na molécula de DNA (Figura 1). O DNA é uma macromolécula polimérica de ácido nucleico composta de três tipos de unidades: um açúcar de cinco carbonos, a desoxirribose, uma base nitrogenada e um grupo fosfato. As bases são de dois tipos, purinas e pirimidinas. No DNA, existem duas bases purinas, adenina (A) e guanina (G), e duas bases pirimidinas, timina (T) e citosina (C).

Os nucleotídeos, cada um composto de uma base, um fosfato e um açúcar, polimerizam-se em longas cadeias polinucleotídicas por ligações fosfodiéster 5' – 3' formadas entre unidades adjacentes de desoxirribose. (NUSSBAUM *et al.*,2001; WATSON & CRICK, 1953). As cadeias polinucleotídicas possuem suas bases nitrogenadas ligadas através de pontes de hidrogênio e associadas aos pares: a adenina irá se ligar apenas a timina e a guanina apenas a citosina. Esses filamentos, ao se entrelaçarem, formam uma dupla hélice com giro para direita. De estrutura similar, temos o RNA, que possui um açúcar ribose no lugar da desoxirribose e a uracila (U) no lugar da timina. Outra diferença estrutural é o fato de que o RNA se apresenta em fita simples na maioria dos organismos (NUSSBAUM *et al.*,2001).

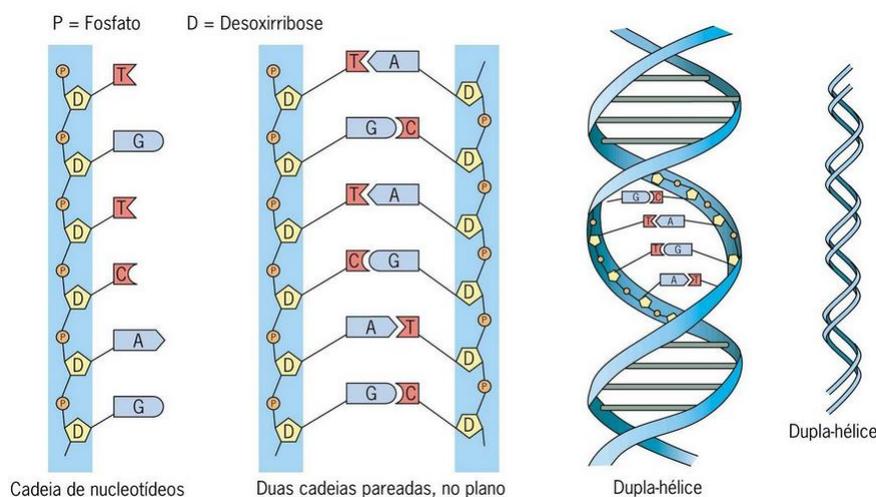


Figura 1: Estrutura do DNA, adaptado de CESAR *et al.*, 2015.

O código genético do DNA é composto por diversos genes, cada gene é uma sequência de nucleotídeos que codifica uma proteína específica. Dentro de uma molécula de DNA há segmentos de genes que não são transcritos (íntrons) e que se intercalam com os segmentos codificadores (éxons). Esse processo começa com a síntese de um RNA a partir de um molde de DNA (processo de transcrição). O RNA, chamado agora de RNA mensageiro (mRNA), irá carregar a sequência de nucleotídeos transcrita do núcleo para o citoplasma. Uma vez no citoplasma, o mRNA irá para os ribossomos onde passará pelo processo de tradução. Esse processo possui três fases: iniciação, alongamento e terminação. Junto com os ribossomos, um outro tipo de RNA atua para produção dos polipeptídeos, o RNA transportador (tRNA). O tRNA é responsável por carregar os aminoácidos que irão constituir o polipeptídeo até o sítio de entrada dos ribossomos e inseri-los de acordo com a sequência de bases correta. (NUSSBAUM *et al.*,2001; BRADLEY *et al.*,2015).

A tradução é constituída de um código que relaciona certos aminoácidos a combinações de três bases adjacentes ao longo do mRNA. Chamamos de códon cada um desses grupos de três bases que é específico para cada aminoácido. Existem uma grande variedade de combinações possíveis das quatro bases (A, T, C ou G) ao longo da cadeia polinucleotídica. Para qualquer posição, temos 4^n combinações possíveis em uma cadeia de n bases. Se considerarmos os códons, existem 4^3 ou 64 combinações possíveis de trincas. Estes 64 códons constituem o código genético. O código genético é chamado de degenerado porque existem apenas 20 aminoácidos e 64 possíveis códons. Deste modo podemos ter uma purina (A ou G), uma pirimidina (T ou C) ou, em alguns casos, qualquer uma das quatro bases e ainda obter a mesma mensagem codificada (NUSSBAUM *et al.*,2001).

De todos os códons possíveis, três deles (UAA, UAG e UGA) não se ligam a molécula de tRNA e tem função na terminação da síntese proteica nos ribossomos. Os aminoácidos que são carregados pelos tRNA ficam ligados a eles através dos anticódons do tRNA em questão. Desse modo, para que um aminoácido qualquer seja levado até os ribossomos, o tRNA deve possuir as bases que se ligam nas bases do aminoácido (exemplo: AUG se liga nas bases UAC do tRNA) (BRADLEY *et al.*,2015).

O início da tradução de um mRNA que está sendo processado em um ribossomo é sempre iniciada em um códon que especifica o aminoácido metionina (AUG).

A metionina é sempre o primeiro aminoácido codificado de cada cadeia polipeptídica e, em geral, é retirada antes que a síntese seja finalizada. O códon AUG é o códon que estabelece a matriz de leitura do mRNA e todos os códons seguintes são lidos para prever a sequência de aminoácidos da proteína (NUSSBAUM *et al.*,2001).

Os ribossomos (Figura 2) são organelas citoplasmáticas constituídas de duas subunidades, uma pequena e outra grande, e que são formados por um ou mais tipos de RNA ribossômico (rRNA) e um grande número de proteínas. Para que a tradução se inicie, é necessário que as duas subunidades dos ribossomos se juntem com uma molécula de mRNA e que um tRNA iniciador (com o anticódon UAC) chegue ao sítio P do ribossomo.

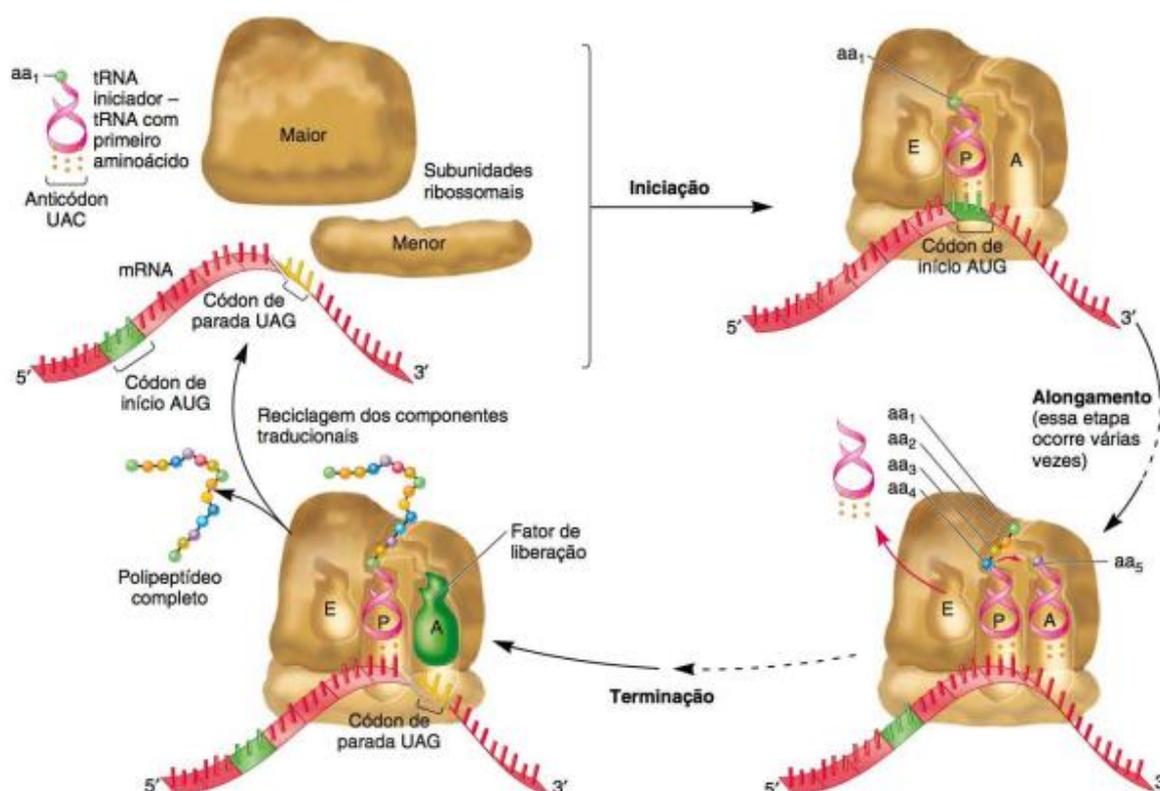


Figura 2: Resumo da tradução de proteínas em bactérias, adaptado de BRADLEY *et al.*,2015.

Um ribossomo possui três sítios, o sítio A (sítio aminoacil) é onde um códon carregado pelo tRNA é colocado para se ligar ao polipeptídeo; no sítio P (sítio peptidil) é onde ocorre a ligação do aminoácido presente no sítio A no polipeptídeo, causando o alongamento do mesmo; Após o alongamento, o tRNA presente no sítio P vai para o sítio E (sítio de saída) e é liberado do ribossomo enquanto o tRNA presente no sítio A vai para o sítio P. Esse movimento faz com que um novo trio chegue ao sítio A, causando a repetição do processo até que chegue um códon de finalização ou códon de parada no sítio A. Os códons de parada se ligam a proteínas chamadas de fatores de liberação ao invés de se ligarem a um tRNA. Isso faz com que a ligação entre o polipeptídeo ligado ao tRNA no sítio P seja hidrolisada (rompida) e os mesmos sejam liberados do ribossomo. O ribossomo é em seguida desmontado em suas subunidades e em um mRNA livre. Todos esses componentes são reutilizados até serem degradados pela célula (BRADLEY *et al.*,2015).

As proteínas têm sua forma e função determinados por alguns fatores, são eles:

- 1) Pelas sequências de aminoácidos gerados pelo produto gênico;
- 2) Pela maneira como as ligações de hidrogênio podem causar repetições de forma em algumas partes da proteína;
- 3) Pela forma como o polipeptídeo vai se dobrando enquanto é sintetizado no ribossomo, geralmente com o auxílio de outras proteínas, as chaperonas.
- 4) Quando dois ou mais polipeptídeos, que geralmente são produzidos por genes diferentes, se ligam para formar um complexo.

Qualquer alteração nos genes que não for corrigida pela célula irá causar alteração estrutural ou funcional nas proteínas e, conseqüentemente, perda ou mudança de função (BRADLEY *et al.*,2015). Um exemplo do papel fundamental dos genes está no reconhecimento das células presentes no corpo pelo sistema imune, sua alteração pode influenciar na maneira como as defesas do corpo reconhecem as células que pertencem ao organismo, células modificadas ou organismos estranhos (GOLDBERG & RIZZO, 2014).

2.2 SISTEMA IMUNE

Devido à grande variedade de substâncias presentes no ambiente, o corpo humano desenvolveu mecanismos de defesa que atuam em conjunto para a preservação da saúde do corpo. Composto por órgãos, células e moléculas, o sistema imune atua como vigilante do bem-estar do corpo, a ação conjunta de seus componentes é chamada de resposta imune. A imunidade de um indivíduo a uma determinada doença ou substância estranha está relacionada com a eficiência com que seu sistema imune detecta e inicia a resposta imunológica, sendo essa mediada pelas reações iniciais da imunidade inata e pelas respostas tardias da imunidade adaptativa (Figura 3) (ABBAS *et al.*,2015). A imunidade inata ou natural é composta por barreiras físicas, químicas e biológicas (epitélio dos tecidos dos órgãos em contato com o meio externo), células especializadas e moléculas solúveis (CRUVINEL *et al.*, 2010).

A imunidade inata possui rápida resposta a infecção, levando cerca de horas, pois seus componentes já estavam presentes no corpo antes que a substância estranha se instalasse. Em contraponto a rápida resposta, seus integrantes possuem baixa especificidade e por isso não são capazes de distinguir pequenas diferenças entre microrganismos muito similares, fazendo com que seus mecanismos sejam específicos para estruturas comuns a grupos de microrganismos relacionados. A imunidade adaptativa possui tempos de resposta imune muito mais longos (dias) e possui a capacidade de distinguir pequenas diferenças entre substâncias, a chamada especificidade, e a capacidade de gerar uma resposta mais eficiente contra um mesmo microrganismo após repetidas exposições, característica chamada de “memória” (ABBAS *et al.*,2015). Cada tipo de imunidade é representado por células específicas que trabalham em conjunto para efetuar a eliminação dos corpos estranhos.

2.2.1 Células do Sistema Imune

Após a detecção de um microrganismo, as células do sistema imune começam a secretar substâncias chamadas de citocinas. As citocinas são proteínas que, após secretadas, fazem a regulação e coordenação das células da imunidade inata e adaptativa (ABBAS *et al.*,2015). Para que as células do sistema imune se

comuniquem de forma eficiente, elas expressam receptores específicos de sinalização para uma grande variedade de citocinas enquanto secretam apenas algumas delas.

Dentre as principais funções das citocinas, podemos citar a diferenciação das células imunes, ativação das funções efetoras dos linfócitos e fagócitos, e a regulação do movimento das células imunes do sangue para os tecidos e dentro deles. A nomenclatura utilizada para identificar as citocinas varia, algumas são chamadas de interleucinas, com um número identificador, e outras que são denominadas pela sua função biológica, como o fator de necrose tumoral (*tumor necrosis factor*, TNF) (ABBAS *et al.*, 2015). A relação entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa se dá na seguinte forma: a resposta imune inata aos microrganismos estimula as respostas imunes adaptativas e sua natureza. E, por outro lado, as respostas adaptativas geralmente trabalham para aumentar os mecanismos protetores da imunidade inata, fazendo com que se tornem capazes de reagir ao corpo estranho com mais vigor.

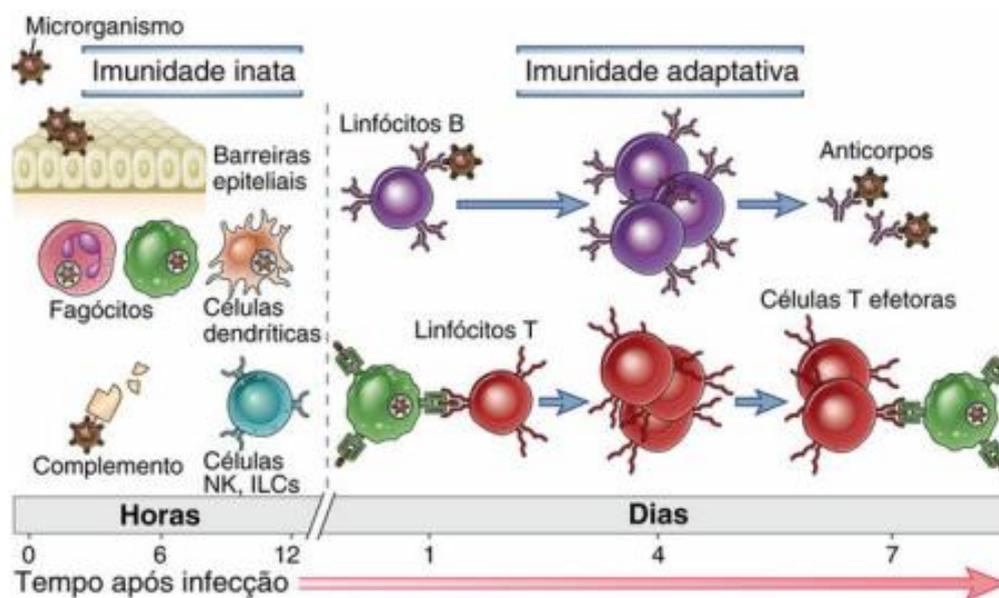


Figura 3: imunidade inata e adaptativa com seus respectivos componentes e tempo de resposta. Adaptado de ABBAS *et al.*, 2015.

Após o rompimento da barreira epitelial, os microrganismos encontrarão as células efetoras da imunidade inata, que são os fagócitos (macrófagos e neutrófilos), células dendríticas e células NK (*natural killer*). A resposta imune inata celular se dá por dois tipos principais de reações - inflamação e defesa viral. A inflamação é o

processo de recrutamento de leucócitos e proteínas plasmáticas do sangue, seu acúmulo nos tecidos e sua ativação para destruir os microrganismos. A defesa viral é uma reação mediada por citocina onde as células adquirem resistência às infecções virais e resulta na morte das células infectadas pelos vírus por ação das células NK (ABBAS *et al.*,2015). Os fagócitos são responsáveis pela fagocitose dos microrganismos e tecidos danificados.

Os neutrófilos ou leucócitos polimorfonucleares, constituem a maior população de células brancas sanguíneas e medeiam as fases iniciais das reações inflamatórias, sendo responsáveis pela lise dos tecidos e microrganismos. Os macrófagos possuem diversas funções, sendo a principal delas a fagocitose (ingestão) e morte de microrganismos. Eles também secretam citocinas quando ativados, o que faz com que mais células do sistema imune migrem para o local da infecção. As células apresentadoras de antígenos (APCs – *antigen presenting cells*) são assim chamadas por que capturam microrganismos e outros antígenos, carregam eles até os linfócitos e enviam sinais que estimulam a proliferação e diferenciação dos linfócitos (ABBAS *et al.*,2015).

As células dendríticas são APCs que participam na ativação das células T imaturas e desempenham um papel principal nas respostas inatas às infecções e na ligação das respostas imunes inata e adaptativa. As principais células do sistema imune adaptativo são os linfócitos, células apresentadoras de antígenos e células efectoras. Os linfócitos são responsáveis pelo reconhecimento e resposta aos antígenos estranhos, sendo os mediadores da imunidade humoral e celular. Entre os tipos de linfócitos, existem subpopulações distintas de linfócitos que diferem em como eles reconhecem os antígenos e em suas funções. Os linfócitos B, por exemplo, são as únicas células capazes de produzir anticorpos. Eles reconhecem os antígenos extracelulares solúveis e na superfície celular e se diferenciam em plasmócitos secretores de anticorpos, atuando como mediadores da imunidade humoral. Os linfócitos T, as células da imunidade mediada por célula, reconhecem os antígenos dos microrganismos intracelulares e as células T ou auxiliam os fagócitos a destruir esses microrganismos ou matam as células infectadas (Figura 4).

Os macrófagos e os linfócitos B desempenham papel de APCs para os linfócitos T auxiliares CD4⁺ (CD – *cluster differentiation*). Os macrófagos que apresentam antígenos para essas células, nos locais de infecção, iniciam sua ativação

e produção de moléculas que irão ativar mais macrófagos. Os linfócitos B apresentam antígenos aos linfócitos T auxiliares gerando a resposta para a produção de anticorpos para os antígenos proteicos. Um tipo diferente de APC são os linfócitos T citotóxicos (CTL – *cytotoxic T lymphocytes*), eles são células T CD8⁺, essas células reconhecem antígenos de qualquer tipo celular nucleado e se ativam para matar a célula.

Diferente das CTL, as células NK não são restritas por proteínas do MHC (*Major Histocompatibility complex*), que são exibidas na superfície das células infectadas, são constituintes citolíticas e não desenvolvem células de “memória”. Por não necessitarem de sensibilização prévia para o desenvolvimento de “memória” após a sua ativação, elas são as células citotóxicas da imunidade inata, em contrapartida ao linfócito T citotóxico da resposta imune adaptativa. Apesar das células NK não expressarem nenhuma molécula específica para antígenos, elas são altamente eficientes em reconhecer e exterminar as células que apresentam alterações ou que estão infectadas (ABBAS *et al*,2015).

Conceitualmente, um antígeno é toda substância estranha ao corpo que induz uma resposta específica do sistema imune ou qualquer molécula que seja capaz de se ligar a um anticorpo ou receptor de célula T (ABBAS *et al*,2015; MURO *et al*, 2009). A imunidade humoral possui as moléculas do sangue e as secreções mucosas, denominadas de anticorpos, que são secretadas pelos linfócitos B (ou células B). A imunidade humoral funciona como o principal mecanismo de defesa extracelular contra microrganismos e suas toxinas. Como cada anticorpo é especializado, eles ativam diferentes mecanismos para combate dos microrganismos, os chamados mecanismos efetores.

Os linfócitos T (ou células T) são os componentes da imunidade celular ou imunidade mediada por célula. Esse tipo de imunidade é responsável por eliminar infecções intracelulares através da destruição de microrganismos que residem nos fagócitos ou pela morte de células infectadas. Alguns linfócitos T ainda desempenham papel auxiliar na destruição de microrganismos extracelulares através do recrutamento de leucócitos para a eliminação do patógeno ou auxiliando os linfócitos B na produção dos anticorpos. Diferente dos linfócitos B, os linfócitos T não produzem anticorpos e possuem especificidade antigênica restrita (ABBAS *et al*,2015).

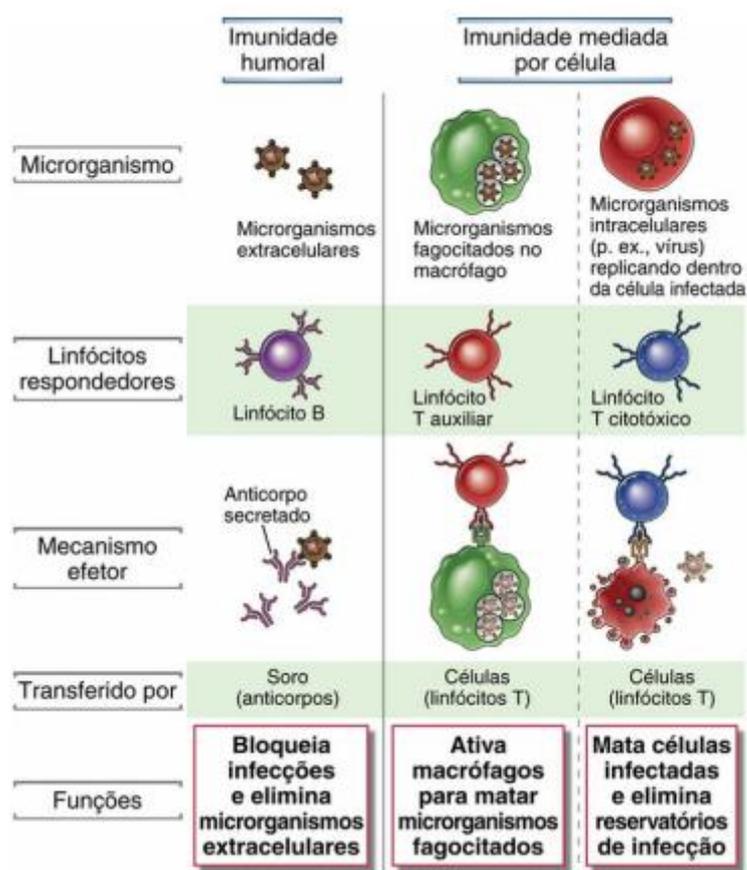


Figura 4: Tipos de imunidades adaptativas e suas principais funções na defesa do corpo. Adaptado de ABBAS *et al*, 2015

Os linfócitos T reconhecem apenas os peptídeos derivados das proteínas estranhas que foram produzidas e clivadas pelas enzimas proteolíticas na célula infectada. Esses pequenos peptídeos se associam com antígenos do hospedeiro que serão carregados para a membrana dessas células e apresentados ao sistema imune. Esses antígenos são moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) (ABBAS *et al*, 2015; VARELLA, 1986). No genoma humano, essa é a região mais variável conhecida e os genes dessa região pertencem ao sistema de antígenos leucocitários humano (HLA – *human leukocyte antigen*), que codificam as principais moléculas envolvidas na apresentação do antígeno na superfície celular (GOLDBERG & RIZZO, 2014). Como são expressas em superfícies de outras células, os linfócitos T só são capazes de reconhecer e responder a antígenos associados a superfície celular, mas não aos antígenos solúveis (ABBAS *et al*, 2015). O processo que leva a ativação dos linfócitos passa por algumas etapas e envolve várias moléculas distintas.

2.2.2 Ativação dos Linfócitos T

Chamamos de imunidade ativa a forma de imunidade que é induzida pela exposição a um antígeno estranho, nesse caso as células do sistema imune estão empenhadas na resposta ao antígeno. Os linfócitos que não tiveram contato com antígenos são chamados de inativos (imaturos ou *naive*). Chamamos de imunidade passiva aquela que foi dada a um hospedeiro através da transferência de soro ou linfócitos de um indivíduo imunizado (transferência adaptativa), adquirindo imunidade sem nunca ter sido exposto (ABBAS *et al.*,2015). Os linfócitos T imaturos só irão se ativar na presença de uma célula dendrítica que apresenta na sua superfície celular um peptídeo-MHC. Os receptores das células T são específicos para os peptídeos associados ao MHC e isso implica que só irá ocorrer interação dos linfócitos T com antígenos associados a células (moléculas do MHC são proteínas de superfície), fazendo com que as funções dos linfócitos T sejam dependentes de interações físicas e químicas (ABBAS *et al.*,2015). Além da interação com os peptídeos-MHC, os linfócitos T ainda interagem com coestimuladores produzidos pelas APCs após o contato destas com o microrganismo. A ligação do antígeno com o receptor da célula T (TCR) fornece especificidade à resposta e a coestimulação garante que as células T respondam aos microrganismos que causaram a indução dessas moléculas coestimuladoras, e não a substâncias do próprio corpo (ABBAS *et al.*,2015). Essa ideia é chamada de hipótese dos dois sinais para ativação dos linfócitos. O primeiro sinal ou gatilho é a apresentação dos antígenos pelas APCs e o segundo é o contato com as moléculas produzidas pela resposta imune inata: Coestimuladores (para células T), citocinas (para células B e T) e produtos da quebra do complemento (para células B).

Pode ocorrer ativação dos linfócitos T sem a necessidade de um segundo sinal, isso ocorre em situações de uma estimulação dos TCR forte. Da mesma forma que há a presença de sinais positivos (ativação), ocorre também há presença de sinais negativos, que geram tolerância a indução de uma resposta imune (SHARPE & FREEMAN,2002; HÜNIG *et al.*, 2015). A estimulação ocorre através da presença e interação com diversas moléculas coestimuladoras, com funções e formas distintas.

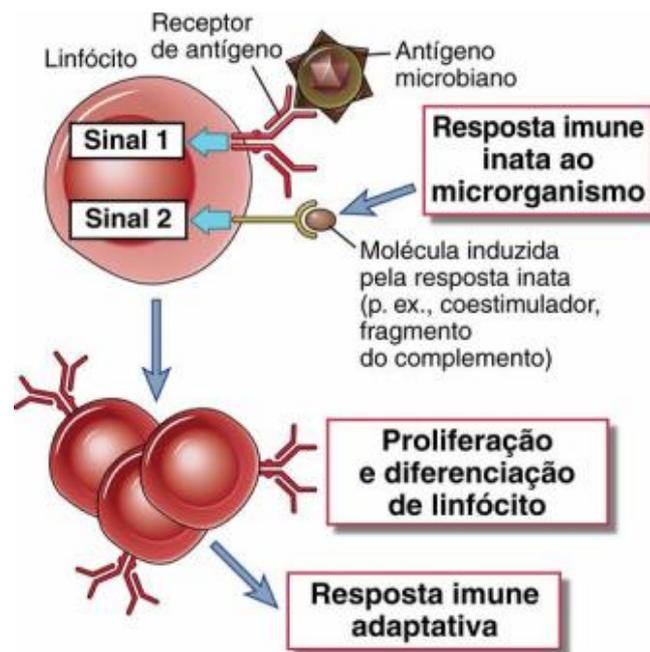


Figura 5: esquematização da hipótese dos dois sinais em uma célula B. adaptado de ABBAS *et al*,2015.

Uma maneira de facilitar o estudo dessas moléculas é dividi-las em famílias de moléculas ou vias de coestimulação (*costimulatory pathways*). A coestimulação das células T se dá através de três grandes famílias de moléculas: a superfamília B7-CD28, a subfamília TNF:TNFR (com falta no domínio para morte celular), a superfamília CD2 e algumas integrinas. Nesse estudo iremos abordar apenas a superfamília B7-CD28 e seu papel na ativação dos linfócitos imaturos e linfócitos experientes (que já tiveram contato com um antígeno). Os sinais que passam através da superfamília B7-CD28 são, em sua maioria, sinais reguladores do equilíbrio crítico entre sinais de estimulação e de inibição das células T. Esses sinais são necessários para se ter respostas imunes efetivas ao patógenos e para manter a tolerância a substâncias próprias ao corpo evitando a autoimunidade (SHARPE & FREEMAN,2002; HÜNIG *et al*, 2015). As moléculas coestimuladoras mais bem definidas para os linfócitos T são um par de proteínas relacionadas, chamadas de B7-1 (também chamada CD80) e B7-2 (também chamada CD86), que são expressas em células dendríticas ativadas, macrófagos e linfócitos B. Os sinais secundários são reconhecidos pela molécula CD28 nas células T, que reconhece a proteína B7 e é responsável pela geração dos sinais secundários (ABBAS *et al*, 2015). Um outro componente ativador da família de CD28 é um receptor chamado ICOS

(coestimulador induzível), que possui função no desenvolvimento de células T auxiliares foliculares (ABBAS *et al*,2015). A via de coestimulação que inclui a molécula responsável pela tolerância é chamada de B7-1/B7-2-CD28/CTLA-4. Nessa via estão inclusos dois membros da família B7, que possuem dupla especificidade por dois membros da família CD28, o receptor estimulador CD28 e o receptor inibitório CTLA-4 (também denominado CD152). Um outro receptor inibitório da mesma família é chamado PD-1 (morte programada 1) (SHARPE & FREEMAN,2002; ABBAS *et al*, 2015; HÜNIG *et al*, 2015). Os efeitos principais da coestimulação da CD28 é o aumento e sustentação das respostas das células T iniciadas pela sinalização receptor-antígeno. Isso permite que as células T sobrevivam e, conseqüentemente, permite que as citocinas iniciem a expansão clonal e diferenciação das células T. Ocorre também a otimização da resposta de células T previamente ativadas, promovendo a produção da interleucina 2 (IL-2) e sobrevivência dessas células (SHARPE & FREEMAN,2002; HÜNIG *et al*, 2015). A ligação com CTLA-4 envia um sinal inibidor de TCR e de transdução de sinais por CD28. Ocorre a inibição da síntese de IL-2 e seu progresso através do ciclo celular, que acaba finalizando a resposta das células T (SHARPE & FREEMAN, 2002; HÜNIG *et al*, 2015; CHEN&FLIES, 2013).

A radiação é um agente externo que pode afetar o comportamento da superfamília B7-1/B7-2-CD28/CTLA-4, seja através da modificação que ela pode causar nos genes envolvidos e que pode inibir sua função correta, seja através dos sinais gerados pelas células afetadas pela radiação e que são percebidos pelo sistema imune e que conseqüentemente causam sua ativação, como será visto a seguir.

2.3 EFEITOS BIOLÓGICOS DAS RADIAÇÕES

A radiobiologia é o estudo dos efeitos das radiações ionizantes em organismos vivos. Chamamos de radiação toda a transmissão de energia que vai de um sistema para o outro através de ondas eletromagnéticas (calor, luz visível, raios ultravioleta, raios X etc) ou partículas (radiação alfa, beta, nêutrons etc). Essa absorção de energia em materiais biológicos pode acarretar em dois efeitos: ionização ou excitação. As radiações ionizantes são aquelas onde os fótons ou partículas que são emitidos possuem energia suficiente para produzir íons na matéria que estão interagindo. As

radiações não-ionizantes são aquelas que não são capazes de produzir íons na matéria, mas que ainda conseguem produzir uma excitação dessa matéria, levando seus átomos e/ou moléculas para um estado mais elevado de energia (HALL & GIACCIA, 2018).

As radiações ionizantes também podem ser classificadas como diretamente ionizantes ou indiretamente ionizantes. Todas as partículas ionizantes (radiação particular) são diretamente ionizantes, isso significa que se elas tiverem energia cinética suficiente, elas podem perturbar a estrutura atômica do material absorvedor por onde passaram e produzir mudanças químicas e biológicas. As radiações eletromagnéticas são consideradas indiretamente ionizantes porque ao serem absorvidas pelo meio, produzem partículas carregadas que serão responsáveis pelo dano ao material (HALL & GIACCIA, 2018).

Nas células e tecidos, os efeitos biológicos são causados de duas maneiras. O primeiro pela ejeção de elétrons após a absorção da radiação e com a interação direta desses elétrons com moléculas críticas do meio celular (DNA, proteínas e lipídeos), causando alterações nas estruturas e nas funções dos componentes celulares. A outra forma de interação que causa danos é a interação da radiação com a água presente nas células. Essa interação faz ejetar elétrons da água produzindo espécies reativas, radicalares ou não (efeito indireto), sendo o principal radical livre resultante da radiólise da água a hidroxila (MARTA, 2014).

Para que as radiações ionizantes pudessem ser usadas no tratamento de doenças como o câncer, criou-se o conceito dos 5Rs da radiobiologia: Reparo, Redistribuição, Repopulação, Reoxigenação e Radiossensibilidade. O conceito de radiossensibilidade foi acrescentado após a descoberta de que as células cancerosas são mais sensíveis aos danos causados no DNA pela radiação, devido a sua alta taxa de mitose. (BERGONIÉ&TRIBONDEAU,1959). Seus estudos mostraram que a sensibilidade das células a radiação era proporcional ao grau de atividade proliferativa e inversamente proporcional ao grau de diferenciação (HAYABUCHI,2004).

Os demais conceitos são entendidos como a capacidade de reparo do DNA (reparo) que é mais eficiente nos tecidos normais, a sensibilidade a radiação de acordo com o estágio do ciclo celular em que a célula se encontra (redistribuição). A repopulação se refere a capacidade de crescimento das células clonogênicas (células

filhas com defeitos genéticos) que não sofreram morte radioinduzida. A reoxigenação vicia as células tumorais hipóxicas, que são mais resistentes à radiação e são mais capazes de se reparar e repopular o tumor. A presença do oxigênio atua como um fixador do dano causado pela radiação, já que os radicais livres peroxidantes gerados não retornam a estrutura original. O fracionamento da dose permite matar as células mais bem oxigenadas (mais sensíveis a radiação) e melhorar a oxigenação das células hipóxicas através da reparação dos vasos sanguíneos que as irrigam, fazendo com que se tornem mais oxigenadas ao longo do tratamento. Esses conceitos resumem o objetivo terapêutico da radioterapia, que é maximizar os efeitos anticâncer em tumores enquanto se procura minimizar os efeitos tóxicos nos tecidos saudáveis ao redor do campo irradiado (MARTA,2004).

2.3.1 Efeitos Biológicos das Radiações sobre o Sistema imune

A radioterapia de uma determinada região inevitavelmente expõe todos os tecidos a uma determinada dose de radiação (causada pela radiação espalhada e de fuga do cabeçote da máquina), e os efeitos causados são diferentes daqueles que ocorrem na região de interesse (FOMENTI & DEMARIA, 2009). A sinalização celular desempenha um papel importante no recrutamento do sistema imune, dessa forma podemos separar os efeitos da irradiação localizada em quatro grupos:

1. Resposta das células não irradiadas aos sinais das células irradiadas;
2. Consequências da radioterapia localizada ao resto do corpo;
3. Efeitos da radiação no microambiente tumoral que resulta em efeitos sistêmicos;
4. Efeitos abscopais, que ocorrem longe do local irradiado.

Antes de se adquirir comprovações dos efeitos abscopais das radiações ionizantes (FOMENTI & DEMARIA, 2009), muitos dos efeitos prejudiciais associados a elas eram atribuídos a irradiação celular, onde a deposição de energia era considerada responsável pelo dano a uma molécula crítica da célula, o DNA. Os processos seguintes sofridos pelas células irradiadas, tecidos e órgãos ou organismo seria o de refletir a resposta celular que foi induzida pelo dano ao DNA. Nesse sentido, os efeitos mutagênicos e clastogênicos (quebra de cromossomos) seriam o resultado de um processo de reparo do DNA, a inibição do progresso do ciclo celular seria

causado pelos mecanismos de controle do ciclo celular e a morte celular, como consequência de processos de reparo que causaram falha mitótica e/ou apoptose (MORGAN, 2003).

A instabilidade genômica é um dos efeitos causados pela radiação em células que não são diretamente irradiadas, é caracterizado por mudanças genéticas que incluem rearranjo dos cromossomos, surgimento de micronúcleos, mutações, amplificação dos genes, mutações genicas e redução da formação de colônias celulares em células replicadas de uma célula irradiada (MORGAN, 2003). Outro efeito, chamado de morte induzida ou DIE (*death-inducing effects*), é observado quando meios celulares que foram expostos a radiação são transferidos para culturas celulares que nunca foram irradiadas. Fatores liberados pelas células que morreram ou que estão morrendo causam um efeito citotóxico sobre as células não irradiadas.

Predominantemente em baixas doses de radiação, temos os chamados efeitos de espectador que são induzidos pela radiação (*radiation-induced bystander effects*), eles se dão pela comunicação das células irradiadas através da secreção de fatores e/ou pelas junções comunicantes entre elas e as células não irradiadas (*cell-to-cell gap junction*).

Entre os efeitos causados, podemos incluir rearranjo dos cromossomos, formação de micronúcleos, transformação celular, mutação dos genes e redução da eficiência replicativa das células. Os fatores clastogênicos foram descritos *in vivo* e *in vitro* e se manifestam quando o plasma sanguíneo isolado de indivíduos ocupacionalmente, ambientalmente ou terapêuticamente expostos a radiações ionizantes conseguem causar aberrações cromossômicas após cocultura com linfócitos do sangue de indivíduos não irradiados (MORGAN, 2003). Os efeitos de transgeração (*transgenerational effects*) ocorrem nos descendentes de indivíduos que foram expostos a radiação.

Todos esses efeitos tem o dano direto ao DNA como um agravante, mas aqueles que afetam a prole de células irradiadas e gerações futuras indicam que a área afetada pela radiação é maior do que o número de células que foram irradiadas (MORGAN, 2003).

Além dessas alterações, as mudanças causadas pela radiação no microambiente tumoral podem sinalizar para um tipo de morte celular chamada imunogênica e a sua ocorrência está relacionada a imunocompetência do hospedeiro (FOMENTI & DEMARIA, 2009). Um dos principais efeitos da radioterapia sobre a resposta imune é a indução de um forte sinal de perigo, conceito postulado por Polly Matzinger em 1994, que está relacionado aos sinais de estresse gerado pelo dano ao tecido. De acordo com essa proposta, quando uma célula é estressada, mesmo na falta de qualquer substância estranha, ela emite moléculas que ativam as APCs. Sem a presença de um antígeno, as células dendríticas podem ser ativadas por sinais endógenos.

Esses sinais vêm de células que sofreram estresse causado por um vírus ou por morte celular através da necrose, mas que não são emitidos por células saudáveis ou que estão em apoptose (THOMAS & COOPER, 2012).

Diversos experimentos mostraram que a dose de radiação está associada a ativação do sistema imune inato ou do sistema imune adaptativo (FOMENTI & DEMARIA, 2009). Em doses menores que 0,5 Gy (Gy – gray, unidade de dose), muito baixas para causar morte celular, as células liberaram radicais de oxigênio e hidrogênio que foram responsáveis por ativar as células do sistema imune inato, como macrófagos, que liberaram citocinas e que teve como resultado um efeito tumorigênico. Em doses altas o suficiente para causar diretamente a morte das células, a radiação induziu a emissão dos sinais de perigo citados acima e resultou em um efeito imune estimulante (FOMENTI&DEMARIA, 2009; De la CRUZ-MERINO *et al.*, 2014).

Evidência experimental demonstrou que o sistema imune tem papel ativo na progressão tumoral, exercendo atividades tanto pró tumorigênicas como antitumorais. Um tumor que se tornou clinicamente aparente, foi capaz passar por um processo de edição imunológica, onde adquiriu resistência a resposta imune. Alguns dos complexos mecanismos de resistência incluem a produção de citocinas imunossupressoras, baixa na regulação de moléculas antigênicas nas células cancerosas, disfunção das células dendríticas (FOMENTI & DEMARIA, 2009; De la CRUZ-MERINO *et al.*, 2014).

Neste contexto, os efeitos que a radiação causa no microambiente tumoral são de grande importância para a prática da imunoterapia. Esses efeitos resultam em

modificações que interferem na imunoresistência do tumor e que podem acarretar em uma ativação e resposta do sistema imune que estava previamente inibido. Um exemplo desse efeito está representado na Figura 6.

Nas seções seguintes serão apresentados os métodos para se analisar esses conjuntos de interações e como é feito para se obter resultados deles.

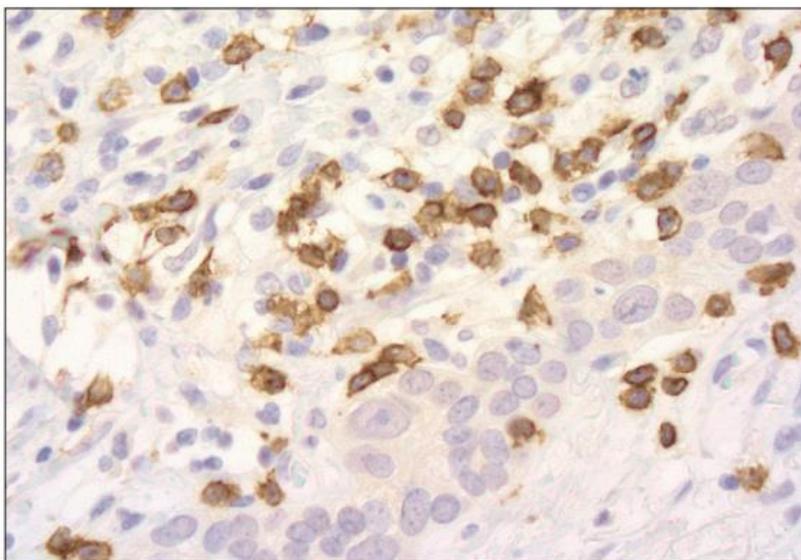


Figura 6: Linfócitos T citotóxicos (marrom) infiltrando células residuais de câncer de mama após radioterapia, adaptado de FOMENTI & DEMARIA, 2009.

2.4 REDES BIOLÓGICAS

Como visto nas seções anteriores, um organismo é formado por um conjunto de moléculas que interagem para produzir um resultado, que pode ser a produção de uma proteína, de um anticorpo, de um sinal que causará uma resposta, entre outros.

A biologia sistêmica é um ramo da ciência que busca entender os organismos biológicos através da descrição das interações de seus constituintes. Ela descreve a relação dos genes contidos no genoma (por exemplo) que são expressos com o intuito de formar proteínas que irão interagir coletivamente em uma via biológica, com o propósito final de executar uma função celular. A representação de uma grande variedade de processos e até sistemas pode ser feita através do uso de modelos de redes biológicas (AITTOKALLIO & SCHWIKOWSKI, 2006).

Redes biológicas são de grande importância para o entendimento dos mais diversos sistemas do corpo. Elas estão presentes nas primeiras delimitações das células, em suas conectividades, no sistema imune e no cérebro, na genética clássica na forma de mapas entre os genes, e entre os genes e seus respectivos fenótipos (IDEKER, 2017). A reconstrução de uma rede fornece a estrutura para a aplicação de métodos matemáticos que podem descrever quantitativamente as propriedades das redes de sinalização. Uma rede de interações, em matemática, é chamada de grafo e seus principais componentes são os nós, módulos e vias (SIMAO, 2012). A figura 7 representa os três principais componentes de uma rede de interação.

Os nós representam os compostos e reações que possuem uma alta conectividade e interação com uma mesma proteína. Uma sinalização de um nó que está altamente conectado pode indicar a ativação de proteínas que desempenham funções importantes dentro do papel funcional da célula. Os módulos englobam grupos de compostos e proteínas que desempenham uma função em conjunto, mas que só são ativados sob certas circunstâncias. Os módulos representam grupos relacionados por suas funções, mas que geralmente atuam em vias diferentes (PAPIN *et al.*, 2005). O terceiro grupo é representado pelas vias que conectam um sinal de entrada a um sinal de saída. Um exemplo de via são os passos necessários para a ligação de um fator de crescimento ao seu receptor através da ativação de fatores de transcrição que induz a expressão de genes alvo (PAPIN *et al.*, 2005). Agregado ao contexto de vias, existem as chamadas subvias, que são as responsáveis por conjuntos de genes com funções bem específicas. Um exemplo de via e sua respectiva subvia, pode ser representado pela via de apoptose (morte celular) e a subvia extrínseca de apoptose, que está presente como um caminho dentro da via de apoptose.

Todas as interações que acontecem nas vias dependem das funções específicas de cada componente, quando cada nó executar sua determinada função poderemos ter a ocorrência da ativação ou inibição de outros componentes da via ou de proteínas relacionadas. Se conhecemos a função de uma determinada proteína, podemos concluir que as proteínas que se ligam a ela agem na mesma via ou em complexos.

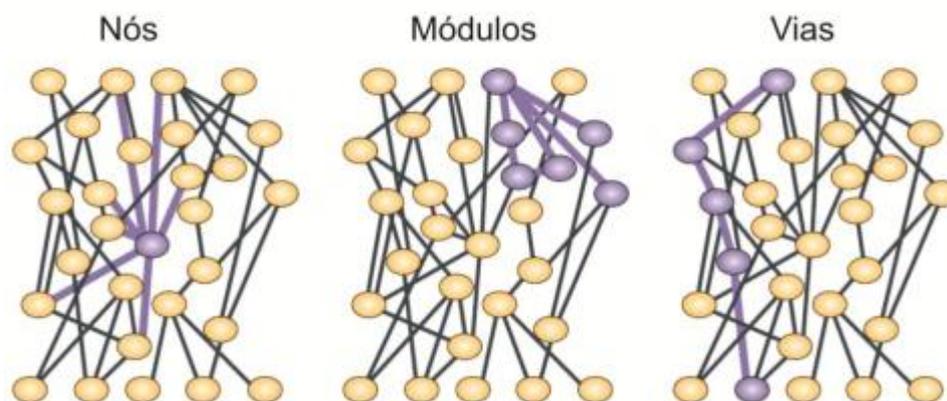


Figura 7: Os três caminhos de uma rede de interação de proteínas, adaptado de PAPIN *et al.*,2005.

Caso algum componente da via seja danificado ou modificado por um agente externo como por exemplo, a radiação ionizante, a via terá sua função interrompida ou alterada e mesmo que seus constituintes possuam outro meio de comunicação, a atividade da via ficará comprometida (EISENBERG *et al.*,2000).

2.5 Mecanismos de Manutenção do Genoma

A medida que envelhecemos, o DNA acumula mutações que ativam proto-oncogenes e inativam genes supressores de tumor. A instabilidade genética que influencia a proliferação de tumores é alimentada pelos danos ao DNA sofridos ao longo da vida e por erros que ocorreram na maquinaria do DNA. Nesse sentido, o câncer é considerado uma doença dos genes (HOEIJMAKERS, 2001). Os resultados dos danos ao DNA são divergentes e em geral desfavoráveis. Efeitos agudos podem surgir do metabolismo incorreto do DNA, resultando em parada do ciclo celular ou morte celular. Efeitos de longa duração podem resultar em mutações irreversíveis que contribuem para a oncogênese (HOEIJMAKERS, 2001).

Aproximadamente 10,000 trilhões de divisões celulares acontecem em um período de vida humana típico, a figura 8 representa um esquema do ciclo celular onde, para cada divisão celular, aproximadamente 6,8 bilhões de pares de base de DNA devem ser replicados e então segregados para cada uma das células filhas. Nesse contexto, a divisão celular acontece junto com milhares de lesões de DNA que ocorrem em cada célula, a cada dia. A maquinaria do ciclo celular tem por função,

encontrar pontos onde possa ter ocorrido algum dano e executar uma correção dos mesmos. Isso acontece em pontos específicos nas fases G1, S, G2 e M, e que permite o reparo das lesões antes que estas sejam convertidas em mutações permanentes, garantindo que cada célula do corpo tenha uma cópia idêntica do genoma (BANSBACH & CORTEZ, 2011).

Devido à grande variedade de agentes que podem afetar o DNA, um único processo não pode resolver todos os possíveis erros. A evolução moldou uma gama de mecanismos que reparam a maior parte dos danos, mas não todos (HOEIJMAKERS, 2001). Nos mamíferos, temos quatro mecanismos que cumprem a função de reparar o DNA: Reparo por excisão de nucleotídeos (NER), reparo por excisão de base (BER), reparo por recombinação homóloga e reparo por junção final (SIMAO, 2012; HOEIJMAKERS, 2001).

O reparo por NER visa cuidar de danos envolvendo distorções na dupla hélice, que interferem com o pareamento de bases, gerando interrupções na transcrição de proteínas e replicação normal. NER é mais versátil em termos de reconhecimento de lesões. Existem duas subvias NER, as chamadas NER de genoma global (GG-NER) e reparo por acoplamento de transcritos (*transcription-coupled repair*). A função da GG-NER é verificar todo o genoma atrás de lesões de distorções e o reparo por acoplamento de transcritos atua em lesões que bloqueiam o alongamento da RNA polimerases. Pequenas alterações químicas das bases são corrigidas através do reparo por BER. Esse tipo de lesão pode ser, ou não, capaz de interromper a transcrição e replicação. Nesse sentido, BER possui grande relevância na prevenção de mutações genéticas. Esses mecanismos agem apenas em lesões que afetam uma das fitas de DNA, a sequência danificada ou errônea é removida, produzindo um espaço que será preenchido usando a fita complementar como molde (HOEIJMAKERS, 2001).

Quando os danos afetam as duas fitas de DNA, os mecanismos de recombinação homóloga e junção final (e outros mecanismos de suporte) são os processos responsáveis por corrigir esses danos. A recombinação homóloga apresenta uma maior relevância nas fases S e G2, quando o DNA é replicado e se tem uma cópia da sequência (cromátide irmã) para alinhar com as fitas danificadas, em contraste, o reparo por junção final é mais relevante na fase G1 do ciclo celular, quando não se tem uma cromátide irmã.

Além desses mecanismos, algumas proteínas podem reverter diretamente algumas lesões, como a O^6 - metilguanina metiltransferase, que remove a O^6 - metilguanina. Essa lesão é altamente mutagênica, já que consegue parear-se tanto com C quanto com T e evitar os mecanismos de reparo por bases mal pareadas. (HOEIJMAKERS, 2001).

Todos os mecanismos de manutenção podem ser classificados dentro de vias de sinalização, que constituem os processos envolvendo as respostas mais imediatas ao dano no DNA (*DDR-DNA damage response*) e eventos tardios que ocorrem caso esses mecanismos não sejam eficientes.

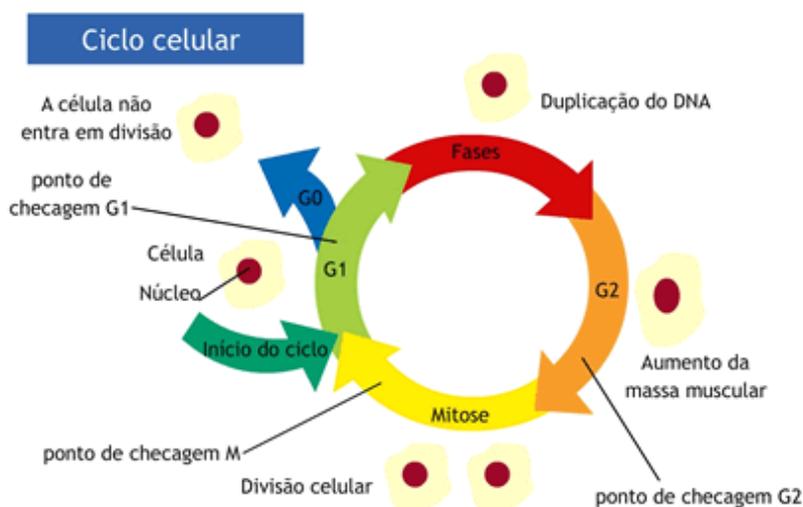


Figura 8: desenho esquemático do ciclo natural de uma célula. A fase marcada por G0 é o momento em que a célula cessa sua evolução no ciclo para corrigir algum erro (senescência), caso isso não ocorra, ela entra em apoptose. Adaptado de SóBiologia,

Essa resposta regula programas transcricionais, replicação de DNA, mitose e reparo. Caso esses primeiros mecanismos não sejam efetivos, outros mecanismos podem promover a eliminação das células danificadas da população através do processo de apoptose ou de senescência (BANSBACH & CORTEZ, 2011). É possível separar os genes do GMM (*Genome Maintenance Mechanisms*) nas seguintes vias: Pontos de controle do ciclo celular, Reparo e recombinação do DNA, Senescência e Apoptose.

Os pontos de controle estão presentes nas passagens da fase G1 para S, da fase G2 para mitose e no próprio processo de mitose. A senescência refere-se ao estado de perda permanente da capacidade proliferativa. As células que entram em

senescência são consideradas viáveis, mas perdem a capacidade de se dividir, param de sintetizar DNA, se tornam alargadas e com aspecto achatado com um aumento na granularidade. Tem se reportado a ocorrência de senescência em células cancerosas seguida de um grande estresse celular na forma de dano ao DNA induzido pelos tratamentos radioterápicos. As células que entram na senescência tendem a morrer principalmente pelo processo de apoptose, que é um mecanismo que causa o encolhimento da célula e a formação dos corpos apoptóticos (BASKAR *et al*, 2012).

Para que seja possível estudar as vias e as alterações decorrentes de ação de agentes externos, como a radiação, por exemplo, normalmente recorre-se ao uso de informações disponibilizadas em bancos de dados públicos.

2.6 BANCOS DE DADOS

Com o início do projeto genoma humano (HGP – *human genome Project*), que foi uma iniciativa internacional para sequenciar todo o genoma humano, surgiu uma grande quantidade de dados relacionados aos genes e suas proteínas (ROUSHAN & AHMED, 2014; WATSON, 1990). Essa iniciativa deu origem a bancos de dados públicos de informações moleculares de diversos organismos e o desenvolvimento de novas tecnologias para tornar a análise dos genes mais eficiente e seu resultado, mais confiável (COLLINS, 1999). Para a biologia sistêmica, os bancos de dados são um repositório que tem por objetivo gerenciar e armazenar as demandas de informação.

A medida que novas informações surgem, elas devem passar por uma padronização para que sejam integradas. Os dados do HGP foram padronizados para diversos bancos de dados (WATSON *et al.*, 1990). O HGNC (*Human Gene Nomenclature Committee*) é um desses bancos de dados, sua função é padronizar a nomenclatura dos mais diversos genes (PAVOY *et al.*, 2001). Pode-se citar também os bancos de dados Ontocancro, *Biocarta*, *Reactome*, *Kegg*, *Gene Ontology* (GO) e *National center for biotechnology* (NCBI) que são outros exemplos de repositórios de informações diversos organismos (Tabela 1).

Tabela 1: Bancos de dados e seus endereços para consulta online.

NOME	ENDEREÇO
Ontocancro	http://www.ontocancro.org/
GEO	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/
Biocarta	http://www.biocarta.com/
Reactome	http://www.reactome.org
Kegg	http://www.genome.jp/kegg/
Gene Ontology	http://www.geneontology.org/
National Cancer Institute	http://www.pid.nci.nih.gov/
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

Além dos bancos de dados, o avanço tecnológico permitiu o desenvolvimento de novas técnicas de análise. A tecnologia de microarranjo foi uma dessas técnicas e se destaca das demais por possuir uma capacidade de análise rápida e eficaz do comportamento de milhares de genes para um mesmo experimento (SCHULZE & DOWNWARD, 2001). Os dados obtidos dessa técnica são armazenados no banco de dados GEO (*Gene expression Omnibus*), que é o maior banco de dados público sobre expressão de genes. As informações armazenadas no GEO vêm de laboratórios e empresas, e abrange uma variedade de fenômenos biológicos (BARRET & EDGAR, 2006). A *Affymetrix*, fundada pelo Dr. Stephen Fodor em 1992, é uma dessas empresas e fabrica os chamados microarranjos de DNA.

2.7 TÉCNICA DE MICROARRANJO

Os microarranjos, arranjos de DNA, chips de DNA, biochips ou GeneChips, como também são chamados, apresentam diversas sequências simples de DNA ou RNA ordenadas em uma matriz sólida (que pode ser de vidro, sílica ou de nylon). Os seguimentos são denominados de “sondas” e o termo transcriptoma define o conjunto de genes que são transcritos por uma célula ou um tecido, expressando suas funções, características fenotípicas ou respostas a estímulos ambientais. As plataformas de arranjo podem ser separadas em dois grupos: aqueles que utilizam oligonucleotídeos

sintéticos e os que fragmentos de DNA complementar (cDNA) (GUIDALINI & TUFIK, 2007; COLOMBO & RAHAL, 2009). O conjunto de sondas é denominado de *probset* e o conjunto de todos os *probsets* de um arranjo irá definir a expressão de um determinado gene.

Outro termo utilizado nessa técnica são os “alvos”, que representam os cDNAs marcados que estão imersos em solução e que são provenientes das amostras biológicas. Em genética, cDNA é o DNA sintetizado a partir de uma molécula de RNA mensageiro, cujos íntrons já foram removidos pelo processo de *splicing* (GRIFFITHS *et al*, 2008).

A hibridização entre as sequências de cDNA alvos que são marcados com fluoróforos ou radioisótopos, com um arranjo de várias sondas de DNA fixadas em uma lâmina ocorre através do pareamento das bases. O nível de expressão de cada gene da amostra é representado pelo sinal de intensidade luminosa (fluorescência) de hibridização que é emitido pela substância selecionada para marcação e determinado por um sistema que realiza a leitura da intensidade da fluorescência. (COLOMBO & RAHAL, 2009; SILVEIRA, 2017). A tecnologia dos microarranjos que utiliza oligonucleotídeos foi desenvolvida pela empresa Affymetrix (www.affymetrix.com) e seus *probsets* são constituídos de aproximadamente 8 sondas, que podem ser de dois tipos: sondas de par perfeito (PM- *Perfect Match*) e de par incompatível (MM- *Mismatch*) (BECKER & FEIJÓ, 2003). A sonda PM complementa perfeitamente as sequências do alvo e as sondas MM são similares as PM mas com uma base modificada no seu centro, isso permite a quantificação e subtração dos sinais causados por sinais inespecíficos e de fundo (*background*) captados pelas sondas PM (SILVEIRA, 2017; BECKER & FEIJÓ, 2003).

A amostra a ser analisada é preparada da isolamento completa de mRNA, em seguida são produzidas fitas duplas de cDNA que carregam um promotor T7 na ponta 5' da fita. Esse promotor é utilizado para se fazer a transcrição *in vitro*, onde os nucleotídeos bionitilados serão incorporados aos cRNA resultantes do processo de fragmentação. O processo de fragmentação se dá através de hidrólise induzida por metais, que fragmenta os cRNAs bionitilados de 35 a 200 bases e que depois serão hibridizadas no GeneChip. Após a ligação dos cRNA bionitilados com os nucleotídeos do chip, é feita a marcação com um conjugado fluorescente de estraptavidina e a intensidade da fluorescência para cada *probset* é adquirida por um scanner a confocal

a laser (BECKER & FEIJÓ, 2003). A figura 9 resume o processo de obtenção dos dados dos microarranjos de oligonucleotídeos.

A etapa final do protocolo Affymetrix de um GeneChip deve passar por um processo de normalização, o objetivo dessa etapa é eliminar variações no brilho geral devido a presença de impurezas e preservar a variação biológica determinada pelo experimento (SILVEIRA, 2017). A normalização também garante que as informações obtidas contenham significado biológico, já que a intensidade da expressão dos genes sem tratamento não representa diretamente os níveis de mRNA (STEINHOFF & VINGRON, 2006).

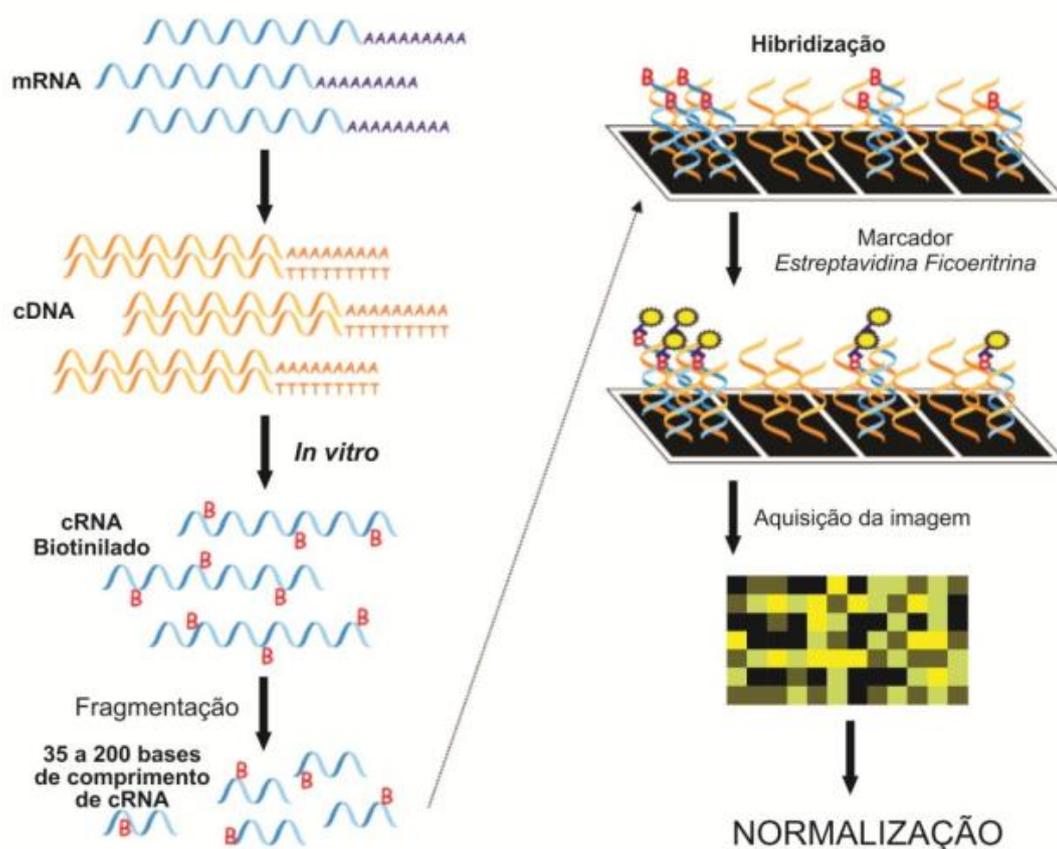


Figura 9: visão geral do protocolo de um GeneChip da Affymetrix. Adaptado de SIMAO, 2012

2.8 MÉTODOS DE NORMALIZAÇÃO

Atualmente existe uma grande variedade de métodos disponíveis e que podem ser usados para executar a normalização dos dados de microarranjos e correções de ruído de *background*, como, por exemplo:

- Média robusta de múltiplos *chips* (RMA- *Robust Multichip Average*)
- Microarranjo de suíte versão 5.0 (MAS 5.0 – *Microarray Suite Version 5.0*).
- RMA para *Affymetrix GeneChip* (GCRMA- *GeneChip Affymetrix RMA*)
- MAS 5.0 com chamadas P/M/A (Presente/Marginal/Ausente)

A utilização desses e outros métodos podem ser aplicados em arquivos no formato *.CELL* através da linguagem estatística de programação R e os pacotes de dados do projeto *Bioconductor* (IRIZARRY *et al*, 2003; STEINHOFF & VINGRON, 2006; SIMAO, 2012).

2.9 ANÁLISE DE DADOS DE EXPRESSÃO DE VIAS E GENES

A base da análise de expressão gênica diferencial está na comparação entre os níveis de expressão de um gene presente nas amostras experimentais e o nível de expressão do mesmo gene em uma amostra de controle (DUDOIT *et al*, 2002).

Uma das metodologias utilizadas para análise das vias é a que foi proposta por Castro e colaboradores, onde se analisa as vias através dos cálculos da atividade e diversidade relativas. Através desses cálculos é possível avaliar se os níveis de expressão gênica estão alterados e definir padrões de expressão entre os genes das vias (CASTRO *et al*, 2007). Para uma determinada via α , a diversidade relativa está ligada ao grau de alteração ocorrido na distribuição de expressão dos genes pertencentes a essa via. Um dos conceitos da Teoria da Informação é a chamada entropia de Shannon e, por definição, a entropia de Shannon normalizada é representada pela seguinte relação

$$H_{\alpha} = -\frac{1}{\ln(M_{\alpha})} \sum_i^{M_{\alpha}} p(i, \alpha) \ln p(i, \alpha) \quad 0 \leq H_{\alpha} \leq 1 \quad (1)$$

Onde:

- M_α é o número de genes em uma via α ;
- $p(i, \alpha)$ é a frequência da diversidade do gene i ;

É possível obter $p(i, \alpha)$ através da seguinte relação:

$$p(i, \alpha) = \frac{s(i, \alpha)}{N_\alpha} \quad (2)$$

Sendo:

- $s(i, \alpha)$ a atividade do gene i ;
- N_α a soma da expressão dos genes que constituem uma determinada via α

É possível definir a diversidade relativa, a partir da equação normalizada da entropia de Shannon (1), para comparar a distribuição de informação contida na expressão de um conjunto de genes associados às amostras experimentais e de controle, como se segue:

$$h_\alpha = \frac{H_\alpha^e}{H_\alpha^e + H_\alpha^c} \quad 0 \leq h_\alpha \leq 1 \quad (3)$$

Onde H_α^e e H_α^c representam a entropia de Shannon para as duas amostras (experimentais e de controle) (CASTRO *et al.*, 2007). Nota-se que quando os valores da entropia de Shannon associada as amostras do experimento são maiores que a as amostras de controle ($H_\alpha^e > H_\alpha^c$), a diversidade relativa associada a via α tem valor maior que 0.5 ($h_\alpha > 0,5$). No caso inverso, para $H_\alpha^e < H_\alpha^c$, a diversidade relativa associada a via α vale menos que 0,5 ($h_\alpha < 0,5$) (CASTRO *et al.*, 2006; 2007).

De forma similar, a atividade relativa pode ser definida como:

$$n_\alpha = \frac{N_\alpha^e}{N_\alpha^e + N_\alpha^c} \quad 0 \leq n_\alpha \leq 1 \quad (4)$$

Onde:

- n_α é a atividade relativa associada à via α ;
- N_α^e é a atividade das expressões de genes pertencentes a via α associada ao experimento;
- N_α^c é a atividade das expressões de genes pertencentes a via α associada ao controle.

E, análogo à diversidade relativa, se $N_\alpha^e > N_\alpha^c$, a atividade relativa associada a via α é maior que 0,5 ($n_\alpha > 0.5$). Caso contrário, quando $N_\alpha^e < N_\alpha^c$, a atividade relativa associada a via α é menor que 0,5 ($n_\alpha < 0,5$)(SIMAO et al., 2010).

A diversidade relativa representa a alteração em um conjunto de genes enquanto que a atividade representa a alteração na via como um todo, para que seja possível determinar se essas alterações possuem significado estatístico quando aplicadas a um determinado estudo (microarranjo), devemos utilizar o método estatístico chamado de bootstrap (SIMAO, 2012)

Este método estatístico permite calcular a distribuição amostral da atividade e diversidade através de uma análise de reamostragem aleatória que abrange todos os genes presentes no microarranjo com repetições que variam de 100 a 100.000 com as mesmas quantidades de genes das vias analisadas. Isso ocorre, para investigar a significância da amostragem em relação a uma distribuição de probabilidade normalizada (RIBEIRO, 2017) (SIMAO et al., 2012).

No ano de 2009, Castro e colaboradores desenvolveram e implementaram um novo software, chamado de ViaComplex (CASTRO et al., 2009). Esse software realiza os cálculos da atividade e diversidade relativa e possibilita a comparação de dados de microarranjo para determinar se um conjunto de amostras experimentais está alterado de forma significativa em relação as amostras de controle, através do uso do método de bootstrap (RIBEIRO, 2017) (SIMAO et al., 2012). O software se utiliza de uma técnica de correção para evitar falsos positivos, conhecido na estatística como erro de tipo I, que corrige um resultado que foi considerado com significado estatístico por acaso (SILVEIRA, 2017). O código fonte do software ViaComplex contendo todas as definições matemáticas e estatísticas, podem ser encontrados em ambiente virtual (CASTRO et al., 2009).

Caso se queira analisar genes específicos de uma via de forma individual, pode-se utilizar métodos estatísticos que comparam diferenças entre grupos de amostras. Um exemplo desse tipo de método é o chamado ANOVA. Uma forma de complementar a análise é utilizando o cálculo de *fold change* associado a esses genes. Ele analisa a variação da expressão de um gene, relacionando o grupo de controle com o do experimento. Assim, o *fold change* será a razão entre o valor de expressão experimental de um gene pelo valor da expressão do mesmo gene em seu controle, dado pela seguinte equação:

$$f_i = \frac{x_i^a}{x_i^c} \quad (5)$$

Onde:

- x_i^a é o valor de expressão do gene alterado;
- x_i^c é o valor de expressão do gene no grupo controle (SILVEIRA, 2017).

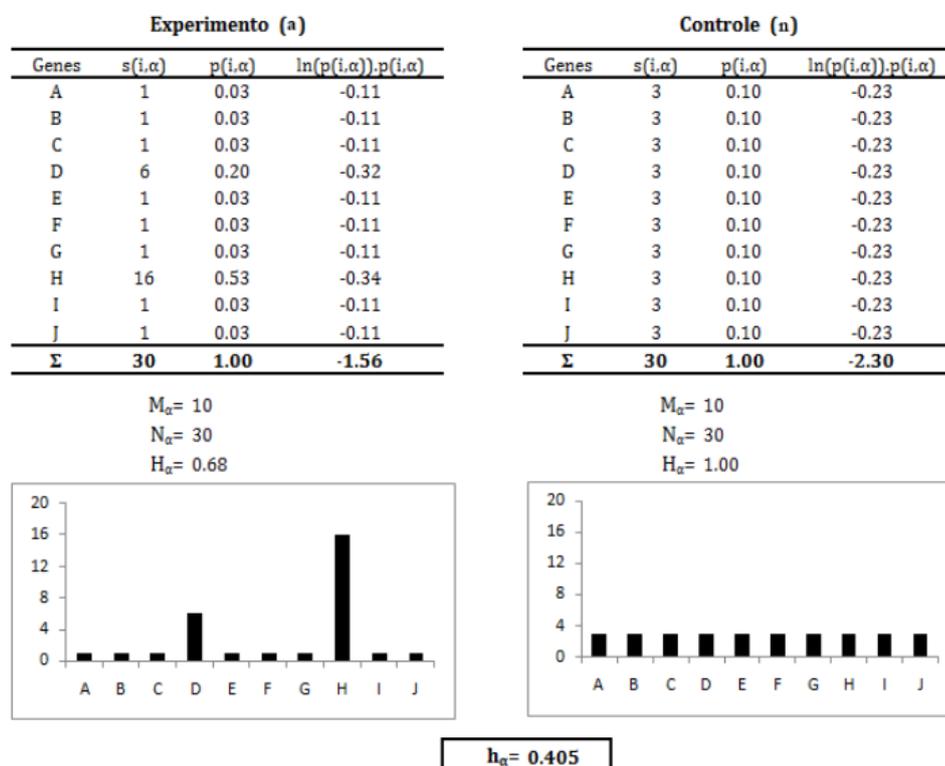


Figura 10: Exemplo do método apresentado mostrando os níveis de expressão de 10 genes quaisquer. Adaptado de SIMAO, 2012

3. METODOLOGIA

Nesta seção serão descritos os tópicos relacionados à metodologia empregada neste estudo para determinar os efeitos causados pela radiação em células T e determinar a atividade das vias associadas ao mecanismo de manutenção do genoma em função da irradiação comparando um controle (0 cGy) com uma amostra irradiada com 600 cGy.

3.1 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS DE MICROARRANJO

Os efeitos biológicos produzidos pela radiação gama em células T foram determinados utilizando-se dados de transcriptoma disponibilizados no banco de dados GEO, Plataforma GPL571 e número de acesso GSE58613. Essa plataforma utiliza a tecnologia de chip de microarranjo Affymetrix HG-U133_2 (do acrônimo em inglês - Human Genome U133A 2.0 Array). Esses dados de transcriptoma foram obtidos a partir de um estudo realizado por Lucas e co-autores (LUCAS *et al.*, 2014), que realizaram irradiação ex-vivo de amostras de sangue coletadas de oito doadores adultos e saudáveis usando um irradiador de ¹³⁷Cs e dose de 600 cGy (número de amostras n=8). Foi considerado um grupo controle relacionado a células não irradiadas (número de amostras n=8).

3.2 SELEÇÃO DE VIAS ASSOCIADAS AO SISTEMA IMUNOLÓGICO

Este estudo considerou as seguintes vias associadas à conservação do genoma humano, de acordo com a literatura (SIMAO *et al.*, 2012).

- 5) Via *Cell Cycle* com as subvias *Cell Cycle Checkpoints*, *Regulation of DNA Replication* e *S phase*;
- 6) Via *DNA Damage Response (DDR)* com a subvia *ATM signaling* e *Nucleotide Excision Repair*;
- 7) Via *Apoptosis* com as subvias *Apoptosis – homo sapiens (AP1)* e *Apoptosis (AP17)*;

A determinação dos níveis de expressão, obtidos a partir do tratamento de dados de transcriptomas, considerou o maior valor de expressão nos casos em que múltiplas

sondas representam o mesmo gene, de acordo com as recomendações de Stalteri & Harrison (STALTERI & HARRISON, 2007).

3.3 ANÁLISE DA RESPOSTA DE VIAS EM FUNÇÃO DA IRRADIAÇÃO

Para se investigar o comportamento das vias em função da dose de 600 cGy, utilizou-se o modelo descrito por Castro e colaboradores (CASTRO *et al.*, 2007) para calcular a diversidade e a atividade relativas, conforme as equações (3) e (4) descritas na Seção 2.7 (Análise de dados de expressão de vias e genes). O método bootstrap foi utilizado para testar a significância da diferença dos valores da atividade e diversidade associadas às amostras irradiadas em relação ao controle através de uma reamostragem do valor da atividade e diversidade relativa com 10.000 repetições (BLAND & ALTMAN, 2015).

Considerou-se que a dose de 600 cGy produziu um aumento significativo nos valores da atividade ou da diversidade relativas das vias para valores de $p \leq 0,05$. Por outro lado, considerou-se que essas doses causaram uma diminuição significativa nos valores da atividade ou da diversidade relativas para valores de $p \geq 0,95$. Para valores de p situados no intervalo $0,05 < p < 0,95$, considerou-se que a irradiação não alterou os valores da atividade ou da diversidade relativas das vias.

Nos casos em que se observou mudanças significativas na atividade e/ou diversidade das vias, utilizou-se análise dos falsos positivos para certificar que essas mudanças não ocorreram por acaso (DALMOLIN *et al.*, 2012). Em todos os testes estatísticos aplicados nessa análise, considerou-se o nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

O software ViaComplex* foi utilizado para realizar os cálculos associados à atividade e diversidade relativa das vias, bem como a análise estatística.

[*] - <http://lief.if.ufrgs.br/pub/biossoftwares/viacomplex/release.htm>

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As tabelas de 2 a 8 apresentam as amostras de microarranjo com as sondas e respectivos genes considerados neste trabalho. De acordo com a metodologia, as amostras de transcriptomas foram obtidas através do banco de dados GEO. A relação entre sondas e genes contidos em cada subvia associada aos mecanismos de manutenção do genoma foram obtidos através do banco de dados Ontocancro.

Tabela 2: Dados referentes a subvia *ATM signaling* da via *DNA Damage Response* considerando as sondas, os genes e os respectivos valores de expressão

Sondas	Genes	Expressão do gene	
		0 cGy	600 cGy
202123_s_at	ABL1	8,470837611	8,454229641
210858_x_at	ATM	8,666635586	7,898994761
209903_s_at	ATR	9,088116834	9,009288415
204531_s_at	BRCA1	5,702348392	5,658316937
205394_at	CHEK1	4,061289283	3,917806954
210416_s_at	CHEK2	5,368090027	5,468802488
203725_at	GADD45A	7,745580473	10,39624888
201464_x_at	JUN	11,49357776	11,50419998
210477_x_at	MAPK8	5,272270668	5,086059079
217542_at	MDM2	5,22015665	7,196109032
201502_s_at	NFKBIA	11,3407449	11,64566481
205024_s_at	RAD51	4,999622084	4,97967265
203344_s_at	RBBP8	8,113722884	8,399318598
201783_s_at	RELA	9,26445604	9,227382317
201528_at	RPA1	10,07862549	9,958490201
201746_at	TP53	7,699856947	7,724329243
220804_s_at	TP73	3,798875613	3,749010037
34689_at	TREX1	8,468522935	8,514487165

Tabela 3: Dados referentes a subvia *Nucleotide Excision Repair* da via *DNA Damage Response* considerando as sondas, os genes e os respectivos valores de expressão.

Sondas	Genes	Expressão do gene	
		0 cGy	600 cGy
208393_s_at	RAD50	7,060423453	7,070557101
210487_at	DNTT	5,087355496	5,086674045
204767_s_at	FEN1	7,746072587	7,897073496
200792_at	XRCC6	11,04480731	11,12742542
221049_s_at	POLL	7,185238576	7,244562286
222238_s_at	POLM	6,811811138	6,739038702
206235_at	LIG4	5,977877807	5,973769915
205395_s_at	MRE11A	7,180368272	7,020449262
204835_at	POLA1	6,466273199	6,3173439
208694_at	PRKDC	8,800473741	8,756810223
219678_x_at	DCLRE1C	8,631254498	8,442577455
205071_x_at	XRCC4	6,707864483	6,689329064
208642_s_at	XRCC5	10,63228574	10,61806387
219418_at	NHEJ1	7,206523799	7,056231671

Tabela 4: Dados referentes a subvia *Cell Cycle Checkpoints* da via *Cell Cycle* considerando as sondas, os genes e os respectivos valores de expressão.

Sonda	Gene	Expressão do gene	
		0 cGy	600 cGy
204252_at	CDK2	6,870376492	6,906098575
209852_x_at	PSME3	8,92861063	9,049398017
212296_at	PSMD14	9,628288879	9,815566076
202284_s_at	CDKN1A	9,755131363	11,63604414
209112_at	CDKN1B	11,25962844	10,801056
207845_s_at	ANAPC10	7,894712496	7,807507868
204244_s_at	DBF4	8,373100574	8,092942843
202954_at	UBE2C	5,653780659	5,68453535
205394_at	CHEK1	4,061289283	3,917806954
210416_s_at	CHEK2	5,368090027	5,468802488
210858_x_at	ATM	8,666635586	7,898994761
1053_at	RFC2	6,911747576	6,900685193
204127_at	RFC3	7,156988381	7,01730678
204023_at	RFC4	7,957796827	7,726086099
203209_at	RFC5	7,421113723	7,301337561
201528_at	RPA1	10,07862549	9,958490201
201756_at	RPA2	9,47031142	9,50676877
209507_at	RPA3	8,848552195	8,679009198
201746_at	TP53	7,699856947	7,724329243
221700_s_at	UBA52	13,06716193	13,03808112
200633_at	UBB	13,18870551	13,21446448
211296_x_at	UBC	13,53711983	13,65416498

Tabela 5: Dados referentes a via *Regulation of DNA Replication* da via *Cell Cycle* considerando as sondas, os genes e os respectivos valores de expressão.

Sondas	Genes	Expressão do gene	
		0 cGy	600 cGy
204252_at	CDK2	6,870376492	6,906098575
202284_s_at	CDKN1A	9,755131363	11,63604414
205394_at	CHEK1	4,061289283	3,917806954
210858_x_at	ATM	8,666635586	7,898994761
201746_at	TP53	7,699856947	7,724329243

Tabela 6: Dados referentes a subvia *S phase* da via *Cell Cycle* considerando as sondas, os genes e os respectivos valores de expressão.

Sondas	Genes	Expressão do gene	
		0 cGy	600 cGy
204252_at	CDK2	6,870376492	6,906098575
209852_x_at	PSME3	8,92861063	9,049398017
212296_at	PSMD14	9,628288879	9,815566076
211297_s_at	CDK7	7,814483882	7,770058941
202284_s_at	CDKN1A	9,755131363	11,63604414
209112_at	CDKN1B	11,25962844	10,801056
212836_at	POLD3	8,502669543	8,279984446
204767_s_at	FEN1	7,746072587	7,897073496
202726_at	LIG1	7,869607291	8,530681877
203565_s_at	MNAT1	6,437884181	6,414502396
201202_at	PCNA	9,529984761	11,61461396
204835_at	POLA1	6,466273199	6,3173439
203422_at	POLD1	6,915027415	6,986227644
201115_at	POLD2	6,965822455	7,08681558
216026_s_at	POLE	7,106805347	7,055449018
202996_at	POLD4	8,469536074	8,363727471
209085_x_at	RFC1	8,127422657	7,913471436
1053_at	RFC2	6,911747576	6,900685193
204127_at	RFC3	7,156988381	7,01730678
204023_at	RFC4	7,957796827	7,726086099
203209_at	RFC5	7,421113723	7,301337561
201528_at	RPA1	10,07862549	9,958490201
201756_at	RPA2	9,47031142	9,50676877
209507_at	RPA3	8,848552195	8,679009198
221700_s_at	UBA52	13,06716193	13,03808112
200633_at	UBB	13,18870551	13,21446448
211296_x_at	UBC	13,53711983	13,65416498
204093_at	CCNH	9,183258975	9,101834048
209941_at	RIPK1	6,841970594	6,894017289
211296_x_at	UBC	13,53711983	13,65416498
200633_at	UBB	13,18870551	13,21446448
221700_s_at	UBA52	13,06716193	13,03808112
201746_at	TP53	7,699856947	7,724329243
212296_at	PSMD14	9,628288879	9,815566076
209852_x_at	PSME3	8,92861063	9,049398017

Tabela 7: Dados referentes a subvia *Apoptosis – homo sapiens (AP1)* da via *Apoptosis* considerando as sondas, os genes e os respectivos valores de expressão

Sondas	Genes	Expressão do gene	
		0 cGy	600 cGy
208536_s_at	BCL2L11	3,76300496	4,040874583
2028_s_at	E2F1	5,358530879	5,463969641
207163_s_at	AKT1	8,620881516	8,590194852
211692_s_at	BBC3	6,511871005	7,899738464
210164_at	GZMB	10,64873951	9,52081474
211553_x_at	APAF1	4,349775093	4,415761473
206536_s_at	XIAP	5,378067853	5,51578936
201157_s_at	NMT1	8,644774828	8,75116856
204285_s_at	PMAIP1	8,638119476	9,508159501
208905_at	CYCS	10,73931629	10,85600073
32541_at	PPP3CC	7,162678705	6,936262247
204506_at	PPP3R1	8,85159429	8,733843272
210671_x_at	MAPK8	5,178255262	5,105033469
2028_s_at	E2F1	5,358530879	5,463969641
219350_s_at	DIABLO	9,256967662	9,449123918
203728_at	BAK1	7,374706417	7,488161381
208478_s_at	BAX	8,008826425	9,745130715
202763_at	CASP3	8,591970179	8,53741329
207181_s_at	CASP7	7,938180128	8,239259375
200703_at	DYNLL1	11,06112481	11,11802372

Tabela 8: Dados referentes a subvia *Apoptosis - AP17* da via *Apoptosis* considerando as sondas, os genes e os respectivos valores de expressão.

Sondas	Genes	Expressão do gene	
		0 cGy	600 cGy
209941_at	RIPK1	6,841970594	6,894017289
211296_x_at	UBC	13,53711983	13,65416498
200633_at	UBB	13,18870551	13,21446448
221700_s_at	UBA52	13,06716193	13,03808112
201746_at	TP53	7,699856947	7,724329243
212296_at	PSMD14	9,628288879	9,815566076
209852_x_at	PSME3	8,92861063	9,049398017

As tabelas 9 e 10 apresentam os resultados associados aos cálculos da atividade relativa e diversidade relativa, apresentando um panorama geral da modulação das subvias relacionadas aos mecanismos de manutenção do genoma em função da dose de 600 cGy. Das 7 subvias analisadas, observou-se que a irradiação regulou de forma positiva a atividade relativa de 5 subvias ($p \leq 0,05$): a) *ATM signaling*; b) *Regulation of DNA Replication*; c) *S phase*; d) *Apoptosis – homo sapiens (AP1)* e) *Apoptosis (AP17)*. Entretanto, observou-se que a irradiação não alterou a atividade relativa das subvias *Nucleotide Excision Repair* e *Cell Cycle Checkpoints* ($p \geq 0,095$). Portanto, de acordo com estes resultados, a irradiação não regulou de maneira negativa a atividade relativa de nenhuma subvia considerada neste estudo. Conforme a tabela 10, observou-se que a irradiação modulou de forma negativa a diversidade relativa de 3 subvias ($p \geq 0,095$): a) *Cell Cycle Checkpoints*; b) *Regulation of DNA Replication*; c) *S phase*. De acordo com os resultados apresentados nessa tabela observou-se que a irradiação não alterou a diversidade relativa de 4 subvias ($0,05 < p < 0,095$): a) *ATM signaling*; b) *Nucleotide Excision Repair*; c) *Apoptosis – homo sapiens (AP1)*; d) *Apoptosis (AP17)*.

Tabela 9: resultados da análise associada a atividade relativa das 7 subvias consideradas neste estudo. O aumento ($p \leq 0,05$) nos valores de atividade relativa (n_α) está indicado por setas para cima (\uparrow), decréscimos ($p \geq 0,95$) desses valores está indicado por setas para baixo (\downarrow), e (-) indica que a via não foi alterada pela radiação ($0,05 < p < 0,95$).

VIAS E SUBVIAS	ATIVIDADE RELATIVA	VALOR p	SIGNIFICÂNCIA
<u>Via DNA DAMAGE RESPONSE</u>			
<u>Subvia</u>			
<i>ATM signaling</i>	0,5063	0,0024	\uparrow
<i>Nucleotide Excision Repair</i>	0,4982	0,8447	-
<u>Via CELL CYCLE</u>			
<u>Subvia</u>			
<i>Cell Cycle Checkpoints</i>	0,5006	0,1892	-
<i>Regulation of DNA Replication</i>	0,5057	0,0116	\uparrow
<i>S phase</i>	0,5015	0,0227	\uparrow
<u>Via APOPTOSIS</u>			
<u>Subvia</u>			
<i>Apoptosis – homo sapiens (AP1)</i>	0,5043	0,0038	\uparrow
<i>Apoptosis (AP17)</i>	0,5018	0,0016	\uparrow

Tabela 10: resultados da análise associada a diversidade relativa das 7 subvias consideradas neste estudo. O aumento ($p \leq 0,05$) nos valores de diversidade relativas (h_α) está indicado por setas para cima (\uparrow), decréscimos ($p \geq 0,95$) desses valores está indicado por setas para baixo (\downarrow), e (–) indica que a via não foi alterada pela radiação ($0,05 < p < 0,95$).

VIAS E SUBVIAS	DIVERSIDADE RELATIVA	VALOR p	SIGNIFICÂNCIA
<u>Via DNA DAMAGE RESPONSE</u>			
<u>Subvia</u>			
<i>ATM signaling</i>	0,4999	0,9215	–
<i>Nucleotide Excision Repair</i>	0.5000	0,6344	–
<u>Via CELL CYCLE</u>			
<u>Subvia</u>			
<i>Cell Cycle Checkpoints</i>	0,4999	0,9974	\downarrow
<i>Regulation of DNA Replication</i>	0,4991	0,9985	\downarrow
<i>S phase</i>	0,4999	0,9975	\downarrow
<u>Via APOPTOSIS</u>			
<u>Subvia</u>			
<i>Apoptosis – homo sapiens (AP1)</i>	0,5002	0,2455	–
<i>Apoptosis (AP17)</i>	0,5000	0,9117	–

De acordo com a subseção 2.9, a diversidade representa a alteração em um conjunto de genes, enquanto que a atividade representa a alteração da via como um todo. No contexto da biologia, o aumento da atividade está relacionado com a ativação da via e, ao contrário, a inibição está relacionada com a diminuição desta atividade.

De acordo com esses resultados, obtidos através do modelo matemático proposto por Castro (CASTRO, *et al.*, 2007), observou-se que 600 cGy (valor típico de dose fracionada usada em radioterapia) modulou de forma diferenciada a organização do sistema biológico, induzindo a ativação da maior parte das vias relacionadas aos mecanismos de conservação do genoma consideradas neste estudo.

Considerando-se a via *DNA damage response*, observou-se que 600 cGy modulou positivamente a resposta da subvia *ATM signaling*. Essa subvia atua principalmente nas quebras de fita dupla. O gene ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated) associado à essa subvia, que está relacionado a uma quinase proteica, desempenha a função de mediador das respostas a esses danos do DNA. Sua função, para os locais de lesão, é executar a fosforilação de SMC1 (*Structural maintenance of chromosomes protein 1*) (KITAGAWA & KASTAN, 2007). No entanto, observou-se que a irradiação não alterou a resposta da sub via Nucleotide Excision Repair.

Considerando-se a via *Cell Cycle*, observou-se que 600 cGy modulou positivamente a resposta das subvias *Regulation of DNA Replication* e *S phase*. A regulação dessa replicação do DNA é regulada através do sistema de replicação ou replisomo (SCLAFANI & HOLZEN, 2007). A subvia *S phase* possui pontos de checagem que atrasam o ciclo celular, regulam a replicação cromossômica e os mecanismos de reparo do DNA. Uma célula que entra em senescência não progride no ciclo celular enquanto os erros detectados nos pontos de checagem não forem corrigidos (KARIM & De PICCOLI, 2014). Entretanto, embora tenha sido observado que 600 cGy ativa essas duas subvias, observou-se que a irradiação não alterou a resposta da subvia *Cell Cycle Checkpoints*.

Considerando-se a via Apoptose, observou-se que 600 cGy modulou positivamente a resposta das subvias *Apoptosis – homo sapiens (AP1)* e *Apoptosis (AP17)*. A subvia *Apoptosis – homo sapiens (AP1)* é representada pelos processos que envolvem a proteína ativadora 1 de fatores de transcrição (*AP1- activator protein transcriptions factor 1*). Essa proteína, quando se liga a genes específicos, pode promover a ativação ou inibição de determinados genes, conforme o processo celular em questão. Os fatores AP1 desempenham função importante nos processos de neoplasias malignas (VESELY, *et al*, 2009). A subvia *Apoptosis (AP17)* envolve o gene AP17 ou AP2S1 (*Adaptor related protein complex 2 subunit sigma 1*), que codifica a cadeia menor do complexo AP-2, que está associado à membrana

plasmática (NCBI). A via de apoptose tem papel fundamental na conservação do genoma ao evitar que mutações sejam transferidas às células filhas no processo de mitose.

Usando os mesmos dados de transcriptomas e a mesma metodologia para a determinação da atividade e diversidade relativas, Silveira (SILVEIRA, 2017) concluiu que essa dose ativa a resposta imunológica. Em complemento a esse estudo de Silveira, os resultados obtidos aqui estabelecem alguns efeitos desta dose nos mecanismos de manutenção do genoma, que podem ajudar a elucidar a função da radiação na ativação do sistema imune de pacientes com câncer tratados com radiações ionizantes.

5 CONCLUSÕES

O cálculo relacionado à determinação da atividade e da diversidade relativas é um modelo matemático que foi proposto para descrever o comportamento de vias em tecidos cancerígenos através do uso de dados transcriptomas disponibilizado em bancos público de dados. Essa abordagem metodológica foi usada neste estudo com o objetivo de investigar a modulação de vias associadas aos mecanismos de manutenção do genoma em função da dose de 600 cGy. Considerando-se as 7 subvias investigadas, os resultados obtidos neste estudo indicam que essa dose ativa os mecanismos que conservam o genoma. Entretanto, considerando-se que esses mecanismos são compostos por uma grande quantidade de subvias, o presente estudo não exclui a necessidade de se investigar outras vias e subvias para melhor delinear a ativação de mecanismos associados a manutenção do genoma em função da irradiação. Além disso, os resultados obtidos neste estudo não consideraram a análise individual da expressão dos genes em resposta à irradiação. Nesse tipo de estudo, metodologias propostas pela bioinformática, como rede biológica, sua modelagem, visualização e análise poderiam ser usadas em estudos futuros sobre os mecanismos de manutenção do genoma em função das doses de irradiações ionizante consideradas no domínio da física médica.

REFERÊNCIAS:

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S.; *Imunologia Celular e Molecular*. 8º ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- AITOKALLIO, T.; SCHWIKOWSKI, B.; Graph-based methods for analysing networks in cell biology. *Briefings in Bioinformatics*, 2006
- BANSBACH, C. E.; CORTEZ, D.; Defining genome maintenance pathways using functional genomic approaches. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 2011
- BARRET, T.; EDGAR, R.; Gene Expression Omnibus: Microarray Data Storage, Submission, Retrieval, and Analysis. *DNA Microarrays, Part B: Databases and Statistics*, 352-369. *METHODS IN ENZYMOLOGY*, VOL 411. 2006
- BASKAR, R.; LEE, K. A.; YEO, R.; YEOH, K.; Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and future Directions. *nt Advances and future Directions. International Journal of Medical Sciences*, IVYSPRING, 2012.
- BECKER, J. D.; FEIJÓ, J. A.; Profiling Genomes with Oligonucleotide Arrays. *Transcriptômica, Boletim de Biotecnologia*, v,24,p. 2-6, 2003
- BERGONIÉ, J; TRIBONDEAU. Interpretation of Some Results of Radiotherapy and an Attempt of Determining a Logical Technique of Treatment. 1959.
- BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G.; *Statistics Notes: Bootstrap resampling methods*, British Medical Journal Publishing Group, 2015
- CASTRO, M. A. A. *et al*. Chromosome aberrations in solid tumors have a stochastic nature. ELSEVIER, 2006
- CASTRO, M. A. A. *et al*. Impaired expression of NER gene network in sporadic solid tumors. *Nucleic Acids Res*; 2007
- CASTRO, M. A. A. *et al*. ViaComplex: software for landscape analysis of gene expression. *Networks in genomic contexto. Bioinformatics*, 2009
- CESAR, S. J. *et al*, *Biologia*, Volume único, 6º ed, editora Saraiva, 2015
- CHEN, lieping; FLIES, Dallas B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature Reviews Immunology*, 2013.
- COLOMBO, J.; RAHAL, P. A tecnologia do *microarray* no estudo do câncer de cabeça e pescoço. *Revista Brasileira de Biociências*, 2009

CRUVINEL, W. M. *et al.* Sistema Imunitário – Parte I, Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. Artigo de revisão. 2010

DALMOLIN, R. J. *et al.* Transcriptomic analysis reveals pH-responsive antioxidant gene networks. *Frontiers in bioscience (scholar edition)*, 2012

De la CRUZ-MERINO, L. *et al.* Cancer Immunotherapies Spanish Group (GETICA). Radiation for awakening the dormant immune system, a promising challenge to be explored. Publicado em 14 de março de 2014.

DUDOIT, S. *et al.* Statistical Methods for Identifying Differentially Expressed Genes In Replicates cDNA Microarray Experiments. *Statistica sinica*, 2002

EISENBERG, D. *et al.* Protein Function in the Post-genomic Era, *Nature*, v.405,, p.823-26, 2000

FOMENTI, S. C.; DEMARIA, Sandra. Systemic effects of local radiotherapy. 2009

GOLDBERG, A. C.; RIZZO, L. V. Estrutura do MHC e função – apresentação de antígenos, Parte 1. Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP, Brasil. 2014

GUIDALINI, C.; TUFIK, S. Uso de microarrays na busca de perfis de expressão gênica – aplicação no estudo de fenótipos complexos. Departamento de Psicobiologia, universidade federal de São Paulo, 2007

GRIFFITHS, A. J.F; *et al.* Introdução à Genética, 9^o edição, editora GUANABARA KOOGAN S.A, 2008

HALL, E J; GIACCIA, A J. Radiobiology for the Radiologist, 8^o ed.

HAYABUCHI, N. Radicable Tumors and Non-Radiocurable Tumors. 2004

HOEIJMAKERS, J. H.J. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Insight review articles*, 2001

HOEIJMAKERS, J. H.J. Genome maintenance mechanisms are critical for preventing cancer as well as other aging-associated diseases. *ScienceDirect, ELSEVIER*, 2007

HÜNIG, T.; BEYERSDORF, N.; KERLAU, T. CD-28 costimulation in T-cell homeostasis: a recent perspective. *ImmunoTargets and Therapy*, 2015.

IDEKER, T.; NUSSINOV, R.; Network approaches and applications in biology. 12 de outubro de 2017

- IRIZARRY, R. A.; *et al.* Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics, Biometrika Trust*, v. 4, n. 2, p. 249-264, 2003
- KARIM, L.; De PICCOLI, G. Surviving chromosome replication: the many roles of the S-phase checkpoint pathway. *Biological Sciences Review*, 2014
- KITAGAWA, R; KASTAN M.B. The ATM-dependent DNA Damage Signaling Pathway. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007
- LEE, Y; *et al.* Therapeutic effects of ablative radiation on local tumor require $CD8^+$ T cells: changing strategies for cancer treatment. *IMMUNOBIOLOGY*, 2009
- LUCAS, J. *et al.* A translatable predictor of human radiation exposure. *Plos One* 2014
- MARTA, G. N. Radiobiologia: princípios básicos aplicados a prática clínica. Serviço de Radioterapia do Centro de Oncologia do Hospital Sírio-Libanês 2014
- MORGAN, W. F. Is there a common mechanism underlying genomic instability, bystander effects and other nontargeted effects of exposure to ionizing radiation?. *Oncogene*, 2003
- MURO, L F F; FERREIRA, L L; GONZAGA, P A L. Relação Antígeno-Anticorpo. *Revista científica eletrônica de medicina veterinária*. Janeiro de 2009
- NUSSBAUM, R. L.; MCINNES, R.R.; WILLARD, H.F. Thompson & Thompson Genética médica. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- OHUCHIDA, K. *et al.* Radiation to stromal fibroblast increases invasiveness of pancreatic cancer cells through tumor-stromal interactions. *Cancer Res*, 2004
- PAPIN, J. A. *et al.* Reconstruction of cellular signalling networks and analysis of their properties. *Nature Reviews*, v.6, p.99-111, 2005
- PRADEU, T.; COOPER, E. L.; The danger theory: 20 years later. Publicado em 17 de setembro de 2012
- RIBEIRO, F. M. Irradiação de sangue usando fontes de ^{137}Cs : determinação da resposta de vias e genes relacionados à superfamília B7-CD28/CTLA4. Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio grande – RS, 2017.
- ROUSHAN, T.; AHMED, D. Human Genome Project – A review. *Medicine today*, v,26 – nº1, 2014
- SCLAFANI, R. A.; HOLZEN, T. M.; Cell Cycle Regulation of DNA Replication. Department of Biochemistry and Molecular Genetics, UCSM, Aurora, Colorado, *Annual Review*, 2007

- SHARPE, A H; FREEMAN, G J. THE B7-CD28 SUPERFAMILY. Fevereiro de 2002
- SILVEIRA, D. A. Expressão de genes e vias associados ao sistema imunológico em resposta à irradiação de células do sangue utilizando ^{137}Cs . Universidade Federal do Rio Grande, Programa de Pós-Graduação em Física, 2017
- SIMAO, E. M. Dinâmica da transição pré-câncer para câncer: estudo da expressão de vias de manutenção do genoma. Santa maria, RS, Brasil, 2012
- SIMAO, E. M. *et al.* Modeling the human Genome Maintenance network. Publicado por Elsevier 2010
- SIMAO, E. M. *et al.* Induced genome maintenance pathways in pré-cancer tissues describe na anti-cancer barrier in tumor development. *Molecular Biosystems*. 2012 v.11 pp.3003-9.
- SMIRNOV, D. A. *et al.* *Genetic variation in radiation-induced cell death*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012
- STALTERI, M.; HARRISON, A. P. Interpretation of multiple probe sets mapping to the same gene in affymetrix genechips. *BMC bioinformatics*, BioMed Central, 2013
- STEINHOFF, C.; VINGRON, M. Normalization and quantification of differential expression. In *gene expression microarrays*. *Briefings in bioinformatics*, Oxford Univ Press, v. 7, n. 2, p. 166-177, 2006
- TEVA, A; FERNADEZ, J C C; SILVA, V L. Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratório de Saúde: IMUNOLOGIA – CAPÍTULO 1.
- VESELY, P.W.; *et al.* Translational regulation mechanisms of AP-1 proteins. *Mutation Research/ Reviews in Mutation Research*, ELSEVIER, 2009
- VIRELLA, G. *Introduction to Medical Immunology*, 4^o ed. Medical University of South Carolina. Charleston, South Carolina. 1986
- WATSON, J. D. The Human Genome Project: Past, Present, and Future. *SCIENCE*, VOL.248. 6 de Abril de 1990