



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIOGRANDE
IMEF - Instituto de Matemática, Estatística e Física
Programa de Pós-Graduação em Física



DANIELE GONÇALVES MESQUITA

**ANÁLISE DOS MECANISMOS DE MANUTENÇÃO DO GENOMA: Efeitos da
Radiação Gama em Células do Sistema Imunológico**

RIO GRANDE - RS

2021

DANIELE GONÇALVES MESQUITA

**ANÁLISE DOS MECANISMOS DE MANUTENÇÃO DO GENOMA: Efeitos da
Radiação Gama em Células do Sistema Imunológico**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física, do Instituto de Matemática, Estatística e Física da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Física.

Orientador: Prof. Dr. Evamberto Garcia de Góes

RIO GRANDE - RS

2021

Ficha Catalográfica

M582a Mesquita, Daniele Gonçalves.
Análise dos mecanismos de manutenção do genoma : efeitos da radiação gama em células do sistema imunológico / Daniele Gonçalves Mesquita. – 2021.
55 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Física, Rio Grande/RS, 2021.

Orientador: Dr. Evamberto Garcia de Goés.

1. Linfócitos 2. Radiação ionizante 3. Manutenção do genoma I. Goés, Evamberto Garcia de II. Título.

CDU 615.849

Catologação na Fonte: Bibliotecária Vanessa Ceiglinski Nunes CRB 10/2174

ANÁLISE DOS MECANISMOS DE MANUTENÇÃO DO GENOMA: Efeitos da Radiação Gama em Células do Sistema Imunológico

Daniele Gonçalves Mesquita

Orientador:

Prof. Dr. Evamberto Garcia de Góes

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Física no Curso de Mestrado em Física, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Física.

Aprovada por:



Prof. Dr. Evamberto Garcia de Góes

Daza de Moraes
Vaz Batista Filgueira

Assinado digitalmente por Daza de Moraes Vaz Batista Filgueira
DN: C=BR, CN=Daza de Moraes Vaz Batista Filgueira,
E=dazafi@gmail.com
Razão: Eu sou o autor deste documento
Localização: sua localização de assinatura aqui
Data: 2021.03.16 07:36:46-03'00'
Foxit Reader Versão: 10.1.1

Prof^a. Dr^a. Daza de Moares Vaz Batista Filgueira

Patrícia Nicolucci

Assinado de forma digital por
Patrícia Nicolucci
Dados: 2021.03.12 15:26:36 -03'00'

Prof^a. Dr^a. Patrícia Nicolucci

Rio Grande
Março de 2021

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Evamberto Garcia de Góes, pela dedicada orientação, amizade, paciência, constante incentivo e apoio, por acreditar na minha capacidade de trabalho e por me mostrar sempre o melhor caminho, principalmente nos momentos de dúvidas. Agradeço, ainda, o apoio e os incentivos constantes ao longo de toda minha formação.

Aos professores do Instituto de Matemática, Estatística e Física (IMEF), especialmente à Prof.^a Dr.^a Aline Guerra Dytz pela amizade e ensinamentos.

À minha Mãe por sempre confiar e acreditar na minha jornada.

Aos amigos que entenderam as minhas ausências e acreditaram em meus potenciais.

À Universidade Federal do Rio Grande (FURG), ao Instituto de Matemática, Estatística e Física (IMEF) e ao Programa de Pós-Graduação em Física.

“O conceito de felicidade para muitos é de que ela é algo a ser atingido, quando de fato ela não é uma meta, mas sim um caminho.”

Pense HC

RESUMO

A radiosensibilidade intrínseca de diferentes tipos de células cancerosas tem sido extensivamente estudada, mas os mecanismos subjacentes ao dano celular são poucos conhecidos. Estudos recentes indicam que a radioterapia recruta o sistema imunológico e isto pode aumentar a eficiência do tratamento radioterápico. Neste estudo, são analisadas amostras de transcriptomas associadas às células do sistema imunológico, disponibilizadas pelo banco de dados Gene Expression Omnibus (GEO), relacionados aos linfócitos T e linfócitos B isolados do sangue total e irradiadas com dose de 150, 300, 600 e 1000 cGy. O objetivo deste estudo é a determinação dos efeitos da radiação gama nas vias associadas aos mecanismos de conservação do genoma. A relação entre genes e vias foi estabelecido através do Banco de Dados Reactome. O comportamento dessas vias foi analisado através de cálculos associados à atividade e diversidade relativas, e o método bootstrap foi usado para testar os efeitos produzidos pela irradiação em relação ao controle. Essa análise foi realizada através do software ViaComplex. Foram investigadas 22 subvias que compõem 5 vias associadas aos mecanismos de manutenção do genoma. Observou-se que a irradiação modulou de forma positiva a ativação da resposta de 3 subvias para a dose de 150 cGy, 12 subvias para a dose de 300 cGy, 13 subvias para a dose de 600 cGy e 7 subvias para a dose de 1000 cGy. Portanto, as doses intermediárias de 300 e 600 cGy são mais relevantes para a ativação dos mecanismos de conservação do genoma em comparação as doses de 150 e 1000 cGy.

Palavras-Chave: Linfócitos, Radiação ionizante, Manutenção do Genoma.

ABSTRACT

The intrinsic radiosensitivity of different types of cancer cells has been extensively studied, however the mechanisms underlying cell damage are poorly understood. Recent studies indicate that radiotherapy recruits the immune system, and this can increase the efficiency of radiotherapy treatment. In this work, samples of transcriptomes associated with the cells of the immune system are analyzed, available by the Gene Expression Omnibus (GEO) database, related to T lymphocytes and B lymphocytes isolated from whole blood and irradiated with doses of 150, 300, 600 and 1000 cGy. The aim of this study is to determine the effects of gamma radiation on the pathways associated to genome maintenance mechanisms. The relationship between genes and pathways was established through the Reactome Database. The behavior of these pathways was analyzed using calculations associated with relative activity and diversity, and the bootstrap method was used to test the effects produced by irradiation in relation to the control. This analysis was performed using the ViaComplex software. In the present study 24 subpathways were analyzed which make up 5 pathways associated with the genome maintenance mechanisms. It was observed the irradiation positively modulated the activation of the response of 3 subpathways for dose of 150 cGy, while dose of 300 cGy activated 12 subpathways, dose 600 cGy activated 13 subpathways and the dose of 1000 cGy activated 7 subpathways. Therefore, the intermediate doses of 300 and 600 cGy are more relevant for the activation of the genome maintenance mechanisms in comparison to the doses of 150 and 1000 cGy.

Keys words: Lymphocytes, Ionizing radiation, Genome maintenance.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de variância
Células NK – Células Natural Kiler
CTLA4 - Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4
DNA – Ácido desoxirribonucleico
GEO – Gene Expression Omnibus
GO– Gene Ontology
Gy – Gray (unidade de medida de dose absorvida)
HGNC – Human gene nomenclature committee
HGP – Human Genome Project
ICRP – International Commission on Radiological Protection
NCBI – National Center for biotechnology information
PDL1 - Programmed death-ligand 1
RI – Radiação ionizante
RNA – Ácido ribonucleico
RNAc – RNA complementar
RNAm – RNA mensageiro
tRNA – RNA transportador
H₂O – Molécula de Água
TNF - Fator de necrose tumoral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Faixas de predominância, em energia e em número atômico, dos três tipos de interação de fótons com a matéria.	19
Figura 2 - Mecanismos de interação direta e indireta da radiação no DNA.	22
Figura 3 - Linfócitos T citotóxicos (marrom) infiltrando células residuais de câncer da mama (lilás), após radioterapia.	25
Figura 4 - Processo de obtenção de dados de transcriptomas a partir da técnica de microarranjo de acordo com Protocolo da Affymetrix®.	28
Figura 5- Modulação da Atividade Relativa em função das doses de 150, 300, 600 e 1000 cGy.	36
Figura 6- Modulação da Diversidade Relativa em função das doses de 150, 300, 600 e 1000 cGy.	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Banco de dados.....	29
Tabela 2 - Relação das vias analisadas, número de genes e alterações produzidas em razão das doses em estudo (150, 300, 600 e 1000 cGy).....	35
Tabela 3 - Resposta da via Cell Cycle, considerando as doses de 150, 300 e 600 cGy sobre linfócitos T irradiados.....	38
Tabela 4 - Resposta da via Cell Cycle, considerando as doses de 1000 cGy sobre linfócitos B irradiados.. ..	39
Tabela 5 - Resposta da via DNA Repair, considerando as doses de 150, 300 e 600 cGy sobre linfócitos T irradiados.. ..	40
Tabela 6 - Resposta da via DNA Repair considerando as doses de 1000 cGy sobre linfócitos B irradiados.. ..	41
Tabela 7 - Resposta da via DNA Replication, considerando as doses de 150, 300 e 600 cGy sobre linfócitos T irradiados.. ..	43
Tabela 8 - Resposta da via DNA Replication considerando as doses de 1000 cGy sobre linfócitos B irradiados.. ..	43
Tabela 9 - Resposta da via Programmed Cell Death, considerando as doses de 150, 300 e 600 cGy sobre linfócitos T irradiados.	45
Tabela 10 - Resposta da via Programmed Cell Death considerando as doses de 1000 cGy sobre linfócitos B irradiados.	45

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE TABELAS	VII
1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Objetivo Geral	15
1.2 Objetivos Específicos.....	15
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1 Informação Genética	16
2.2 Mecanismos de Manutenção do Genoma e Vias Associadas	17
2.3 Interação da Radiação Eletromagnética com a Matéria para Energias de até 20 Mev	18
2.4 Efeitos Biológicos Das Radiações Ionizantes	21
2.5 Resposta Imunológica à Irradiação	23
2.6 Determinação da Atividade e Diversidade Relativa das Vias.....	25
2.7 Microarranjos de DNA.....	27
2.8 Banco de Dados	29
3 METODOLOGIA.....	30
3.1 Seleção das Amostras de Microarranjo	30
3.2 Seleção de Vias	31
3.3 Análise das Vias.....	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 Resposta das Vias em Função das Doses de 150, 300, 600 e 1000 cGy	34
4.2 Análise da Via Cell Cycle	37
4.3 Análise da Via DNA Repair	40
4.4 Análise da Via DNA Replication	42
4.5 Análise da Via Programmed Cell Death	44
4.6 Análise da Via Signal Transduction.....	46
4.7 Aspectos Gerais da Ativação das Vias.....	47
5 CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

Em radiodiagnóstico, a primeira imagem de estruturas anatômicas humana obtida através do uso de raios X foi realizada por Wilhelm Conrad Roentgen, em 1895, ano em que ele descobriu este tipo de radiação. Em radioterapia, o uso da radiação gama no tratamento do câncer ocorreu logo após a descoberta dos elementos radioativos rádio, em 1896, e polônio, em 1898, pelo casal Marie e Pierre Curie. As grandezas dosimétricas relacionadas a este tipo de radiação foram estabelecidas pela Comissão Internacional de Proteção Radiológica (ICRP), que foi criada em 1928 (ICRP, 1977; ICRP, 2007).

Há pouco mais de meio século após o início dos primeiros tratamentos radioterápicos, em 1959, Bergonié e Tribondeau (BERGONIÉ & TRIBONDEAU, 1959) realizaram experimentos para demonstrar que as células cancerosas são mais sensíveis à radiação em relação àquelas que constituem os tecidos normais. O conhecimento dos efeitos biológicos, produzidos pelas radiações ionizantes, são importantes para o desenvolvimento de novas tecnologias que priorizam a maximização do efeito biológico em detrimento aos efeitos deletérios produzido pelo uso destas radiações. 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 5 Rs da radiobiologia, o qual é constituído pela reparação ao dano, redistribuição no ciclo celular, repovoamento acelerado, reoxigenação e radiosensibilidade intrínseca (FOMENTI & DEMARIA, 2009).

Nas células do sistema imunológico, doses altas, superior a 2000 cGy, resultam em grande número de mortes em células sanguíneas, como de linfócitos, por exemplo (DONNELLY et al. 2010). Além da imunossupressão, um dos efeitos mais comuns de altas doses de radiação é a indução de processos pró-inflamatórios (Hayashi et al. 2005). Bernstein e colegas investigaram os efeitos modulatórios da radiação na expressão de moléculas coestimulatórias e coinibitórias da ativação de linfócitos T em diferentes linhagens celulares de câncer de próstata in vitro para doses de 500, 1000 e 1500 cGy (Bernstein et al. 2014). Os resultados obtidos por esse grupo indicaram que a radiação poderia estimular a sinalização para ativação de linfócitos devido ao aumento da expressão de moléculas coestimulatórias (CD70, OX40L e 41BBL) e diminuição dos genes coinibidores (CTLA-4 e PDL1). Embora essas doses induzam efeitos deletérios nas células do sistema imunológico, também podem estimular a ativação de suas

respostas. Estudos de genes associados a resposta imune adaptativa mostraram que altas doses de radiação, superiores a 100 cGy, podem estimular a expressão destes genes (Morel et al. 1998; Reits et al. 2006). Um estudo recente indicou que a radiação gama pode modular a expressão de genes relacionados ao sistema imunológico (SILVEIRA et al., 2020). De acordo com os achados desse estudo, 300 cGy pode induzir a produção de citocinas e genes que estão associados à ativação e diferenciação de linfócitos T. Entretanto, os efeitos das radiações ionizantes nos mecanismos associados à conservação do genoma ainda não estão elucidados.

1.1 Objetivo Geral

Este estudo tem como objetivo geral determinar o efeito da radiação gama nos mecanismos relacionados à conservação do genoma através do uso de dados de transcriptoma disponíveis no banco de dados Gene Expression Omnibus (GEO).

1.2 Objetivos Específicos

De acordo com o objetivo geral estabelecido, os objetivos específicos deste estudo são os seguintes:

- a) determinação dos efeitos da radiação gama nos mecanismos de manutenção do genoma considerando-se linfócitos B irradiadas com dose de 1000 cGy;
- b) determinação dos efeitos da radiação gama nos mecanismos de manutenção do genoma considerando-se linfócitos T irradiadas com doses de 150, 300 e 600 cGy.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Nesta seção estão descritos os conceitos associados ao presente estudo, envolvendo uma perspectiva interdisciplinar aos tópicos relacionados à biologia, física e métodos de aquisição e tratamento de dados com base na bioinformática.

2.1 Informação Genética

O genoma é toda a informação composta pela sequência completa das cadeias de ácido desoxirribonucleico (DNA). A conformação entre a sequência de bases do DNA e a correspondente sequência de aminoácidos, na proteína, é denominada de código genético. Intitulado código genético universal, este é reconhecido por possuir o mesmo genoma em grande parte das células de um mesmo organismo, havendo a funcionalidade de transferir as propriedades genéticas presentes no DNA (WATSON et al., 2004). A estrutura do DNA é composta por uma dupla de filamentos ordenados de ácido fosfórico e açúcar desoxirribose, formando a dupla hélice (dupla fita) entrelaçada. A dupla de filamentos é conectada por ligações de hidrogênio que são acopladas a quatro diferentes bases de nucleotídeos. As bases de nucleotídeos são subdivididas em dois tipos: as purinas e as pirimidinas. A adenina (A) e a guanina (G) compõem o tipo purina enquanto a citosina (C) e a timina (T) ao tipo pirimidina, e suas conexões químicas estabelecem algumas ligações estritas (adenina liga-se apenas a timina e a guanina à citosina). Diferentemente ao DNA, o ácido ribonucleico (RNA) é composto por uma fita simples, um açúcar ribose substituindo a desoxirribose e uma uracila (U) formada a partir da timina. São agregadas a sequências específicas destas bases a informação genética codificada (NUSSBAUM et al., 2001).

Em ativação genética ocorre a formação de moléculas de RNA mensageiro (mRNA) a partir da informação codificada no DNA, processo denominado de transcrição do DNA. O mRNA, originado a partir de uma sequência de nucleotídeos de DNA (gene), transporta o gene transcrito para o citoplasma celular e posteriormente migra para o ribossomo. No ribossomo, o mRNA entra no processo de tradução que passa por três fases consecutivas para desenvolver a síntese proteica: iniciação, alongamento e terminação. Juntamente com o mRNA, o RNA transportador (tRNA) auxilia na produção de polipeptídios apresentando e inserindo de acordo com a sequência de base adequada no ribossomo. De forma complexa, a síntese de proteínas garante a estruturação e funcionalidade específica de cada célula do organismo, conservando os genes durante

toda a vida celular. Para garantir a estrutura e funcionalidade celular, quaisquer alterações precisam ser identificadas e corrigidas (NUSSBAUM et al., 2001; BRADLEY et al., 2015).

De forma geral, a vida celular se divide em duas etapas, conhecidas como interfase e mitose, que variam ciclicamente. O ciclo celular inicia na interfase, que é subdividida nas fases sequenciais: G1, S e G2. A fase G1 é caracterizada pelo início do processo de divisão celular, na qual ocorrem diversas atividades e sinalizações para o seu desenvolvimento. Enquanto a fase S é responsável pela replicação do DNA, e a fase G2 corresponde ao processo de aumento de massa. Na sequência do ciclo estende-se a meiose (fase M), a qual implica na divisão por completa da célula. Durante o ciclo, há presença de pontos de checagem do DNA. Nesses pontos são verificados a integridade do genoma, para manter a informação genética intacta durante as duplicações (ALBERTS *et al.*, 2010).

2.2 Mecanismos de Manutenção do Genoma e Vias Associadas

A estabilidade genômica pode ser rompida a partir de diversos danos que atuam sobre o DNA. Estes danos possuem origens em alterações biológicas como a ação das radiações ionizantes, que exerce a potencialidade de realizar a quebra de fita dupla do DNA, fita simples, em modificações de bases e ligações entre proteínas e DNA. Ao nível molecular, ocorrem os danos de quebra de fita simples e da modificação de bases, ações estas que não comprometem a integridade genômica. Nesse caso, é mantido a integridade do filamento de nucleotídeo. Diferentemente, danos que levam a quebra de fita dupla do DNA comprometem a integridade genética e ocasionam lesões tóxicas por haver perda das informações genéticas através dos nucleotídeos (WARTERS & HOFER, 1977). Mecanismos biológicos de controle do ciclo celular (checkpoints ou pontos de checagem), de resposta ao dano no DNA, de reparo ao DNA, de morte celular programada (apoptose), senescência e regulação da necrose atuam para regular a instabilidade genômica, fazendo estes parte dos mecanismos de conservação e manutenção do genoma.

Para certificar a conservação do genoma, o mecanismo de controle do ciclo celular é ativado durante a divisão celular, que pode ocorrer na fase G1, G2 ou M. Nestas ativações, quando encontradas células danificadas o ciclo celular é interrompido devido à ação da proteína p53 que age para localizar danos e sinalizar às vias de reparo ao dano do DNA (WATSON et al., 2004). Quando ativadas as vias de reparo, e subvias

associadas, atuam na manutenção das quebras de fitas duplas de DNA em busca de impedir a propagação de mutações no genoma, assegurando uma duplicação celular efetiva com a cópia genética idêntica (BANSBACH & CORTEZ, 2011). Dentro dos mecanismos de reparo do DNA, o reparo por excisão de nucleotídeos, o reparo por excisão de base, o reparo por recombinação homóloga e o reparo por junção final compreendem vias de manutenção e conservação do genoma. Há inúmeros agentes que ocasionam danos ao DNA, assim como mecanismos de combate, mas ainda há uma variedade de danos que não são reparados (SIMAO, 2012; HOEIJMAKERS, 2001).

Desta forma, vias como Ciclo Celular, Reparo ao DNA, Replicação do DNA, Morte Celular Programada e Transdução de Sinal compõem características importantes para atuação da conservação e manutenção do genoma. O Ciclo Celular compõe um conjunto de fases, que atuam para garantir a integridade do genoma na proliferação celular de células filhas, Replicação do DNA (CHAUDHRY et al., 2003; HALAZONETIS, 2008; SIMÃO et al, 2010). O mecanismo de reparo do DNA examina continuamente o genoma e mantém a integridade do genoma removendo ou consertando qualquer dano detectado. Dependendo do tipo de dano ao DNA e do estado do ciclo celular, o mecanismo de reparo do DNA utiliza várias vias diferentes para restaurar o genoma ao seu estado original. Quando o dano e as circunstâncias são tais que o DNA não pode ser reparado com fidelidade absoluta, o mecanismo de reparo do DNA tenta minimizar o dano e remendar o genoma danificado o suficiente para garantir a viabilidade celular (CHAUDHRY et al., 2007; HALAZONETIS, 2008; SIMÃO et al, 2010). A Morte Celular Programada é o mecanismo que impede a proliferação celular, por identificação de danos ou por controle populacional, induzindo a morte de células indesejadas. Ações inibitórias de indução de morte de células danificadas estão associadas ao desencadeamento de diversas patologias, onde o câncer, por exemplo, tem origem devido à proliferação celular de células que não sofreram resposta das vias de Reparos no DNA e de Morte Celular Programada (CHAUDHRY et al., 2007; SIMÃO et al, 2010). A Transdução de sinal é o processo no qual os sinais extracelulares são traduzidos para estímulos internos que provocam mudanças da atividade celular (IKUSHIMA et al, 1996).

2.3 Interação da Radiação Eletromagnética com a Matéria para Energias de até 20 MeV

A interação da radiação com a matéria é compreendida por diversas características no âmbito de classificar o tipo de transferência e absorção da energia pela

matéria, sendo as radiações ionizantes subdividas em: radiações diretamente ionizantes e indiretamente ionizantes (DESOUKY; DING; ZHOU, 2015). São denominadas diretamente ionizantes radiações que possuem carga elétrica, com poder de alta transferência de energia (e de curto alcance) devido à ação de seu campo elétrico, como elétrons, partículas α e entre outras partículas aceleradas. As radiações indiretamente ionizantes constituem-se em radiações de carga nula como as radiações eletromagnéticas (fótons de raios X e gama) e nêutrons, com baixo poder de transferência de energia e alto alcance devido a interações individuais com o meio (TAUHATA et al., 2013; OKUNO & YOSCHIMURA, 2010). Os raios X e gama possuem grande penetração, pois possuem baixa probabilidade de interação com o meio, de acordo com o material (densidade e número atômico), sendo estes o foco de interesse neste trabalho.

No processo de deposição de energia e ionização, são descritas três principais interações de fótons com a matéria: Efeito Fotoelétrico, Efeito Compton e Produção de Pares (EVANS & NOYAU, 1955). Destas, cada interação ocorre dentro de uma faixa probabilidade de acordo com a energia do fóton incidente (MeV) e com a densidade e o número atômico do material (Z do absorvedor). As faixas de predominância das interações são apresentadas graficamente na Figura 1, onde são identificadas que para baixas energias há a prevalência do efeito fotoelétrico, enquanto para a produção de

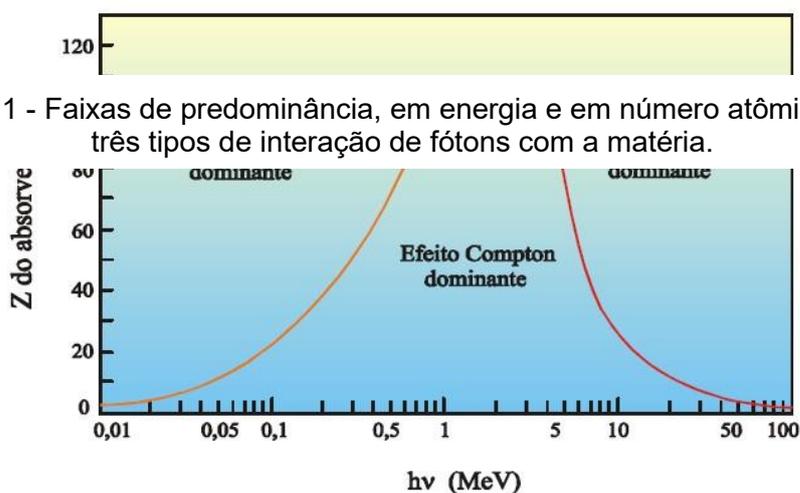


Figura 1 - Faixas de predominância, em energia e em número atômico, dos três tipos de interação de fótons com a matéria.

pares apenas em altas energias ocorrem sua interação (TAUHATA et al., 2013).

Fonte: Tauhata et al. (2013)

O Efeito Fotoelétrico ocorre quando um fóton transfere toda a sua energia para um único elétron. Este elétron é ejetado com uma energia e angulação que depende da energia do fóton incidente, desta forma são característica desse efeito que em energias

baixas (abaixo 20KeV) o ângulo de ejeção ocorra com angulações em torno de 70°, enquanto, para altas energias (acima de 3 MeV) é alta a probabilidade que ocorra a ejeção do elétron sob a mesma angulação do feixe de fótons incidente. Estas ações ocorrem devido ao campo eletromagnético do fóton ser perpendicular à propagação do feixe (OKUNO & YOSCHIMURA, 2010; TAUHATA et al., 2013).

O Efeito Compton é caracterizado pela interação do feite de fóton incidente sobre um elétron livre do meio. Ao incidir sobre o elétron, o fóton cede parte de sua energia e sofre espalhamento em uma determinada angulação e menor energia. O elétron absorve e sofre recuo com energia cinética e momento linear.

Como mencionado anteriormente, a produção de pares (elétron-pósitron) ocorre para altas energias de fótons incidentes sobre um material absorvedor. Quando um fóton com energia maior que 1,022 MeV interage com um meio, é absorvido e ocasionam em um par elétron-pósitron. Ambas as partículas interagem com meio, gerando novas interações e ionizações, onde o pósitron (anti-partícula do elétron) se recombina com um elétron e emite dois fótons com energia de 511 KeV cada (OKUNO & YOSCHIMURA, 2010; TAUHATA et al., 2013).

Devido às interações dos fótons não ocorrerem sob efeitos isolados, a transferência de energia pode não ser absorvida totalmente e/ou ser depositada ao longo da trajetória no meio, ocasionando a ionização do meio e conseqüentemente em eventos consecutivos, além de haver probabilidades de não interagir com um meio absorvedor de baixa densidade. Outras interações como excitação dos átomos e radiação de freamento (onde o fóton não penetra no material, sofrendo desvio) podem ocorrer, assim como parte da energia absorvida corresponder ao aumento de energia cinética de partículas (energia térmica), ionizações de átomos e danos em ligações químicas (OKUNO & YOSCHIMURA, 2010; TAUHATA et al., 2013).

A grandeza que relaciona a energia absorvida e a massa de um material é denominada Dose absorvida. Com o intuito de especificar as energias absorvidas em determinados pontos do volume de um material em análise, a Dose absorvida foi definida em função do ponto de interesse e sua grandeza é utilizada para qualquer tipo de radiação ionizante. Desta forma, a expressão para dose absorvida é descrita como:

$$D = \frac{d\bar{E}}{dm} \text{ (J/Kg}^{-1} = \text{Gy)},$$

onde $d\bar{E}$ é a distribuição de energia média depositada pela radiação no ponto de interesse, em um determinado meio com distribuição de massa dm (TAUHATA et al., 2013).

Introduzida para aplicação em tratamentos radioterápicos no intuito de determinar as quantidades de energias depositadas nos tumores, em 1950, inicialmente com unidade chamada de rad (radiation absorbed dose), em que

$$1 \text{ rad} = 10^{-2} \text{ J. Kg}^{-1}.$$

Após alguns anos foi substituída pela unidade gray (Gy) no sistema internacional de unidades, onde sua equivalência é relacionada por

$$1 \text{ Gy} = 100 \text{ rad} = 1 \text{ J. Kg}^{-1}.$$

Nos tratamentos radioterápicos, por exemplo, uma sessão de irradiação de tumor pode ser aplicada uma Dose absorvida de 2 Gy (200 rad). A aplicação de irradiação também ocorre na indústria alimentícia para esterilizar alimentos e/ou conservar o estado de amadurecimento de legumes, tubérculos e entre outros, sendo aplicadas doses de 10 KGy à 20 KGy (OKUNO & YOSCHIMURA, 2010).

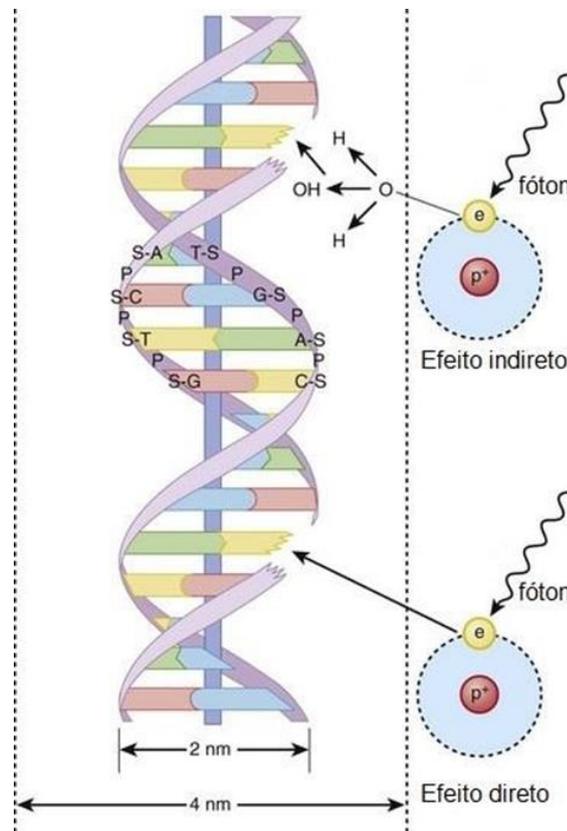
2.4 Efeitos Biológicos Das Radiações Ionizantes

Com as primeiras observações dos efeitos biológicos das radiações ionizantes na medicina, suas aplicações foram realizadas deliberadamente sem limites de energia e de intensidade dos feixes de radiação, ocasionando efeitos deletérios com ações imediatas e/ou tardias. Desta forma, os efeitos biológicos da radiação atuam sob dependência da natureza de reação, sob forma imediata (teciduais) ou em efeitos tardios (estocásticos), e dos mecanismos de interação direta e indireta com a matéria. Para efeitos radiobiológicos, é compreendido que o alvo biológico de um tecido irradiado é o DNA e diversos danos podem ser gerados sobre sua estrutura, como: mudança e/ou perda de uma base, quebra nas pontes de hidrogênio, quebra de fita única e entre outras (OKUNO & YOSCHIMURA, 2010).

Conforme desenho esquemático dos mecanismos de interação da radiação com o DNA na Figura 2, pela interação direta a radiação incide sobre moléculas de DNA, promovendo um possível dano sobre a fita dupla (quebra da fita que pode resultar no surgimento de aberrações cromossômicas). O mecanismo de ação indireta da radiação, Figura 2, realiza o processo de radiólise da água (quebra da molécula de H₂O) que geram radicais livres, íons e outros agentes oxidantes capazes de fragmentarem e danificarem substâncias que compõem o DNA, assim como realizar danos às sinalizações dos mecanismos de conservação e manutenção do genoma (HALL, 2009). Devido à abundância de água presente no corpo humano, composto por cerca de 70% de água,

este mecanismo é associado de forma proporcional à grande parte dos efeitos biológicos da radiação (HALL, 2009; OKUNO & YOSCHIMURA, 2010).

Figura 2 - Mecanismos de interação direta e indireta da radiação no DNA.



Fonte: Adaptado de HALL, 2009

As doses absorvidas são equivalentes à pequenas quantidades de energia depositadas de forma aleatória sobre um volume de massa e com alta incidências sobre as moléculas de DNA. Para danos genéticos se perpetuarem, é necessário que apenas uma interação ocorra sem a ação eficiente dos mecanismos de reparo do genoma. Com o surgimento de novos eventos interativos da radiação sobre o DNA o câncer pode ser desencadeado, uma vez que são considerados ao menos quatro danos acumulativos pelos efeitos da radiação para isto acontecer. Efeitos biológicos acumulativos, com potencialidade de geração de câncer sobre uma única célula, são os denominados efeitos estocásticos (OKUNO & YOSCHIMURA, 2010; TAUHATA et al., 2013).

As reações teciduais se caracterizam pelo alto dano sobre órgãos e tecidos, devida à altas deposições de dose, resultando na morte celular de grande número das células que os compõem e prejudicando o seu funcionamento (de forma total ou parcial). Estes efeitos são comumente conhecidos por antigas denominações como: efeitos não-estocásticos ou efeitos determinísticos. Tais efeitos são identificados em ocorrências de

acidentes ou em tecidos periféricos aos alvos irradiados nos tratamentos de radioterapia (OKUNO & YOSCHIMURA, 2010; TAUHATA et al., 2013).

Na radioterapia, as radiações ionizantes são aplicadas devido ao seu poder de dano ao DNA no combate de células malignas que constituem o tumor em tratamento. Alguns fatores relacionados à radiobiologia foram descritos pelo modelo de Withers (1975), o qual identifica ações anticancerígenas que minimizam eventos tóxicos aos tecidos subjacentes ao alvo de tratamento. Para Withers são considerados cinco fatores, conhecidos como os 5R's da Radiobiologia: reparação, redistribuição, repovoamento, reoxigenação e radiosensibilidade.

O fator de reparação refere-se quando um dano é reversível, ocorrendo durante o ciclo celular nos pontos de verificação (checkpoints) com maior eficiência em células saudáveis. Em células cancerosas, a radiação causa maiores danos ao DNA devido a sua sensibilidade (radiossensibilidade) estar relacionada à alta atividade proliferativa destas células e ao seu estágio no ciclo celular (redistribuição) (BERGONIÉ & TRIBONDEAU, 1959; MARTA, 2014). O conceito de repopulação é relativo ao grau de crescimentos das células cancerígenas, as quais driblam os mecanismos de morte radioinduzida.

Como as células oxigenadas são mais sensíveis à ação indireta da radiação, a reoxigenação visa irrigar as células tumorais hipóxicas estimulando a irrigação por vasos sanguíneos. Devido a este conceito, os tratamentos de radioterapia são administrados sob fracionamento de doses para potencializar os efeitos anticancerígenos (MARTA, 2014). O fracionamento de dose faz parte do planejamento radioterápico, o qual inclui determinar os campos dos feixes de radiação necessário para focalizar o tecido em tratamento. Mesmo com o planejamento, tecidos adjacentes são irradiados desencadeando respostas biológicas como a mobilização do sistema imune (FOMENTI & DEMARIA, 2009).

2.5 Resposta Imunológica à Irradiação

O sistema imunológico é responsável pela proteção do organismo contra agentes patógenos, acionando células e moléculas de combate por meio de dois principais mecanismos de defesa, que ocorrem de forma imediata ou tardia, que são, respectivamente, a resposta inata e resposta adaptativa (ABBAS, 2012). O mecanismo de resposta imunológica inata é responsável pela resposta inicial contra antígenos estranhos, considerados não próprios ao organismo, sendo mediada por células efectoras

como os neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, células Natural Killer (NK), citocinas e proteínas do sistema complemento, além de sinalizar a ação da resposta adaptativa. A resposta imunológica adaptativa age de forma mais eficaz e específica sobre os agentes patológicos (antígenos), devido à sua adaptação à novas exposições e capacidade de memória, havendo como componentes de ação os linfócitos e os anticorpos. Os linfócitos T e B são os principais atuantes sobre os antígenos, com funções específicas e distintas entre si. Enquanto os linfócitos T buscam detectar prováveis infecções ou modificações, produzindo receptores compatíveis, os linfócitos B detectam e anulam certos patógenos com a sintetização e secreção de anticorpos no organismo (PILLAI et al., 2015).

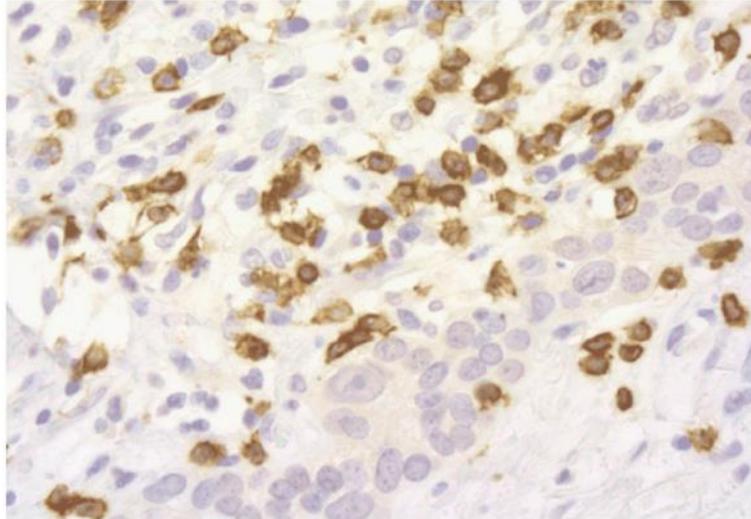
Estudos clínicos demonstram que a ação da resposta imune adaptativa também é acionada, e potencializada, devido ao tratamento de radioterapia. As células tumorais, ao serem submetidas à radioterapia, produzem mediadores inflamatórios e imunogênicos que atraem células do sistema inato, e, conseqüentemente, sinalizam a ação da resposta adaptativa. Desta forma, as respostas imunológicas ocorrem por células não irradiadas, localizadas em áreas fora do campo de tratamento, próximas ou distante do alvo irradiado, efeito denominado de abscopal. No tratamento radioterápico, também foram identificados que os mecanismos de liberação de antígenos, gerados pela destruição neoplásica, desencadeiam as respostas imunológicas sobre tumores de baixas mutações (pouco imunogênico), uma vez que a resposta imune ocorre em maior probabilidade sobre tumores de alta taxa de mutação (CHEN, 2013).

Experimentos com aplicações de doses inferiores à 50 cGy, de baixa taxa de indução de morte celular, demonstram que as células liberam espécies reativas capazes de ativar a resposta imunológica inata. De acordo com Fomenti & Demaria (2009), a ativação da resposta imunológica inata e adaptativa está relacionada com a dose de radiação administrada, identificando para altas taxas de dose (passíveis de morte celular) a emissão de sinalização de perigo e efeito imunológico estimulante (de LA CRUZ MERINO et al., 2014). Evidenciou-se que o sistema imunológico atua na progressão tumoral, desempenhando papel pró-tumorigênico como também antitumoral. A produção de citocinas imunossupressoras compõe mecanismos de resistência, com papel de diminuir as regulações de moléculas antigênicas nos tecidos tumorais (FOMENTI & DEMARIA, 2009; de LA CRUZ MERINO et al., 2014).

Desta forma, a radioterapia apresenta ganho nas práticas de imunoterapia, acionando os mecanismos de ação do sistema imune, potencialmente inibidos previamente, e interferindo na imunoresistência do tumor em tratamento. A Figura 3 exemplifica a ação da resposta imunológica no tecido tumoral em tratamento, onde

linfócitos T citotóxicos (em marrom) penetram células residuais do câncer de mama após a radioterapia (em lilás) (FOMENTI & DEMARIA, 2009).

Figura 3 - Linfócitos T citotóxicos (marrom) infiltrando células residuais de câncer da mama (lilás), após radioterapia.



Fonte: FOMENTI & DEMARIA, 2009.

Portanto, a resposta imunológica sinalizada pelas células irradiadas pode ser classificada sob quatro grupos relacionadas por: resposta das células não irradiadas sinalizadas pelas células irradiadas, dose absorvida decorrente do tratamento de radioterapia localizado no restante do corpo, alterações do microambiente tumoral que resulta em efeitos sistêmicos e efeitos abscopais (DAGOGLU et al, 2019).

Em estudos recentes, foram demonstrados que a radiação gama pode ativar a expressão de genes relacionados ao sistema imunológico (RIBEIRO, 2017; SILVEIRA et al., 2020). Silveira e colaboradores (2020) investigaram a ação das doses de 150, 300 e 600 cGy sobre vias do sistema imunológico. Observaram que a dose de 150 cGy não é eficaz para a ativação do sistema imunológico, enquanto a dose de 300 cGy demonstrou alta eficiência na indução da resposta imunológica. Para a dose de 600 cGy identificaram a diminuição significativa da atividade do sistema imunológico, induzindo o efeito de imunossupressão. De acordo com Silveira e Colaboradores (2020), 300 cGy pode induzir a produção de citocinas e genes que estão associados à ativação e diferenciação de linfócitos T.

2.6 Determinação da Atividade e Diversidade Relativa das Vias

Para analisar dados de expressão genéticas de vias, Castro e Colaboradores (2007) introduziram um método de investigação. O método se baseia em calcular a

atividade relativa e a diversidade relativa para estimar os valores de expressão de um grupo de genes e determinar padrões de expressão entre os genes da via de estudo. Enquanto a atividade relativa representa a alteração de uma via como um todo, a diversidade relativa representa a alteração em um conjunto de genes.

A atividade relativa de uma via α , com um número de genes M_α , é calculada a partir da comparação entre os genes expressos alterados (amostras experimentais) e genes expressos normais (amostras controle). Sendo n_α a atividade relativa da via α , a equação matemática é dada por:

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

onde N_α é a soma da expressão dos genes na via α , em que N_α^e se refere as amostras experimentais e N_α^c as amostras controle. O valor da atividade relativa varia entre $0 \leq n_\alpha \leq 1$, se $n_\alpha > 0,5$ a atividade da via com amostra experimental é maior que a atividade do controle, sendo $n_\alpha < 0,5$ a atividade da amostra experimental menor que a atividade do controle.

O cálculo para determinar quantitativamente a diversidade relativa de uma via α utiliza o conceito de entropia de Shannon da Teoria da Informação (SHANNON, 1951), que relaciona a quantidade de informação extraída a partir de uma distribuição de genes expressos. A entropia de Shannon normalizada é dada por:

$$H_\alpha = -\frac{1}{\ln M_\alpha} \sum_i^{M_\alpha} p(i, \alpha) \ln p(i, \alpha), \quad (2)$$

onde $\ln M_\alpha$ é o fator de normalização que limita $0 \leq H_\alpha \leq 1$, $p(i, \alpha)$ é a frequência do gene i descrito por:

$$p(i, \alpha) = \frac{s(i, \alpha)}{N_\alpha}, \quad (3)$$

sendo $s(i, \alpha)$ a atividade do gene i . Com isso, a diversidade relativa (h_α) é definida como:

$$h_\alpha = \frac{H_\alpha^e}{H_\alpha^e + H_\alpha^c}, \quad (4)$$

análoga a expressão para a atividade relativa, em que H_α^e se refere a diversidade da amostra experimental e H_α^c a diversidade da amostra controle. O valor da diversidade relativa varia entre $0 \leq h_\alpha \leq 1$, se $h_\alpha > 0,5$ a diversidade da via com amostra experimental é maior que a diversidade do controle, sendo $h_\alpha < 0,5$ a diversidade da amostra experimental menor que a diversidade do controle.

Para determinar alterações significativas em uma via (atividade relativa) ou em um conjunto de genes (diversidade relativa) de um estudo em microarranjo, é utilizado o método estatístico denominado *bootstrap*. Com o método de *bootstrap* calcula-se a distribuição da atividade e da diversidade a partir da análise de reamostragem aleatória que

engloba todos os genes presentes no microarranjo. Nesta reamostragem ocorrem repetições de 100 a 100.000 com as mesmas quantidades de genes das vias em análise para verificar a significância amostral sobre uma distribuição de probabilidade. Para identificar se a atividade e diversidade relativa de um grupo de genes são ou não significativos é utilizado o valor de p (*p-value*) para comparar com os níveis de significância de uma distribuição de probabilidade.

De acordo com o método de investigação descrito acima, Castro e colaboradores (2009) desenvolveram o *software ViaComplex* que realiza os cálculos da atividade e diversidade relativa e através do método de *bootstrap* e pela correção de falsos positivo para determinar a significância da via.

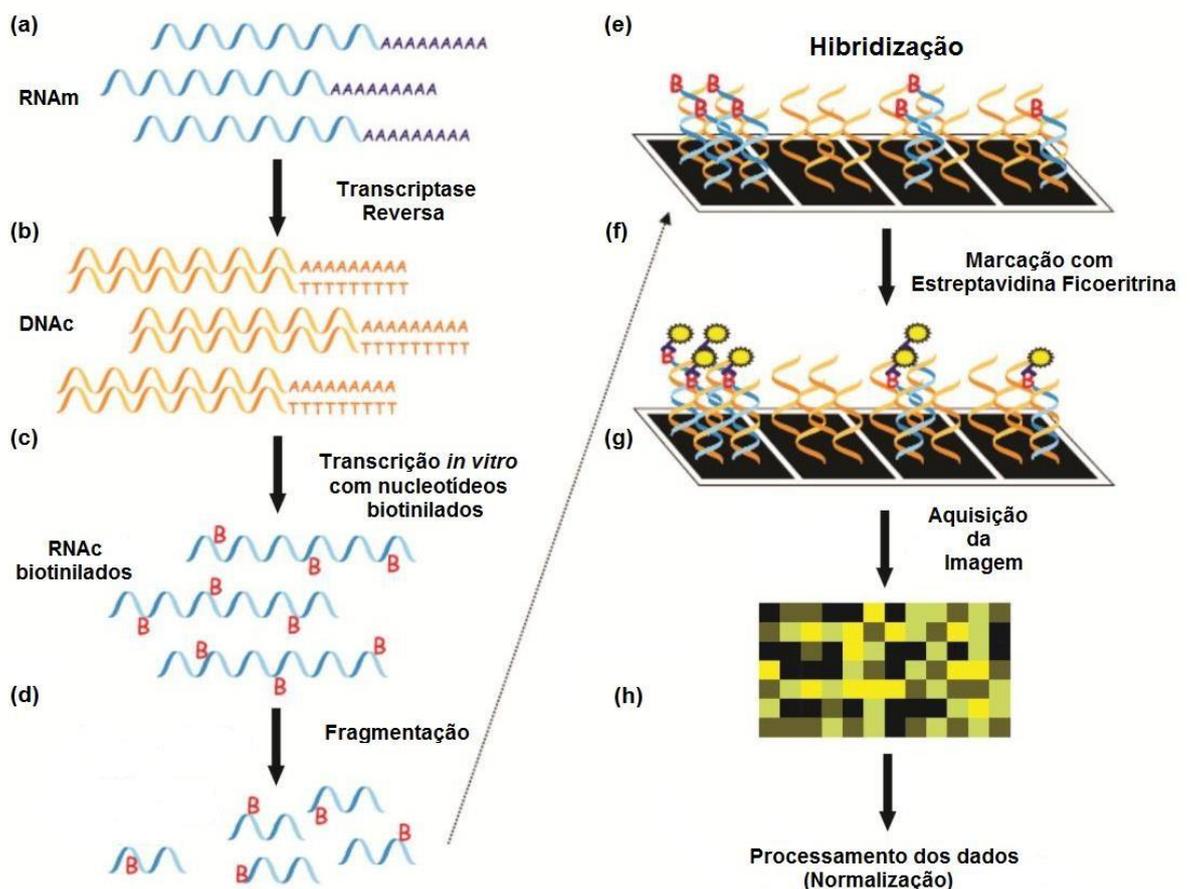
2.7 Microarranjos de DNA

Com o objetivo de estudar a expressão genética de variadas células, algumas tecnologias foram desenvolvidas para medir seus níveis utilizando o conjunto completo de RNAs transcritos em uma célula (transcriptomas). O transcriptoma corresponde a fração do código genético (DNA) que é transcrita pelo RNA polimerase em moléculas de RNA. Destacam-se para este tipo de estudo as tecnologias de microarranjo, desenvolvida a partir de 1982 e utilizada em larga escala desde a década de 90 para analisar a grande quantidade de informação gerada pelo sequenciamento de genomas. Há também a RNA-seq, uma tecnologia de sequenciamento genético de 2ª geração implantada nos últimos anos (não abordada neste trabalho).

Os microarranjos são utilizados em experimentos que comportam milhares de genes, e consistem em quantificar os níveis de expressão de transcritos. A indústria Affymetrix® produz microarranjos de DNA formados por oligonucleotídeos fixados na superfície de um chip. Esse chip é confeccionado em lâmina de vidro (ou nylon) com área de 1,3 cm x 13 cm. Em sua superfície os oligonucleotídeos são imobilizados por sondas que atuam na detecção dos genes expressos, os quais podem ser representados por uma ou mais sondas. O chip da fabricante Affymetrix®, denominado microarranjo GeneChip 2.0 Genoma Humano U133A, utiliza uma única matriz representativa de 15.500 genes humanos que podem ser utilizados para explorar, à nível molecular, o comportamento de processos biológicos normais e disfuncionais. A técnica de microarranjo é utilizada na análise de comportamento para diversas classes de células que foram submetidas a estímulos farmacológicos e/ou de irradiações.

O início do processo de quantificação dos RNAs transcritos ocorre com a remoção das moléculas de RNAm sintetizadas nas células de interesse, conforme a Figura 4a (AUER et al., 2009; SLONIM & YANAI, 2009). Com as amostras coletadas, ocorre a execução da transcriptase reversa para alargar linearmente as amostras de RNAm, o que assegura a estabilidade dessa molécula. No transcorrer desse processo, moléculas complementares de DNA (DNAc) são polimerizadas, Figura 4b, e tornam-se base para síntese de RNA complementar (RNAc) biotiniado, Figura 4c. Posteriormente, para dispor as moléculas de oligonucleotídeos na superfície do microarranjo GeneChip, as moléculas de RNAc biotinizados são fracionadas para auxiliar no processo de hibridação, Figura 4d e 4e (BECKER et al., 2003; AUER et al., 2009).

Figura 4 - Processo de obtenção de dados de transcriptomas a partir da técnica de microarranjo de acordo com Protocolo da Affymetrix®.



Fonte: Adaptado de SIMÃO et al., 2012.

Segundo Fulekar (2009), define-se a hibridação pelo processo biológico que decorre a união, pareamento, das bases nitrogenadas relacionadas com a molécula alvo e

a sequência de bases das sondas fixadas na superfície do microarranjo. Levando em consideração a molécula de RNAc biotinizado, composta pela sequência de bases AUGCU, terá hibridação com sondas de sequência TACGA (AUER et al., 2009; SLO-NIM& YANAI, 2009). As RNAc hibridizadas são quantificadas a partir da marcação fotoluminescente com Estreptavidina Ficoeritrina (indica a extensão da hibridação em diferentes sondas), e realizam a ligação ao biotinizado e excitam-se por laser, Figura 4g. Após estas ações, realiza-se a leitura via scanner de fluorescência para interpretação e digitalização da imagem, Figura 4h. Com as imagens do microchip, relaciona-se a expressão de um gene, em uma sonda, com a intensidade dos sinais luminosos emitidos pelas moléculas fotoluminescentes associadas a esta sonda (AUER et al., 2009). Os resultados são interpretados a partir da informação capturada da intensidade de fluorescência e das posições das sondas, que são convertidas em dados e exportas com extensão .CEL pelo sistema de arquivos (BECKER et al., 2003; BOLÓN-CANEDO et al., 2014).

2.8 Banco de Dados

A iniciativa internacional de sequenciação do genoma humano, projeto genoma humano (HGP – Human Genome Project), levou ao surgimento de incontáveis dados associados aos genes e à geração de bancos públicos de dados contendo estas informações (ROUSHAN & AHMED, 2014; WATSON, 1990). Com o decorrer de novas informações genéticas, foram necessárias normalizações integradas aos dados do HGP (WATSON, et al., 1990), como a padronização de nomenclatura para diversos genes pela HGNC (Human Gene Nomenclature Committee). Bancos de dados como Ontocancro, Biocarta, Reactome, Kegg, Gene Ontology (GO) e National Center for biotechnology (NCBI), são exemplos de repositórios de informações para diversos organismos, e seus respectivos links de acesso estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Banco de dados.

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

3 METODOLOGIA

Nesta seção são descritos os procedimentos metodológicos utilizados para a realização do estudo, considerando-se a seleção das amostras e das vias relacionadas à manutenção do genoma, incluindo a metodologia usada para a análise destas vias e a estatística usada para tratar os dados obtidos.

3.1 Seleção das Amostras de Microarranjo

Com fonte de origem no banco de dados GEO (BARRET et al., 2009; BARRET et al., 2013), as amostras de transcriptomas selecionadas estão relacionadas à Plataforma GPL571, que utiliza a tecnologia de chip de microarranjo de oligonucleotídeos produzidos pela empresa Affymetrix HG-U133_2 (do acrônimo de Human Genome U133A 2.0 Array). As amostras são referentes à estudos que utilizam ^{137}Cs para exposição em linfócitos B (NAYAK et al., 2014) e linfócitos T (LUCAS et al., 2014), com respectivos números de acesso GSE36910 e GSE58613 do banco de dados.

Para estudar os efeitos biológicos produzidos pela radiação gama nos mecanismos de manutenção do genoma dos linfócitos B e T irradiados, foram determinados para o estudo dois grupos de amostras de dados de transcriptomas de células isoladas de sangue periférico e irradiadas com ^{137}Cs . O primeiro grupo contabiliza 285 amostras de linfócitos B irradiados com doses de 1000 cGy, subdivididos em 3 grupos, com 95 amostras cada, para análise de estudo após 0h, 2h e 6h da irradiação, sendo as amostras analisadas após 0h da irradiação consideradas como controle. O segundo grupo contabiliza um total de 52 amostras de linfócitos T irradiados, dos quais 13 amostras receberam doses de 150 cGy, 14 doses receberam 300 cGy e outras 11 amostras doses de 600 cGy, o restante de 14 amostras não foram irradiadas (0 Gy), sendo estas últimas as amostras controle. Para cada subgrupo de linfócitos T com doses fracionadas, além das amostras controle, metade das amostras foram analisadas após 6h e a outra metade após 24h a irradiação, exceto para as doses de 150 cGy e 600 cGy, das quais foram analisadas respectivamente 7 e 4 amostras após 6h e 6 e 7 amostras após 24h.

3.2 Seleção de Vias

Para este estudo foram consideradas 5 vias associadas aos mecanismos de manutenção do genoma, cujas são: Cell Cycle, DNA Repair, DNA Replication, Programmed Cell Death e Signal Transduction. Em vista de estudos já realizados algumas destas vias (CHAUDHRY et al., 2003; CHAUDHRY, 2007; HALAZONETIS, 2008; SIMÃO et al, 2010; SOUZA, 2019), foram analisadas 22 subvias associadas à manutenção do genoma humano, compondo um total de 716 genes presentes nas subvias em análise, disponibilizadas pelo banco de dados Reactome (CROFT et al., 2014; MATTHEWS et al., 2014, FABREGAT et al., 2016).

Para via Cell Cycle, foram selecionadas 6 subvias: Cell Cycle Checkpoints, E2F mediated of Regulation of DNA Replication, S Phase, Deposition of New CENPA-Containing nucleosomes at the centromere, Extension of Telomeres e Packaging of Telomere ends. A subvia Cell Cycle Checkpoints atua nos pontos de verificação, checagem, da progressão do ciclo. Enquanto a subvia E2F mediated of Regulation of DNA Replication possui papel fundamental na regulação da expressão gênica em células sob proliferação e diferenciação. A Subvia S Phase está relacionada com a síntese e a duplicação do DNA. E a Deposition of New CENPA-Containing nucleosomes at the centromere atua quando nucleossomos contendo CENPA (proteína que define a posição do centrômero) permanecem associados ao centrômero e são divididos igualmente para células durante as fases mitóticas. As subvias Extension of Telomeres e Packaging of Telomere ends atua na Manutenção do Telomero durante a mitose.

Para a via de DNA Repair, foram selecionadas cinco subvias: DNA Damage Reversal, Recruitment and ATM-mediated phosphorylation of repair and signaling proteins, Nucleotide Excision Repair, DNA Damage Bypass e Fanconi Anemia Pathway. A subvia DNA Damage Reversal age sobre enzimas carcinogênicas e imunossupressoras para reverter a ação danosa ao DNA. A subvia Recruitment and ATM-mediated phosphorylation of repair and signaling proteins atua em resposta a quebra de fita dupla do DNA, principalmente devido à interação da radiação (HAN & YU, 2010). A subvia Nucleotide Excision Repair atua na reparação de alterações durante a síntese do DNA e da restauração da fita de DNA. A subvia DNA Damage Bypass age tolerando danos, sem realizar a reversão destes danos. Enquanto a subvia Fanconi Anemia Pathway atua no reparo de ligações cruzadas entre cadeias de DNA.

Para a via DNA Replication, foram selecionadas 5 subvias: Assembly of the Pre-Replicative Complex, Ativation of the Pre-Replicative Complex, DNA Replication initiation,

Switching of origins to a post-replicate state e DNA Strand Elongation. As subvias Assembly of the Pre-Replicative Complex e Ativation of the Pre-Replicative Complex atuam no Complexo de ligação ao DNA de várias subunidades, que se liga em todos os eucariotos de uma maneira dependente de ATP às origens da replicação. Enquanto as subvias DNA Replication initiation, Switching of origins to a post-replicate state e DNA Strand Elongation atuam na síntese do DNA.

Para a via Programmed Cell Death foram selecionadas 5 subvias: Caspase Activation via Extrinsic Apoptotic Signalling pathway, Apoptotic execution phase, Intrinsic Pathway for Apoptosis, Regulation of Apoptosis e RIPK1-mediated regulated necrosis. A subvia Caspase Activation via Extrinsic Apoptotic Signalling pathway age para estimular a sinalização para apoptose, sua inibição conduz para a sinalização de necrose. A subvia Apoptotic execution phase gera fatores apoptóticos na ativação de proteínas, induzindo a fragmentação do DNA que leva à morte celular por meio da Caspase. A subvia Intrinsic Pathway for Apoptosis atua na resposta de vários tipos de estresse intracelular, que incluem a supressão do fator de crescimento, dano ao DNA, estimulação do receptor de morte etc. A subvia Regulation of Apoptosis realiza a regulação da apoptose, enquanto a subvia RIPK1-mediated regulated necrosis regula a necrose.

Para a via Signal Transduction foi selecionada apenas a subvia TNF Signallig, que atua na realização de sinalização para o receptor de morte (IKUSHIMA et al, 1996).

O tratamento dos dados de transcriptomas considera o valor máximo de expressão genética, no caso de múltiplas sondas representarem um mesmo gene conforme Stalteri & Harison (2007).

3.3 Análise das Vias

Na análise do comportamento das vias em função das doses de 150, 300, 600 e 1000 cGy, foi empregado o método desenvolvido por Castro e colaboradores (CASTRO et al., 2007) para calcular a atividade e a diversidade relativas, conforme descrição da seção 2.6. Para testar a significância dos valores da atividade e diversidade associadas às amostras não irradiadas e irradiadas, para cada dose em estudo, o método *bootstrap* foi aplicado para realizar a reamostragem do valor da atividade e diversidade relativa com 10.000 repetições (BLAND & ALTMAN, 2015). Nestes testes, foram considerados aumentos significativos quando identificados valores de $p < 0,05$ na atividade e diversidade relativa das vias em estudo, enquanto para valores de $p > 0,95$ foram considerados a diminuição significativa de atividade e diversidade relativa nestas vias.

Dentro deste intervalo, $0,05 < p < 0,95$, considera-se que não houve alteração significativa nos valores de atividade e diversidade relativa para as vias irradiadas. Para analisar as mudanças significativas de atividade e diversidade relativa, aplicou-se a análise dos falsos positivos para confirmar a confiabilidade das alterações (DALMOLIN et al., 2012). Em todas as análises estatísticas executadas, considerando o nível de significância em 5% ($\alpha=0,05$), utilizou-se o software ViaComplex na realização dos cálculos que envolvem a atividade e diversidade relativa das vias.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção estão apresentados os resultados e discussão associados ao estudo, em conformidade com os objetivos e a metodologia estabelecidos.

4.1 Resposta das Vias em Função das Doses de 150, 300, 600 e 1000 cGy

Através dos dados obtidos pela plataforma Reactome, foram analisadas 22 subvias que integram as 5 vias associadas aos mecanismos de manutenção do genoma. De acordo com a metodologia empregada para calcular a atividade e diversidade relativa das vias em estudo, em função das doses de 150, 300, 600 e 1000 cGy sobre as células imunológicas irradiadas, de forma geral os resultados observados apresentaram alterações significativas ($0,05 > p > 0,95$) em um total de 16 subvias, enquanto em 6 subvias não foram identificadas alterações significativas ($0,05 < p < 0,95$), de acordo com a Tabela 2. Para a Tabela 2, configuram-se os resultados nas análises das subvias conforme as alterações significativas, de forma positiva (Sim) ou negativa (Não), quando houve modificações na atividade relativa ou na diversidade relativa, ou, como em alguns casos, em ambas, não explicitando as modulações destas alterações (aumento ou diminuição).

Cada dose está relacionada à exposição de um grupo de células imunológicas, com resultados específicos para observações em tempos diferentes (comparadas com o controle de cada grupo). As doses de 150, 300 e 600 cGy estão relacionadas aos linfócitos T irradiadas, observadas após 6 e 24 horas da irradiação. Enquanto a dose de 1000 cGy está associada aos linfócitos B observados após 2 e 6 horas da irradiação. Desta forma, a análise das vias precisa ser observada considerando estes dois grupos de células do sistema imunológico irradiadas.

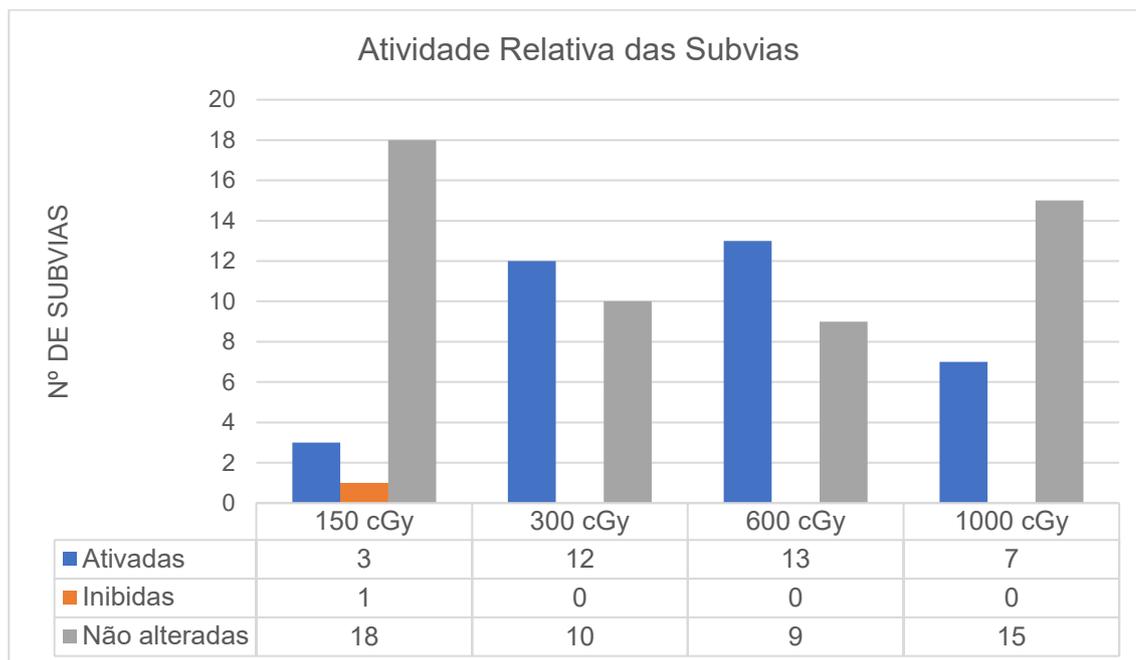
Tabela 2 - Relação das vias analisadas, número de genes e alterações produzidas em razão das doses em estudo (150, 300, 600 e 1000 cGy).

Vias e subvias	Nº Genes	Alteração das Vias			
		T		B	
Tipo celular (linfócitos)		150 cGy	300 cGy	600 cGy	1000 cGy
Via Cell Cycle					
<u>Subvias</u>					
Cell Cycle Checkpoints	275	Não	Sim	Sim	Sim
E2F mediated of Regulation of DNA Replication	22	Não	Não	Não	Não
S Phase	161	Sim	Sim	Sim	Sim
Deposition of New CENPA-Containing nucleosomes at the centromere	54	Não	Sim	Sim	Não
Extension of Telomeres	30	Não	Sim	Sim	Não
Packaging of Telomere ends	33	Não	Sim	Sim	Não
Vias DNA Repair					
<u>Subvias</u>					
DNA Damage Reversal	8	Não	Não	Não	Não
Recruitment and ATM-mediated phosphorylation of repair and signaling proteins	59	Não	Sim	Sim	Não
Nucleotide Excision Repair	110	Não	Sim	Sim	Não
DNA Damage Bypass	48	Não	Sim	Sim	Não
Fanconi Anemia Pathway	38	Não	Não	Não	Não
Vias DNA Replication					
<u>Subvias</u>					
Assembly of the Pre-Replicative Complex	68	Não	Sim	Sim	Sim
Ativation of the Pre-Replicative Complex	33	Sim	Não	Não	Sim
DNA Replication initiation	8	Não	Não	Não	Não
Switching of origins to a post-replicate state	90	Não	Sim	Sim	Sim
DNA Strand Elongation	32	Não	Sim	Sim	Sim
Vias Programmed Cell Death					
<u>Subvias</u>					
Caspase Activation via Extrinsic Apoptotic Signalling pathway	29	Sim	Sim	Sim	Não
Apoptotic execution phase	51	Não	Não	Não	Não
Intrinsic Pathway for Apoptosis	52	Sim	Sim	Sim	Sim
Regulation of Apoptosis	53	Não	Sim	Sim	Não
RIPK1-mediated regulated necrosis	23	Sim	Sim	Sim	Não
Vias Signal Transduction					
<u>Subvias</u>					
TNF Signalling	47	Não	Não	Não	Não

A modulação da atividade relativa das subvias, em resposta à irradiação, estão apresentadas na Figura 5. De acordo com a metodologia, o aumento significativo da atividade relativa em uma via, ou subvia, está associada à ativação desta via, enquanto a diminuição significativa está relacionada com a inibição desta via. Desta forma, para um panorama geral das modulações de atividade relativa, a Figura 5 apresenta o número

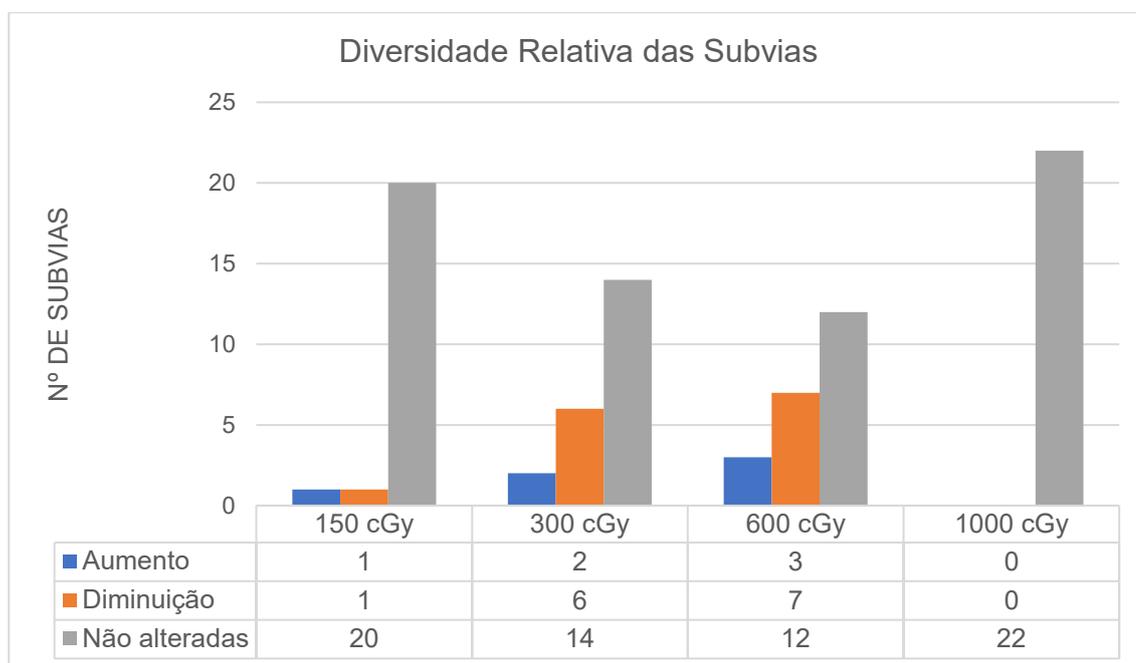
de subvias ativadas, inibidas e não alteradas em função das doses de 150, 300, 600 e 1000 cGy. Considerando o total de 22 subvias analisadas, observou-se que 150 cGy ativou 3 subvias, 300 cGy ativou 12 subvias, 600 cGy ativou 13 subvias e 1000 cGy ativou 7 subvias. Quanto à inibição, observou-se que a irradiação inibiu apenas 1 (uma) subvia considerando-se a dose de 150 cGy.

Figura 5– Modulação da Atividade Relativa em função das doses de 150, 300, 600 e 1000 cGy.



A Figura 6 apresenta, de maneira geral, os resultados das alterações produzidas pela irradiação considerando-se a diversidade relativa das subvias e as doses de 150, 300, 600 e 1000 cGy. De acordo com a metodologia apresentada, a diversidade relativa está associada ao aumento ou diminuição da expressão de um determinado grupo de genes que compõem a via. De acordo com a Figura 6, observou-se o aumento da diversidade relativa em 1 subvia para a dose de 150 cGy, 2 subvias para a dose de 300 cGy, 3 subvias para a dose de 600 cGy e nenhuma aumento significativo para a dose de 1000 cGy. Em relação à diminuição dos níveis de expressão, de acordo com os resultados relacionados à diversidade relativa, observou-se alteração significativa em 1(uma) subvia para a dose de 150 cGy, 6 subvias para a dose de 300 cGy, 7 subvias para a dose de 600 cGy e nenhuma diminuição significativa para a dose de 1000 cGy. Desta forma, o número de subvias não alteradas para os resultados obtidos relacionados à diversidade relativa totalizam 20 subvias para a dose de 150 cGy, 14 subvias para a dose de 300 cGy, 12 subvias para a dose de 600 cGy e 22 subvias para a dose de 1000 cGy.

Figura 6- Modulação da Diversidade Relativa em função das doses de 150, 300, 600 e 1000 cGy.



As especificações das modulações associadas a atividade e diversidade relativas, para cada subvia, são apresentadas e discutidas nas próximas seções.

4.2 Análise da Via Cell Cycle

Considerando a via Cell Cycle (Ciclo Celular), foram analisadas 6 subvias em função das doses de 150, 300, 600 e 1000 cGy. Nestas subvias, não foram observadas alterações significativas relacionadas a atividade e diversidade relativa em nenhuma das doses investigadas sobre as células imunológicas em estudo para a subvia E2F Mediated of Regulation of DNA Replication.

Considerando os dados relacionados aos linfócitos T irradiados com doses de 150, 300 e 600 cGy, a Tabela 3 apresenta os resultados associados a atividade (n_{α}) e diversidade relativa (h_{α}) das subvias considerando o tempo de observação de 6 e 24 horas após a irradiação. Para a dose de 150 cGy, foi observado alteração em apenas uma subvia, havendo a diminuição da diversidade relativa de S Phase ($p > 0,95$) em 24 h, enquanto as demais subvias não sofreram alterações. Considerando a dose de 300 cGy, houveram apenas aumentos significativos para a atividade relativa ($p < 0,05$) nas subvias Cell Cycle Checkpoints (em 6h), S Phase (em 6h), Deposition of New CENPA-Containing nucleosomes at the centromere (em 6 e 24h), Extension of Telomeres (em 6h) e

Packaging of Telomere ends (em 6 e 24h), enquanto para a diversidade relativa foram identificados apenas diminuições significativas ($p>0,95$) nas subvias Cell Cycle Checkpoints (em 24h), S Phase (em 24h) e Extension of Telomeres (em 6 e 24h). Para a dose de 600 cGy houveram aumentos significativos para a atividade relativa ($p<0,05$) nas subvias Cell Cycle Checkpoints (em 6h), S Phase (em 6h), Deposition of New CENPA-Containing nucleosomes at the centromere (em 24h), Extension of Telomeres (em 6h) e Packaging of Telomere ends (em 6 e 24h), enquanto para a diversidade relativa foram identificados aumentos significativos para as subvias Deposition of New CENPA-Containing nucleosomes at the centromere (em 24h) e Packaging of Telomere ends (em 24h) e diminuições significativas ($p>0,95$) nas subvias Cell Cycle Checkpoints (em 24h), S Phase (em 24h) e Extension of Telomeres (em 6 e 24h).

Tabela 3 - Resposta da via Cell Cycle, considerando as doses de 150, 300 e 600 cGy sobre linfócitos T irradiados. O aumento no valor da atividade (n_α) e diversidade relativa (h_α) é identificado por setas direcionadas para cima (\uparrow), enquanto para baixo (\downarrow) relaciona-se com a diminuição destes valores. O símbolo (-) identifica as subvias sem alterações significativas para determinada dose e tempo de observação.

Via Cell Cycle	Dose											
	150 cGy				300 cGy				600 cGy			
	6h		24h		6h		24h		6h		24h	
Subvias	n_α	h_α	n_α	h_α	n_α	h_α	n_α	h_α	n_α	h_α	n_α	h_α
Cell Cycle Checkpoints	-	-	-	-	\uparrow	-	-	\downarrow	\uparrow	-	-	\downarrow
S Phase	-	-	-	\downarrow	\uparrow	-	-	\downarrow	\uparrow	-	-	\downarrow
E2F mediated of Regulation of DNA Replication	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Deposition of New CENPA-Containing nucleosomes at the centromere	-	-	-	-	\uparrow	-	\uparrow	-	-	-	\uparrow	\uparrow
Extension of Telomeres	-	-	-	-	\uparrow	\downarrow	-	\downarrow	\uparrow	\downarrow	-	\downarrow
Packaging of Telomere ends	-	-	-	-	\uparrow	-	\uparrow	-	\uparrow	-	\uparrow	\uparrow

Para os resultados dos linfócitos B irradiados com doses de 1000 cGy, conforme tabela 4, houve aumento significativo ($p<0,05$) apenas da atividade relativa nas subvias Cell Cycle Checkpoints e S Phase após 2 horas da irradiação. Considerando essa dose, não foram observadas alterações significativas na diversidade relativa em nenhuma outra subvia considerada no estudo.

Tabela 4 - Resposta da via Cell Cycle, considerando as doses de 1000 cGy sobre linfócitos B irradiados. O aumento no valor da atividade (n_{α}) e diversidade relativa (h_{α}) é identificado por setas direcionadas para cima (\uparrow), enquanto para baixo (\downarrow) relaciona-se com a diminuição destes valores. O símbolo (-) identifica as subvias sem alterações significativas para determinada dose e tempo de observação.

Via Cell Cycle	Dose			
	1000 cGy			
	2h		6h	
Subvias	n_{α}	h_{α}	n_{α}	h_{α}
Cell Cycle Checkpoints	\uparrow	-	-	-
S Phase	\uparrow	-	-	-
E2F mediated of Regulation of DNA Replication	-	-	-	-
Deposition of New CENPA-Containing nucleosomes at the centromere	-	-	-	-
Extension of Telomeres	-	-	-	-
Packaging of Telomere ends	-	-	-	-

Considerando as doses de 150, 300, 600 e 1000 cGy, os resultados relacionados às subvias Deposition of New CENPA-Containing nucleosomes at the centromere, Extension of Telomeres e Packaging of Telomere ends mostram alterações significativas para atividade e diversidade relativa nas doses intermediárias 300 e 600 cGy. Entretanto, para as doses mínima de 150 cGy e máxima de 1000 cGy, não se observou alterações significativas nestas vias, que atuam durante a manutenção do cromossomo.

Observou-se que apenas a dose de 150 cGy não alterou significativamente ($p < 0,05$) a atividade relativa das subvias Cell Cycle Checkpoints e S Phase. Entretanto, um aumento significativo ($p < 0,05$) da atividade relativa foi observado nessas vias para as doses de 300, 600 e 1000 cGy. Essas subvias estão relacionadas à divisão celular durante o processo de mitose. A subvia Cell Cycle Checkpoints possui a função de verificar a integridade do genoma nos pontos de checagem, para garantir a fidelidade da duplicação cromossômica durante o processo de mitose. Assim, considerando essas subvias, esses resultados indicam que 300, 600 e 1000 cGy ativam os mecanismos de conservação do genoma.

Em estudos recentes, Souza (2019) analisou a ação da dose de 1000 cGy sobre linfócitos B na modulação das vias do ciclo celular usando dados armazenados na plataforma Ontocancro e Reactome. Souza observou o aumento significativo ($p < 0,05$) de expressão genética das subvias Cell Cycle Checkpoints e S Phase, em comum acordo com os resultados apresentados para estas subvias no presente estudo.

4.3 Análise da Via DNA Repair

Considerando a via DNA Repair, foram analisadas 5 subvias em função das doses de 150, 300, 600 e 1000 cGy. De acordo com os resultados gerais, não foram observadas alterações significativas da atividade e diversidade relativas em nenhuma das doses investigadas sobre as células imunológicas em estudo para 2 subvias, as quais são: DNA Damage Reversal e Fanconi Anemia Pathway.

Para os resultados relacionados às células T irradiadas com as doses de 150, 300 e 600 cGy, considerando o tempo de observação após 6 e 24 horas, identificou-se que para a dose de 150 cGy não houve alterações significativas para nas 5 subvias analisadas. Conforme resultados apresentados na Tabela 5, para as doses de 300 e 600 cGy, houve aumento significativo da atividade relativa ($p < 0,05$) apenas para a subvia Nucleotide Excision Repair (em 6h), enquanto para a diversidade relativa houve aumento significativo para a subvia Recruitment and ATM-mediated phosphorylation of repair and signaling proteins (em 24h) e diminuição da diversidade relativa ($p > 0,95$), para as subvias Nucleotide Excision Repair (em 24h) e DNA Damage Bypass (em 24h).

Tabela 5 - Resposta da via DNA Repair, considerando as doses de 150, 300 e 600 cGy sobre linfócitos T irradiados. O aumento no valor da atividade (n_α) e diversidade relativa (h_α) é identificado por setas direcionadas para cima (\uparrow), enquanto para baixo (\downarrow) relaciona-se com a diminuição destes valores. O símbolo (-) identifica as subvias sem alterações significativas para determinada dose e tempo de observação.

Via DNA Repair	Dose											
	150 cGy				300 cGy				600 cGy			
	6h		24h		6h		24h		6h		24h	
Subvias	n_α	h_α	n_α	h_α	n_α	h_α	n_α	h_α	n_α	h_α	n_α	h_α
DNA Damage Reversal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Recruitment and ATM-mediated phosphorylation of repair and signaling proteins	-	-	-	-	-	-	-	\uparrow	-	-	-	\uparrow
Nucleotide Excision Repair	-	-	-	-	\uparrow	-	-	\downarrow	\uparrow	-	-	\downarrow
DNA Damage Bypass	-	-	-	-	-	-	-	\downarrow	-	-	-	\downarrow
Fanconi Anemia Pathway	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

De acordo com os resultados obtidos para a via DNA Repair em relação a dose de 1000 cGy de irradiação em linfócitos B, conforme na Tabela 6, não houve alterações significativas para atividade e diversidade relativa em nenhuma das 5 subvias analisadas.

Tabela 6 - Resposta da via DNA Repair considerando as doses de 1000 cGy sobre linfócitos B irradiados. O aumento no valor da atividade (n_{α}) e diversidade relativa (h_{α}) é identificado por setas direcionadas para cima (\uparrow), enquanto para baixo (\downarrow) relaciona-se com a diminuição destes valores. O símbolo (-) identifica as subvias sem alterações significativas para determinada dose e tempo de observação.

Via DNA Repair	Dose			
	1000 cGy			
	2h		6h	
Subvias	n_{α}	h_{α}	n_{α}	h_{α}
DNA Damage Reversal	-	-	-	-
Recruitment and ATM-mediated phosphorylation of repair and signaling proteins	-	-	-	-
Nucleotide Excision Repair	-	-	-	-
DNA Damage Bypass	-	-	-	-
Fanconi Anemia Pathway	-	-	-	-

Para essa via, considerando as doses de irradiação sobre as células imunológicas analisadas, observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) da atividade relativa da subvia Nucleotide Excision Repair para as doses intermediárias de 300 e 600 cGy. Esse resultado indica a ativação dessa subvia. Por outro lado, não se observou alteração nessa subvia considerando-se as doses de 150 e 1000 cGy. Ainda para esta subvia, nas doses intermediárias, observou-se a diminuição significativa ($p > 0,95$) da diversidade relativa. De acordo com esses resultados, a subvia Nucleotide Excision Repair é ativada pela irradiação, apesar da inibição da expressão de algum grupo específico de genes que compõem a Via. Da mesma forma, para as doses intermediárias, observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) da diversidade relativa para a subvia Recruitment and ATM-mediated phosphorylation of repair and signaling proteins, que identificam a ativação em algum grupo de genes, mas não o bastante para induzir a ativação da subvia como um todo. Entretanto, para a subvia DNA Damage Bypass, observou-se a diminuição significativa ($p > 0,95$) da diversidade relativa e isso mostra a inibição de algum grupo de genes, mas não o suficientemente para inibir a subvia.

A subvia DNA Damage Reversal age sobre enzimas carcinogênicas e imunossupressoras, no intuito de reverter a ação danosa ao DNA, enquanto a subvia DNA Damage Bypass tolera certos danos e não realiza a reversão. A subvia Fanconi Anemia Pathway atua no reparo de ligações cruzadas entre cadeias de DNA, enquanto a subvia Recruitment and ATM-mediated phosphorylation of repair and signaling proteins atua em resposta a quebra de fita dupla do DNA, em decorrência dos processos biológicos de interação da radiação com a matéria. A subvia Nucleotide Excision Repair

age na reparação da síntese do DNA e da restauração da fita de DNA.

Desta forma entende-se que para as subvias não alteradas, em função das doses analisadas, os mecanismos de manutenção do genoma não foram modificados, mas compreende-se que para as subvias DNA Damage Reversal e Fanconi Anemia Pathways eram esperadas modificações significativas devido a atuação danosa da radiação. Assim, mais investigações sobre estes mecanismos precisam elucidados.

4.4 Análise da Via DNA Replication

Para a via DNA Replication, foram analisadas 5 subvias. De acordo com os resultados obtidos para as doses de 150, 300, 600 e 1000 cGy, apenas a subvia DNA Replication Initiation não apresentou alterações significativas em resposta a estas doses.

Analisando os resultados dos linfócitos T irradiados, conforme apresentado na tabela 7, para a dose de 150 cGy, houve apenas a diminuição da atividade relativa ($p > 0,95$) na via Ativation of the Pre-Replicative Complex após 6h da exposição, enquanto para demais vias analisadas não houve ocorrência de modificações para esta dose. Considerando a dose de 300 cGy, observou-se o aumento significativo da atividade relativa ($p < 0,05$) nas subvias Assembly of the Pre-Replicative Complex e Switching of origins to a post-replicate state, após 6h, e diminuição significativa da diversidade relativa ($p > 0,95$) na via DNA Strand Elongation, após 24h da irradiação. Para a dose de 600 cGy, houve aumento significativo da atividade relativa na subvias Assembly of the Pre-Replicative Complex, Switching of origins to a post-replicate state e DNA Strand Elongation, após 6h da irradiação, enquanto para diversidade relativa observou-se a diminuição significativa na subvia DNA Strand Elongation, após 24h da irradiação.

Tabela 7 - Resposta da via DNA Replication, considerando as doses de 150, 300 e 600 cGy sobre linfócitos T irradiados. O aumento no valor da atividade (n_{α}) e diversidade relativa (h_{α}) é identificado por setas direcionadas para cima (\uparrow), enquanto para baixo (\downarrow) relaciona-se com a diminuição destes valores. O símbolo (-) identifica as subvias sem alterações significativas para determinada dose e tempo de observação.

Via DNA Replication	Dose											
	150 cGy				300 cGy				600 cGy			
	6h		24h		6h		24h		6h		24h	
Subvias	n_{α}	h_{α}										
Assembly of the Pre-Replicative Complex	-	-	-	-	\uparrow	-	-	-	\uparrow	-	-	-
Ativation of the Pre-Replicative Complex	\downarrow	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DNA Replication Initiation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Switching of origins to a post-replicate state	-	-	-	-	\uparrow	-	-	-	\uparrow	-	-	-
DNA Strand Elongation	-	-	-	-	-	-	-	\downarrow	\uparrow	-	-	\downarrow

Considerando a dose de 1000 cGy usada na irradiação de linfócitos B, conforme Tabela 8, observou-se o aumento significativo ($p < 0,05$) da atividade relativa em 4 subvias: Assembly of the Pre-Replicative Complex, Ativation of the Pre-Replicative Complex, Switching of origins to a post-replicate state e DNA Strand Elongation. Esses resultados referem a observações após 2 horas da irradiação. Para essa dose de 1000 cGy, não foram observadas alterações considerando-se a diversidade relativa associadas a essas subvias.

Tabela 8 - Resposta da via DNA Replication considerando as doses de 1000 cGy sobre linfócitos B irradiados. O aumento no valor da atividade (n_{α}) e diversidade relativa (h_{α}) é identificado por setas direcionadas para cima (\uparrow), enquanto para baixo (\downarrow) relaciona-se com a diminuição destes valores. O símbolo (-) identifica as subvias sem alterações significativas para determinada dose e tempo de observação.

Via DNA Replication	Dose			
	1000 cGy			
	2h		6h	
Subvias	n_{α}	h_{α}	n_{α}	h_{α}
Assembly of the Pre-Replicative Complex	\uparrow	-	-	-
Ativation of the Pre-Replicative Complex complexo pré-replicativo	\uparrow	-	-	-
DNA Replication Initiation	-	-	-	-
Switching of origins to a post-replicate state	\uparrow	-	-	-
DNA Strand Elongation	\uparrow	-	-	-

Nas subvias Assembly of the Pre-Replicative Complex e Switching of origins to a post-replicate state, não se observou aumento significativo da atividade relativa ($p < 0,05$), apenas para dose mínima analisada (150 cGy), ao contrário das demais doses (300, 600

e 1000 cGy), que ocasionaram um aumento significativo da atividade relativa destas vias. Na via DNA Strand Elongation, as maiores doses, de 600 e 1000 cGy, induziram aumento da atividade relativa ($p < 0,05$), enquanto observou-se em diminuição ($p > 0,95$) da diversidade relativa para as doses intermediárias de 300 e 600 cGy. Entretanto, para a subvia Ativation of the Pre-Replicative Complex, observou-se a diminuição da atividade relativa ($p > 0,95$) na dose de 150 cGy e, ao contrário, um aumento desta atividade para a dose de 1000 cGy.

De acordo com esses resultados obtidos, observou-se que a quantidade de subvias ativadas associadas à via DNA Replication aumentam com o aumento da dose.

4.5 Análise da Via Programmed Cell Death

Considerando a via Programmed Cell Death, foram investigadas a resposta à irradiação de 5 subvias. De acordo com os dados apresentados na Tabela 9, a irradiação não alterou a resposta apenas da subvia Apoptotic Execution Phase.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 9, observou-se um aumento da atividade relativa ($p < 0,05$) causada pela dose de 150 cGy das subvias Caspase Activation via Extrinsic Apoptotic Signalling pathway (em 6 e 24h), Intrinsic Pathway for Apoptosis (em 6h) e RIPK1-mediated regulated necrosis (em 6 e 24h). Considerando a diversidade relativa, observou-se apenas o aumento significativo para a subvia RIPK1-mediated regulated necrosis (em 6 e 24h). Para a dose de 300 cGy, observou-se o aumento significativo ($p < 0,05$) das atividades relativas das subvias Caspase Activation via Extrinsic Apoptotic Signalling pathway (em 6h), Intrinsic Pathway for Apoptosis (em 6h), Regulation of Apoptosis (em 6h) e RIPK1-mediated regulated necrosis (em 6h). Considerando a diversidade relativa, observou-se o aumento significativo para a subvia RIPK1-mediated regulated necrosis (em 6h) e diminuição significativa da subvia Regulation of Apoptosis (em 24h). Para a dose de 600 cGy, observou-se o aumento significativo ($p < 0,05$) da atividade relativa das vias Caspase Activation via Extrinsic Apoptotic Signalling pathway (em 6h), Intrinsic Pathway for Apoptosis (em 6h), Regulation of Apoptosis (em 6h) e RIPK1-mediated regulated necrosis (em 6h). Considerando a diversidade relativa, observou-se apenas a diminuição significativa da subvia Caspase Activation via Extrinsic Apoptotic Signalling pathway (em 24h).

Tabela 9 - Resposta da via Programmed Cell Death, considerando as doses de 150, 300 e 600 cGy sobre linfócitos T irradiados. O aumento no valor da atividade (n_{α}) e diversidade relativa (h_{α}) é identificado por setas direcionadas para cima (\uparrow), enquanto para baixo (\downarrow) relaciona-se com a diminuição destes valores. O símbolo (-) identifica as subvias sem alterações significativas para determinada dose e tempo de observação.

Via Programmed Cell Death	Dose											
	150 cGy				300 cGy				600 cGy			
	6h		24h		6h		24h		6h		24h	
Subvias	n_{α}	h_{α}										
Caspase Activation via Extrinsic Apoptotic Signalling pathway	\uparrow	-	\uparrow	-	\uparrow	-	-	-	\uparrow	-	-	\downarrow
Apoptotic Execution Phase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Intrinsic Pathway for Apoptosis	\uparrow	-	-	-	\uparrow	-	-	-	\uparrow	-	-	-
Regulation of Apoptosis	-	-	-	-	\uparrow	-	-	\downarrow	\uparrow	-	-	-
RIPK1-mediated regulated necrosis	\uparrow	\uparrow	\uparrow	\uparrow	\uparrow	\uparrow	-	-	\uparrow	-	-	-

Na investigação dos efeitos da dose de 1000 cGy em linfócitos B, observou-se o aumento significativo ($p < 0,05$) da atividade relativa da subvia Intrinsic Pathway for Apoptosis após 2 horas da irradiação. Para demais subvias associadas a via Programmed Cell Death, não foram observadas alteração significativas para a atividade e diversidade relativa para esta dose. Em um estudo recentes, os resultados obtidos considerando a resposta da via Programmed Cell Death para dose de 1000 cGy em linfócitos B irradiados, Souza (2019) observou o aumento significativo ($p < 0,05$) na expressão genética da subvia Intrinsic Pathway for Apoptosis, enquanto para as subvias Regulation of Apoptosis e Apoptotic Execution Phase não foram observadas alterações significativas. Os achados do presente estudo estão em conformidade com esses resultados.

Tabela 10 - Resposta da via Programmed Cell Death considerando as doses de 1000 cGy sobre linfócitos B irradiados. O aumento no valor da atividade (n_{α}) e diversidade relativa (h_{α}) é identificado por setas direcionadas para cima (\uparrow), enquanto para baixo (\downarrow) relaciona-se com a diminuição destes valores. O símbolo (-) identifica as subvias sem alterações significativas para determinada dose e tempo de observação.

Via Programmed Cell Death	Dose			
	1000 cGy			
	2h		6h	
Subvias	n_{α}	h_{α}	n_{α}	h_{α}
Caspase Activation via Extrinsic Apoptotic Signalling pathway	-	-	-	-
Apoptotic Execution Phase	-	-	-	-
Intrinsic Pathway	\uparrow	-	-	-
Regulation of Apoptosis	-	-	-	-
RIPK1-mediated regulated necrosis	-	-	-	-

Os resultados relacionados à via Programmed Cell Death, para a irradiação com doses de 150, 300, 600 e 1000 cGy dos linfócitos T e B irradiados, observou-se que a subvia Intrinsic Pathway for Apoptosis apresentou aumento significativos ($p < 0,05$) da atividade relativa. A subvia Regulation of Apoptosis apresentou aumento significativo ($p < 0,05$) da atividade relativa somente para as doses de 300 e 600 cGy.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 9, a subvia RIPK1-mediated regulated necrosis apresentou aumento significativo ($p < 0,05$) tanto para atividade como para a diversidade relativa em 150 cGy (6 e 24h após a irradiação). Para a dose de 300 cGy, observou-se o aumento significativo ($p < 0,05$) da atividade e diversidade relativa apenas após 6 horas após a irradiação. Considerando-se a dose de 600 cGy, houve aumento significativo ($p < 0,05$) apenas da atividade relativa quando observada 6 horas após irradiação.

As subvias Caspase Activation via Extrinsic Apoptotic Signalling pathway, Apoptotic Execution Phase, Intrinsic Pathway for Apoptosis e Regulation of Apoptosis são vias relacionadas ao processo de morte celular programa por apoptose, enquanto a subvia RIPK1-mediated regulated necrosis atua na regulação da necrose. A ativação da subvia Caspase Activation via Extrinsic Apoptotic Signalling pathway estimula a sinalização para apoptose, ao contrário, com a inibição, conduz para a sinalização de necrose. A subvia Intrinsic Pathway for Apoptosis realiza resposta sobre vários tipos de estresse intracelular, que incluem a supressão do fator de crescimento, dano ao DNA, estimulação do receptor de morte, por exemplo. Fatores apoptóticos na ativação de proteínas, da subvia Intrinsic Pathway, induzem a fragmentação do DNA e consequentemente à morte celular por meio da subvia Caspase Activation via Extrinsic Apoptotic Signalling pathway. Observando a relação dos resultados para estas subvias, identificou-se que a subvia RIPK1-mediated regulated necrosis também sofre aumento da ativação em paralelo as subvias Caspase Activation via Extrinsic Apoptotic Signalling pathway e Intrinsic Pathway for Apoptosis.

Pelo que foi exposto, de acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 9 e 10, é mais evidente que a irradiação ativa a via Via Programmed Cell Death quando se considera os efeitos produzidos pelas doses de 300 e 600 cGy.

4.6 Análise da Via Signal Transduction

Para a via Signal Transduction investigou-se unicamente a subvia TNF signalling, operante na sinalização de receptor de morte. Em relação as doses administradas em

linfócitos T e B (150, 300, 600 e 1000 cGy) não foram identificadas alterações significativas de atividade e diversidade relativa em nenhuma destas situações. Desta forma, entende-se que, para este resultado, a via conservou o seu mecanismo de atuação sem induzir aumentos significativos da expressão dos genes e da ativação da via, ou inibir o seu funcionamento. Os resultados encontrados para esta subvia, em função da dose de 1000 cGy, estão em concordância com resultados obtidos por Souza (2019).

4.7 Aspectos Gerais da Ativação das Vias

Conforme seção 2.6, a atividade relativa representa a alteração de uma via como um todo, enquanto a diversidade relativa representa a alteração em um conjunto específico de genes desta via. Desta forma, o aumento da atividade está associado a ativação da via, enquanto a diminuição da atividade corresponde à inibição desta ativação.

De acordo com os resultados do presente estudo, considerando os valores da atividade relativa obtidos para a dose de 150 cGy, observou-se que a radiação ativou o total de 3 subvias associadas aos mecanismos de manutenção do genoma: Caspase Activation via Extrinsic Apoptotic Signalling pathway, Intrinsic Pathway for Apoptosis e RIPK1-mediated regulated necrosis. Para a subvia Ativation of the Pre-Replicative Complex identificou-se a inibição de sua ativação. Considerando os resultados da diversidade relativa, houve modulação positiva na subvia RIPK1-mediated regulated necrosis e modulação negativa na subvia S Phase, enquanto para demais subvias não foram identificadas alterações significativas na diversidade relativa. Desta forma, para doses de 150 cGy, houve modulação positiva da resposta de 3 subvias relacionadas a Via Programmed Cell Death e modulação negativa em 1 (uma) subvia relacionada a via DNA Replication.

Em relação a dose de 300 cGy, para os resultados obtidos de atividade relativa, identificou-se que a radiação ativou positivamente o total de 12 subvias associadas aos mecanismos de manutenção do genoma: Cell Cycle Checkpoints, S Phase, Deposition of New CENPA-Containing nucleosomes at the centromere, Extension of Telomeres, Packaging of Telomere ends, Nucleotide Excision Repair, Assembly of the Pre-Replicative Complex, Switching of origins to a post-replicate state, Caspase Activation via Extrinsic Apoptotic Signalling pathway, Intrinsic Pathway for Apoptosis, Regulation of Apoptosis e RIPK1-mediated regulated necrosis. Considerando os resultados da diversidade relativa,

houve modulação positiva da resposta das subvias Recruitment and ATM-mediated phosphorylation of repair and signaling proteins e RIPK1-mediated regulated necrosis. Considerando as subvias Cell Cycle Checkpoints, S Phase, Extension of Telomeres, Nucleotide Excision Repair, DNA Damage Bypass e Regulation of Apoptosis, observou-se modulações negativas da resposta. Assim, a irradiação causou a modulação positiva da resposta de 5 subvias da via Cell Cycle: 1 (uma) subvia relacionada a via DNA Repair, 2 subvias associadas a via DNA Replication e 4 subvias associadas a via Programmed Cell Death. Isso resultou na ativação de 12 subvias relacionadas aos mecanismos de manutenção do genoma para a dose de 300 cGy.

Para a dose de 600 cGy, considerando os resultados obtidos para a atividade relativa, observou-se que a radiação ativou positivamente a resposta de 13 subvias associadas aos mecanismos de manutenção do genoma: Cell Cycle Checkpoints, S Phase, Deposition of New CENPA-Containing nucleosomes at the centromere, Extension of Telomeres, Packaging of Telomere ends, Nucleotide Excision Repair, Assembly of the Pre-Replicative Complex, Switching of origins to a post-replicate state, DNA Strand Elongation, Caspase Activation via Extrinsic Apoptotic Signalling pathway, Intrinsic Pathway for Apoptosis, Regulation of Apoptosis e RIPK1-mediated regulated necrosis. Considerando os resultados da diversidade relativa, observou a modulação positiva da resposta das subvias Packaging of Telomere ends e Recruitment and ATM-mediated phosphorylation of repair and signaling proteins. Para as subvias Cell Cycle Checkpoints, S Phase, Deposition of New CENPA-Containing nucleosomes at the centromere, Extension of Telomeres, Nucleotide Excision Repair, DNA Damage Bypass, DNA Strand Elongation e Caspase Activation via Extrinsic Apoptotic Signalling pathway, observou-se a modulação negativa da resposta. Assim, a irradiação modulou positivamente a resposta de 5 subvias relacionadas a via Cell Cycle: 1 (uma) subvia associada a via DNA Repair, 3 subvias da via DNA Replication e 4 subvias da via Programmed Cell Death. Desta forma, foram ativadas 13 subvias associadas aos mecanismos de manutenção do genoma para a dose de 600 cGy.

Considerando os valores da atividade relativa obtidos para a dose de 1000 cGy, observou-se que a irradiação ativou positivamente a resposta de 7 subvias associadas aos mecanismos de manutenção do genoma: Cell Cycle Checkpoints, S Phase, Assembly of the Pre-Replicative Complex, Ativation of the Pre-Replicative Complex, Switching of origins to a post-replicate state e DNA Strand Elongation, Intrinsic Pathway for Apoptosis. Para esta dose, não se observou outras alterações significativas. Desta forma, para doses de 1000 cGy, houve modulação positiva da resposta de 2 subvias

relacionadas a via Cell Cycle, 4 associadas a via DNA Replication e 1(uma) subvia associada a via Programmed Cell Death.

De acordo com a literatura, há evidências que indicam padrões de dose-dependência da ativação da resposta imunológica pela irradiação. Doses inferiores à 0,1 Gy influenciam a ação de efeitos anti-inflamatórios, enquanto no intervalo de 0,1 Gy a 1,0 Gy promovem a expressão de citocinas pró-inflamatória (RUBNER et al., 2012; POCKLEY, 2012; HELLWEG, 2015). Para doses superiores à 1,0 Gy, são geradas as respostas imunológicas e ações antitumorais radioinduzidas (POCKLEY, 2012; MARÍN et al., 2015; RÖDEL et al., 2015). Silveira e colaboradores (2020), observaram que a dose de 300 cGy é mais eficiente para estimular o sistema imunológico em relação a dose de 150 e 600 cGy. Ribeiro e colaboradores (2017) observaram que o sistema imunológico pode ser ativado por doses elevadas, como 1000 cGy. Usando a mesma metodologia desses estudos para a determinação da ativação das vias, foi observado no presente estudo que a irradiação é mais eficiente para ativar os mecanismos de manutenção do genoma quando se considera doses intermediárias, como 300 e 600 cGy. Entretanto, mais estudos são necessários para melhor elucidar os efeitos das radiações ionizantes nos mecanismos associados à conservação do genoma.

5 CONCLUSÕES

Estudos sobre os efeitos biológicos produzidos pelo uso das radiações ionizantes no tratamento do câncer mostram a ativação da resposta imunológica sobre o microambiente tumoral. O modelo matemático proposto para calcular atividade e a diversidade relativas permite descrever o comportamento de vias e genes em tecidos tumorais através do uso de dados públicos de transcriptomas. Esta abordagem metodológica foi utilizada no presente estudo para elucidar o comportamento de vias relacionados ao mecanismo de manutenção do genoma em resposta à irradiação considerando as doses de 150, 300, 600 e 1000 cGy em linfócitos B e T relacionados ao sistema imunológico. No presente estudo, foram selecionadas 22 subvias que compõem 5 vias para representar os mecanismos de manutenção do genoma. De acordo com os resultados obtidos, observou-se que a irradiação modulou de forma positiva a resposta de 3 subvias para a dose de 150 cGy, 12 subvias para a dose de 300 cGy, 13 subvias para a dose de 600 cGy e 7 subvias para a dose de 1000 cGy. Portanto, as doses intermediárias de 300 e 600 cGy são mais relevantes para a ativação dos mecanismos de conservação do genoma em comparação as doses de 150 e 1000 cGy.

Estudos recentes sugerem a relação de dependência entre a dose de irradiação e a expressão de genes e vias associadas ao sistema imunológico, indicando que doses de 150 cGy podem não ser suficiente para a ativação deste sistema, enquanto efeitos de imunossupressão são relevantes considerando a dose de 600 cGy. Nesse contexto, é importante a determinação da magnitude do efeito dessas doses na conservação do genoma. Neste estudo, considerou-se doses que podem ser usadas na rotina de hospitais, por exemplo. Os efeitos biológicos investigados neste estudo são relevantes para elucidar a resposta dos mecanismos de manutenção do genoma à irradiação, mas isso não exclui a necessidade de mais estudos para melhor esclarecer os efeitos biológicos produzidos pelas radiações ionizantes.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Abul. *Imunologia celular e molecular 7a edição*. Elsevier Brasil, 2012.
- ALBERTS, B. et al. *Biologia Molecular da Célula*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- AUER, H.; NEWSOM, D. L.; KORNACKER, K. "Expression profiling using Affymetrix GeneChip microarrays". *Microchip Methods in Diagnostics*, 2009.
- BANSBACH, C. E.; CORTEZ, D.; Defining genome maintenance pathways using functional genomic approaches. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 2011.
- BARRETT, T. et al. (2011). "NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—10 years on". *Nucleic acids research*, 2011.
- BARRETT, T. et al. "NCBI GEO: archive for high-throughput functional genomic data". *Nucleic acids research*, 2009.
- BECKER, J. D.; FEIJO, J. A. "Profiling Genomes With Oligonucleotide Arrays, Affymetrix Core Facility" *Boletim de Biotecnologia*, v.24, p.2-6, 2003.
- BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. *Statistics notes: bootstrap resampling methods*. *bmj*, v. 350, p. h2622, 2015.
- BOLÓN-CANEDO, V. et al. A review of microarray datasets and applied feature selection methods. *Information Sciences*, 2014.
- BERGONIÉ, J; TRIBONDEAU. *Interpretation of Some Results of Radiotherapy and an Attempt of Determining a Logical Technique of Treatment*. 1959.
- BERNSTEIN MB, et al. Radiation- induced modulation of costimulatory and coinhibitory T-cell signaling molecules on human prostate carcinoma cells promotes productive antitumor immune interactions. *Cancer Biother Radiopharm*. 29(4): 153–161. 2014.
- BRADLEY, P. et al. Rapid antibiotic-resistance predictions from genome sequence data for *Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Communications*, volume 6. Article number: 1006, 2015.
- CASTRO, M. A. A. et al. "Impaired expression of NER gene network in sporadic solid tumors". *Nucleic Acids Res*; 35: 1859-1867, 2007.
- CASTRO, M. A. et al. "ViaComplex: software for landscape analysis of gene expression networks in genomic context". *Bioinformatics*, 25(11), 1468-1469, 2009.
- CHAUDHRY, M. A. Base excision repair of ionizing radiation-induced DNA damage in G1 and G2 cell cycle phases. *Cancer Cell International*, v. 7, n. 15, 2007.

CHAUDHRY, M. A. et al. Gene expression profile of human cells irradiated in G1 and G2 phases of cell cycle. *Cancer Letters*, v. 195, p. 221–233, 2003.

CHEN, L.; FLIES, D. B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature Reviews Immunology*, 2013.

CROFT, D. et al. The Reactome pathway knowledgebase. *Nucleic acids research*, v. 42, n. D1, p. D472-D477, 2014.

DALMOLIN, R. J. et al. “Transcriptomic analysis reveals pH-responsive antioxidant gene networks”. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*, 4, 1556, 2012.

DE LA CRUZ-MERINO, L. et al. “Radiation for awakening the dormant immune system, a promising challenge to be explored”. *Front. Immunol*, 2014.

DESOUKY, Omar; DING, Nan; ZHOU, Guangming. Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, Elsevier, v. 8, n. 2, p. 247–254, 2015

DONNELLY, E. H. et al. Acute radiation syndrome: assessment and management. *Southern medical journal*, v. 103, n. 6, p. 541–546, 2010.

DAGOGLU, N.; KARAMAN, S.; CAGLAR, H. B.; ORAL, E. N. Abscopal Effect of Radiotherapy in the Immunotherapy Era: Systematic Review of Reported Cases. *Cureus*. 2019 Feb; 11(2): e4103.

EVANS, Robley Dunglison; NOYAU, Atome. *The atomic nucleus*. [S.l.]: McGraw-Hill New York, 1955. v. 582.

FABREGAT, A. et al. The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic acids research*, v. 44, n. D1, p. D481-D487, 2016.

FORMENTI, S. C.; DEMARIA, S. (2009). “Systemic effects of local radiotherapy”. *The lancet oncology*, 10(7), 718-726, 2009.

FULEKAR, M. H. (Ed.). “Bioinformatics: applications in life and environmental sciences”. Springer Science & Business Media, 2009.

HALL, E. J. Radiation biology for pediatric radiologists. *Pediatric radiology*, v. 39, n. 1, p. 57, 2009.

HALAZONETIS, T. D. et al. An Oncogene-Induced DNA Damage Model for Cancer Development. *Science*, v. 319, p. 1352-1355, 2008.

HAN W., YU, K. N. Ionizing Radiation, DNA Double Strand Break and Mutation. In: *Advances in Genetics Research*. V. 4, 2010.

HAYASHI, T. et al. Long-term effects of radiation dose on inflammatory markers in atomic bomb survivors. *The American journal of medicine*, Elsevier, v. 118, n. 1, p. 83–86, 2005.

HELLWEG, C.E. The nuclear factor κ B pathway: a link to the immune system in the radiation response. *Cancer Lett*, 2015.

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

ICRP, 2007. The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP Publication 103. *Ann. ICRP* 37 (2-4).

ICRP, 1977. Recommendations of the ICRP. ICRP Publication 26. *Ann. ICRP* 1 (3).

IKUSHIMA, T. et al. Radioadaptive response: Efficient repair of radiation-induced DNA damage in adapted cells. *Mutation Research*, v. 358, p. 193-198, 1996.

LUCAS, J. et al. A translatable predictor of human radiation exposure. *PloS one, Public Library of Science*, v. 9, n. 9, p. e107897, 2014.

MARTA, G. N. Radiobiologia: princípios básicos aplicados a prática clínica. Serviço de Radioterapia do Centro de Oncologia do Hospital Sírio-Libanês. 2014.

MARÍN, A. et al. "Bystander effects and radiotherapy". *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy*, 20(1), 12-21, 2015.

MATTHEWS, L. et al. "Reactome knowledgebase of human biological pathways and processes". *Nucleic acids research*, 2014.

MOREL, Arnaud; FERNANDEZ, Nadine; COSTE, Alix de La; HADDADA, Hédi; VIGUIER, Mireille; POLLA, Barbara S; ANTOINE, Bénédicte; KAHN, Axel. g-ray irradiation induces B7. 1 costimulatory molecule neoexpression in various murine tumor cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy, Springer*, v. 46, n. 5, p. 277–282, 1998.

NAYAK, R. R. et al. "Stress-induced changes in gene interactions in human cells". *Nucleic acids research*, 42(3), 1757-1771, 2014.

NUSSBAUM, R. L.; MCINNES, R.R.; WILLARD, H.F. Thompson & Thompson *Genética Médica*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

OKUNO, E.; YOSCHIMURA, E. Física das Radiações. *Oficina de Textos*. São Paulo 2010, p. 70, 2010.

PILLAI, Shiv; ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew HH. *Imunologia celular e molecular*. Elsevier Brasil, 2015.

POCKLEY, A. G. Radiation-induced effects and the immune system in cancer. *Radiationinduced effects and the immune system*, 2012.

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 ¹³⁷Cs: determinação da resposta de vias e genes relacionados à superfamília B7-CD28/CTLA4. 2017. Dissertação (Mestrado em Física) – Instituto de Matemática, Estatística e Física, Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, 2017.

REITS, E. A. et al. Radiation modulates the peptide repertoire, enhances mhc class i expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *The Journal of experimental medicine*, Rockefeller Univ Press, v. 203, n. 5, p. 1259–1271, 2006.

RÖDEL, F. et al. Contribution of the immune system to bystander and non-targeted effects of ionizing radiation. *Cancer letters*, 356(1), 105-113, 2015.

ROUSHAN, T.; AHMED, D. Human Genome Project – A review. *Medicine today*, v. 26, n. 1, 2014.

RUBNER, Y.; WUNDERLICH, R.; RÜHLE, P. F.; KULZER, L.; WERTHMÖLLER, N.; FREY, B. How does ionizing irradiation contribute to the induction of anti-tumor immunity? *Front Oncol* 2012.

SHANNON, C. E. “Prediction and Entropy of Printed English”. *The Bell System Technical Journal*, 1951.

SILVEIRA, D. A. et al. Expression of genes and pathways associated with the B7-CD28 superfamily in response to irradiation of blood cells using ¹³⁷Cs. *International Journal of Radiation Biology*, v. 97, n. 2, p. 149-155, 2020.

SIMÃO, E. M. et al. “Induced genome maintenance pathways in pre-cancer tissues describe an anti-cancer barrier in tumor development”. *Molecular BioSystems*, 8(11), 3003-3009, 2012.

SIMÃO, E. M. et al. Modeling the Human Genome Maintenance Network. *Physical A*, v.389, p. 4188-94, 2010.

SLONIM, D. K.; YANAI, I. “Getting Started in Gene Expression Microarray Analysis”. *PLoS Comput Biol* 5(10): e1000543.

SOUZA, V. S. Análise Do Comportamento De Vias Associadas À Manutenção Do Genoma Em Resposta À Exposição De Células B À Radiação Gama. Dissertação (Mestrado em Física) – Instituto de Matemática, Estatística e Física, Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, 2019.

STALTERI, M. A.; HARRISON, A. P. Interpretation of multiple probe sets mapping to the same gene in Affymetrix GeneChips. *BMC bioinformatics*, v. 8, n. 1, p. 13, 2007.

TAUHATA, L.; SALATI, I. P. A., DI PRINZIO, R., DI PRINZIO, M. A. R. R. Radioproteção e Dosimetria: Fundamentos. 9ª revisão, Rio de Janeiro - IRD/CNEN. 345p. 2013.

WARTERS, R. L.; HOFER, K. G. Radionuclide toxicity in cultured mammalian cells: Elucidation of the primary site for radiation-induced division delay. *Radiation research*, v. 69, n. 2, p. 348-358, 1977.

WATSON, J. et al. *Molecular Biology of the Gene*, 5 ed, 2004.

WATSON, J. D. The Human Genome Project: Past, Present, and Future. *SCIENCE*, VOL.248. 6 de Abril de 1990.

WITHERS, H. R. "The four R's of radiotherapy". *Advances in Radiation Biology*, 1975.