

ANÁLISE DE MARCADORES MICROSSATÉLITES LOCALIZADOS NO CROMOSSO- MO Y (Y-STR) DE INDIVÍDUOS EXPOSTOS AO CÉSIO-137*

ATHAMY SARAH DE PAULA CRUZ, DANIELA DE MELO E SILVA, FERNANDA RIBEIRO GODOI, ALDAIRES VIEIRA DE MELO, EMÍLIA OLIVEIRA ALVES COST, EDUARDO ROCHA PEDROSA, APARECIDO DIVINO DA CRUZ

Resumo: o objetivo deste estudo foi analisar de forma retrospectiva a frequência de mutações germinativas de Y-STR em famílias das quais o pai foi diretamente exposto à radiação ionizante do Césio-137, durante o acidente de 1987 em Goiânia. Foram utilizados 11 marcadores em STR do cromossomo Y e apenas 01 mutação foi detectada no marcador DYS19.

Palavras-chave: Y-STRs. Césio-137. Acidente radiológico. Mutação.

No ano de 1987 ocorreu um acidente radiológico em Goiânia que provocou contaminação ambiental, por radiação ionizante. Uma cápsula, utilizada em aparelhos de radioterapia, foi encontrada nas antigas instalações do Instituto Goiano de Radioterapia e continha cerca de 19,26 g de cloreto de césio-137 ($^{137}\text{CsCl}$) segundo da Cruz *et al.* (1996) e Ramalho *et al.* (1988). A unidade de grandeza utilizada para quantificar a “dose absorvida” é medida pela quantidade de energia depositada por quilograma de tecido biológico e é expressa em rad (radiation absorbed dose - dose de radiação absorvida). O Sistema Internacional de Medidas utiliza-se da unidade Gy (Gray), que equivale a 100 rad. Gray é uma unidade adotada para qualquer tipo de radiação ionizante (BIRAL, 2002).

Além das pessoas que tiveram um contato direto com o sal radioativo, os trabalhadores da defesa civil, membros do corpo de bombeiros e da polícia militar, também foram expostos. Porém mesmo depois de identificada a natureza da

contaminação continuaram a realizar as atividades necessárias como: remoção do lixo radioativo e lavagem de asfalto e isolamento dos locais atingidos (GOÍAS, 2002). Vários estudos têm mostrado que a instabilidade no genoma decorrentes de mutações, aberrações cromossômicas, formação de micronúcleos e mutações em microssatélites, que em consequência podem promover ou retardar a morte celular, são comumente relatadas em células de mamíferos expostos à radiação ionizante. Uma mutação é definida como qualquer alteração herdável e permanente na sequência do DNA (NIWA, 2006). As mutações, em organismos multicelulares, podem ocorrer tanto em células somáticas quanto em células germinativas em qualquer estágio do ciclo celular. Mutações em células somáticas não são transmitidas à geração filial, somente aquelas sofridas por células germinativas (WATSON *et al.*, 2007).

O genoma humano tem aproximadamente três bilhões de bases e baseado neste número pode-se estimar cerca de seis milhões de diferenças de uma pessoa para outra (FRANKHAM *et al.*, 2002) A avaliação individual é feita com o uso de marcadores genéticos ou moleculares que aponta no DNA de um indivíduo o padrão ou o perfil de fragmentos próprios do seu genoma. Para se estabelecer vínculo genético faz-se uso de marcadores polimórficos de DNA, regiões bialélicas ricas em variações populacionais (COOMBER *et al.*, 2007). Estas regiões muito variáveis são conhecidas como sequências de DNA repetidas em tandem ou ainda de DNA satélite, representam aproximadamente 10% do genoma humano e se mostraram uma ferramenta bastante eficiente para estabelecer a variabilidade genética de acordo com Li *et al.* (2004).

Dentre os marcadores moleculares mais conhecidos, encontram-se os minissatélites e os microssatélites, sendo, respectivamente, as VNTRs (do inglês Variable number tandem repeat, ou Repetições Variáveis em Tandem) e as STRs (do inglês short tandem repeats, ou repetições curtas em tandem) os marcadores mais usados nos estudos populacionais (BOIS, 2003).

Os microssatélites (STR) são sequências de 1 a 6 pb que estão repetidas várias vezes ao longo do genoma e se caracterizam por serem altamente polimórficas. Os STR se tornaram uma poderosa ferramenta para identificação humana, uma vez que, para sua detecção, pode-se utilizar a técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR), que amplifica a região de DNA do STR adjacente aos oligonucleotídeos iniciadores que se anelam em regiões flangeadoras não repetitivas (ZANE *et al.*, 2002).

Análises das sequências repetitivas de DNA demonstraram que estas sequências são sujeitas a altas taxas de mutações espontâneas. Assim tornar-se iam excelentes ferramentas investigativas para se estimar o dano induzido ao genoma decorrente da sua exposição a agentes genotóxicos (JEFFREYS *et al.*, 1988; SAJANTILLA *et al.*, 1999; BRIDGES, 2001).

Recentemente, vários estudos desenvolveram um novo sistema para monitorar os efeitos das mutações induzida por radiação em células somáticas e germinativas em regiões hipervariáveis. Por causa da alta taxa de mutação, as sequências de DNA repetitivo, se tornaram excelentes candidatos. Com um novo método para estimar risco genético em humanos, Jeffreys, Dubrova e colaboradores (1993), estudaram a expansão de repetições minissatélites induzida por radiação, o que refletia o fenômeno de instabilidade genômica (Wu *et al.*, 2006). As sequências minissatélites e microssatélites

têm sido usadas para demonstrar satisfatoriamente a indução de mutação germinativa em camundongos, humanos, dentre outros organismos (WEINBERG *et al.*, 2001; LIVSHITS *et al.*, 2001; FURITSU *et al.*, 2005; YAU, 2004; SLEBOS *et al.*, 2004; DUBROVA, 2003).

As análises de STR localizadas em cromossomos autossômicos são o primeiro foco de uma análise. Durante a última década, muitas pesquisas descreveram um alto grau de polimorfismo nos STR localizados no cromossomo Y (Y-STR), tornando-se estes, em alguns casos, uma poderosa ferramenta na identificação humana (KURIHARA R. *et al.*, 2004).

A utilização dos Y-STR como ferramenta de identificação está baseada nas diferenças entre os cromossomos X e Y e os autossômicos, onde os marcadores no cromossomo Y se encontram em regiões não-recombinantes (NRY) ao X, uma vez que estes loci são geneticamente ligados e herdados de pai para filho (QUINTANA-MURCIL *et al.*, 2001).

De acordo com Ali e Hasnain (2002), o cromossomo sexual Y pertence ao grupo G e possui morfologia acrocêntrica. Apresentando um pequeno número de pares de bases, cerca de 60 milhões, é o terceiro menor cromossomo do cariótipo humano e representa apenas 2% do gradiente total do genoma.

O cromossomo Y possui duas regiões homologas ao X, essas regiões são chamadas de PAR1 (região pseudoautossômica 1) e PAR2 (região pseudoautossômica 2) localizadas nas regiões distais dos braços longo e curto de ambos os cromossomos. Os PAR1 e 2 correspondem a 5% da sequência do Y. Os 95% restantes não se recombinam com nenhum outro cromossomo sendo conhecidos como região não recombinante do cromossomo Y (NRY) também conhecida como região masculino-específica do cromossomo Y (MSY) segundo Lahn *et al.* 2001. Após uma investigação detalhada da sequência do cromossomo Y, foram identificados 166 novos marcadores dando um total de mais de 300 microssatélites descritos, afirma Kayser *et al.* (2004).

O Y tem um alto valor informativo para análises de polimorfismo em teste de paternidade por estabelecer a patrilinhagem, herança gênica paterna, que não sofre recombinação (BUTLER, J.M., 2003). Marcadores encontrados na NRY são conduzidos à geração F1 masculina na forma de haplótipos, sem que ocorram alterações de geração para geração, a menos que aconteça mutação segundo Mitchel e Hammer (1996).

A especificidade masculina presente na maior parte do cromossomo Y e a falta de unidades de recombinação gera uma distribuição alélica específica na população (ROEWER, 2003).

O estabelecimento da estimativa das taxas de mutações nestes marcadores se faz necessário para que se possa evitar uma falsa exclusão em casos onde possa existir uma discrepância alélica entre pai biológico e o filho devido a uma mutação (KURIHARA, R. *et al.*, 2004).

Desta forma, a população exposta à radiação gama do Césio-137, durante o acidente radioativo de Goiânia, oferece uma oportunidade única para se compreender os efeitos biológicos da radiação em células germinativas, utilizando marcadores Y-STR.

O objetivo deste estudo foi analisar de forma retrospectiva a frequência de mutações germinativas de Y-STR em famílias das quais o pai foi diretamente exposto à radiação ionizante do Césio-137, durante o acidente de 1987 em Goiânia.

METODOLOGIA

O grupo amostral foi composto por homens acidentalmente e ocupacionalmente expostos somados aos descendentes de primeiro grau do sexo masculino totalizando 28 pessoas. Todos os indivíduos foram entrevistados, e após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), foram coletados 10 mL de sangue periférico por venipunção em tubos heparinizados. O material biológico foi fracionado em hemácias, plasma e creme leucocitário, armazenado entre -20°C e -86°C. O creme leucocitário foi usado, subsequentemente, para a extração e o isolamento do DNA genômico.

O DNA genômico foi purificado a partir de 350 µL de creme leucocitário utilizando-se um kit comercial de extração de DNA (Easy® DNA Purification Kit, Invitrogen, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de DNA existente em cada amostra foi quantificada por análise comparativa em géis de agarose a 1%, corados com brometo de etídio a 10ng/µL e comparada com o marcador de peso molecular Low DNA Mass® (Invitrogen, EUA).

As reações de amplificação foram realizadas para um volume final de 12,5

µL de solução contendo 100 ng de DNA, tampão da enzima livre de magnésio

10x, 10 ng de solução contendo 16 oligonucleotídeos fluorescentes marcados com os fluoróforos FAN, HEX e NED e 0,5U de Taq DNA polimerase. O termociclador DNA IQ 5® (Biorad, EUA) foi utilizado nas reações de amplificação. Para a leitura dos produtos de PCR foi utilizado o sequenciador automático de DNA MEGABACE 1000® (Amersham Pharmacia Biotech, EUA). Para tanto, 2µL do produto de PCR foi diluído em 8 µL de uma solução contendo 7,75 µL de solução de Tween 20 a 0,1% e 0,25 µL de ET-ROX® GE HealthCare.

Para a análise dos dados obtidos com a corrida eletroforética no sequenciador automático foi utilizado o software Fragment Profiler v1.2® (GE Healthcare, EUA). Uma vez configurados os parâmetros da leitura, o programa exibiu o padrão de leitura e os dados obtidos para cada amostra em forma de eletroferogramas.

Para calcular as taxas de mutação em loci STR do cromossomo Y foi considerado o número total de pais analisados neste estudo. Este número foi multiplicado por um, considerando-se a singularidade do Y observada nos homens da espécie humana e pelo número de marcadores analisados. Esse cálculo pode ser representado pela equação 1, a seguir:

$$\text{Eq1: número total de alelos} \\ X = n \times 1 \times y$$

Onde,

X= número total de alelos amostrados;

n = número total de progenitores;
 1 = constante;
 y = número de marcadores analisado

A taxa de mutação germinativa, por loco amostrado, foi calculada utilizando-se a equação 2 a seguir:

Eq2: Taxa de mutação/loco
$TM = tml/Eq1$

Onde,

TM = Taxa de mutação por loco;

Tml = número total de mutações por loco.

RESULTADOS

O presente estudo analisou 12 amostras de sangue periférico de homens acidentalmente e ocupacionalmente expostos à radiação ionizante do césio-137, e 16 filhos do sexo masculino, incluindo-se um total de 28 indivíduos, dos quais alguns tinham de um a dois filhos. Foram utilizados 11 marcadores em STR do cromossomo Y (tabela 1) para analisar 308 alelos.

Tabela 1: Características dos 11 marcadores Y-STR utilizados para genotipagem dos indivíduos expostos

STR Locos	Fluoróforos
DYS391 DYS389I DYS389II	FAN DYS439
DYS393 DYS390	NED DYS385
DYS438 DYS437 DYS392	HEX DYS19

Foi encontrada apenas 1 mutação germinativa de origem paterna no locus DYS19 (Tabela 2) no grupo ocupacionalmente exposto. A taxa de mutação encontrada foi de 0,0075. Não foi utilizado o grupo controle por não termos alcançado um número amostral representativo.

Tabela 2: Quantidade de eventos mutacionais por locus STR observados no grupo de indivíduos acidentalmente exposto à RI de césio-137 em Goiânia

<i>Locus STR Paternas</i>		Número de Mutações	
	DYS391	DYS3891	-
DYS439	DYS389II	DYS393	-
DYS390	DYS385	DYS438	-
DYS437	DYS19	1	-
DY392	-	-	-
TOTAL	-	-	-

Essa pequena frequência de mutação pode estar ligada ao fato de que a taxa de absorção de radiação foi pouco significativa, obtendo um valor médio $\geq 0,2$ Gy.

CONCLUSÃO

A análise retrospectiva da frequência de mutações em locus STR no cromossomo Y do grupo amostral composto por 12 pais expostos acidentalmente e ocupacionalmente à radiação ionizante do Césio-137, durante o acidente de

1987 em Goiânia, permitiu chegar à conclusão de que houve somente uma mutação observada no locus DYS19 e a dose de radiação a que foram expostos os progenitores não foi suficiente para causar mutações capazes de serem transferidas às gerações futuras.

ANALYSIS OF MARKERS MICROSATELLITE LOCATED ON CHROMOSOME Y (Y-STR) FOR INDIVIDUALS EXPOSED TO-137 CAESIUM

Abstract: the aim of this study was to retrospectively analyze the frequency of germline mutations of Y-STR families in which the father was directly exposed to ionizing radiation of cesium-137 during the 1987 accident in Goiania. We used 11 STR markers in Y chromosome and only 01 mutations were detected at marker DYS19.

Keywords: Y-STRs. 137-Caesium. Radiological accident. Mutation.

Referências

BIRAL, A. R. Radiações ionizantes para médicos, físicos e leigos. 1.ed., Florianópolis: Insular, pp.232, 2002.

112 BRIGES, BA. Radiation and germline mutation at repeat sequences: Are we in the middle of

a paradigm shift? Radiation research 156, 631-641, 2001.

BUTLER JM. Recent Developments in Y-Short Tandem Repeat and Y- single Nucleotide polymorphism Analysis. Forensic Sci Rev, 2003; 15:91-111.

COOMBER N, DAVID VA, O'BRIEN SJ, MENOTTI-RAYMOND M. Validation of a short Tandem Repeat Multiplex Typing System for Genetic Individualization of domestic Cat Samples. Forensic Science 48, 547-555, 2007.

DA CRUZ, AD; CURRY J; CURADO MP; GLICKMAN, BW. Monitoring hprt Mutant Frequency Over Time in T-Lymphocytes of People Accidentally Exposed to High Doses of Ionizing Radiation. Environmental and Molecular Mutagenesis 27, 165-175, 1996.

DUBROVA YE. Long-term genetic effects of radiation exposure. Mutation research 544, 433-439, 2003.

DUBROVA YE, JEFFREYS AJ, MALASSHENKO AM. Mouse minisatellite mutations induced by ionizing radiation. Nat. Genet. 5, 92-94, 1993.

FRANKHAM, R; BALLOU, JD; BRISCOE, DA. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, 2002.

FURITSU K et al. Microsatellite mutations show no increase in the children of the Chernobyl liquidators. Mutation research 581, 69-82, 2005.

KURIHARA R et al. Mutations in 14 Y-STR loci among Japanese father-son haplotypes. Int J Legal Med.118:125-131.2004.

KURIHARA R. et al. Mutations in 14 Y-STR loci among Japanese father-son haplotypes. Int. J. Legal Med. 2004; 118: 125-131.

LANH BT, PEARSON NM, JEGALIAN K. The human Y chromosome in the light of evolution. Nature Gen 2: 207-216.2001.

LI YC, KOROL AB, FAHIMA T, BEILES A, NEVO E. Microsatellites Within Genes: Structure, Function and Evolution. Molecular Biology Evolution 21(6), 991-1007, 2004.

LIVSHITS LA et al. Children of Chernobyl cleanup works do not show elevated rates of mutations in minisatellite alleles. Radiation research 155, 74-80, 2001.

MITCHEL R J, HUMMER M F. Human evolution and the Y chromosome. Curr opin genet Dev 6: 737-742.1996.

NIWA, O. Indirect mechanisms of genomic instability and the biological significance of mutations at tandem repeat loci. Mutation research 598, 61-72, 2006.

QUINTANA-MURCIL, KRAUSZ C, MCELREAVEY K. The human Y chromosome: function, evolution and disease. Forensic Sci Int 2001; 118: 169-181 Ali S and Hasnain SE (2002) Molecular dissection of the human Y- chromosome. Gene 281: 1-10.

RAMALHO AT, NASCIMENTO ACH, NATARAJAN AT. Dose assessments by cytogenetic analysis in the Goiânia (Brazil) radiation accident. Radiat Protect Dosimetry 25, 97-100, 1988.

ROEWER L et al. Analysis for molecular variance (AMOVA) of Y-chromosome- specific Microsatellites in two closely related human populations. Hum Mol GENETS: 1029-1033.1996.

SAJANTILLA A et al. Experimentally observed germline mutations at human micro and minisatellite loci. European Journal of Human Genetics 7, 263- 266, 1999.

WATSON, JD et al. Recombinant DNA. Genes and Genomes – A short course. Third Edition. W. H. Freeman and Comoany, New York, 2007.

WEINBERG HSh et al. Very high mutation rate in offspring of Chernobyl accident liquidators. The Royal Society 268, 1001-1005, 2001.

WU J. et al. Radiation-induced germline mutations detected by a direct comparison of parents and first-generation offspring DNA sequences containing SNPs. Mutation Research 596, 1-11, 2006.

YAUK CL. Advances in the application of germline tandem repeat instability for in situ monitoring. Mutation research 566, 169-182, 2004.

* Recebido em: 03.03.2012. Aprovado em: 22.03.2012.

ATHAMY SARAH DE PAULA CRUZ

Graduando em Biologia na Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

DANIELA DE MELO E SILVA, FERNANDA RIBEIRO GODOI, ALDAIRES VIEIRA DE MELO,
EMÍLIA OLIVEIRA ALVES COST, EDUARDO ROCHA PEDROSA, APARECIDO DIVINO DA CRUZ
Núcleo de Pesquisas Replicon; Pontifícia Universidade Católica de Goiás.