



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-graduação em Biologia
Mestrado em Biologia Celular e Molecular

**Ocorrência de mutações em *loci* ligados ao cromossomo Y na
prole nascida de indivíduos expostos à radiação ionizante**

Jalsi Tacon Arruda

Goiânia-GO

2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-graduação em Biologia
Mestrado em Biologia Celular e Molecular

**Ocorrência de mutações em *loci* ligados ao cromossomo Y na
prole nascida de indivíduos expostos à radiação ionizante**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa em Biologia Celular e Molecular
do Instituto de Ciências Biológicas, como
requisito para obtenção do título de
Mestre.

Orientador: Dr. *Aparecido Divino da Cruz*, Ph.D.
Co-Orientadora: Dra. *Katia Karina Verolli de Oliveira Moura*

Goiânia-GO

2009

Aos meus queridos pais pelo incentivo e dedicação.

Ao amor da minha vida, pelo companheirismo.

“Algo só é impossível até que alguém duvida e prova o contrário”.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

“Para terminar uma caminhada de mil passos devemos iniciar com o primeiro”.

Provérbio Chinês

A meu *DEUS*, agradeço por minha vida, pelos momentos em que me carregou nos braços e não permitiu que caminhasse sozinha.

Aos meus pais *Luiz* e *Danizete*, por me ensinar que o conhecimento é a única herança que levamos conosco. Em especial ao meu *PAI*, obrigada por me dizer que “o caminho mais curto entre dois pontos sempre será uma reta”... À minha *MÃE*, por todas as manhãs que me acordou para ir à aula, pelo exemplo de pessoa, esposa, amiga e mãe.

Ao meu marido *Bruno*, minha alma gêmea, por estar, permanecer e continuar em minha vida, sempre acreditando em mim, pela paciência, compreensão, carinho, amizade, e principalmente pelo nosso amor eterno.

Ao meu orientador Dr. *Aparecido Divino da Cruz*, Ph.D., o *Professor Peixoto*, pela oportunidade de mostrar minha capacidade, ampliar minha formação acadêmica e científica. Obrigada por me acolher com carinho e por me guiar durante essa importante fase da minha vida. À minha co-orientadora Professora Dra. *Katia Karina Verolli de Oliveira Moura* que concedeu uma oportunidade de fazer ciência.

Aos amigos do Núcleo de Pesquisas Replicon, pelos momentos de carinho e por “*replicarem*” comigo as horas de alegria. Agradeço a todos os professores que contribuíram para a minha formação. À equipe do LaGene, em especial a *Sandra Maria Torres* por ser uma pessoa especial.

Obrigada por tudo!

As atividades realizadas no presente estudo contaram com a colaboração das seguintes instituições: Universidade Federal de Goiás (UFG) – Programa de Pós-graduação Mestrado em Biologia Celular e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas; Universidade Católica de Goiás (UCG) – Núcleo de Pesquisas Replicon; Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular (LaGene) – Superintendência Leide das Neves (SULEIDE) – Secretaria do Estado de Saúde (SES-GO) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fomento.

SUMÁRIO

	Página
Lista de Figuras.....	VIII
Lista de Tabelas.....	IX
Lista de Siglas e Abreviaturas.....	X
Lista de Anexos.....	XI
Resumo.....	XII
Abstract.....	XIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Histórico do Acidente.....	3
1.2 Césio e Radiação Ionizante.....	7
1.3 Genoma Humano.....	9
1.4 Retrovírus Endógenos Humanos.....	10
1.4.1 Efeitos genômicos das seqüências HERV.....	12
1.5 Mutação.....	13
1.6 Cromossomo Y.....	14
1.6.1 Genes localizados no cromossomo Y.....	16
2. JUSTIFICATIVA.....	20
3. OBJETIVOS.....	21
3.1 Objetivo Geral.....	21
3.2 Objetivos Específicos.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 Grupo de Estudo.....	22
4.2 Amostra Biológica.....	23
4.3 Extração de DNA.....	23
4.4 Reação em Cadeia da Polimerase.....	23
4.5 Análise das Mutações.....	24
5. RESULTADOS.....	26
5. DISCUSSÃO.....	31
6. CONCLUSÃO.....	40
7. REFERÊNCIAS.....	41
8. ANEXOS.....	51

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ruínas do prédio de onde foi retirada a cápsula contendo Césio-137 que causou o acidente radioativo em Goiânia. Fonte: acervo científico da SULEIDE.	3
Figura 2. Processo de descontaminação da Rua 57. Fonte: acervo científico da SULEIDE.	6
Figura 3. Ideograma do cromossomo Y com esquema das bandas G e <i>locus</i> . Fonte: modificado de Jobling e Tyler-Smith, 2003.	16
Figura 4. Desenho esquemático do cromossomo Y com os marcadores analisados. Fonte: modificado de Kamp <i>et al.</i> , 2001.	24
Figura 5. Registro visual do gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio. As setas indicam as mutações encontradas em Yp: deleção no gene <i>SRY</i> , duplicação no gene <i>AMELY</i> e o gene <i>ZFY</i> normal. Pais: 34, 54. Filhos: 35, 56. Ld: Marcador de peso molecular de 50pb.	24
Figura 6. Mutações encontradas no cromossomo Y dos indivíduos analisados nos grupos analisados.	28
Figura 7. Diagrama de dispersão mostrando que a taxa de mutação aumenta conforme a idade dos pais.	30
Figura 8. Diagrama de dispersão mostrando que a taxa de mutações aumenta conforme a dose absorvida de radiação ionizante.	30

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Frequência de mutações nos indivíduos de cada grupo analisado.	26
Tabela 2. Taxa de mutação para cada <i>locus</i> analisado em cada grupo.	29

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<i>AMELY</i>	Gene <i>Amelogenin</i>
<i>AZF</i>	Região Fator de Azoospermia (do inglês <i>Azoospermia Factor</i>)
<i>CDY</i>	Gene <i>Chromodomain Y</i>
<i>CNEN</i>	Comissão Nacional de Energia Nuclear
<i>CNPq</i>	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
<i>CNS</i>	Conselho Nacional de Saúde
<i>CONEP</i>	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
<i>CsCl</i>	Cloreto de céσιο
<i>DAZ</i>	Gene <i>Deleted in Azoospermia</i>
<i>DAZLI</i>	Gene <i>DAZ like-autosomal 1</i>
<i>DBY</i>	Gene <i>Dead-box Y RNA helicase</i>
<i>DDX3Y</i>	Gene <i>Dead (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, Y-linked</i>
<i>FUNLEIDE</i>	Fundação Leide das Neves Ferreira
<i>Gy</i>	Unidade de medida de radiação ionizante absorvida (do inglês <i>Gray</i>)
<i>HERV</i>	Retrovírus endógenos humanos (do inglês <i>Human Endogenous Retrovírus</i>)
<i>L1</i>	Repetição longa interpassada (do inglês <i>Long Interspersed Repeated DNA LINE-1</i>)
<i>LaGene</i>	Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular
<i>LTR</i>	Repetições terminais longas nas extremidades (do inglês <i>Long Terminal Region</i>)
<i>MS</i>	Ministério da Saúde
<i>Rads</i>	Unidade de medida de doses de radiação absorvida (do inglês <i>Radiation absorbed dose</i>)
<i>RBMY1A1</i>	Gene <i>RNA-Binding Motif</i>
<i>RI</i>	Radiação Ionizante
<i>SAR</i>	Síndrome Aguda da Radiação
<i>SCO</i>	Síndrome de Células Únicas de Sertoli (do inglês <i>Sertoli Cell Only</i>)
<i>SES/GO</i>	Secretaria de Saúde do Estado de Goiás
<i>SRY</i>	Gene <i>Sex determining Region of Y</i>
<i>STR</i>	Repetições curtas em tandem (do inglês <i>Short Tandem Repeats</i>)
<i>STS</i>	Sítio de seqüência marcada (do inglês <i>Sequence Tagged Sites</i>)
<i>SULEIDE</i>	Superintendência Leide das Neves Ferreira
<i>USP9Y</i>	Gene <i>Ubiquitin-specific protease 9 Y</i>
<i>UTY</i>	Gene <i>Ubiquitously Transcribed TPR gene on Y chromosome</i>
<i>XKRY</i>	Gene <i>X Kell blood-related Y</i>
<i>Yp</i>	Braço curto do cromossomo Y
<i>Ypter</i>	Região terminal do braço curto do cromossomo Y
<i>Yq</i>	Braço longo do cromossomo Y
<i>Yqter</i>	Região terminal do braço longo do cromossomo Y
<i>ZFY</i>	Gene <i>Zinc Finger protein Y</i>

LISTA DE ANEXOS

	Página
Anexo 01. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dos Indivíduos Examinados	51
Anexo 02. Dados do grupo de estudo com os indivíduos expostos a radiação ionizante	53
Anexo 03. Protocolos da PCR	54
Anexo 04. Recombinações homólogas entre HERVs causa duplicações na região <i>AZFa</i> de homens acidentalmente expostos ao césio-137 em Goiânia	61

RESUMO

Em setembro de 1987, em Goiânia-GO, Brasil, ocorreu um dos mais graves acidentes radiológicos envolvendo uma unidade de radioterapia com uma fonte de césio-137. Uma área de 2.000m² foi contaminada e 249 pessoas foram expostas, tanto externa quanto internamente, a grandes doses de radiação ionizante, resultando em 4 óbitos, devido a síndrome aguda da radiação. O presente estudo analisou a ocorrência de possíveis mutações no cromossomo Y de homens expostos e seus descendentes do sexo masculino divididos em dois grupos: A) 8 homens expostos acidentalmente e 8 meninos; B) 12 homens expostos ocupacionalmente e 16 meninos; e o grupo controle com 8 homens e 8 meninos não expostos. O DNA foi isolado de linfócitos de sangue periférico e 30 loci (SRY, AMELY, ZFY, AZFa-Prox1, SY83, AZFa-Prox2, SY86, SY85, SY84, USP9Y, SY87, DBY, AZFa-Dist1, 12f2, AZFa-Dist2, UTYpe, SY106, SY124, SY127, SY134, SY135, SY143, SY1197, SY1291, SY1125, SY1054, YDAZ3, SY254, SY255, RH65618) foram analisados pela reação em cadeia da polimerase. Todos os genomas apresentaram um vínculo genético de pelo menos 99,99% de probabilidade acumulada de paternidade. Todos os indivíduos analisados amplificaram os STS; entretanto 4 pais (8,4%) e 8 filhos (21,2%) no grupo A, e 3 pais (7,1%) e 3 filhos (63,3%) no grupo B apresentaram mutações. A taxa de mutação total foi 0,11. A primeira geração do grupo acidentalmente exposto apresentou 7 mutações no SY86, 12 mutações no SY84, 1 mutação nos loci 12f2 e SY135. A primeira geração do grupo ocupacionalmente exposto apresentou 2 mutações no SRY, AMELY, AZFa-Prox1, AZFa-Prox2, SY86, SY85, SY84, USP9Y, SY87, AZFa-Dist1, UTYpe, SY106, SY124, SY127, SY134, SY135, SY143, SY1125, SY1054, YDAZ3, SY254, SY255, RH65618, e 4 mutações no 12f2. No grupo controle somente um filho apresentou uma deleção no SY84. Acredita-se que eventos de recombinação entre regiões repetitivas sejam a causa da alta frequência de mutações *de novo* no cromossomo Y. As mutações encontradas possivelmente foram geradas por mecanismos mutacionais intrínsecos que podem ter sido aumentados pela radiação ionizante do césio-137. A exposição à radiação ionizante de césio-137 pode ser biomonitorada na descendência dos indivíduos expostos e a taxa de mutação pode ser atribuída à exposição à radiação.

Palavras-chave: recombinação, cromossomo Y, radiação ionizante, césio-137.

Abstract

In September 1987, in Goiânia-GO, Brazil, one of the most serious radiological accidents occurred at a radiotherapy unit involving a source of cesium-137. An area of 2,000 m² was contaminated and 249 people were exposed, both externally and internally, to substantial doses of ionizing radiation, resulting in four fatalities due to acute radiation syndrome. The current study examined the occurrence of possible mutations in the Y chromosome of the exposed men and their male offspring divided into two groups: A) eight accidentally exposed men and eight boys; B) twelve occupationally exposed men and sixteen boys; and the control group with 8 men and 8 boys not exposed. DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes and 30 loci (SRY, AMELY, ZFY, AZFa-Prox1, SY83, AZFa-Prox2, SY86, SY85, SY84, USP9Y, SY87, DBY, AZFa-Dist1, 12f2, AZFa-Dist2, UTYPe, SY106, SY124, SY127, SY134, SY135, SY143, SY1197, SY1291, SY1125, SY1054, YDAZ3, SY254, SY255, RH65618) were amplified by the polymerase chain reaction. All DNA tests had a probability of paternity of at least 99.99%. All analyzed individuals amplified STS; however, 4 fathers (8.4%) and 8 sons (21.2%) in group A, and 3 fathers (7.1%) and 3 sons (63.3%) in group B showed mutations. The total mutation rates were 0.11. The first generation of the accidentally exposed group showed 7 mutations in SY86, 12 mutations in SY84, and 1 mutation both in 12f2 and SY135. The first generation of the occupationally exposed group showed 2 mutations in SRY, AMELY, AZFa-Prox1, AZFa-Prox2, SY86, SY85, SY84, USP9Y, SY87, AZFa-Dist1, UTYPe, SY106, SY124, SY127, SY134, SY135, SY143, SY1125, SY1054, YDAZ3, SY254, SY255, and RH65618; and 4 mutations in 12f2. In the control group, only one son showed an SY84 deletion. Recombination events between repetitive regions are possibly the cause of the high incidence of de novo mutations in the Y chromosome. The mutations were possibly generated by intrinsic mechanisms that could have been increased by the ionizing radiation from cesium-137. The exposure to ionizing radiation from cesium-137 can be detected in offspring of exposed individuals, and the mutation rate can be attributed to radioactive exposure.

Key words: Recombination; Y chromosome; Ionizing radiations; Cesium-137.

1. INTRODUÇÃO

Em setembro de 1987 ocorreu em Goiânia – GO (Brasil) o maior acidente radioativo do hemisfério ocidental, envolvendo uma fonte de césio-137 (da Cruz *et al.*, 1996, 1997a/b, 2008; da Silva, 2000). Um acidente pode envolver desde indivíduos isolados até comunidades inteiras e, neste caso, centenas de pessoas foram expostas a doses moderadas e altas de radiação ionizante. A partir do acidente, foi criada uma instituição para acompanhar e prestar assistência aos radioacidentados – *Fundação Leide das Neves Ferreira* (FUNLEIDE), vinculada à *Secretaria do Estado de Saúde de Goiás* (SES/GO).

A população exposta e seus descendentes recebem atenção à saúde a longo prazo. Os protocolos médicos de acompanhamento visam monitorar os agravos à saúde das pessoas potencialmente expostas durante o acidente. Decorridos 21 anos do acidente, o acompanhamento da saúde genética dos radioacidentados vem sendo executado pelo *Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular* (LaGene) da SULEIDE.

O efeito da radiação ionizante pode não ser apenas a morte celular, mas também o acúmulo de alterações no DNA das células. As mutações incorporadas e fixadas no genoma das células germinativas podem ser transmitidas verticalmente ao longo das gerações (da Cruz *et al.*, 1997a/b; Barber *et al.*, 2002; Dubrova *et al.*, 2002, 2006; Aizawa *et al.*, 2007; da Cruz *et al.*, 2008). Além dos conseqüentes efeitos estocásticos e determinísticos a saúde dos radioacidentados, a exposição individual resulta em agravos psicológicos e sociais aos sujeitos envolvidos no evento (Wascheck *et al.*, 2002; Miranda *et al.*, 2005).

O uso freqüente de fontes de radiação na medicina, na indústria e nas usinas nucleares pode aumentar o risco relativo de acidentes radioativos para a população. O acidente goiano possui características únicas e, portanto, oferece uma oportunidade rara para se estudar os efeitos do radionuclídeo césio-137 sobre o organismo humano.

Analisar a ocorrência de mutações germinativas na prole dos radioexpostos contribui para ampliar o conhecimento acerca dos efeitos biológicos da exposição à radiação ionizante em populações humanas. O cromossomo Y é herdado de forma patrilinear. Portanto, o objetivo geral do presente estudo, apoiado em dados já obtidos (da Cruz *et al.*, 1996, 1997a/b; da Silva, 2000; Arruda *et al.*, 2008; da Cruz *et al.*, 2008; Flores, 2008) consiste em avaliar a ocorrência de mutações em regiões do cromossomo Y de homens expostos à radiação ionizante durante o acidente em Goiânia que constituíram dois grupos: expostos acidentalmente e os expostos ocupacionalmente à radiação ionizante do césio-137.

1.1. Histórico do Acidente

Durante a tarde de domingo do dia 13 de setembro de 1987, duas pessoas a procura de papel descartado para reciclagem, entraram nas ruínas de um prédio no centro de Goiânia, localizado entre as ruas Tocantins e Paranaíba, onde funcionava uma clínica de radioterapia, o Instituto Goiano de Radioterapia, que havia sido desativada há dois anos (Figura 1) [da Cruz *et al.*, 1996, 1997a/b, 2008].



Figura 1. Ruínas do prédio de onde foi retirada a cápsula contendo Césio-137 que causou o acidente radioativo em Goiânia. Fonte: acervo científico da SULEIDE.

No local, encontravam-se equipamentos abandonados. Os indivíduos, movidos pela possibilidade de vender o chumbo como sucata a um ferro-velho, removeram partes do cabeçote que revestia um aparelho de radioterapia e as levaram para sua residência, situada também no Setor Central da capital goiana, usando um carrinho de mão. Para recuperar o chumbo, as partes foram rompidas

a golpes de marreta e, rompendo a blindagem, o ambiente foi exposto a cápsula com 19,26g de cloreto de céσιο-137 (CsCl), na forma de um pó branco semelhante ao sal de cozinha, que no escuro luminescia uma coloração azul-esverdeada (da Cruz *et al.*, 1996, 1997a/b, 2008; da Silva, 2000).

Os eventos subseqüentes à ruptura da cápsula de céσιο-137 podem ser comparados ao acontecimento mitológico da abertura da *Caixa de Pandora*, cujo conteúdo e seus efeitos, eram desconhecidos da população. A partir do rompimento do cabeçote de chumbo, a radiação ionizante liberada atingiu todas as pessoas que manipularam as partes da sucata, contaminando objetos, casas, animais domésticos, plantas e pessoas que de alguma forma tiveram contato direto com o radionuclídeo (da Cruz *et al.*, 1996, 1997a/b, 2008; da Silva, 2000).

Quando o acidente tornou-se público, as pessoas expostas já manifestavam sintomas agudos decorrentes da exposição individual à radiação ionizante do céσιο-137 (RI), incluindo náuseas, vômitos, dores de cabeça, radiodermites, etc. O efeito imediato após exposição a RI é a Síndrome Aguda da Radiação (SAR), que é a principal causa de morte de mamíferos irradiados, nas primeiras semanas após exposição e caracterizam-se por sintomas gastrointestinais e alterações hematológicas (da Cruz *et al.*, 1996, 1997a/b, 2008). A SAR variou de intensidade conforme a dose de radiação absorvida pelos radioacidentados. Onze radioacidentados com doses estimadas entre 3,0 a 7,1Gy sofreram a SAR e destes, oito tiveram aplasia de medula (Costa *et al.*, 1988; Valverde, 1988).

Um total de 249 pessoas foram expostas a RI, sendo que 4 foram a óbito 6 semanas após a exposição. A descontaminação dos radioacidentados e o tratamento emergencial foram realizados no Hospital Geral de Goiânia e no

Hospital Naval Marcílio Dias no Rio de Janeiro (Costa *et al.*, 1988; Valverde, 1988).

Além do envolvimento da população exposta acidentalmente, os trabalhadores que atuaram na defesa civil foram acionados para iniciar os trabalhos de atendimento ao desastre que, a princípio, foi tipificado como possível vazamento de gás tóxico. A principal preocupação dos trabalhadores no local do acidente foi com o que respiravam, e não com a exposição de corpo inteiro à radiação ionizante (Flores, 2008). Durante um acidente que envolve risco de exposição ocupacional a RI, os trabalhadores da segurança pública podem receber altas doses de radiação. O risco relativo da exposição acidental se eleva quando se desconhece a natureza do material que gera a ocorrência (da Cruz *et al.*, 1996, 1997a/b, 2008; da Silva, 2000; Flores, 2008).

A atividade radioativa em Goiânia, detectada com valores superiores aos preconizados internacionalmente como seguro para a população humana, segundo dados oficiais da *Comissão Nacional de Energia Nuclear* (CNEN), pôde ser identificada numa área de 2.000m². A radiação ionizante depositado no solo infiltrou-se e provocou a derrubada de árvores e casas (Figura 2). A descontaminação dos locais envolvidos no acidente gerou 6.500m³ de rejeitos radioativos, que foram armazenados no depósito permanente nas proximidades da cidade de Abadia de Goiás (Goiás, 1988a; da Cruz *et al.*, 1996, 1997a/b; da Silva, 2000; Flores, 2008).



Figura 2. Processo de descontaminação da Rua 57. Fonte: acervo científico da SULEIDE.

Passado o momento agudo e emergencial do acidente radioativo, foi criada uma instituição para proceder com o acompanhamento e assistência a longo prazo aos radioacidentados. A instituição foi denominada *Fundação Leide das Neves Ferreira* (FUNLEIDE), legitimando, como uma homenagem póstuma, o sofrimento e óbito da única criança que sucumbiu fatalmente ao acidente (Goiás, 1988a).

A criação da FUNLEIDE data de fevereiro de 1988 (Lei nº 10.339, Diário Oficial - DOE nº 15.376, de 15/12/87, e Decreto de Regulamentação nº 2.897, de 11/02/88, DOE nº 417, de 18/02/88). Posteriormente, uma reforma administrativa no Governo do Estado de Goiás converteu-a em *Superintendência Leide das Neves Ferreira* (SULEIDE), de acordo com a Lei nº 13.530, de 11/11/99, subordinada a Secretaria do Estado da Saúde de Goiás – Diário Oficial nº 18.302, de 12/11/99 (Goiás, 1988b).

A SULEIDE é encarregada de zelar pelo acervo relativo ao acidente, oferecer assistência aos radioacidentados, realizar estudos epidemiológicos,

capacitar pessoal técnico, articular e coordenar intercâmbios científicos, promover a divulgação de conhecimentos tecnológicos e a edição de publicações técnicas e científicas, dentre outras (Wascheck, 2002). Atualmente, recebem acompanhamento médico, odontológico, psicológico e social de 615 pessoas, divididas em três grupos. Os critérios adotados para inclusão dos indivíduos nos grupos foram adaptados das diretrizes internacionais divulgadas pelas *Nuclear Regulatory Commission* e *Energy Research and Development Administration*, dos Estados Unidos. A propositura dos grupos leva em consideração as doses significativas de radiação absorvidas e o nível de comprometimento orgânico individual decorrente da exposição a RI de céσιο-137 (Goiás, 1988a/c/d).

1.2. Céσιο e Radiação Ionizante

O nome do elemento deriva do latim *caesium*, que significa – céu azul. O elemento foi descoberto por volta de 1860 por Robert W. Bunsen e Gustav Kirchoff, um químico e físico de origem alemã, respectivamente. O céσιο corresponde ao primeiro elemento descoberto por análise espectral a partir de espectroscopia conduzida em uma amostra de água mineral. A observação espectral do céσιο resulta na formação de linhas espectrais azuis (Leitão e Gomes, 2004).

O elemento céσιο, um metal alcalino, pertence ao grupo 1 da classificação periódica dos elementos. Na natureza é o menos abundante dos cinco metais alcalinos não radioativos. Em sua versão natural seu número de identidade atômica é 133, refletindo sua massa. Já o céσιο-137, que possui 55 prótons e 82 nêutrons, é um isótopo artificial, formado como um subproduto da reação de

fissão nuclear do Urânio. O isótopo radioativo de cézio-137 possui meia-vida aproximada de 30 anos (Leitão e Gomes, 2004).

Radiações ionizantes correspondem a ondas altamente energéticas que, ao interagir com átomos e moléculas do meio, captam elétrons orbitais formando íons e radicais livres que são espécies reativas. As RI, podem ser classificadas em corpusculares (as partículas α , β , prótons, nêutrons, partículas subatômicas, dotadas de carga e massa) ou eletromagnéticas (raios X e γ) [Leitão e Gomes, 2004].

No caso do acidente radioativo de Goiânia, o radionuclídeo de cézio-137 emitia partículas β e raios γ . As partículas β , em virtude de sua pequena massa, apresentam trajetória tortuosa e têm um alcance de até 1,5cm no tecido humano, podendo ser blindadas por folhas de alumínio. Já os raios γ , que provêm do núcleo atômico ou da aniquilação de partículas, são ondas de grande poder de penetração, chegando a atingir até 7,2cm no tecido humano. Raios γ são blindados por materiais densos, como o chumbo, o concreto, o aço, ferro ou uma espessa camada de terra (Goiás, 1988d; Leitão e Gomes, 2004).

A radiação gama ionizante de cézio-137 é freqüentemente usada como fonte radioativa em aparelhos de radioterapia. A maioria dos desastres e acidentes provocados por equipamentos de radiologia relaciona-se com erros humanos e com a desobediência de normas de segurança nacionais e internacionais estabelecidas por instituições reguladoras do uso da radiação (Brasil, 2004; Flores, 2008).

Os efeitos biológicos da exposição à radiação ionizante não dependem do isótopo radioativo que gerou a exposição do indivíduo, mas da dose absorvida

pelos tecidos, da quantidade recebida de radiação e da distribuição espacial da energia transferida ao organismo (Brenner *et al.*, 2003). Dois tipos de efeitos principais da exposição à radiação são: os efeitos determinísticos, associados à morte celular, e os efeitos estocásticos, associados à modificação celular, dentre elas o câncer e outras desordens genéticas (Leitão e Gomes, 2004; Aizawa *et al.*, 2007).

1.3. Genoma Humano

O genoma humano apresenta seqüências codificantes e não codificantes que determinam a fisiologia celular. As seqüências codificantes são transcritas em RNA e traduzidas em proteínas. As seqüências não codificantes compreendem os introns, pseudogenes e seqüências não traduzidas. Embora algumas das seqüências não codificantes tenham significado informacional para a fisiologia da célula, elas não são traduzidas em proteínas. Na sua forma diplóide, o genoma consiste em $6,4 \times 10^9$ pares de bases de DNA, organizadas linearmente em 46 moléculas individuais que compõe os cromossomos (IHGSC, 2001; Watson *et al.*, 2007).

Ainda como componente genômico pode ser observado o DNA extragênico que corresponde a seqüências de cópia única repetitivas, elementos genéticos de transposição (do inglês *Transposons*), DNA espaçador, minissatélites e microssatélites ou STR (do inglês *Short Tandem Repeats*) [Dubrova *et al.*, 2002; Dubrova, 2005; Wu *et al.*, 2006; Flores, 2008].

Embora grande parte do genoma humano (45%) seja ocupado por elementos transponíveis, somente uma pequena porção destes permanece ativo

até hoje (<0,05%), produzindo a diversidade genética entre as populações e também causando doenças devido sua integração no genoma (Mill e Petronis, 2007; Watson *et al.*, 2007).

Atualmente, passado mais de meio século do descobrimento da estrutura do DNA, não resta dúvida de que tais moléculas estão constantemente sob agressão de vários agentes químicos, físicos e biológicos, sejam eles endógenos ou exógenos, gerando lesões na estrutura do DNA (Esnault *et al.*, 2000). Portanto, na era da genômica funcional, muito há que ser elucidado sobre o DNA e seu papel na manutenção da integridade ao mesmo tempo em que representa o substrato sobre o qual a diversidade genética é construída (Watson *et al.*, 2007).

1.4. Retrovírus Endógenos Humanos

Cerca de 10% do genoma humano é composto por seqüências de origem retroviral diferentes entre si, mas agrupadas didaticamente por uma denominação genérica: retrovírus endógenos humanos (do inglês *Human Endogenous RetroVirus* – HERV) [Esnault *et al.*, 2000; Arruda *et al.*, 2008]. Uma característica fundamental do grupo dos retrovírus é a sua capacidade de integrar-se ao DNA da célula hospedeira na forma de pró-vírus, como parte estratégica de seu ciclo de replicação (Barbulescu *et al.*, 1999; Bosch *et al.*, 2004; Andersson *et al.*, 2005).

Ainda que as infecções na linhagem germinativa não sejam eventos freqüentes, acredita-se que os retrovírus endógenos sejam os resultados de infecções no genoma ancestral (Bock e Stoye, 2000). Ao incorporarem-se ao DNA nuclear, alguns retrovírus passaram a ser parte integral e estável do genoma e

que, portanto, passaram a ser transmitidos às gerações subseqüentes (Medstrand e Mager, 1998; Esnault *et al.*, 2000; Bannert e Kurth, 2004).

Ao formar parte do genoma, os HERV se transmitem de modo vertical, com comportamento mendeliano (Deininger e Batzer, 2002). A diversidade de cópias de uma mesma seqüência HERV em diferentes localizações genômicas em um dado organismo pode ser explicada pelo fenômeno de retotransposição (Sugimoto *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2005). Enquanto se transmitem de modo vertical à descendência, as seqüências HERV acumulam mutações, em parte, devido à alta taxa de erro da transcriptase reversa, e a recombinação homóloga entre as seqüências HERV, que também favorece o aparecimento de novas combinações e variação das seqüências existentes (Belgnaoui *et al.*, 2006; Huh *et al.*, 2006).

Os HERV integrados sofreram múltiplos eventos de retrotransposição, com amplificação e transposição, graças à presença de duas repetições terminais longas nas extremidades (do inglês *Long Terminal Region – LTR*) e da transcriptase reversa, de modo que geraram muitas seqüências parciais ou completas, dispersas pelo genoma humano (Eickbush, 2002; Farkash e Prak, 2005; Belgnaoui *et al.*, 2006). Algumas destas seqüências mantêm a estrutura proviral completa e são capazes de formar partículas virais. Muitas delas são defeituosas e perderam a capacidade individual de replicar-se e a maioria são LTR solitárias que perderam todos os genes estruturais, mas mantêm a capacidade regulatória (Bock e Stoye, 2000; Han *et al.*, 2004; Han e Boeke, 2005).

1.4.1. Efeitos genômicos das seqüências HERV

Na espécie humana já foram identificadas 22 famílias de HERV (Farley *et al.*, 2004; Parseval e Heidmann, 2005; Huh *et al.*, 2006). Dentre as quais, podem ser encontradas em genomas de espécies distantes filogeneticamente, ainda que a maioria seja característica de primatas (Martin *et al.*, 2005; Gasior *et al.*, 2006).

Ainda que falte muito do genoma humano funcional para ser conhecido, calcula-se que há centenas de seqüências HERV específicas da espécie humana. Alguns membros são únicos da espécie humana, principalmente a superfamília HERV-K, as LTR solitárias e as seqüências provirais completas (Barbulescu *et al.*, 1999; Stankiewicz e Lupski, 2002b; Gasior *et al.*, 2006). Um repertório único de genes estruturais e elementos regulatórios próprios das seqüências HERV contribuem para explicar diferenças genéticas entre a espécie humana e as espécies próximas (Stankiewicz e Lupski, 2002a; Lupski, 2003; Martin *et al.*, 2005).

A ocorrência de homologia entre as seqüências de DNA HERV facilita a recombinação homóloga entre distintas regiões do genoma (Lupski, 2003). O mecanismo de recombinação é importante para promover reorganizações gênicas e, em alguns casos concretos, duplicações e inversões de si mesmas e de genes que estejam flanqueados pelas repetições de HERV (Medstrand *et al.*, 2005; Arruda *et al.*, 2008). Os eventos de recombinação entre HERV promovem duplicações de segmentos cromossômicos completos, e como outros elementos móveis associados aos genomas, para produzir outras reordenações cromossômicas (Deininger e Batzer, 2002; Eickbush, 2002; Kulpa e Moran, 2006).

Estudos calculam que ao menos 4% dos genes contêm retroelementos inseridos e que são convertidos em exons novos (Morrish *et al.*, 2002;

Stankiewicz e Lupski, 2002a/b; Watson *et al.*, 2007). A integração de HERV produz também diversidade alélica nas populações, como na região do complexo maior de histocompatibilidade (do inglês *Major Histocompatibility Complex – MHC*) [Dawkins *et al.*, 1999].

1.5. Mutação

As mutações podem ser compreendidas como alterações súbitas que ocorrem no material genético. O efeito fenotípico favorável ou desfavorável de uma mutação depende do local do genoma envolvido e do ambiente fisiológico em que foram introduzidas. Ao longo da vida, o DNA pode sofrer mutações naturais, causadas por erros durante a replicação na divisão celular, que não foram corrigidos pelo sistema de reparo (Stankiewicz e Lupski, 2002a; Karmous-Benailly *et al.*, 2006).

Um evento mutacional pode ocorrer em qualquer célula do organismo. Em células somáticas ocorre durante a replicação do DNA que precede uma divisão mitótica (Watson *et al.*, 2007). Todas as células descendentes serão afetadas e, portanto, fixadas nesta população de células, mantendo-se restrita a esta porção do organismo, não sendo transmitidas à descendência. Na linhagem germinativa as mutações ocorrem durante a replicação do DNA que precede a meiose. A mutação fixada nos gametas afeta todas as células que deles descendem, sendo, portanto, transmitida aos descendentes (Kodaira *et al.*, 2004).

As mutações podem ser espontâneas, sendo a frequência de ocorrência dependentes do organismo, ou ainda, induzidas, podendo ser ocasionadas pela exposição do genoma a agentes mutagênicos. A mutagenicidade de um agente

químico, físico ou biológico, pode ser avaliada de acordo com o aumento da frequência de mutações induzidas em relação à frequência de mutações em nível basal (Flores, 2008).

A mutação é responsável pela variabilidade gênica e pela variabilidade genotípica, proporcionando o aparecimento de formas variantes de um gene. Embora a mutação seja a força motriz para a evolução, e de maneira geral, ocorre em sistemas estáveis e bem adaptados, as mutações são observadas como eventos deletérios (da Cruz *et al.*, 2008; Flores, 2008).

1.6. Cromossomo Y

O cromossomo Y é caracterizado citogeneticamente como acrocêntrico pertencente ao grupo G, sendo o terceiro menor cromossomo humano. A maior parte deste cromossomo – 41Mb do total de 63Mb – é composta por seqüências exclusivas, representando cerca de 2% do genoma (Kamp *et al.*, 2000; Quintana-Murci e Fellous, 2001).

Da seqüência total deste cromossomo, 95% estão na região não-recombinante contendo eucromatina e heterocromatina, enquanto que os 5% restantes estão distribuídos nas extremidades correspondentes às regiões pseudoautossômicas (do inglês *Pseudo-Autosomal Regions* – PAR1 com 2,6Mb e PAR2 com 0,34Mb). No cromossomo Y, PAR são responsáveis pelo *crossing-over* entre X–Y durante a meiose (Rozen *et al.*, 2003; Vogt, 2004). Desempenha importante papel durante a espermatogênese, pois são responsáveis pelo correto pareamento, recombinação e segregação entre X–Y. Estudos indicam que

deleções na região PAR podem levar a esterilidade masculina por falhas na divisão meiótica (Kamp *et al.*, 2001).

Os genes pseudo-autossômicos apresentam contrapartes no cromossomo X e codificam uma variedade de proteínas que funcionam em ambos os sexos, participando ou controlando atividades tais como crescimento ósseo, transdução de sinal, síntese de hormônios e receptores (Jobling e Tyler-Smith, 2003). O cromossomo Y é determinante sexual por conter genes específicos para o desenvolvimento testicular atuando sobre a gônada indiferenciada e para a fertilidade masculina, estando envolvido no desenvolvimento e na manutenção das células germinativas do homem (IHGSC, 2001).

A eucromatina possui uma estrutura genética não usual muito rica em seqüências palindrômicas e seqüências duplicadas, que estão próximas de genes preservando a integridade estrutural de conversões gênicas (Kirsch *et al.*, 2004). Cerca de 2% do cromossomo Y são constituídos por seqüências polimórficas, altamente repetitivas e está localizado principalmente na porção heterocromática do braço longo, desde Yq13 até Yqter (Parseval e Heidmann, 2005).

A maior parte deste cromossomo humano consiste em seqüências hipervariáveis que podem ser utilizadas para a caracterização cromossômica sexual. As ligações dos *loci* do Y são interessantes, pois são haplótipos herdados paternalmente em bloco do ancestral masculino (Joblin e Tyler-Smith, 2003). Esta propriedade faz com que o estudo do cromossomo Y se torne muito importante nos casos forenses e na genética populacional por possuir microssatélites e outros polimorfismos (Blanco *et al.*, 2000; Bosch e Jobling, 2003; Rozen *et al.*, 2003).

1.6.1. Genes localizados no cromossomo Y

O cromossomo Y tem atraído grande atenção devido ao seu pequeno tamanho, número limitado de genes, por ser haplóide contendo uma cópia simples do passado evolutivo e um excesso de seqüências repetitivas (Blanco *et al.*, 2000; Jobling e Tyler-Smith, 2003).

O braço curto (Yp) foi dividido nos intervalos de 1 a 4, excluindo a região PAR. A região eucromática do braço longo (Yq) é representadas pelos intervalos 5, 6 e a região PAR pelo intervalo 7 segundo padrões de hibridização obtidos através de 23 fragmentos de restrição Y-específicos com o genoma de 27 indivíduos portadores de alterações estruturais neste cromossomo (Jobling e Tyler-Smith, 2003) [Figura 4].

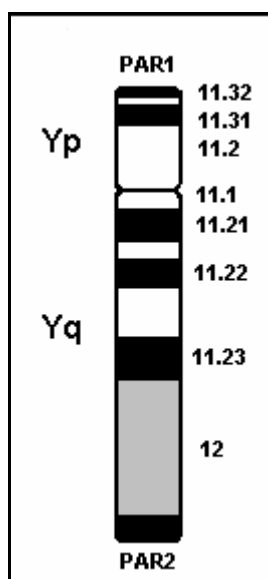


Figura 3. Ideograma do cromossomo Y com esquema das bandas G e locus.

Fonte: modificado de Jobling e Tyler-Smith, 2003.

O gene *SRY* (*Sex determining Region of Y*) é Y-específico e apresenta seqüências conservadas entre os mamíferos codificando um transcrito testículo-específico (Erdal e Barlas, 2000). Está localizado em Yp11.3, possui somente um exon e falta homólogo no X. Mutações nesse gene podem causar falhas no

desenvolvimento testicular, sexo reverso completo ou parcial (Erdal e Barlas, 2000).

A translocação do gene *SRY* com o cromossomo X é uma das causas do sexo reverso, no qual os indivíduos apresentam fenótipo masculino, um cariótipo 46,XX e são positivos para o gene *SRY* (Arnedo *et al.*, 2004). Ocorre uma recombinação perto do limite pseudoautosomal do gene *SRY*, de tal forma que este fica translocado no cromossomo X. Aproximadamente 10% dos homens com cariótipo 46,XX, não apresentam *SRY* detectável. A maioria com genitália externa ambígua, embora um fenótipo masculino completo possa ser observado (Arnedo *et al.*, 2004).

Ainda em Yp encontra-se o gene *ZFY* (*Zinc Finger protein Y*) que codifica uma proteína dedo de zinco e, próximo ao centrômero está o gene *AMELY-Like* (Yp11.2) que codifica a proteína amelogenina envolvida na formação do esmalte dentário, ambos com homólogos no X (Arnedo *et al.*, 2004).

No braço longo do cromossomo Y, há uma região chamada de fator de azoospermia (do inglês *Azoospermia Factor* – *AZF*). A região *AZF* (Yq11) possui genes envolvidos na regulação da espermatogênese. Foi descrita primeiramente em estudos citogenéticos realizados por Tiepolo e Zuffardi (1976), que identificaram homens inférteis com deleções submicroscópicas e que possuíam pais com um Y normal, caracterizando como mutações “*de novo*”.

A região *AZF* original foi subdividida em três regiões não-sobrepostas denominadas *AZFa*, *AZFb* e *AZFc* com tamanho estimado de 1Mb, 1.5Mb e 3Mb respectivamente (Foresta *et al.*, 2000) e uma quarta região *AZFd* foi também sugerida (Vogt, 2004).

Na região *AZFa* estão os genes *USP9Y* (*Ubiquitin-specific protease 9 Y*, também conhecido como *DFFRY Drosophila fat facets related Y*) e o *DBY* (*Dead-box Y RNA helicase*), que possuem homólogos no cromossomo X. Quando deletados levam ao fenótipo da síndrome de células únicas de Sertoli mostrando envolvimento na espermatogênese e provável efeito sinérgico (Vogt, 2005). Também nessa região está o gene *UTY* (*Ubiquitously Transcribed TPR gene on Y chromosome*).

Em *AZFa* encontra-se duas seqüências de retrovírus endógenos humanos (HERV) de ≈ 10 kb que flanqueiam 780kb desta região, sendo que o HERV distal possui um fragmento L1 inserido com $\approx 1,5$ kb (Kamp *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2000; Kamp *et al.*, 2001; Bosch e Jobling, 2003; Arruda *et al.*, 2008).

As microdeleções em *AZFa* são causadas por recombinações não-alélicas entre duas seqüências de HERV (Ditton *et al.*, 2004). Também contribuem com a aparição de duplicações de segmentos cromossômicos completos que se observa no genoma humano e como outros elementos móveis, podem produzir reordenação genômica (Han *et al.*, 2004; Parseval e Heidmann, 2005; Huh *et al.*, 2006).

Na região *AZFb* está localizado o gene *RBM1A1* (*RNA-Binding Motif*) expresso em espermatogônia e espermatócito (Vogt, 2004). Os genes *CDY* (*Chromodomain Y*) e *XKRY* (*X Kell blood-related Y*) são expressos especificamente em tecido testicular adulto e estão deletados em homens inférteis (Vogt, 2005).

AZFc possui a família do gene *DAZ* (*Deleted in Azoospermia*), que codifica uma proteína específica do testículo e está presente em seis a nove cópias na região *AZFc* (Vogt, 2004). É encontrado apenas no cromossomo Y em humanos,

macacos do velho mundo e chimpanzés, em todos os outros mamíferos estão localizados apenas em cromossomos autossômicos (Vogt, 2005).

O homólogo autossomal *DAZL1* (*DAZ like-autosomal 1*) está localizado no cromossomo 3p24 e é expresso somente em tecido testicular codificando proteínas ligantes a RNA (Foresta *et al.*, 2000). *DAZL1* tem 83% de similaridade na região codificante do cDNA. Acredita-se que o gene *DAZ* tenha aparecido há 40 milhões de anos durante a evolução proveniente da translocação e subsequente amplificação do gene ancestral autossomal.

O gene *DAZ* está ausente em 10% a 15% de homens cromossomicamente normais com azoospermia não-obstrutiva e oligozoospermia severa (Pina-Neto *et al.*, 2006). Muitos dos genes presentes na região *AZF* são expressos apenas nos testículos (Sãopedro *et al.*, 2003).

Quando comparadas com outras causas de infertilidade, as microdeleções do cromossomo Y são relativamente comuns (7% a 10%), e sua frequência aumenta com o grau de comprometimento da espermatogênese (Carrara *et al.*, 2004; Arruda *et al.*, 2007).

Esta forma de infertilidade masculina pode ser classificada como uma desordem genética, na qual a lesão surge por causa de características estruturais do genoma (Stankiewicz e Lupski, 2002b).

Apesar de ainda não existir uma definição entre o tipo de microdeleção e a gravidade do defeito espermatogênico, as microdeleções *AZFa* condicionam a síndrome de células de únicas de Sertoli, em *AZFb* provocam parada na meiose I da espermatogênese e em *AZFc* levam a hipoespermatogênese (Arruda *et al.*, 2007).

2. JUSTIFICATIVA

A radiação ionizante é uma forma de estresse genotóxico que pode resultar em danos ao material genético, em razão do efeito mutagênico da deposição direta da energia radioativa sobre o DNA, ou devido à ionização das moléculas de água e outras biomoléculas do meio celular, produzindo quebras na dupla-fita (da Cruz *et al.*, 1996, 1997a/b, 2008; Sankaranarayanan, 2006).

O biomonitoramento genético-retrospectivo é realizado frequentemente nos indivíduos expostos assim como na prole. Desta forma, a população exposta à radiação ionizante do césio-137 deve ser avaliada para conhecimento da extensão dos danos genéticos causados pela exposição, contribuindo para a prevenção e diagnóstico de patologias que poderão surgir em decorrência da exposição.

Durante os últimos anos, a equipe do Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular (LaGene) tem realizado o acompanhamento da saúde genética com o biomonitoramento dos indivíduos, e esse estudo é de suma importância para o acompanhamento dos radioacidentados.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Analisar a ocorrência de mutações no cromossomo Y da prole nascida de indivíduos expostos à radiação ionizante de césio-137.

3.2. Objetivos específicos

- Analisar a ocorrência de mutações em marcadores nas regiões Yp e Yq nos indivíduos do grupo acidentalmente e ocupacionalmente exposto à radiação ionizante de césio-137 e na prole;
- Contribuir para o acompanhamento a longo prazo da saúde genética dos radioacidentados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Grupo de estudo

O presente estudo foi aprovado pela *Comissão Nacional de Ética em Pesquisa* (CONEP) com seres humanos. Todos os indivíduos concordaram voluntariamente em participar do estudo e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 01).

O grupo de estudo foi subdividido em:

1) Grupo A composto por 8 homens expostos acidentalmente à radiação ionizante e 8 meninos representando a geração F1. A exposição parental foi classificada como exposição de corpo inteiro com doses absorvidas variando entre 150,3 e ≥ 20 rad; classificados de acordo com os grupos estabelecidos pela SULEIDE (grupo I e II).

2) Grupo B composto por 12 homens expostos ocupacionalmente por atuarem nas ações de defesa civil durante o acidente e 16 meninos representando a geração F1. Foram classificados de acordo com os grupos estabelecidos pela SULEIDE (grupo III), com dosimetria estimada em < 20 rad.

Os dados gerais dos indivíduos que compõem o grupo amostral do presente estudo estão descritos no Anexo 02.

O grupo controle foi composto por 09 famílias contendo pai e filho (18 indivíduos), sem história de exposição à radiação ionizante.

Todos os genomas apresentaram um vínculo genético de pelo menos 99,999% de probabilidade acumulada de paternidade comprovados por teste de paternidade realizados pelo Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular (LaGene) e Núcleo de Pesquisas Replicon.

4.2. Amostra biológica

Foram coletados 10mL de sangue periférico, por venipunção em tubos heparinizados, dos indivíduos expostos, bem como dos filhos.

4.3. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada seguindo-se as instruções do fabricante do kit comercial *Illustra Blood Genomic DNA*[®] (GE HealthCare, EUA). As amostras extraídas foram rotuladas e armazenadas a -20°C para utilização posterior nas reações de PCR. A concentração de DNA existente em cada amostra foi quantificada por análise visual em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio a 5µg/mL e comparada com o marcador de peso molecular *Low DNA Mass*[®] (Invitrogen, EUA).

4.4. Reação em cadeia da polimerase

Foram analisados 3 *loci* em Yp, 13 *loci* na região AZFa, 6 *loci* em AZFb, 6 *loci* em AFZc e mais 2 *loci* na região AZFb+c descritos na tabela 2, totalizando 30 marcadores distribuídos ao longo do cromossomo Y. As reações foram padronizadas para cada *locus* e encontram-se descritas no Anexo 03. O material amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2% em solução tampão Tris-borato de EDTA (TBE) a 1x e um campo elétrico uniforme de 8 V/cm por 2 horas. Após a corrida eletroforética, os géis foram corados em solução de brometo de etídio a 5µg/mL por 20 minutos. O registro visual da imagem do gel foi feito com o auxílio de um sistema de vídeo-documentação (*Image Master VDS*[®] - Amersham Pharmacia Biotech, EUA). As reações de genotipagem dos 30 *loci* foram realizadas em duplicata e nos casos suspeitos de mutação foi repetida para

confirmação. Como controle interno para a reação, foi utilizado DNA genômico de um homem não exposto à radiação ionizante de césio-137 e com todos os *loci* analisados normais.

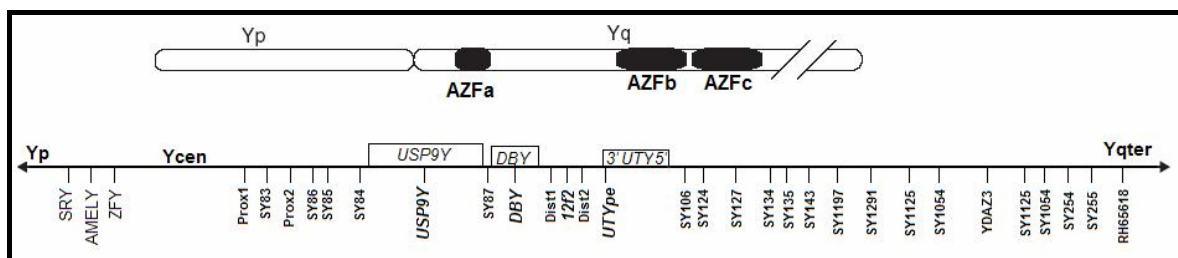


Figura 4. Desenho esquemático do cromossomo Y com os marcadores analisados.

Fonte: modificado de Kamp *et al.*, 2001.

4.5. Análise das mutações

Para analisar possíveis mutações germinativas, o perfil alélico observado foi comparado entre pai e filho. Os marcadores analisados foram considerados normais quando o registro visual do gel apresentou apenas uma banda. A ausência ou a duplicação da banda referente ao marcador analisado foi considerada como mutação (Figura 5). Uma variante no filho que não foi observada no pai biológico foi considerada como uma mutação germinativa *de novo*.

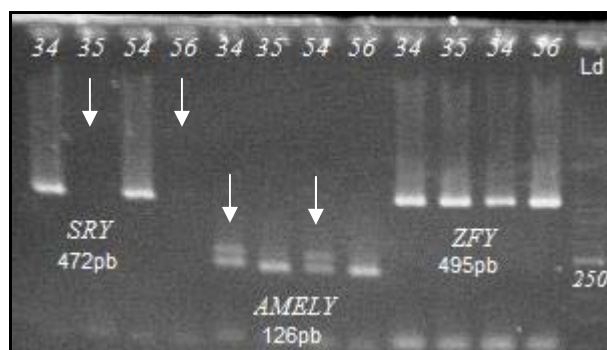


Figura 5. Registro visual do gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio. As setas indicam as mutações encontradas em Yp: deleção no gene *SRY*, duplicação no gene *AMELY* e o gene *ZFY* normal.

Pais: 34, 54. Filhos: 35, 56. Ld: Marcador de peso molecular de 50pb.

A partir das mutações observadas nos pais expostos foi realizado o cálculo da taxa de mutação para cada *locus* analisado a partir da razão entre o número de mutações encontradas e o número total de alelos analisados.

Para as análises estatísticas foi utilizado o software BioEstat[®] 5.0 (2008, Sociedade Civil Mimirauá/MCT – CNPq) disponível gratuitamente na internet. As análises estatísticas foram elaboradas utilizando-se um intervalo de confiança de 95% ($\alpha = 5\%$; valor significativo de $P \leq 0,05$).

5. RESULTADOS

No Grupo A, todos os filhos nasceram após o acidente radioativo. Já no Grupo B os filhos N°. 43 e 69 nasceram antes do acidente, considerados como controle endógeno, e os 14 demais nasceram após o acidente.

Dos 30 *loci* analisados no cromossomo Y, 24 apresentaram mutações. Do total de 44 indivíduos analisados no grupo de estudo, 18 apresentaram mutações (40,9%). No Grupo A, 4 pais apresentaram 6 mutações e 8 filhos apresentaram 15 mutações no total. No Grupo B, 3 pais apresentaram 5 mutações e 3 filhos apresentaram 45 mutações no total (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência de mutações nos indivíduos de cada grupo analisado.

		Indivíduos com mutação	Indivíduos sem mutação	N°. total de mutações	P
Grupo A	Pais	4	4	6	0,07
	Filhos	8	0	15	
Grupo B	Pais	3	9	5	1,0
	Filhos	3	13	45	
Grupo Controle	Pais	0	9	0	1,0
	Filhos	1	8	1	

P= valores calculados pelo Teste Exato de Fisher

O Grupo A apresentou além das mutações já descritas em Arruda *et al.*, 2008 (Anexo 04), deleção do marcador 12f2 no filho N°. 943 e do SY135 no filho N°. 965.

O Grupo B apresentou um número maior de mutações. Os filhos N°. 43/69 do Grupo B, nascidos antes do acidente, não apresentaram nenhuma mutação assim como os respectivos pais e irmãos. Os pais de N°. 34/54/58 apresentaram mutações. Os pais N°. 34/54 apresentaram o gene *AMELY* e a região *AZFa-prox2*

duplicadas, porém com amplificação normal nos respectivos filhos (N°. 35/56). O pai N°. 58 apresentou uma deleção do marcador 12f2 e seu filho N°. 62 apresentou a mesma mutação.

Os filhos N°. 35/56 do Grupo B, nascidos após o acidente, apresentaram 22 mutações cada um. Os genes *SRY* e *USP9Y*, e os marcadores SY86, SY85, SY84, SY87, AZFa-dist1, 12f2, SY127, SY134, SY135, SY1125, YDAZ3, SY254 e SY255 foram deletados. Já as regiões AZFa-prox1, SY106, SY124, SY143, SY1054, RH65618 e o gene *UTYpe* foram duplicadas. Entretanto, as mesmas mutações não foram detectadas nos respectivos pais.

No grupo controle somente um filho apresentou uma deleção no marcador SY84, não observada no respectivo pai.

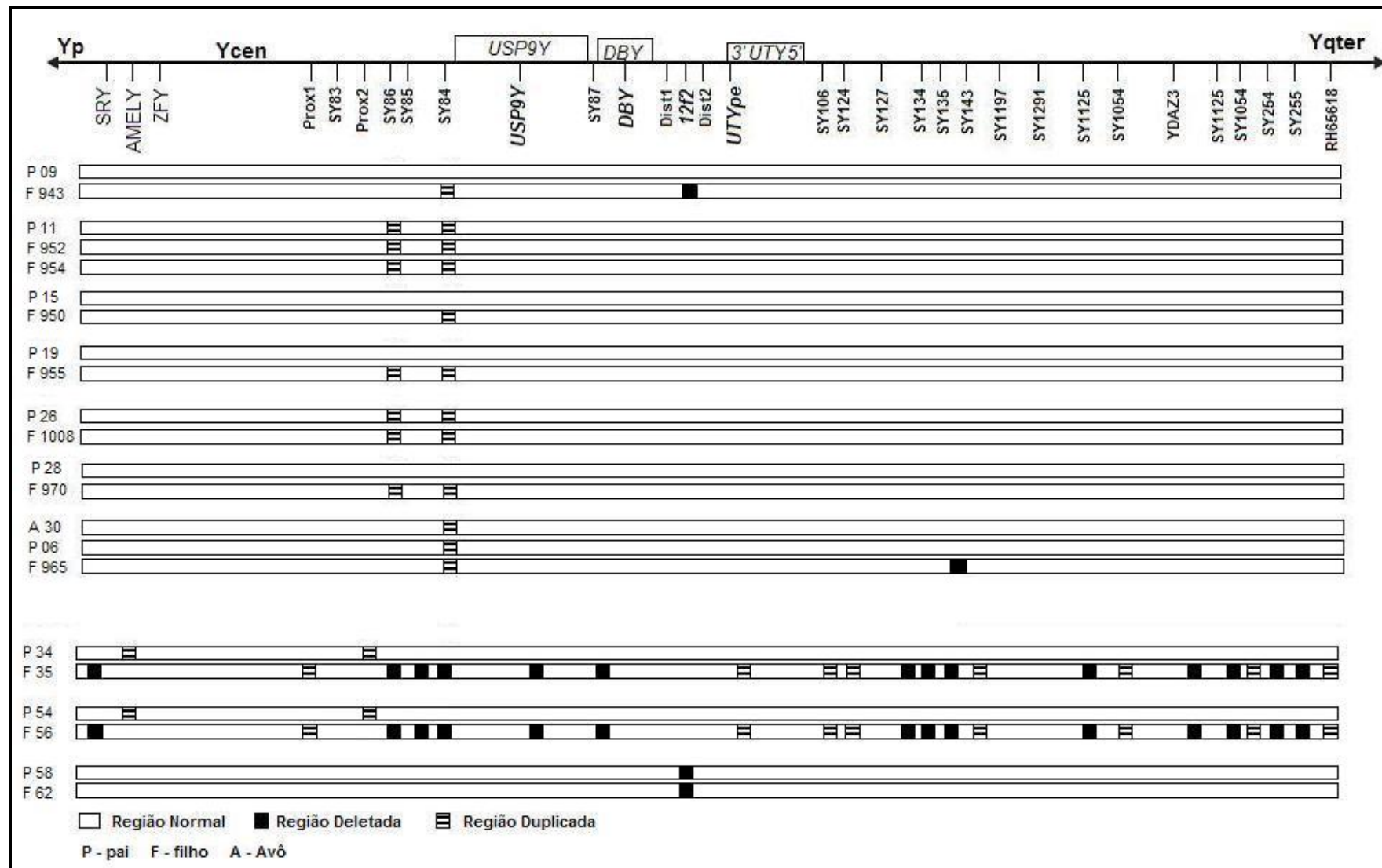


Figura 6. Mutações encontradas no cromossomo Y dos indivíduos analisados nos grupos analisados.

A taxa de mutação total foi de 0,11 levando em conta o número total de mutações encontradas. Na análise isolada do Grupo A, a taxa de mutação foi de 0,08 e no Grupo B foi 0,13 (Tabela 2).

Tabela 2. Taxa de mutação para cada *locus* analisado em cada grupo.

Locus	Nº. de Mutações por grupo		Taxa de Mutação por grupo		Taxa de Mutação por Marcador
	A	B	A	B	
SRY	0	2	0	0,005	0,003
ZFY	0	0	0	0	0
AMELY	0	2	0	0,005	0,003
AZFa-prox1	0	2	0	0,005	0,003
SY83	0	0	0	0	0
AZFa-prox2	0	2	0	0,005	0,003
SY86	7	2	0,02	0,005	0,015
SY85	0	2	0	0,005	0,003
SY84	12	2	0,05	0,005	0,023
USP9Y	0	2	0	0,005	0,003
SY87	0	2	0	0,005	0,003
DBY	0	0	0	0	0
AZFa-dist1	0	2	0	0,005	0,003
12f2	1	4	0,004	0,01	0,008
AZFa-dist2	0	0	0	0	0
UTYpe	0	2	0	0,005	0,003
SY106	0	2	0	0,005	0,003
SY124	0	2	0	0,005	0,003
SY127	0	2	0	0,005	0,003
SY134	0	2	0	0,005	0,003
SY135	1	2	0,004	0,005	0,005
SY143	0	2	0	0,005	0,003
SY1197	0	0	0	0	0
SY1291	0	0	0	0	0
SY1125	0	2	0	0,005	0,003
SY1054	0	2	0	0,005	0,003
YDAZ3	0	2	0	0,005	0,003
SY254	0	2	0	0,005	0,003
SY255	0	2	0	0,005	0,003
RH65618	0	2	0	0,005	0,003
TOTAL	21	50	0,08	0,13	0,11

O teste de regressão linear simples mostrou que a taxa de mutação aumenta conforme a idade dos pais ($P= 0,7$; $F= 0,11$). A dose de radiação absorvida pelos pais também aumenta a taxa de mutação ($P= 0,7$; $F= 0,10$) apesar de não apresentar significância estatística (Figuras 7 e 8).

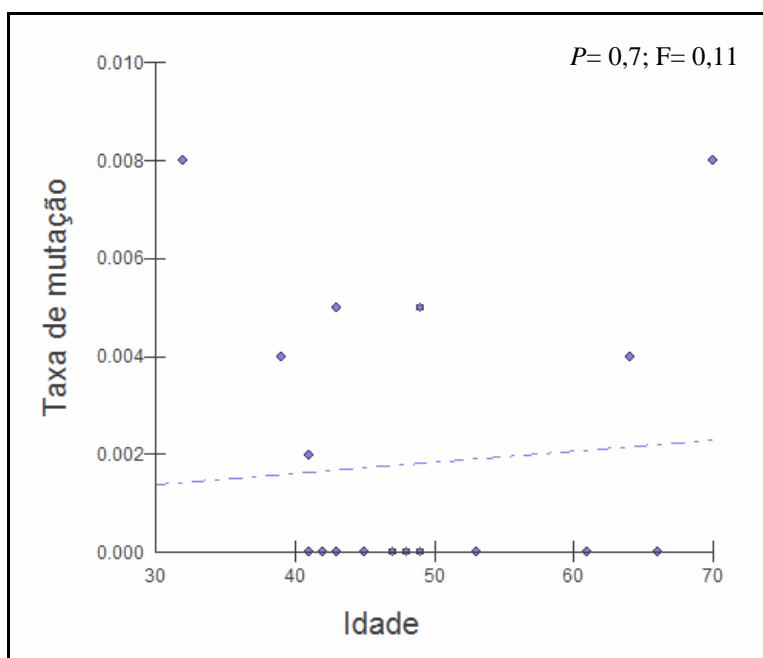


Figura 7. Diagrama de dispersão mostrando que a taxa de mutação aumenta conforme a idade dos pais.

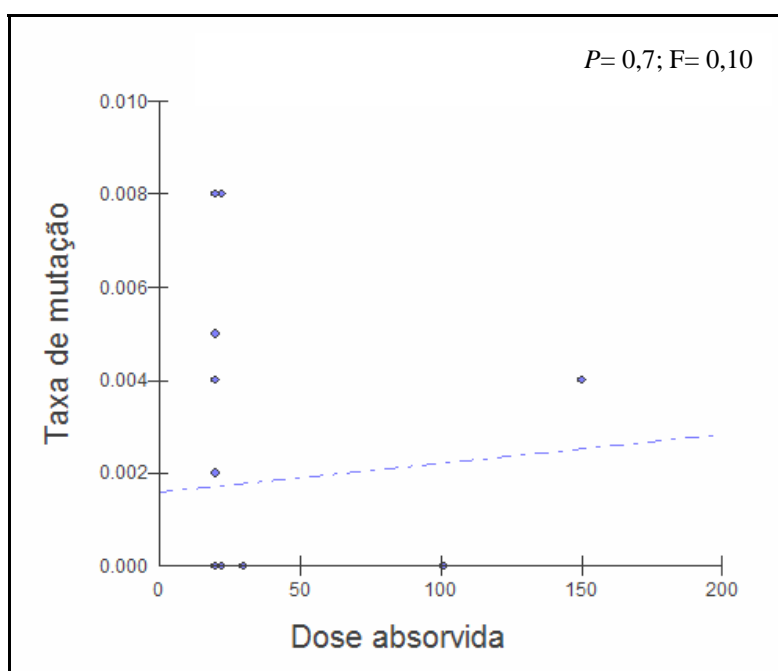


Figura 8. Diagrama de dispersão mostrando que a taxa de mutações aumenta conforme a dose absorvida de radiação ionizante.

6. DISCUSSÃO

Com exceção dos estudos, envolvendo a segunda geração dos sobreviventes da bomba atômica de Hiroshima e Nagasaki (Kodaira *et al.*, 2004), do acidente em Chernobyl (Mikhalevich *et al.*, 2000; Weinberg *et al.*, 2001; Dubrova *et al.*, 2002; Dubrova e Plumb, 2002; Dubrova, 2003; Dubrova *et al.*, 2006) e estudos com indivíduos expostos ao céσιο-137 em Goiânia (da Cruz *et al.*, 1996, 1997a/b; da Silva, 2000; Arruda *et al.*, 2008; da Cruz *et al.* 2008; Flores, 2008); a maioria das informações sobre mutações induzidas por radiação tem sido obtida por experimentos com animais, em sua maioria usando camundongos (Barber *et al.* 2002; Dubrova, 2005; Martin *et al.*, 2005).

Entretanto, é necessário avaliar os efeitos biológicos da radiação ionizante, em células somáticas e germinativas, para estimar e estabelecer os riscos genéticos, principalmente em populações expostas, visto que o DNA representa o alvo biológico mais sensível dentro da célula.

O cromossomo Y proporciona uma oportunidade para estudar as mutações no genoma devido sua herança patrilinear. Este cromossomo haplóide não se recombina durante a meiose, sendo modificado apenas por mutações, o que facilita o estudo de rearranjos genômicos ou a conversão gênica intracromossomoal que representam uma forma de recombinação exclusiva deste cromossomo (Bosch e Jobling, 2003; Rozen *et al.*, 2003).

O Y tem sido o cromossomo preferido de diferentes tipos de HERV devido aos poucos genes codificantes de proteínas, grande quantidade de seqüências repetitivas e a ausência de recombinação, possuindo muitos retrovírus jovens da classe II (HERV-K) e poucos retrovírus antigos da classe III (HERV-L) quando

comparado a outros cromossomos (Skaletsky *et al.*, 2003; Andersson *et al.*, 2005; Parseval e Heidmann, 2005; Barber e Dubrova, 2006).

O presente estudo foi dividido em dois momentos distintos: primeiro a análise de 6 marcadores em Yq (SY86, SY84, SY127, SY134, SY254 e SY255) dos indivíduos que compõe o Grupo A; e o segundo momento em que os indivíduos do Grupo B foram incluídos na análise que foi ampliada para mais 24 marcadores além dos 6 já analisados.

No primeiro trabalho publicado sobre as análises do cromossomo Y de indivíduos expostos (Arruda *et al.*, 2008; Anexo 04), os indivíduos do Grupo A (exposição acidental) apresentaram a região *AZFa* duplicada (*loci* SY86 e SY84), sugerindo uma possível relação entre a radiação ionizante e a estrutura da dupla-fita dos pais gerando quebras que potencializaram o rearranjo entre as seqüências de HERV presentes na região do cromossomo Y.

Estudos indicam que exposições entre 2 a 4Gy de radiação ionizante aumentam o percentual de malignização das células e as quebras na dupla-fita são proporcionais à dose radioativa absorvida (Dubrova, 2003; Gasior *et al.*, 2006; Farkash e Prak, 2005; Farkash *et al.*, 2006). Durante o reparo da quebra por recombinação entre seqüências parálogas, podem ser gerados vários produtos genômicos incluindo rearranjos ou a reposição de uma seqüência por uma homóloga (conversão gênica) [Eichler, 2001; Eickbush, 2002; Lupski, 2003].

É possível que a radiação recebida acidentalmente pelos pais tenha atuado no processo da retrotransposição da seqüência L1 presente no HERV distal, gerando a duplicação da região *AZFa* tanto nos pais quanto nos filhos (Sankaranarayanan, 2006). O DNA danificado serve de substrato perfeito para a inserção de L1 e estudos feitos com células submetidas à radiação gama,

mostram que ocorre uma alteração no ambiente celular tornando favorável a retrotransposição de L1 aumentando as chances de gerar assim a duplicação numa via dependente de endonucleases (Morrish *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2005; Belgnaoui *et al.*, 2006; Farkash *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006).

Mutações *missense* na seqüência L1 causam uma inativação funcional com retrotransposição indicando que a exposição à radiação ionizante pode facilitar os mecanismos de retrotransposição de L1, já que ativa as endonucleases que fazem uma falha (do inglês *nick*) na dupla-fita e a transcriptase reversa usa esse *nick* para iniciar a transcrição na extremidade 3' (Esnault *et al.*, 2000; Bannert e Kurth, 2004; Medstrand *et al.*, 2005).

As duplicações podem ser mediadas por recombinação homóloga não-alélica entre os HERV que flanqueiam essa região e essa troca ocorre dentro do bloco entre a seqüência proximal e distal onde concentram os *hotspots* com alta taxa de recombinação (Kamp *et al.*, 2001; Lupski, 2003; Hurles *et al.*, 2004).

Essas duplicações podem persistir por várias gerações e as mutações podem se acumular diferenciando o alelo em uma cópia na região, manifestado como um duplo alelo nestes *loci* em particular (Bosch *et al.*, 2004). Esse fato foi verificado, já que alguns filhos apresentaram a mesma duplicação que seus respectivos pais (Arruda *et al.*, 2008). Porém, ainda não se conhece o efeito patogênico dessas duplicações, embora estudos mostrem relação entre doenças genéticas e duplicações (Stankiewicz e Lupski, 2002a).

Prováveis eventos independentes da duplicação ocorreram nos limites da região onde estão as seqüências do HERV que compõe estes *loci*, mostrando que a diversidade entre as cópias duplicadas da região *AZFa* são compatíveis com a fertilidade masculina (Bosch e Jobling, 2003), visto que os pais geraram filhos.

A questão sobre a fertilidade dos indivíduos analisados ser normal ainda permanece em aberto e as correlações entre fenótipo-genótipo devem ser cuidadosas. A deleção completa ou parcial da região *AZFa* causa a infertilidade masculina manifestada com a ausência células germinativas (Ditton *et al.*, 2004; Krausz *et al.*, 2006), levantando a pergunta de como o fenótipo da duplicação em *AZFa* será nas futuras gerações.

Dessa forma, como a fertilidade dos indivíduos expostos é, até o momento, normal e a fertilidade dos filhos ainda não foi analisada, sugeri-se uma possível associação entre a exposição paterna à radiação ionizante e os mecanismos de duplicação gerados por rearranjos cromossômicos.

No segundo momento, os indivíduos do Grupo A (exposição acidental) foram avaliados juntamente com os indivíduos do Grupo B (exposição ocupacional) para um número maior de *loci* no cromossomo Y.

No Grupo A, o filho N°. 943 apresentou uma deleção no *locus* 12f2. Neste *locus* (também chamado de *DYS11*) existe um polimorfismo que pode ser detectado pelas enzimas de restrição *EcoRI* (gerando dois fragmentos de 5.2 e 3.2kb, respectivamente) e *TaqI* (10 e 8kb). Este polimorfismo compreende três categorias de mutações: deleções grandes ou pequenas, e as duplicações e é pouco variável (Kamp *et al.*, 2000). Outra mutação encontrada foi no filho N°. 965 no *locus* SY135 da região *AZFb*.

Já entre os indivíduos do Grupo B, três pais e seus respectivos filhos apresentaram mutações (N°. 34/35, 54/56 e 58/62). Os pais N°. 34 e 54 apresentaram uma duplicação do gene *AMELY* sugerindo uma cópia extra desse gene (Murphy *et al.*, 2007). Deleções em *AMELY* tem sido relatada em homens saudáveis (Lattanzi *et al.*, 2005), mas podem afetar o desenvolvimento dental e

essas deleções são mais freqüentes em certas etnias refletindo um ancestral comum do cromossomo Y. Essa duplicação pode interferir na interpretação de análises de cromossomos sexuais, podendo sugerir um falso cariótipo XYY que deve ser confirmado por citogenética.

Outra duplicação foi observada no *locus* AZFa-prox2 já na porção Yq, nos mesmos pais, considerada como um evento aleatório sem associação com o HERV ou com recombinação. Já o pai N°. 58 e seu filho N°. 62 apresentaram o *locus* 12f2 deletado indicando que houve uma recombinação na seqüência Id2 contida no HERV distal resultando em deleção parcial da região AZFa.

Os filhos N°. 35 e 56 apresentaram várias mutações. Em Yp o gene *SRY* foi deletado, mas os meninos apresentam fenótipo masculino. Estudos indicam que é possível haver masculinização em homens com cariótipo 46,XX (Erdal e Barlas, 2000). Já a duplicação do gene *AMELY* encontrada nos respectivos pais, não foi observada nos filhos.

Na região AZFa esses meninos apresentaram dois *loci* duplicados e sete deletados (Tabela 4). A maioria dos *hotspots* dentro das duas seqüências de HERV medeiam deleções em AZFa e as duplicações são geradas como produtos de deleções recíprocas (Bosch *et al.*, 2004).

Estima-se que 0,17% dos homens apresentam a região AZFa duplicada, mas estas duplicações podem agir como intermediários para re-deleções estruturais que parece ser produto de conversão gênica ou duplo *cross-over* entre HERV e tal complexidade necessita ser analisada em repetições parálogas diretas (Bosch *et al.*, 2004; Kirsch *et al.*, 2004).

Os *loci* duplicados AZFa-prox1 e o gene *UTY* podem ter sofrido a influência da radiação ionizante nas células germinativas paternas facilitando a

recombinação encontrada no DNA genômico dos filhos. No gene *UTY* a seqüência analisada corresponde a região 3' UTR (do inglês *untranslated region*) com leitura invertida em sentido ao centrômero e, nesse caso, houve um evento aleatório a recombinação.

Os *loci* SY86, SY85, SY84, o gene *USP9Y*, SY87, AZFa-dist1 e 12f2 foram deletados em AZFa nos filhos N°. 35 e 56. A seqüência do *locus* SY83 está contida na região Id1 do HERV proximal, assim como o *locus* 12f2 está contido em Id2 do HERV distal. Esses marcadores utilizados foram desenvolvidos por Kamp *et al.* (2001) para detectar os eventos de recombinação entre as seqüências de HERV em AZFa. Quando o *locus* SY83 está deletado, ocorreu um evento de recombinação entre Id1 dos HERV proximal e distal, e quando o *locus* 12f2 é deletado ocorre à recombinação entre Id2 de ambos HERV. Quando ambos *loci* estão presentes, é identificada a deleção parcial em AZFa e quando ambos foram deletados a região AZFa foi completamente deletada.

A presença de AZFa-prox1 e AZFa-dist2 juntamente com a ausência de AZFa-prox2 e AZFa-dist1 confirmam a deleção completa da região AZFa. Não foi identificada nenhuma deleção total de AZFa nem a deleção parcial nos indivíduos analisados.

O gene *USP9Y* quando deletado resulta no fenótipo de hipoespermatogênese. A produção de espermatozóides ainda não foi analisada (filhos de N°. 35 com 13 anos e N°. 56 com 17 anos). O gene *DBY* (renomeado como *DDX3Y – Dead (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, Y-linked*) não apresentou mutação e isso pode manter a formação de células germinativas, segundo alguns estudos (Foresta *et al.*, 2000; Ditton *et al.*, 2004). Quando os dois

genes estão ausentes pode ser identificada a Síndrome de Células Únicas de Sertoli (do inglês *Sertoli Cell Only – SCO*) [Kamp *et al.*, 2000, 2001].

Todos os *loci* da região *AZFb* e *AZFc* apresentaram mutação nos filhos N°. 35 e 56 do Gruppo B. A região *Yq* pode estar completamente deletada, mas o cariótipo pode parecer normal (46,XY). É necessário analisar marcadores na porção heterocromática de *Yq* para confirmar essa hipótese (STS SY160) [Kamp *et al.*, 2001].

O estudo do *Y* possibilita a detecção dos mecanismos moleculares que atuam sobre os *hotspots* desta região e que são os prováveis responsáveis pela ocorrência dos rearranjos (Kamp *et al.*, 2001; Hurles *et al.*, 2004; Han e Boeke, 2005) e é provável que os cromossomos com duplicação se tornem alvos da seleção natural (Rozen *et al.*, 2003).

Um fato relevante é o grande número de divisões celulares que ocorrem durante a espermatogênese e, portanto, a replicação do DNA que aumenta as chances de mutações, que podem ser intra-alélicas, facilitada pela estrutura secundária das repetições como mecanismo responsável, ou podem surgir de trocas desiguais entre cromátides irmãs (Jobling e Tyler-Smith, 2003; Gasior *et al.*, 2006).

O “deslizamento ou escorregão” da enzima DNA-polimerase (do inglês *Polymerase Slippage*) é considerado como um mecanismo originador de mutações em microssatélites bem como de artefatos durante a PCR, que contém uma repetição a menos que o alelo principal, conhecidos como “bandas de repetição” (do inglês *sutter*) [Krausz *et al.*, 2006].

O deslizamento da polimerase ocorre quando a enzima se dissocia do DNA durante uma pausa na replicação e o filamento em síntese se separa do filamento

molde e volta a parear com outra repetição para frente ou para trás da posição correta (erro de pareamento). Este tipo de pareamento é uma propriedade intrínseca de seqüências microssatélites e ocorre frequentemente sendo o mecanismo responsável pela grande variabilidade dos *loci* (Flores, 2008), sendo que quando as alterações ocorrem em células germinativas são transferidas aos descendentes (Rodvalho *et al.*, 2008).

Os rearranjos genômicos são igualmente prováveis de ocorrer durante a meiose e as duplicações em *AZFa* suportam também a idéia de que os homens que as carregam podem ser férteis e gerar crianças igualmente portadoras da duplicação (Stankiewicz e Lupski, 2002a/b; Arruda *et al.*, 2008).

Se o mesmo rearranjo for encontrado no genitor normal, mais rearranjos podem ocorrer na meiose, por exemplo, pelo “*crossing-over*” desigual (Kamp *et al.*, 2000, 2001). O “*crossing-over*” desigual entre cromossomos homólogos na meiose ocorre tanto na oogênese quanto na espermatogênese. No entanto, para as deleções que são o resultado de uma troca desigual entre cromátides irmãs, a maioria (cerca de 64%) ocorre no cromossomo paterno e o cromossomo Y é herança patrilinear.

No recente estudo realizado por da Cruz *et al.* (2008) encontraram 10 mutações de origem paterna quando analisaram 12 *loci* STR autossômicos no grupo exposto acidentalmente ao césio-137 (Grupo A), no qual pais e mães foram expostos; e Flores (2008) encontrou 09 mutações de origem paterna em 12 *loci* STR autossômicos analisados no grupo ocupacionalmente exposto durante o acidente radioativo (Grupo B), no qual somente os pais trabalharam nas ações de socorro e as mães não foram expostas à radiação. O aumento da taxa de

mutação nos dois grupos (0,02) estaria relacionado à exposição à radiação gama ionizante do céσιο-137.

As análises moleculares do cromossomo Y no presente estudo, foram realizadas com DNA genômico isolado de sangue periférico. Entretanto, utilizando DNA isolado das células germinativas dos pais, pode ser possível encontrar as mesmas mutações observadas no DNA genômico dos filhos.

A maioria das mutações foi observada em dois filhos (N°. 35 e 56) do grupo de trabalhadores da defesa civil que atuou na assistência à população, na descontaminação dos locais e na escolta e guarda dos rejeitos do acidente radioativo com o céσιο-137. Esses trabalhadores foram reconhecidos como ocupacionalmente expostos à radiação ionizante e esse grupo possui, entre outros profissionais, bombeiros e policiais militares que atuaram nas diversas atividades durante e após a deflagração do acidente (Goiás, 2002; Flores, 2008).

O envelhecimento natural desta população somado a exposição à radiação, aumenta a preocupação e os cuidados no que se refere à prevenção do câncer, o diagnóstico precoce, mas também o acompanhamento das futuras gerações. Há também o agravante de que muitos destes pacientes são portadores de hábitos prejudiciais á saúde (Goiás, 1990; Wascheck, 2002).

Desta forma, a população exposta à radiação gama ionizante do céσιο-137, oferece uma oportunidade para se compreender os efeitos biológicos da radiação. O conhecimento da extensão dos danos genéticos causados pela exposição permitirá uma avaliação direta do risco aos descendentes, além de contribuir para prevenção e provável diagnóstico de patologias que poderão surgir em decorrência à exposição parental.

7. CONCLUSÃO

No Grupo A (exposição acidental), 12 indivíduos apresentaram mutações, sendo 2 deleções e 19 duplicações. Em 4 filhos, detectou-se a duplicação, porém, a mesma não foi detectada nos respectivos pais.

Indivíduos do Grupo B (exposição ocupacional), três pais e seus respectivos filhos apresentaram mutações. Dois pais apresentaram duas duplicações não detectadas nos respectivos filhos. Um pai e seu filho apresentaram uma deleção cada. Dois filhos apresentaram 22 mutações, sendo que foram 7 duplicações e 15 deleções, não detectadas nos respectivos pais.

A taxa de mutação no Grupo A foi de 0,08 e no Grupo B 0,13.

O Grupo A apresentou mais indivíduos com poucas mutações. Entretanto o Grupo B apresentou poucos indivíduos, mas dois com muitas mutações.

A exposição à radiação ionizante de césio-137 possivelmente susceptibilizou a ocorrência de mutações, gerando quebras no DNA que potencializaram o rearranjo entre as seqüências de HERV presentes no cromossomo Y.

Sugere-se analisar amostras de DNA genômico isolado das células germinativas dos pais para verificar as mutações observadas no DNA genômico dos filhos.

Sugere-se a realização do espermograma para os pais e filhos.

Novos estudos deverão ser realizados para o acompanhamento as vítimas e gerações futuras, no intuito de verificar a fertilidade e a ocorrência de novas mutações.

8. REFERÊNCIAS

1. Aizawa K, Yori K, Kaminaga C, Yamashita T, Kinoshita M, Oda S, Mitani H. Responses of embryonic germ cells of the radiation-sensitive Medaka mutant to g-Irradiation. *Journal of Radiation Research*. 48:121-128, 2007.
2. Andersson Ac, Yun Z, Sperber Go, Larsson E, Blomberg J. ERV3 and related sequences in humans: structure and RNA expression. *Journal of Virology*. 79(14):9270-9284, 2005.
3. Arnedo N, Nogués C, Bosch M, Templado C. Mitotic and meiotic behaviour of a naturally transmitted ring Y chromosome: reproductive risk evaluation. *Human Reproduction*. 20(2):462-468, 2004.
4. Arruda JT, Bordin BM, Santos PR, Mesquita WEJC, Silva RCPC, Maia MCS, Approbato MS, Florêncio RS, Amaral WN, Rocha Filho MA, Moura KKVO. Y chromosome microdeletions in Brazilian fertility clinic patients. *Genetics and Molecular Research*. 6(2):461-469, 2007.
5. Arruda JT, Silva DM, da Silva CC, Moura KKVO, da Cruz AD. Homologous recombination between HERVs causes duplications in the AZFa region of men accidentally exposed to cesium-137 in Goiânia. *Genetics and Molecular Research*, 7(4):1063-1069, 2008.
6. Bannert N, Kurth R. Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*. 101(Suppl. 2):14572-14579, 2004.
7. Barber R, Plumb MA, Boulton E, Roux I, Dubrova YE. Elevated mutation rates in the germ line of first and second generation offspring of irradiated male mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*. 99(10):6877-6882, 2002.

8. Barber RC, Dubrova YE. The offspring of irradiated parents, are they stable? *Mutation Research – Fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*. 598(1-2):50-60, 2006.
9. Barbulescu M, Turner G, Seaman MI, Deinard AS, Kidd KK, Lenz J. Many human endogenous retrovirus K (HERV-K) proviruses are unique to humans. *Current Biology*. 9(16):861-868, 1999.
10. Belgnaoui SM, Gosden RG, Semmes OJ, Haoudi A. Human Line-1 retrotransposon induces DNA damage and apoptosis in cancer cells. *Cancer Cell International*. 6:13. 2006.
11. BioEstat. Software de bioestatística versão 5. Disponível em <http://www.Mamiraua.Org.Br/Download/>. Acesso em 02/10/2008.
12. Blanco P, Shlumukova M, Sargent CA, Jobling MA, Affara N, Hurles MA. Divergent outcomes of intrachromosomal recombination on the human Y chromosome: male infertility and recurrent polymorphism. *Journal of Medical Genetics*. 37:752-758, 2000.
13. Bock M, Stoye JP. Endogenous retroviruses and the human germ line. *Current Opinion in Genetics & Development*. 10:651-655, 2000.
14. Bosch E, Hurles ME, Navarro A, Jobling MA. Dynamics of a human interparalog gene conversion hotspot. *Genome Research*. 14:835-844, 2004.
15. Bosch E, Jobling MA. Duplications of the AZFa region of the human Y chromosome are mediated by homologous recombination between HERVs and are compatible with male fertility. *Human Molecular Genetics*. 12(3):341-347, 2003.
16. Brasil, Ministério da Integração Nacional, Secretaria Nacional de Defesa Civil Manual de Desastres Humanos, I Parte: De Natureza Tecnológica. Brasília. 3-11, 2004.
17. Brenner DJ, Doll R, Goodhead DT, Hall EJ, Land CE, Little JB, Lubin JH, Preston DL, Preston RJ, Puskin JS, Ron E, Sachs RK, Samet JM, Setlow RB, Zaider M. Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: assessing what we really know. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*. 100(24):13761-13766, 2003.

18. Carrara RCV, Yamasaki R, Mazucatto LF, Veludo MAL, Sartorato EL, Pina-Neto JM. Somatic and germ cell cytogenetic studies and AZF microdeletion screening in infertile men. *Genetics and Molecular Biology*. 27(4):477-482, 2004.
19. Costa LF, Gouveia JJ, Azeredo SPA, Pellini MP, Cervo MAC, Evangelista MG. Procedimentos em medicina nuclear. *Arquivos Brasileiros de Medicina Naval*. 49(1):41-56, 1988.
20. 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(3):165-175, 1996.
21. Da Cruz AD, Glickman BW. Nature of mutation in the human HPRT gene following in vivo exposure to ionizing radiation of cesium-137. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 30(4):385-395, 1997a.
22. Da Cruz AD, Volpe JP, Saddi V, Curry J, Curado MP, Glickman BW. Radiation risk estimation in human populations: lessons from the radiological accident in Brazil. *Mutation Research*. 373(2):207-214, 1997b.
23. Da Cruz AD, Silva DM, da Silva CC, Nelson JR, Ribeiro LM, Pedrosa ER, Carneiro JJ, Curado MP. Microsatellite mutations in the offspring of irradiated parents 19 years after the cesium-137 accident. *Mutation Research – Genetic toxicology and environmental mutagenesis*. 652(2): 175-179, 2008.
24. Da Silva CC. Avaliação citogenética de indivíduos expostos acidentalmente à radiação ionizante de césio-137 em Goiânia (Brasil). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Goiás. 2000.
25. Dawkins R, Leelayuwat C, Gaudieri S, Tay G, Hui J, Cattley S, Martinez P, Kulski J. Genomics of the major histocompatibility complex: haplotypes, duplication, retroviruses and disease. *Immunological Reviews*. 167:275-304, 1999.
26. Deininger PL, Batzer MA. Mammalian retroelements. *Genome Research*. 12(10):1455-1465, 2002.

27. Ditton HJ, Zimmer J, Kamp C, Rajpert-De Meyts E, Vogt PH. The AZFa gene DBY (DDX3Y) is widely transcribed but the protein is limited to the male germ cells by translation control. *Human Molecular Genetics*. 13(19):2333-2341, 2004.
28. Dubrova YE, Grant G, Chumak AA, Stezhka VA, Karakasian AN. Elevated minisatellite mutation rate in the post-Chernobyl families from Ukraine. *American Journal of Human Genetics*. 71(4):801-809, 2002.
29. Dubrova YE, Plumb MA. Ionizing radiation and mutation induction at mouse minisatellite loci. The story of the two generations. *Mutation Research – Fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*. 499(2):143-150, 2002.
30. Dubrova YE. Monitoring of radiation-induced germline mutation in humans. *Swiss Medical Weekly*. 133:474-478, 2003.
31. Dubrova YE. Radiation-induced mutation at tandem repeat DNA loci in the mouse germline: spectra and doubling doses. *Radiation Research*. 163(2):200-207, 2005.
32. Dubrova YE, Ploshchanskaya OG, Kozionova OS, Akleyev AV. Minisatellite germline mutation rate in the Techa River population. *Mutation Research – Fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*. 602(1-2):74-82, 2006.
33. Eichler EE. Segmental duplications: what's missing, misassigned, and misassembled – and should we care? *Genome Research*. 11:653-656, 2001.
34. Eickbush TH. Repair by retrotransposition. *Nature Genetics*. 31(2):126-127, 2002.
35. Erdal ME, Barlas IO. Detection of the SRY gene in 46,XX phenotypic female by the PCR-SSCP method. *Turkish Journal of Medical Sciences*. 30:501-503, 2000.
36. Esnault C, Maestre J, Heidmann T. Human line retrotransposons generate processed pseudogenes. *Nature Genetics*. 24(4):363-367, 2000.
37. Farkash EA, Prak ETL. DNA damage and L1 retrotransposition. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2006:1-8, 2005.

38. Farkash EA, Kao GD, Horman SR, Prak ET. Gamma radiation increases endonuclease-dependent L1 retrotransposition in a cultured cell assay. *Nucleic Acids Research*. 34(4):1196-1204, 2006.
39. Farley AH, Luning Prak ET, Kazazian HH Jr. More active human L1 retrotransposons produce longer insertions. *Nucleic Acids Research*. 32(2):502-510, 2004.
40. Flores BC. Monitoramento genético retrospectivo de população ocupacionalmente exposta à radiação ionizante utilizando marcadores STR. Dissertação de Mestrado. Universidade Católica de Goiás. 2008.
41. Foresta C, Ferlin A, Moro E. Deletion and expression analysis of AZFa genes on the human Y chromosome revealed a major role for DBY in male infertility. *Human Molecular Genetics*. 9(8):1161-1169, 2000.
42. Gasior SL, Wakeman TP, Xu B, Deininger PL. The human Line-1 retrotransposon creates DNA double-strand breaks. *Journal of Molecular Biology*. 357(5):1383-1393, 2006.
43. Goiás. Governo do Estado. Sistema unificado e descentralizado de saúde. Fundação Leide das Neves Ferreira. Acidente radioativo de Goiânia – Um ano depois – Relatório de atividades /Dossiê. Goiânia. 1988a.
44. Goiás. Governo do Estado. Fundação Leide das Neves Ferreira. Acidente radioativo de Goiânia. Relatório de atividades. Goiânia. 1988b.
45. Goiás. Governo do Estado. Superintendência estadual do meio-ambiente de Goiás. Acidente radioativo de Goiânia - Um ano depois - Programa de monitoramento ambiental - Dossiê. Goiânia. 1988c.
46. Goiás. Governo do Estado. Sistema unificado e descentralizado de saúde. Fundação Leide das Neves Ferreira. I Simpósio internacional sobre o acidente radioativo com o céσιο-137 em Goiânia - Anais. Goiânia. 1988d.
47. Goiás. Governo do Estado. Sistema unificado e descentralizado de saúde. Fundação Leide das Neves Ferreira. Lições do acidente com o céσιο-137 em Goiânia. Goiânia. 1990.

48. Goiás. Corpo de Bombeiros Militar. Extrato do livro da parte diária do dia 29/09/1987 do oficial de dia redigida pelo 2º Ten Elisa Nunes Cavalcante. (Documentação) Goiânia. 2002.
49. Han JS, Szak ST, Boeke JD. Transcriptional disruption by the L1 retrotransposon and implications for mammalian transcriptomes. *Nature*. 429:268-274, 2004.
50. Han JS, Boeke JD. Line-1 Retrotransposons: Modulators of quantity and quality of mammalian gene expression? *BioEssays*. 27(8):775-784, 2005.
51. Huh JW, Kim DS, Ha HS, Kim TH, Kim W, Kim HS. Formation of a new solo-LTR of the human endogenous retrovirus H family in human chromosome 21. *Molecules and Cells*. 22(3):360-363, 2006.
52. Hurles ME, Willey D, Matthews L, Hussain SS. Origins of chromosomal rearrangement hotspots in the human genome: evidence from the AZFa deletion hotspots. *Genome Biology*. 5(8):R55, 2004.
53. IHGSC. International Human Genome Sequencing Consortium. The genome sequencing consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 409(6822):860-921, 2001.
54. Jobling MA, Tyler-Smith C. The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. *Nature*. 4(8):598-612, 2003.
55. Kamp C, Hirschmann P, Voss H, Huellen K, Vogt PH. Two long homologous retroviral sequence blocks in proximal Yq11 cause AZFa microdeletions as a result of intrachromosomal recombination events. *Human Molecular Genetics*. 9(17):2563-2572, 2000.
56. Kamp C, Huellen K, Fernandes S, Sousa M, Schlegel PN, Mielnik A, Kleiman S, Yavetz H, Krause W, K pker W, Johannisson R, Schulze W, Weidner W, Barros A, Vogt PH. High deletion frequency of the complete AZFa sequence in men with Sertoli-Cell-Only syndrome. *Molecular Human Reproduction*. 7(10):987-994, 2001.

57. Karmous-Benailly H, Giuliano F, Massol C, Bloch C, De Ricaud D, Lambert JC, Perelman S. Unbalanced inherited complex chromosome rearrangement involving chromosome 8, 10, 11 and 16 in a patient with congenital malformations and delayed development. *European Journal of Medical Genetics*. 49(5):431-438, 2006.
58. Kirsch S, Weiss B, Miner TL, Waterston RH, Clark RA, Eichler EE, Munch C, Schempp W, Rappold G. Interchromosomal segmental duplications of the pericentromeric region on the human Y chromosome. *Genome Research*. 15(2):195-204, 2004.
59. Kodaira M, Izumi S, Takahashi N, Nakamura N. No evidence of radiation effect on mutation rates at hypervariable minisatellite loci in the germ cells of atomic bomb survivors. *Radiation Research*. 162(4):350-356, 2004.
60. Krausz C, Degl'Innocenti S, Nuti F, Morelli A, Felici F, Sansone M, Varriale G, Forti G. Natural transmission of USP9Y gene mutations: a new perspective on the role of AZFa genes in male fertility. *Human Molecular Genetics*. 15(18):2673-2681, 2006.
61. Kulpa DA, Moran JV. Cis-preferential Line-1 reverse transcriptase activity in ribonucleoprotein particles. *Nature Structural & Molecular Biology*. 13(7):655-660, 2006.
62. Lattanzi W, Di Giacomo MC, Lenato GM, Chimienti G, Voglino G, Resta N, Pepe G, Guanti G. A large interstitial deletion encompassing the amelogenin gene on the short arm of the Y chromosome. *Human Genetics*. 116(5):395-401, 2005.
63. Leitão AAC, Gomes RA. *Radiobiologia e Fotobiologia – Respostas celulares às lesões induzidas por agentes físicos e químicos*. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2004.
64. Lupski Jr. Genomic disorders recombination-based disease resulting from genomic architecture. *American Journal of Human Genetics*. 72(2):246-252, 2003.
65. Martin SL, Li WL, Furano AV, Boissinot S. The structures of mouse and human L1 elements reflect their insertion mechanism. *Cytogenetic and Genome Research*. 110(1-4):223-228, 2005.

66. Medstrand P, Mager DL. Human-specific integrations of the HERV-K endogenous retrovirus family. *Journal of Virology*. 72(12):9782-9787, 1998.
67. Medstrand P, van de Lagemaat LN, Dunn CA, Landry JR, Svenback D, Mager DL. Impact of transposable elements on the evolution of mammalian gene regulation. *Cytogenetic and Genome Research*. 110(1-4):342-352, 2005.
68. Mikhalevich LS, De Zwart FA, Perepetskaya GA, Chebotareva NV, Mikhalevich EA, Tates AD. Radiation effects in lymphocytes of children living in a Chernobyl contaminated region of Belarus. *International Journal of Radiation Biology*. 76(10): 1377-1385, 2000.
69. Mill J, Petronis A. Molecular studies of major depressive disorder: the epigenetic perspective. *Molecular Psychiatry*. 12:799-814, 2007.
70. Miranda FJ, Pasquali L, Neto SBC, Barreto MQ, David Filho G, Rosa TV. O acidente radioativo em Goiânia: “O tempo cura todos os males?”. *Arquivos Brasileiros de Psicologia*. 57(1-2):58-87, 2005.
71. Morrish TA, Gilbert N, Myers JS, Vincent BJ, Stamato TD, Taccioli GE, Batzer MA, Moran JV. DNA repair mediated by endonuclease-independent Line-1 retrotransposition. *Nature Genetics*. 31(2):159-165, 2002.
72. Murphy KM, Cohen JS, Goodrich A, Long PP, Griffin CA. Constitutional Duplication of a Region of Chromosome Yp Encoding AMELY, PRKY, and TBL1Y: implications for sex chromosome analysis and bone marrow engraftment analysis. *Journal of Molecular Diagnostics*. 9(3):408-413, 2007.
73. Parseval N, Heidmann T. Human endogenous retroviruses: from infectious elements to human genes. *Cytogenetic and Genome Research*. 110(1-4):318-332, 2005.
74. Pina-Neto JM, Carrara RCV, Bisinella R, Mazzucatto LF, Martins MD, Sartoratto E, Yamasaki R. Somatic cytogenetic and azoospermia factor gene microdeletion studies in infertile men. *Brazilian Journal of Medical Biological Research*. 39(4):555-561, 2006.
75. Quintana-Murci L, Fellous M. The human Y chromosome: the biological role of a “Functional Wasteland”. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 1(1):18-24, 2001.

76. Rodovalho RG, Arruda JT, Moura KKVO. Tracking microdeletions of the AZF region in a patrilineal line of infertile men. *Genetics and Molecular Research*. 7(3):614-622, 2008.
77. Rozen S, Skaletsky H, Marszalek JD, Minx PJ, Cordum HS, Waterston RH, Wilson RK, Page DC. Abundant gene conversion between arms of palindromes in human and ape Y chromosomes. *Nature*. 423(6942):873-876, 2003.
78. Sankaranarayanan, K. Estimation of the genetic risks of exposure to ionizing radiation in humans: current status and emerging perspectives. *Journal of Radiation Research*. 47(suppl. B):B57-B66, 2006.
79. Sãopedro SL, Fraietta R, Spaine D, Porto CS, Srougi M, Cedenho AP, Avellar MCW. Prevalence of Y chromosome deletions in a Brazilian population of non-obstructive azoospermic and severely oligozoospermic men. *Brazilian Journal of Medical Biological Research*. 36(6):787-793, 2003.
80. Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG, Repping S, Pyntikova T, Ali J, Bieri T, Chinwalla A, Delehaunty A, Delehaunty K, Du H, Fewell G, Fulton L, Fulton R, Graves T, Hou SF, Latrielle P, Leonard S, Mardis E, Maupin R, McPherson J, Miner T, Nash W, Nguyen C, Ozersky P, Pepin K, Rock S, Rohlffing T, Scott K, Schultz B, Strong C, Tin-Wollam A, Yang SP, Waterston RH, Wilson RK, Rozen S, Page DC. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature*. 423(6942):825-837, 2003.
81. Stankiewicz P, Lupski Jr. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends in Genetics*. 18(2):74-82, 2002a.
82. Stankiewicz P, Lupski Jr. Molecular-evolucionary mechanisms for genomic disorders. *Current Opinion in Genetics & Development*. 12(3):312-319, 2002b.
83. Sugimoto J, Matsuura N, Kinjo Y, Takasu N, Oda T, Jinno Y. Transcriptionally active HERV-K genes: identification, isolation and chromosomal mapping. *Genomics*. 72(2):137-144, 2001.

-
84. Sun C, Skaletsky H, Rozen S, Gromoll J, Nieschlag E, Oates R, Page DC. Deletion of azoospermia factor A (Azfa) region of human Y chromosome caused by recombination between HERV15 proviruses. *Human Molecular Genetics*. 9(15):2291-2296, 2000.
85. Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the Y chromosome long arm. *Human Genetics*. 34(2):119-224, 1976.
86. Valverde N. Atendimento inicial de radioacidentados em Goiânia. *Arquivos Brasileiros de Medicina Naval*. 49(1):09-20, 1988.
87. Vogt PH. Molecular genetic of human male infertility: from genes to new therapeutic perspectives. *Current Pharmaceutical Design*. 10(5):471-500, 2004.
88. Vogt PH. AZF deletions and Y chromosomal haplogroups: history and update based on sequence. *Human Reproduction Update*. 11(4):319-336, 2005.
89. Wascheck CC. Avaliação da efetividade do protocolo de acompanhamento odontológico dos radioacidentados com o césio-137 em Goiânia – Goiás, no período de 1988 a 2001. Trabalho de Conclusão de Curso Lato Sensu, Universidade Federal de Goiás. 2002.
90. Watson JD, Myers RM, Caudy AA, Witkowski JA. *Recombinant DNA: genes and genomes – a short course, Third Edition*. W.H. Freeman and Company, New York. 2007.
91. Weinberg HSH, Korol AB, Kirzhner VM, Avivi A, Fahima T, Nevo E, Shapiro S, Rennert G, Piatak O, Stepanova EI, Skvarkskaja E. Very high mutation rate in offspring of Chernobyl accident liquidators. *Proceedings of the Royal Society: Biological Sciences*. 268(1471):1001-1005, 2001.
92. Wu J, Morimyo M, Hongo E, Higashi T, Okamoto M, Kawano A, Ohmachi Y. Radiation-induced germline mutations detected by a direct comparison of parents and first-generation offspring DNA sequences containing SNPs. *Mutation Research – Fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*. 596(1-2):1-11, 2006.

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
DOS INDIVÍDUOS EXAMINADOS**

“Monitoramento genético retrospectivo da população potencialmente exposta à radiação ionizante”.

I. Dados de identificação do sujeito da pesquisa ou responsável legal

1. Nome: _____

Documento de Identidade _____ Org. Exp. _____

Data de nascimento: ____/____/____

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ Estado: _____

CEP: _____ Telefone: () _____

2. Responsável legal _____

Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc) _____

Documento de identidade _____ Sexo: M () F ()

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ Estado: _____

CEP: _____ Telefone: () _____

II. Dados sobre a pesquisa científica

1. Título do protocolo de pesquisa: *Monitoramento genético retrospectivo da população potencialmente exposta à radiação ionizante.*

2. Pesquisador responsável: Dr. Aparecido Divino da Cruz, Superintendência Leide das Neves Ferreira. Fone: (062) 3946-1086; e-mail: acruz@ucg.br

3. Avaliação do risco da pesquisa: Os procedimentos da pesquisa não oferecem riscos de ocorrência de algum dano imediato ou tardio para o paciente (apenas hematomas locais após a coleta).

4. Duração da pesquisa: Dezembro de 2006 a Dezembro de 2009.

III. Registro das explicações do pesquisador ao paciente ou seu representante legal sobre a pesquisa

Nós conduzimos um estudo para encontrar provas de contaminação com o céσιο-137. Para isso solicitamos aos membros do Corpo de Bombeiros que se julgarem de alguma forma afetados com o acidente do céσιο-137 em 1987, que contribuam.

A sua participação na pesquisa inclui: a) responder perguntas de um questionário; b) doação de amostras de sangue da veia do braço (10mL).

IV. Esclarecimentos dados pelo pesquisador sobre Garantias do sujeito da pesquisa

Todas as informações prestadas em questionário e durante a entrevista serão de caráter confidencial e as informações colhidas serão utilizadas somente para fins científicos descritos no protocolo desta pesquisa, sem qualquer identificação pessoal. Qualquer provável benefício do estudo para o bem-estar da população depende da exatidão de suas respostas. Portanto, se o Senhor não entender alguma das questões, por favor, solicite todos os esclarecimentos que julgar necessário sobre os procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa ou qualquer dúvida. Os resultados dos estudos esclarecerão apenas se existe ou não possibilidade de contaminação com o Céσιο - 137, sendo necessários outros estudos para a confirmação. O sangue que sobrar da coleta será guardado para que outros exames e estudos sejam feitos no futuro. O Senhor tem a liberdade de não participar do estudo, saber ou não dos resultados dos exames, e retirar seu consentimento a qualquer momento deixando de participar do estudo, sem que isto traga qualquer prejuízo à continuidade de sua assistência. Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa em:

Goiânia, ___/___/_____ Assinatura: _____

Dados do grupo de estudo com os indivíduos expostos a radiação ionizante

	FAMÍLIA	INDIVÍDUO	IDADE	RADIAÇÃO (rad)	GRUPO DE EXPOSIÇÃO
<i>Grupo A</i>	I	09 Pai	49	101	I
		943 Filho	13	-	-
	II	11 Pai	32	22,2	I
		952 Filho	03	-	-
		954 Filho	10	-	-
	III	15 Pai	66	<22,2	I
		950 Filho	16	-	-
	IV	19 Pai	48	30	I
		955 Filho	04	-	-
	V	26 Pai	70	-	II
		1008 Filho	16	-	-
	VI	28 Pai	61	<20,025	I
		970 Filho	06	-	-
	VII	30 Avô	64	150,3	I
06 Pai		39	<20,04	I	
965 Neto		12	-	-	
<i>Grupo B</i>	VIII	34 Pai	43	<20	III
		35 Filho	13	-	-
	IX	41 Pai	45	<20	III
		43 Filho	22	-	-
		44 Filho	18	-	-
	X	50 Pai	43	<20	III
		52 Filho	19	-	-
		53 Filho	15	-	-
	XI	54 Pai	49	<20	III
		56 Filho	17	-	-
	XII	58 Pai	41	<20	III
		62 Filho	02	-	-
	XIII	67 Pai	47	<20	III
		69 Filho	26	-	-
		70 Filho	20	-	-
	XIV	71 Pai	53	<20	III
		73 Filho	16	-	-
	XV	75 Pai	42	<20	III
		77 Filho	10	-	-
XVI	78 Pai	41	<20	III	
	80 Filho	17	-	-	
	81 Filho	14	-	-	
XVII	82 Pai	43	<20	III	
	84 Filho	09	-	-	
XVIII	85 Pai	41	<20	III	
	87 Filho	16	-	-	
XIX	95 Pai	43	<20	III	
	98 Filho	17	-	-	

PROTOCOLOS DE PCR

Tabela I. Sequência dos *primers* e tamanho esperado dos fragmentos.

<i>Primer</i>	<i>Seqüência 5' - 3'</i>	<i>Região</i>	<i>Locus</i>	<i>Tamanho (pb)</i>
SRY	F - GAATATCCCGCTCTCCGGA R - GCTGGTGCTCCATTCTTGAG		Yp11.3	472
AMELY	F - CCTACCGCATCAGTGAATTC R - TCTGTATGTGGAGTACACATGG	Yp	Yp11	126
ZFY	F - ACCRCTGTACTGACTGTGATTACAC R - CACYTCTTTGGTATCYGAGAAAAGT		Yp22.3	495
AZFa-prox1	F - CTTAAATGTTGACTCTTCACC R - GCCTTGTGTAGAATAAGCAGATCA			126
SY83	F - CTTGAATCAAAGAAGGCCCT R - CAATTGGTTTTGGCTGACAT			277
AZFa-prox2	F - GGTTCCCTGAACAGGGGACT R - GGCAGCAGAAGGGCCTCTC			220
SY86	F - GTGACACACAGACTATGCTTC R - ACACACAGAGGGACAACCCT			320
SY85	F - TGGCAATTTGCCTATGAAGT R - ACAGGCTATTTGACTGGCAG			369
SY84	F - AGAAGGGTCTGAAAGCAGGT R - GCCTACTACCTGGAGGCTTC			326
USP9Y	F - CACTTTATTTTAGTCTGTGCTTTTTTC R - AAACCTTAGTAACATCTATTTCTCTCT		AZFa	305
SY87	F - TCTGTTGCTTGAAAAGAGGG R - ACTGCAGGAAGAATCAGCTG			252
DBY	F - TTTTTTTTGAGACGGAGTCTTG R - CTTGACAAAATCCTGAATAATACAAA			271
AZFa-dist1	F - TTGTCCTTCAATGCAGATG R - GGCTTCTAGTAGTATGGTC			390
12f2	F - CTGACTGATCAAAATGCTTACAGATC R - TCTTCTAGAATTTCTTACAGAATTG			427
AZFa-dist2	F - GCACTCCAGAAAAGATAATACATC R - GTTCCCCATTCTATACTGTTAGC			271
UTYpe	F - AAAGTATTACGGAAGTTTGCTG R - CACTGACTATATGTTTTCTACTG			138
SY106	F - AACACGCATTTCCTTTTCAA R - TTTAGCCATAATTATCTG TGGAAGA	Yq		231
SY124	F - CAGGCAGGACAGCTTAAAAG R - ACTGTGGCAAAGTTGCTTTC			109
SY127	F - GGCTCACAAACGAAAAGAAA R - CTGCAGGCAGTAATAAGGGA		AZFb	274
SY134	F - GTCTGCCTCACCATAAAAACG R - ACCACTGCCAAAACCTTCAA			301
SY135	F - CATTTCCACATTATGATAATTATGC R - ACCCAGAGAGTAGAAAACAGTGC			253
SY143	F - GCAGGATGAGAAGCAGGTAG R - CCGTGTGCTGGAGACTAATC			311
SY1197	F - TCATTGTGTCTTCTCTTGGA R - CTAAGCCAGGAACCTTGCCAC		AZFb+c	453
SY1291	F - TAAAAGGCAGAAGTCCAGG R - GGGAGAAAAAGTTCTGCAACG			527
SY1125	F - GTGGGGGTTTCACATTATGG R - GGTACACAGACTCACATTTAAGCA			283
SY1054	F - ACCTAAGGGAACCCAGGAGA R - CGACACTTTTGGGAAGTTTCA			340
YDAZ3	F - GCTAGAACCAAATATTCTGGAT R - ACTCCTCAGACACTCTATTAGTT		AZFc	256
SY254	F - GGGTGTACCAGAAGGCAAA R - GAACCGTATCTACCAAAGCAGC			400
SY255	F - GTTACAGGATTCGGCGTGAT R - CTCGTCATGTGCAGCCAC			126
RH65618	F - GAGTGGTCAAAGGAGCCAAA R - AGGAGCCACCTCCCTGAG			144

pb: pares de base; R: A/G; Y: C/T. Os marcadores estão descritos de acordo com a seqüência em que aparecem no cromossomo, Ypter → Yqter (Kamp *et al.*, 2000 e 2001).

SRY (472 pb)

ZFX/Y (495 pb)

AMELY (126pb)

REAGENTES	[] UTILIZADA	VOL. P/ 1 AMOSTRA
Tampão (10X)	1X	2,5µL
MgCl ₂ (50mM)	1,5mM	1,5µL
DNTPs (10mM)	1,25mM	2µL
Taq polimerase (5U/µL)	1,5U/µL	0,3µL
Primer sense (1mM)	20pMol	0,5µL
Primer antisense (1mM)	20pMol	0,5µL
H ₂ O Mili Q	---	15,7µL
DNA amostra	200ng/µL	2µL
Volume final		25µL

OBS: volumes para cada *primer*.**CICLAGEM**

TEMPERATURA	TEMPO	Nº CICLOS
94°C	5 minutos	1
94°C	1 minuto	
55°C	1 minuto	35
72°C	1 minuto	
72°C	7 minutos	1
4°C	∞	---

AZFa-prox1 (126pb)	SY83 (277pb)
AZFa-prox2 (220pb)	SY85 (369pb)
SY87 (252pb)	AZFa-dist1 (390pb)
AZFa-dist2 (271pb)	SY106 (231pb)
SY124 (109pb)	SY135 (253pb)
SY143 (311pb)	SY1197 (453pb)
SY1291 (527pb)	SY1125 (283pb)
SY1054 (340pb)	YDAZ3 (256pb)
RH65618 (144pb)	

REAGENTES	[] UTILIZADA	VOL. P/ 1 AMOSTRA
Tampão (10X)	1X	2,5µL
MgCl ₂ (50mM)	1,5mM	2µL
DNTPs (10mM)	1,25mM	2µL
Taq polimerase (5U/µL)	1,5U/µL	0,3µL
Primer sense (1mM)	20pMol	0,5µL
Primer antisense (1mM)	20pMol	0,5µL
H ₂ O Mili Q	---	15,7µL
DNA amostra	200ng/µL	2µL
Volume final		25µL

OBS: volumes para cada *primer*.

CICLAGEM

TEMPERATURA	TEMPO	Nº CICLOS
94°C	5 minutos	1
94°C	1 minuto	
56°C	1 minuto	35
72°C	1 minuto	
72°C	7 minutos	1
4°C	∞	---

SY254 (400pb)

SY255 (126pb)

REAGENTES	[] UTILIZADA	VOLUME P/ 1 AMOSTRA
Tampão (10X)	1X	2,5µL
MgCl ₂ (50mM)	1,5mM	1,5µL
DNTPs (10mM)	1,25mM	1µL
Taq polimerase (5U/µL)	1,5U/µL	0,3µL
Primer sense (1mM)	20pMol	0,5µL
Primer antisense (1mM)	20pMol	0,5µL
H ₂ O Mili Q	---	15,7µL
DNA amostra	200ng/µL	2µL
Volume final		25µL

OBS: volumes para cada *primer*.**CICLAGEM**

TEMPERATURA	TEMPO	Nº. CICLOS
94°C	5 minutos	1
94°C	1 minuto	
56°C	1 minuto	35
72°C	1 minuto	
72°C	7 minutos	1
4°C	∞	---

USP9Y (305pb)

DBY (271pb)

12f2 (427pb)

UTYpe (138pb)

REAGENTES	[] UTILIZADA	VOLUME P/ 1 AMOSTRA
Tampão (10X)	1X	2,5µL
MgCl ₂ (50mM)	1,5mM	2µL
DNTPs (10mM)	1,25mM	2µL
Taq polimerase (5U/µL)	1,5U/µL	0,3µL
Primer sense (1mM)	20pMol	0,5µL
Primer antisense (1mM)	20pMol	0,5µL
H ₂ O Mili Q	---	15,2µL
DNA amostra	200ng/µL	2µL
Volume final		25µL

OBS: volumes para cada *primer*.**CICLAGEM**

TEMPERATURA	TEMPO	Nº. CICLOS
94°C	5 minutos	1
94°C	1 minuto	
57°C	1 minuto	35
72°C	1 minuto	
72°C	7 minutos	1
4°C	∞	---

SY127 (274pb)

SY134 (301pb)

REAGENTES	[] UTILIZADA	VOLUME P/ 1 AMOSTRA
Tampão (10X)	1X	2,5µL
MgCl ₂ (50mM)	1,5mM	3µL
DNTPs (10mM)	1,25mM	2µL
Taq polimerase (5U/µL)	1,5U/µL	0,3µL
Primer sense (1mM)	20pMol	0,5µL
Primer antisense (1mM)	20pMol	0,5µL
H ₂ O Mili Q	---	15,2µL
DNA amostra	200ng/µL	2µL
Volume final		25µL

OBS: volumes para cada *primer*.**CICLAGEM**

TEMPERATURA	TEMPO	Nº. CICLOS
94°C	5 minutos	1
94°C	1 minuto	
57°C	1 minuto	35
72°C	1 minuto	
72°C	7 minutos	1
4°C	∞	---

SY84 (320 pb)

SY86 (326 pb)

REAGENTES	[] UTILIZADA	VOLUME P/ 1 AMOSTRA
Tampão (10X)	1X	2,5µL
MgCl ₂ (50mM)	1,5mM	1,5µL
DNTPs (10mM)	1,25mM	2µL
Taq polimerase (5U/µL)	1,5U/µL	0,3µL
Primer sense (1mM)	20pMol	0,5µL
Primer antisense (1mM)	20pMol	0,5µL
H ₂ O Mili Q	---	15,7µL
DNA amostra	200ng/µL	2µL
Volume final		25µL

OBS: volumes para cada *primer*.**CICLAGEM**

TEMPERATURA	TEMPO	Nº. CICLOS
94°C	5 minutos	1
94°C	1 minuto	
58°C	1 minuto	35
72°C	1 minuto	
72°C	7 minutos	1
4°C	∞	---

Recombinações homólogas entre HERVs causa duplicações na região *AZFa* de homens acidentalmente expostos ao césio-137 em Goiânia

Resumo

A região *AZF* contém diversos genes envolvidos na fertilidade masculina, localizados na região eucromática do Yq, estão fortemente associados aos defeitos da espermatogênese, tais como a azoospermia e a oligozoospermia. Durante o monitoramento genético-retrospectivo dos indivíduos que foram expostos ao Césio-137, realizado frequentemente, foram analisadas a ocorrência de possíveis mutações relacionadas à região *AZF* do cromossomo Y de homens expostos, assim como na prole desses indivíduos. O DNA genômico de 16 indivíduos foram analisados para os STS: sY84, sY86 (*AZFa*), sY127, sY134 (*AZFb*) e sY254, sY255 (*AZFc*), e os genes *SRY* e *ZFX/Y*. Como grupo controle foi utilizado o DNA genômico de 55 homens saudáveis e sem história prévia de exposição à radiação. Os indivíduos expostos apresentaram todos os STS amplificados, porém, sY84 e sY86 apresentaram uma duplicação em 12 (75%) dos indivíduos analisados. As famílias dos radioexpostos foram classificadas de A a G, para que os dados fossem facilmente representados. As famílias B e E apresentaram a duplicação tanto nos pais quanto nos filhos para sY84 e sY86. Entretanto, as famílias A, C, D e F os pais não apresentaram a duplicação, mas seus filhos sim. Destas quatro famílias, os filhos em A e D apresentaram a duplicação para os Y84 e sY86. Já nas famílias C e F somente houve uma duplicação do sY84 dos filhos. A família G apresentou duplicação de sY84 desde o avô até o neto. Recombinações não-alélicas entre duas seqüências de retrovírus endógenos humanos (HERV) de ≈ 10 kb que flanqueiam 780kb da região *AZFa* causam rearranjos - deleções ou duplicações, e o HERV distal possui um elemento L1 com ≈ 1.5 kb. As duplicações possivelmente foram geradas por mecanismos mutacionais, que podem ter sido potencializadas pelas radiações ionizantes do Césio-137 e que acarretou na recombinação homóloga não-alélica entre os HERV. Os *hotspots* dentro do HERV medeiam as recombinações em *AZFa* e as duplicações mostram que a diversidade entre as cópias duplicadas são compatíveis com a fertilidade masculina, uma vez que, até a presente data, nenhum dos indivíduos expostos apresentou ou apresenta problemas de fertilidade.

Palavras-chave: HERV, cromossomo Y, *AZFa*, desordem genética.