

Análise por citometria de fluxo da expressão da proteína p21 em linfócitos humanos irradiados

N. F. G. Santos¹; R. Freitas-Silva²; V. R. A. Pereira³; D. R. Tasat⁴; A. Amaral¹

¹Departamento de Energia Nuclear/Laboratório de Modelagem e Biodosimetria Aplicada, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-540, Recife-PE, Brasil

²Departamento de Ciências Naturais e Exatas, Universidade de Pernambuco, 55920-000, Garanhuns-PE, Brasil

³Departamento de Imunologia/Laboratório de Imunoparasitologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Fundação Oswaldo Cruz, 50670-420, Recife-PE, Brasil

⁴ Escuela de Ciencia y Tecnología/Laboratorio de Biología Celular del Pulmón, Universidad Nacional de General San Martín, C.P. 1650, Pcia. de Buenos Aires, Argentina

neyliane@gmail.com

(Recebido em 29 de março de 2013; aceito em 15 de julho de 2013)

O bloqueio do ciclo celular em G1 é um mecanismo regulado pela proteína p21 e associado à resposta celular radioinduzida para permitir a checagem do conteúdo genético, reparo e morte celular. A análise de proteínas que participam desta resposta tem progredido com as novas ferramentas analíticas, e os dados contribuem à compreensão dos eventos moleculares radioinduzidos e para novas abordagens em práticas que empregam radiações ionizantes. Nessa perspectiva, o objetivo desta pesquisa foi avaliar, por citometria de fluxo, os níveis de expressão da proteína p21 em linfócitos humanos irradiados e mantidos sob diferentes condições experimentais. Amostras de sangue periférico de 10 indivíduos saudáveis foram submetidas a doses de 0 (não irradiada); 1; 2 e 4 Gy. Os linfócitos foram processados para análises por citometria de fluxo, *ex vivo* (sem cultura) e após cultivo durante 24; 48 e 72 horas, com e sem estímulo com fitohemaglutinina. Os níveis de expressão da p21 foram mensurados em valores percentuais. Os resultados indicam que o ensaio por citometria de fluxo possibilita a detecção de variações na expressão da p21, uma vez que foram detectadas elevações significantes nas amostras estimuladas com fitohemaglutinina, para todos os tempos, em relação à expressão basal (*ex vivo*). Entretanto, não foram verificadas variações significantes da expressão radioinduzida da proteína p21, para todas as doses, tempos e condições de cultura analisados. Estes resultados não indicam, portanto, a proteína p21 como bioindicador de exposição à radiação ionizante. Contudo, a confirmação destes dados pode requerer a análise de uma população maior.

Palavras-chave: radiação ionizante; proteína p21; citometria de fluxo.

Flow cytometric analysis of p21 protein expression on irradiated human lymphocytes.

Cell cycle blockage in G1 is a mechanism p21 protein-regulated and coupled to DNA damage response to permit genetic content analysis, damage repair and cell death. Analysis of proteins that participates of this response has progressed with new analytic tools, and data contributes to comprehension of radioinduced molecular events as well as to new approaches on practices that employ ionizing radiation. On this perspective, the aim of this research was to evaluate, by flow cytometry, p21 expression on irradiated human lymphocytes, maintained under different experimental conditions. Peripheral blood samples from 10 healthy subjects were irradiated with doses of 0 (non-irradiated), 1, 2 and 4 Gy. Lymphocytes were processed to analysis on *ex vivo* (no cultured) condition and after 24; 48 and 72 hours culture, with and without phytohemagglutinin stimulation. p21 protein expression levels were measured by flow cytometry, as percentage values. Results indicate that flow cytometric assay allows detection of changes on p21 expression, since it was detected significant increase on phytohemagglutinin-stimulated samples, for all times, against basal expression (*ex vivo*). However, it was not observed significant alterations on p21 protein radioinduced levels, for all doses, times and culture conditions analyzed. These results not indicate so p21 protein as bioindicator of ionizing radiation exposure. Nevertheless, data confirmation may to require analysis of a more numerous population.

Keywords: ionizing radiation; p21 protein; flow cytometry.

1. INTRODUÇÃO

Um dos requisitos mais importantes para práticas humanas e médicas envolvendo radiações ionizantes é a compreensão dos mecanismos que regem os efeitos moleculares, celulares e teciduais induzidos pelas radiações. Os atuais avanços em radiobiologia visam não só uma melhor compreensão da resposta celular radioinduzida, como também o desenvolvimento de abordagens prognósticas, diagnósticas e terapêuticas modernas em radioproteção e radio-oncologia ¹.

Uma das áreas de maior interesse e impacto em radiobiologia consiste na investigação da resposta aos danos radioinduzidos à molécula de DNA, ou DDR (*DNA-damage response*), em particular aos eventos que decorrem dos danos à dupla fita ². A DDR consiste em uma via molecular complexa que atua no sentido de promover a restauração da integridade do DNA e envolve a localização e sinalização dos danos, bloqueio do ciclo celular, checagem do conteúdo genético, reparo dos danos e morte celular ³.

A ampla gama de moléculas e eventos que fazem parte desta cascata de sinalização intracelular pode ser investigada no intuito de caracterizar a resposta celular radioinduzida. Os parâmetros que melhor caracterizam essa resposta consistem em potenciais bioindicadores de exposição, efeito ou sensibilidade às radiações. Alguns ensaios já são bem estabelecidos nesse sentido, a exemplo da avaliação de alterações citogenéticas para estimativa de dose em radioproteção. Dentre as células que podem ser empregadas nestas análises, os linfócitos têm se destacado como um bom modelo para análise dos efeitos biológicos da radiação, devido à sua radiosensibilidade e facilidade de obtenção e cultivo em laboratório ⁴.

O crescente desenvolvimento de análises genômicas e proteômicas, associado ao advento de novas tecnologias para estudos *in vivo* e *in vitro*, tem agregado novas possibilidades aos estudos em radiobiologia. A análise de proteínas tem despontado como uma alternativa importante neste empreendimento, uma vez que, após a exposição à radiação, uma série de proteínas são hipo ou hiper-reguladas nos distintos mecanismos relacionados à DDR como resultado de alterações gênicas, alterações pós-traducionais ou mesmo nas vias de sinalização intra e intercelular ⁵. Nesse contexto, é interessante analisar proteínas associadas a mecanismos da DDR, utilizando novas ferramentas analíticas em sua detecção.

Um dos mecanismos desenvolvidos pelas células são os pontos de checagem, que devido à sua importância à integridade genômica, foram acoplados à DDR. Estes mecanismos complexos de sobrevivência celular são executados durante o ciclo celular no intuito de monitorar o DNA e neutralizar possíveis danos, de forma a garantir a transmissão fiel da informação genética para a progênie. As vias de sinalização executadas inibem a progressão do ciclo celular até que o dano seja resolvido – e para isso associam também vias de reparo e morte celular ⁶. Dos pontos de checagem induzidos em resposta à irradiação, o mecanismo melhor caracterizado é o bloqueio do ciclo celular na fase G1 mediado pela p53 e seus reguladores diretos (Mdm2 [*murine double minute 2*] e Chk2 [*checkpoint kinase 2*]) ⁷.

A ativação do ponto de checagem em G1 mediado pela p53 radioinduzida envolve principalmente a interação da proteína p53 e o gene p21, que codifica o inibidor de ciclinas dependentes de quinase CDKN1A. A proteína codificada por este gene, denominada p21 (devido a seu peso molecular de 21 quiloDaltons [kDa]), WAF1 (*wild-type p53-activated fragment 1*) ou CIP1 (*cdk interaction protein 1*), é o regulador chave dos eventos que regem o bloqueio em G1 ⁸.

O complexo que regula a passagem da fase G1 para a fase S do ciclo celular é aquele formado entre a ciclina E e a cdk2. Quando complexada à ciclina E, a cdk2 torna-se uma unidade ativa e passa a fosforilar a proteína do retinoblastoma (pRb), causando modificações estruturais nesta proteína que estimulam sua dissociação do fator de transcrição E2F. O fator E2F, em sua forma livre, participa da transcrição dos genes que regulam a disponibilidade da ciclina E e fatores requeridos para a fase S ⁹.

A proteína p21 é um potente inibidor de cdk2 e atua ligando-se aos heterodímeros formados entre a cdk2 e a ciclina E, inibindo a atividade da cdk2, em seu complexo com a ciclina E, na fosforilação da pRb. Sem sua fosforilação, a pRb não sofre as alterações conformacionais que permitem sua dissociação do fator E2F e, conseqüentemente, a atividade deste fator. Assim, há

o bloqueio na produção de ciclina E, e outros fatores necessários à passagem à fase S não são transcritos, o que resulta no bloqueio do ciclo celular em G1, de forma que a proteína p21 exerce um papel relevante nos processos de bloqueio do ciclo celular¹⁰.

Uma das ferramentas disponíveis para a análise da proteína p21 é a citometria de fluxo, que tem despontado como uma das ferramentas analíticas mais versáteis no estudo de sistemas biológicos. Esta tecnologia permite a realização de análises rápidas e quantitativas de múltiplos parâmetros em um grande número de células¹¹.

Considerando este contexto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar os níveis de expressão da proteína p21, por citometria de fluxo, usando como modelo biológico linfócitos periféricos humanos irradiados *in vitro*. Visando avaliar a melhor condição de ensaio para análise da p21, os linfócitos foram submetidos a diferentes doses de radiação e mantidos em cultura sob diferentes tempos pós-exposição e estímulo mitogênico (com e sem fitohemaglutinina).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare); solução salina tamponada com fosfato (PBS – *phosphate-buffered saline*, pH 7,2-7,4); meio de cultura RPMI-1640 contendo hepes, 300 mg/mL de L-glutamina, 50 mg/L de sulfato de gentamicina e 2 mg/L de anfotericina B (Cultilab); soro bovino fetal (SBF) estéril e inativado (Cultilab); azul de trypan a 0,4 % (Sigma); solução tampão contendo paraformaldeído a 4 % e saponina a 0,1 % (Cytotfix/Cytoperm, BD); tampão de permeabilização e lavagem 1X (Perm/Wash, BD); anti-CD8-PE (BD); anti-IgG1-PE (BD); anti-p21 (WAF1)-PE (FKBiotec).

2.2 Métodos

2.2.1 Perfil do estudo e aspectos éticos

O estudo foi do tipo prospectivo e experimental, realizado com 10 indivíduos, adultos e saudáveis, com idades entre 19 e 44 anos (média: 28,8 anos), sendo 6 mulheres e 4 homens. Todos os indivíduos relataram não terem sofrido exposição recente a medicamentos ou químicos de elevada toxicidade, ou às radiações ionizantes.

Todos os procedimentos de abordagem, informação, coleta de sangue periférico e uso dos dados foram realizados seguindo as recomendações do Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal de Pernambuco (processo 297/09).

2.2.2 Obtenção do material biológico e ensaio de irradiação

De cada voluntário, foram coletados 36 mL de sangue periférico venoso em tubos contendo heparina sódica. A amostra total foi dividida em 4 alíquotas, das quais uma foi mantida como controle não irradiado e as demais, irradiadas com doses de 1; 2 e 4 grays (Gy) de radiação gama, oriunda de uma fonte de cobalto-60 (Radionics Laboratory, USA) com taxa de dose média para as irradiações de 3,7 Gy/hora. A escolha das doses foi baseada em outros trabalhos do grupo envolvendo a análise de proteínas em resposta à irradiação e correspondem a doses elevadas para exposições ocupacionais e de relevância no setor terapêutico: 1 Gy – administrada a pacientes radiossensíveis, como variação do protocolo convencional; 2 Gy – dose 100 vezes maior que o limite anual para o trabalhador; dose convencional empregada por sessão em protocolos convencionais de radioterapia; 4 Gy – corresponde a DL50(30) para o homem (dose letal para 50 % dos indivíduos irradiados de corpo inteiro, para um período de 30 dias)^{4,12}.

2.2.3 Obtenção e cultura de linfócitos

As amostras foram diluídas em PBS e em seguida depositadas sobre solução de Ficoll (3:1) e centrifugadas a 400 x g, durante 35 minutos. A camada de células mononucleares foi resgatada e submetida a lavagens com PBS (250 x g, 10 minutos). O pellet final foi ressuscitado em meio RPMI suplementado com 10 % de SBF e analisado quanto à sua viabilidade (via ensaio com azul de trypan).

Para as análises *ex vivo*, uma parte da suspensão celular foi processada diretamente para citometria de fluxo. Como a capacidade das células removerem o dano ao DNA pode estar relacionada com a atividade proliferativa, foram avaliadas células quiescentes e em divisão. Assim, para as análises *in vitro* após 24, 48 e 72 horas, as células foram submetidas a cultivo celular, realizado em placas de fundo chato, com e sem fitohemaglutinina (PHA - *phytohemagglutinin*) (concentração final: 10 µg/mL). As placas foram incubadas a 37 °C, 5 % de CO₂, sob atmosfera umidificada.

2.2.4 Citometria de fluxo

2.2.4.1 Processamento e marcação

Para cada análise, foram utilizadas 6 x 10⁵ células/tubo. O meio suplementado foi retirado por centrifugação (300 x g, 5 minutos) e as células, lavadas com PBS gelado (300 x g, 5 minutos). Em seguida, as células foram fixadas durante 20 minutos, em gelo, com solução contendo paraformaldeído a 4 % e saponina a 0,1 %. Esta solução foi removida por centrifugação (400 x g, 5 minutos) e as células foram submetidas à permeabilização através de lavagens (400 x g, 5 minutos) com solução contendo saponina e soro bovino fetal (solução de permeabilização e lavagens). O pellet celular foi ressuscitado nesta mesma solução para marcação com os anticorpos monoclonais.

Para as amostras controle (não-irradiadas), foi montado um *set* de tubos para ajustes iniciais, sendo: um tubo sem marcação, um tubo marcado com anti-CD8-PE; e um tubo marcado com anti-IgG1-PE (controle isotópico). Para amostras controle e irradiadas, um tubo foi marcado com anti-p21 (WAF1)-PE. Após a adição dos anticorpos, as células foram incubadas durante 30 minutos, ao abrigo da luz. A retirada do excesso de anticorpos (400 x g, 5 minutos) e ressuspensão final do pellet foram realizados com tampão de permeabilização e lavagem.

2.2.4.2 Aquisição e análise de dados

As leituras das amostras foram realizadas em citômetro de fluxo modelo Gallios (Beckman Coulter), utilizando software do próprio equipamento. Gráficos de densidade foram utilizados na visualização das populações celulares de interesse e análise da fluorescência. A fluorescência foi analisada também através de gráficos do tipo histograma.

Na leitura de cada amostra (tubo), foram adquiridos 50.000 eventos. As células não marcadas foram utilizadas no ajuste dos detectores de voltagem e ganho dos sinais de dispersão do laser (FSC: *forward scatter*; SSC: *side scatter*), para delimitação da população de interesse (linfócitos) e definição da região negativa de análise da proteína; marcadas com CD8-PE (PE: ficoeritrina), para ajuste da região positiva do detector de fluorescência FL2; marcadas com IgG1-PE (controle isotópico), para medida das ligações inespecíficas. Em seguida, foram realizadas as leituras das amostras marcadas com o anticorpo de interesse (anti-p21-PE).

Os dados adquiridos foram analisados no software Kaluza (Beckman Coulter), e as expressões da proteína foram mensuradas em valores percentuais.

2.2.5 Análise estatística e apresentação dos dados

A ferramenta utilizada na análise dos dados de expressão da proteína foi o programa Biostat (Instituto Miramauá). Na análise, foi realizada uma estatística descritiva dos dados. Diferenças entre médias foram analisadas através da análise da variância (ANOVA) one-way e, sendo as

variâncias desiguais, foi aplicado o teste t de Student. Para interpretação da verdade científica, diferenças estatisticamente significantes foram aceitas para valores de p de significância iguais ou menores que 0,05 ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS

A Figura 1 apresenta gráficos obtidos a partir de amostras não irradiadas, analisadas *ex vivo* e após cultura de 24, 48 e 72 horas, com e sem estímulo com PHA. Os gráficos relacionam os parâmetros físicos de tamanho (FSC) e complexidade (SSC) das células, permitindo a diferenciação dos grupos celulares contidos na amostra e a delimitação da população de interesse, os linfócitos. A análise das células irradiadas foi realizada da mesma maneira.

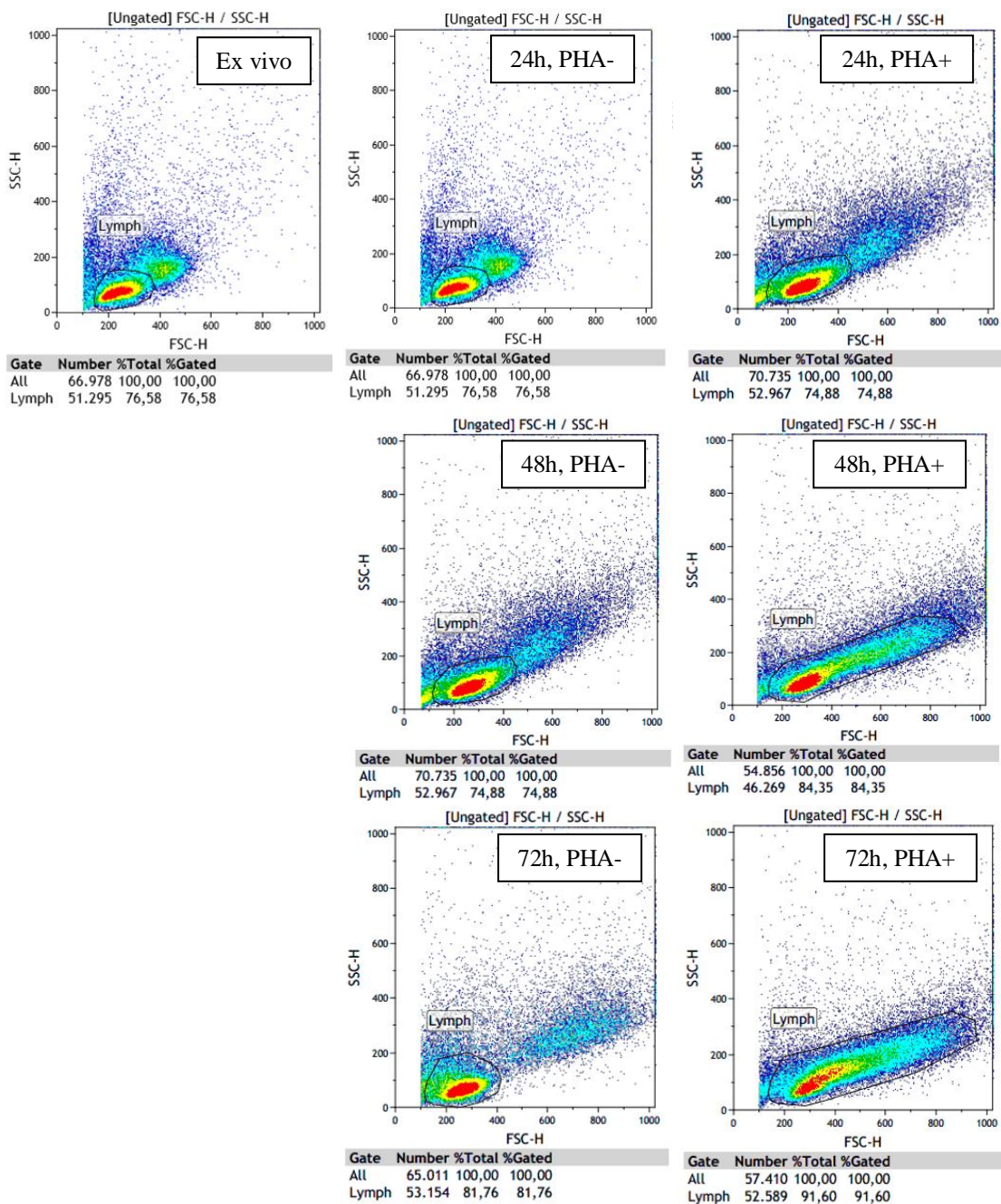


Figura 1: Dot plots de aquisição dos parâmetros de tamanho (FSC) e complexidade (SSC) celular para as análises de amostras não irradiadas, *ex vivo* e após cultura de 24, 48 e 72 horas, com e sem fitohemaglutinina (PHA), com 'gate' delimitando a população de interesse (linfócitos, em Lymph).

A Figura 2 ilustra os dot plots de aquisição de fluorescência a partir da população delimitada nas gates.

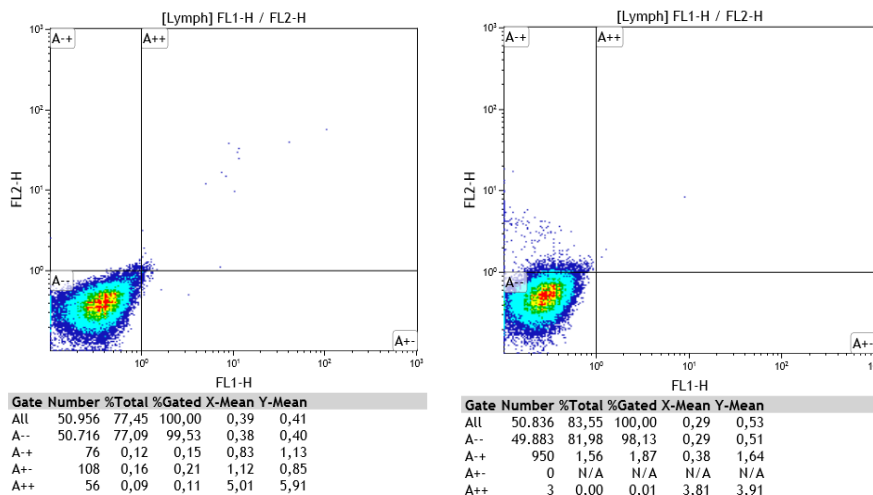


Figura 2: Dot plots de análise de fluorescência. O gráfico à esquerda foi obtido a partir da leitura de amostra não irradiada, marcada com IgG1-PE, e à direita, marcado com p21-PE. A fluorescência da ficoeritrina (PE) é apresentada no eixo y e a positividade para o marcador, no quadrante A++ (acima e à esquerda)

A Tabela 1 apresenta os valores de média (\bar{X}) (n = 10) e desvio padrão (DP) da expressão da proteína p21 nas amostras analisadas *ex vivo* (sem cultivo, 0 horas).

Tabela 1: Expressão da proteína p21 nas análises *ex vivo*.

Dose	Expressão (%) ($\bar{X} \pm DP$)
Controle	2,13 ± 2,12
1 Gy	2,05 ± 1,65
2 Gy	1,75 ± 1,33
4 Gy	1,87 ± 1,43

Gy: Gray; \bar{X} : média; DP: desvio padrão

A análise estatística dos dados não indicou diferença entre os grupos controle e irradiados para estas análises, realizadas imediatamente após a irradiação.

A Tabela 2 apresenta os valores de média e desvio padrão da expressão da proteína p21 nas amostras cultivadas durante 24, 48 e 72 horas, com e sem fitohemaglutinina (PHA).

Tabela 2: Expressão da proteína p21 após irradiação e cultivo durante 24, 48 e 72 horas, com e sem fitohemaglutinina.

Dose	Expressão (%) ($\bar{X} \pm DP$)					
	24 horas		48 horas		72 horas	
	Sem PHA	Com PHA	Sem PHA	Com PHA	Sem PHA	Com PHA
Controle	3,33 ± 3,15	5,33 ± 3,63	3,80 ± 4,31	6,67 ± 5,74	4,39 ± 3,69	6,71 ± 6,97
1 Gy	2,53 ± 2,60	5,61 ± 3,57	2,59 ± 1,05	6,37 ± 5,78	4,06 ± 3,01	6,74 ± 6,22
2 Gy	2,20 ± 2,09	5,14 ± 2,82	3,44 ± 1,47	6,06 ± 4,41	4,31 ± 2,69	6,81 ± 5,31
4 Gy	2,30 ± 1,86	5,80 ± 3,91	7,46 ± 9,40	7,17 ± 5,89	5,18 ± 4,08	10,14 ± 7,41

Gy: Gray; \bar{X} : média; DP: desvio padrão; PHA: fitohemaglutinina

Para as amostras cultivadas *in vitro*, os níveis médios da expressão da p21 nas amostras não estimuladas foram similares aos detectados nas amostras estimuladas com PHA. Entretanto,

comparando-se as amostras estimuladas em relação às amostras analisadas *ex vivo*, os níveis médios de expressão dessa proteína apresentaram um aumento significativo ($p < 0,01$), indicando que a condição de cultivo em presença do estímulo mitógeno da PHA eleva os níveis da proteína p21 nos linfócitos.

Com relação à exposição à radiação, não foram detectadas diferenças significantes nos níveis médios da expressão da proteína p21 entre as amostras controle e irradiadas, para todas as doses e tempos analisados, tanto para os linfócitos quiescentes quanto para linfócitos proliferantes (induzidos pela PHA).

4. DISCUSSÃO

Com relação à resposta da proteína p21 em linfócitos ao estímulo com PHA, resultados semelhantes foram relatados por Fukao e colaboradores¹³ e Vilasová e colaboradores¹⁴, que referenciam um aumento na expressão da p21 após o estímulo com PHA. As metodologias empregadas por estes grupos diferem da presente pesquisa com relação apenas à ferramenta de análise proteica – enquanto estes grupos fizeram uso do Western blot, aqui foi utilizada a citometria de fluxo. Considerando-se o fato de o presente ensaio por citometria de fluxo conseguir detectar as variações na expressão da p21 induzidas pelo mitógeno detectadas por Western blot, sugere-se que esta ferramenta pode ser utilizada para análises da proteína em questão.

Na análise da resposta à radiação, não foram detectadas alterações radioinduzidas na expressão da proteína p21. A comparação destes dados com aqueles da literatura é limitada, uma vez que uma quantidade relativamente pequena de pesquisas tem se dedicado a analisar a relação entre a expressão da proteína p21 e a irradiação, principalmente empregando o mesmo modelo biológico (linfócitos humanos) e a mesma ferramenta de análise (citometria de fluxo) utilizados no presente trabalho.

Cavalcanti¹⁵ analisou a expressão do regulador direto da p21 – a proteína p53 – em linfócitos humanos após a irradiação, para os tempos de 0, 24, 48 e 72 horas, em culturas com e sem PHA. Os resultados desta análise apontaram o tempo de 72 horas como o melhor tempo de detecção da p53, verificando-se uma correlação com a dose de radiação. Bartek e Lukas⁸ afirmam que a p53 radioinduzida interage com o gene p21, regulando positivamente a expressão deste gene e a consequente produção da proteína codificada por ele. Entretanto, a proteína p53 pode atuar na regulação de outros processos, tais como a apoptose. Os dados aqui obtidos sobre a p21, em conjunto com os dados sobre a p53¹⁵, podem indicar que a p53 radioinduzida – e mesmo a baixa expressão da p21 – está mais relacionada à execução da apoptose.

De acordo com Čmielová e Řezáčová¹⁰, após o dano ao DNA, a p21 pode exercer funções distintas, a depender de sua localização celular e da extensão do dano. Sobre a localização na célula: quando no núcleo, a proteína atua no bloqueio da passagem da fase G1 para a fase S e, quando no citoplasma, esta proteína tem efeito anti-apoptótico. Sobre a extensão do dano: para baixos níveis de dano, a expressão da p21 é aumentada e induz o bloqueio do ciclo celular, realizando também atividades anti-apoptóticas, mas após danos extensos, a quantidade da proteína é reduzida a níveis basais e a célula é conduzida à apoptose. Em macrófagos, Taranto e colaboradores¹⁶ também relacionaram a redução da expressão da proteína p21 ao aumento da apoptose.

Na presente pesquisa, foram empregadas altas doses, variando de 1 a 4 Gy. A ausência de relação entre a expressão da proteína p21 e os níveis de dose pode ter sido devida à atuação da proteína em resposta a danos extensos e sua atuação no citoplasma, que levam à condução da apoptose. Esta correlação foi confirmada através da análise da expressão da caspase 3 (dado não publicado) nas mesmas amostras.

Devido à ausência de relação entre a expressão da p21 e os níveis de dose de radiação aos quais as amostras foram expostas, os resultados não indicam a proteína p21 como bioindicador de exposição à radiação ionizante. Em contradição, outras pesquisas relatam que há um aumento radioinduzido da expressão da proteína p21 em células irradiadas^{17,18}. Vilasová e colaboradores¹⁴ inclusive identificaram um aumento radioinduzido da p21 em linfócitos humanos quiescentes

após 24 horas (permanecendo durante 48 e 72 horas), e proliferantes, após 4 horas (permanecendo durante 24, 48 e 72 horas). A quase totalidade destes trabalhos emprega a técnica do Western blotting na análise da proteína p21, de forma que é possível que a citometria de fluxo apresente uma menor sensibilidade que o Western blotting, por alguma limitação da técnica sobre reagentes (e.g. anticorpos disponíveis) ou mesmo de padronização.

5. CONCLUSÃO

Os níveis médios de expressão da p21 não apresentaram correlação de dose-dependência, para todos os tempos (0; 24; 48, 72 h) e condições de cultura (sem/com PHA) analisados nesta pesquisa. Um aumento da expressão foi verificado apenas para o tempo de 24 horas nas amostras estimuladas com PHA em relação às amostras não estimuladas. Estes resultados indicam que a análise por citometria de fluxo conseguem detectar variações significantes na expressão da proteína p21, mas que a exposição à radiação não induz tais variações. Sugere-se, a partir destas evidências, que a p21 não seria indicada para emprego como bioindicador de exposição à radiação, mas é importante considerar que estas evidências requerem uma confirmação a partir da análise de um 'n' (população) mais numeroso.

6. AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), pelo auxílio financeiro; ao Laboratório de Metrologia das Radiações Ionizantes (LMRI – DEN/UFPE), por disponibilizar o equipamento para irradiação das amostras.

-
1. International Atomic Energy Agency (IAEA). Radiation biology: a handbook for teachers and students. Vienna: IAEA; 2010. 151 p. Training Course Series, 42.
 2. Selzer E, Hebar A. Basic principles of molecular effects of irradiation. *Wien Med Wochenschr.* 2012 Feb;162(3-4):47-54.
 3. Thompson LH. Recognition, signaling, and repair of DNA double strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: the molecular choreography. *Mutat Res.* 2012 Oct-Dec; 751(2):158-246.
 4. Pinto MM, Santos NF, Amaral A. Current status of biodosimetry based on standard cytogenetic methods. *Radiat Environ Biophys.* 2010 Nov;49(4):567-81.
 5. Guipaud O, Benderitter M. Protein biomarkers for radiation exposure: towards a proteomic approach as a new investigation tool. *Ann Ist Super Sanita.* 2009;45(3):278-86.
 6. Pawlik TM, Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004 Jul;59(4):928-42.
 7. Favaudon V. Régulation du cycle cellulaire et de la mort cellulaire radio-induite. *Cancer Radiother.* 2000;4:355-368.
 8. Bartek J, Lukas J. DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr Opin Cell Biol.* 2007 Apr;19(2):238-45.
 9. Morris L, Allen KE, La Thanque NB. Regulation of E2F transcription by cyclin E-Cdk2 kinase mediated through p300/CBP coactivators. *Nat Cell Biol.* 2000 Apr;2(4): 232-9.
 10. Čmielová J, Řezáčová M. Protein and its function based on a subcellular localization. *J Cell Biochem.* 2011 Dec;112(12):3502-6.
 11. Nolan JP, Yang L. The flow of cytometry into systems biology. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 2007 Jun;6(2):81-90.
 12. Marcu LG. Altered fractionation in radiotherapy: from radiobiological rationale to therapeutic gain. *Cancer Treat Rev.* 2010 Dec;36(8):606-14.
 13. Fukao T, Kaneko H, Birrell G, Gatei M, Tashita H, Yoshida T, Cross S, Kedar P, Watters D, Khana KK, Misko I, Kondo N, Lavin MF. ATM is upregulated during the mitogenic response in peripheral blood mononuclear cells. *Blood.* 1999 Sep 15;94(6):1998-2006.

14. Vilasová Z, Řezáčová M, Vávrová J, Tuchý A, Vokurková D, Zoelzer F, Řeháková Z, Osterreicher J, Lukášová E. Changes in phosphorylation of histone H2A.X and p53 in response of peripheral blood lymphocytes to gamma irradiation. *Acta Biochim Pol.* 2008;55(2):381-90.
15. Cavalcanti MB. Utilização da citometria de fluxo para avaliação dos níveis de expressão da proteína p53 em linfócitos do sangue periférico humano irradiados in vitro [dissertação]. [Recife]: Universidade Federal de Pernambuco; 2005.
16. Taranto E, Xue JR, Morand EF, Leech M. Modulation of expression and cellular distribution of p21 by macrophage migration inhibitory factor. *J Inflamm (Lond).* 2009;6(24). 10 p.
17. Koike M, Yotoku Y, Koike A. Accumulation of p21 proteins at DNA damage sites independent of p53 and core NHEJ factors following irradiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Aug 19;421(1):39-43.
18. Wiese C, Rudolph JH, Jakob B, Fink D, Tobias F, Blattner C, Taucher-Scholz G. PCNA-dependent accumulation of CDKN1A into nuclear foci after ionizing irradiation. *DNA Repair (Amst).* 2012 May;11(5):511-21.