



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

EFEITOS DAS RADIAÇÕES γ (^{60}Co) E β (^{90}Sr) EM CÉLULAS
DE OVÁRIO DE HAMSTER CHINÊS (CHO-k1):
INDUÇÃO DE MICRONÚCLEOS E MORTE CELULAR

DANIELLA MURAKAMI

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear - Aplicações.

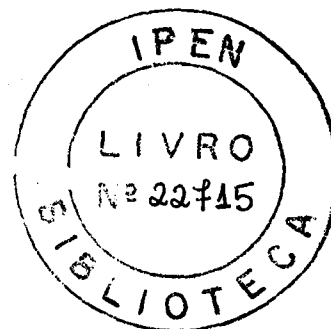
Orientadora:
Dra. Kayo Okazaki

São Paulo
2003

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**EFEITOS DAS RADIAÇÕES γ (^{60}Co) E β (^{90}Sr)
EM CÉLULAS DE OVÁRIO DE HAMSTER CHINÊS (CHO-K1):
INDUÇÃO DE MICRÓNÚCLEOS E MORTE CELULAR**

DANIELLA MURAKAMI



**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear – Aplicações.**

**Orientadora:
Dra. Kayo Okazaki**

**SÃO PAULO
2003**

AGRADECIMENTOS

À Dra. Kayo Okazaki, pela orientação, confiança, constante apoio e incentivo.

Às colegas do Grupo de Dosimetria Biológica e Mutagênese, Miriam, Márcia e Lenita pela participação nas discussões e no desenvolvimento das técnicas citogenéticas.

Aos pesquisadores do Centro de Biologia Molecular, Olga, Patrick e Luiz Guilherme, pelo incentivo e colaboração.

Aos amigos e bolsistas do Centro de Biologia Molecular, Janaina, Fernanda, Johnny, Murilo, Alberto, pelo apoio e por compartilharem suas idéias e opiniões.

Aos professores da pós-graduação, pela mostra de carinho e pela empolgação em busca do conhecimento e amor à pesquisa.

Aos técnicos do Centro de Biologia Molecular, Centro de Tecnologia das Radiações e do Centro de Metrologia das Radiações, pelo auxílio na irradiação das amostras e manutenção dos laboratórios.

Ao meu querido marido Cassiano Ricardo, pela paciência, amor e carinho.

Ao CNPq, pela bolsa de mestrado.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN - CNEN/SP, pelo apoio a esta linha de pesquisa.

**Dedicado aos meus pais e irmãos,
ao meu marido
e ao Gustaff**

Efeitos das radiações γ (^{60}Co) e β (^{90}Sr) em células de ovário de hamster chinês (CHO-K1): indução de micronúcleos e morte celular

Daniella Murakami

RESUMO

Entre os vários tipos de radiação ionizante, os radionuclídeos emissores beta estão envolvidos em vários setores da atividade humana, por exemplo, em medicina nuclear, indústrias nucleares e em biomedicina, aumentando, conseqüentemente, o risco de exposições acidental, ocupacional ou terapêutica. No entanto, apesar da sua reconhecida importância, há poucas informações sobre o efeito da partícula β em nível celular em comparação com outros tipos de radiação ionizante. Assim, o objetivo do presente trabalho foi o de averiguar efeitos genotóxicos e citotóxicos do ^{90}Sr , uma fonte pura de partículas beta altamente energéticas, em células CHO-K1 e comparar os dados obtidos com os do ^{60}Co . Para tanto, células CHO-K1 irradiadas com diferentes doses (1,0; 2,5; 5,0 e 7,5 Gy) de ^{60}Co (0,34 Gy/min) e de ^{90}Sr (0,23 Gy/min) foram processadas para a análise de morte clonogênica, indução de micronúcleos (MN) e mortes necrótica e apoptótica. As curvas de sobrevivência obtidas para ambos os tipos de radiação foram melhor ajustadas pelo modelo linear-quadrático, as quais mostraram ser similares entre si. Todavia, os resultados citogenéticos mostraram que, tanto a proporção de células micronucleadas como a magnitude de lesões radioinduzidas demonstradas pela análise de distribuição de MN, foram significativamente mais altas em células irradiadas com ^{60}Co do que com ^{90}Sr , ao passo que para a indução de morte celular, o ^{90}Sr foi mais danificante que o ^{60}Co . A necrose foi a principal modalidade de morte observada em células CHO-K1. Os dados obtidos sugerem que a incidência mais baixa de células micronucleadas observada quando da exposição com ^{90}Sr pode ser decorrente de uma eliminação seletiva de células severamente danificadas da população por processo necrótico numa proporção mais alta do que com ^{60}Co . Os dados obtidos mostraram também, a necessidade da utilização de vários parâmetros para uma melhor estimativa da radiosensibilidade celular frente à ação dos genotóxicos ambientais, o que será de grande valia não somente do ponto de vista radiobiológico, como também oncológico e terapêutico.

Effects of γ (^{60}Co) and β (^{90}Sr) radiations in Chinese hamster ovarian cells (CHO-K1): induction of micronucleus and cell death

Daniella Murakami

ABSTRACT

Among various types of ionising radiation, the beta emitter radionuclides are involved in many sectors of human activity, such as nuclear medicine, nuclear industries and biomedicine, with a consequent increased risk of accidental, occupational or therapeutic exposure. Despite their recognized importance, there is little information about the effect of beta particles at the cellular level when compared to other types of ionizing radiation. Thus, the objective of the present study was to evaluate the genotoxic and cytotoxic effects of ^{90}Sr , a pure, highly energetic beta source, on CHO-K1 cells and to compare them with data obtained with ^{60}Co . CHO-K1 cells irradiated with different doses (1.0, 2.5, 5.0, 7.5 Gy) of ^{60}Co ($0.34 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$) and ^{90}Sr ($0.23 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$) were processed for analysis of clonogenic death, induction of micronuclei (MN) and necrotic and apoptotic death. The survival curves obtained for both types of radiation were better fitted by the linear-quadratic model and were similar. However, the cytogenetic results showed that both the proportion of micronucleated cells and the magnitude of radioinduced lesions demonstrated by the analysis of MN distribution were significantly higher in cells irradiated with ^{60}Co than in cells irradiated with ^{90}Sr , whereas ^{90}Sr was more damaging than ^{60}Co in terms of cell death induction. Necrosis was the major type of death observed in CHO-K1 cells. The data obtained suggest that the low incidence of micronucleated cells after exposure to ^{90}Sr may be a consequence of selective elimination of severely damaged cells from the population by the necrotic process at a higher rate than observed with ^{60}Co exposure. The data obtained also demonstrated the need to use several parameters for a better estimate of cellular sensitivity to the action of genotoxic agents, which would be important in terms of radiobiology, oncology and therapeutics.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Avaliação do dano ao DNA- Técnica do micronúcleo	4
1.2. Morte celular	7
1.3. Células de ovário de hamster Chinês (CHO)	10
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Células CHO-K1	13
3.2. Métodos	14
3.2.1. Condições de irradiação	14
3.2.2. Teste de formação de colônias.....	16
3.2.3. Técnica de coloração diferencial.....	17
3.2.4. Técnica do micronúcleo (MN).....	19
3.2.5. Análise das lâminas	21
3.2.6. Análise estatística	21
4. RESULTADOS	22
4.1. Averiguação de morte reprodutiva pela formação de colônias	22
4.2. Averiguação da indução de micronúcleos (MN).....	26
4.3. Averiguação de apoptose e necrose pela técnica de coloração diferencial.....	34
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1. INTRODUÇÃO

Vários agentes, direta ou indiretamente, podem afetar o patrimônio genético dos seres vivos. Estes podem ser divididos em dois grupos: os agentes endógenos que estão associados aos componentes genético, hormonal e imunológico, e os exógenos que estão relacionados com o meio ambiente, do qual advem vários fatores de risco como álcool, fumo, aditivos e corantes alimentares, pesticidas organoclorados, medicamentos e várias formas de radiação ionizante.

A radiação ionizante é uma modalidade terapêutica muito difundida na prática clínica e oncológica, além de ser utilizada com outras finalidades, tanto na indústria como na agricultura. Dessa maneira, torna-se necessário conhecer melhor sua ação nos casos de ocorrência de acidentes e de exposição ocupacional, para uma avaliação mais acurada dos riscos biológicos envolvidos.

Sabe-se que quando alguma forma de radiação ionizante, eletromagnética (raios-X e γ) ou particulada (neutrões e partículas α e β), é absorvida por um material biológico, há possibilidade que esta venha interagir diretamente com alvos celulares, dentre eles o DNA. Sua natureza não específica induz uma variedade muito ampla de danos e respostas de estresse em vários tipos celulares.

A radiação ionizante pode modificar o DNA por dois mecanismos básicos: ação direta, quando há interação direta da energia da radiação com o DNA e por ação indireta, quando ocorre transferência de energia da radiação, primariamente às moléculas circundantes do DNA, especialmente a água, levando ao início à uma cadeia de reações químicas e bioquímicas, que resultam na produção de radicais livres, ($^{\bullet}\text{OH}$, $^{\bullet}\text{H}$), espécimes

reativos de O_2 ($O_2^{\cdot -}$; H_2O_2) e vários radicais orgânicos que podem afetar a estrutura e a função celular.

Tanto os efeitos diretos, como os indiretos, produzem uma variedade de lesões à molécula de DNA, como quebra nas fitas simples e duplas da molécula, ligações cruzadas (entre DNA-DNA, entre DNA-proteínas) e alterações na desoxirribose ou nas bases púricas e pirimídicas (Hall, 2000; Pouget & Mather, 2001).

Apesar de todos os tipos de radiações induzirem efeitos qualitativamente similares nos sistemas biológicos, o tipo de radiação implica numa diferença quantitativa considerável na expressão da resposta biológica, embora a quantidade total de energia depositada e o número de pares de íons formados sejam os mesmos (Goodhead *et al.*, 1993; Hall & Varma, 1994). Isto porque os efeitos biológicos estão intimamente relacionados com a transferência linear de energia (LET) que é definida como uma medida da quantidade média de energia depositada no tecido por unidade de distância percorrida ($keV/\mu m$).

De modo geral, as radiações de alta LET (partículas α , íons pesados, fragmentos de fissão e nêutrons) induzem maiores danos biológicos que as de baixa LET (raios-X, γ e partículas β) por apresentarem uma velocidade mais lenta e, portanto, depositarem toda a sua energia numa distância muito curta (50 - 90 μm no tecido) (Casarett, 1968; Lewington, 1993; Hall, 2000).

O estudo dos efeitos da radiação beta em nível celular é de particular interesse, tendo em vista a sua aplicação direta em medicina nuclear. Muitos radiofármacos utilizados para fins diagnóstico e terapêutico são fundamentalmente emissores beta (^{153}Sm -EDTMP, $Na^{131}I$, ^{186}Re -HEDP, $^{89}SrCl$), considerados como os mais promissores em virtude do seu pequeno alcance nos tecidos (alcance máximo de 1 a 12 mm no tecido mole) e da sua energia ($E_{máx}$ de 0,3 a 2,3 MeV), minimizando a radiotoxicidade aos tecidos sadios

circunvizinhos (Lewington, 1993; Allen & Blagojevic, 1996). Além disso, a radiação beta está envolvida também em outras áreas, por exemplo, em indústrias nucleares e em biomedicina, associadas com exposições ocupacional ou acidental (Regulla, 1986).

A despeito da sua reconhecida importância, trabalhos publicados sobre os efeitos biológicos da radiação beta não são numerosos. Estudos citogenéticos de ^3H (Vulpis, 1984; Tanaka *et al.*, 1994; Deng *et al.*, 1998), ^{131}I (MKacher *et al.*, 1996; Wuttke *et al.*, 1996; Gutierrez *et al.*, 1997), ^{89}Sr (Watanabe *et al.*, 1998) e do ^{153}Sm (da Silva *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2002) foram avaliados em linfócitos periféricos humanos. Efeitos genotóxicos do ^{90}Sr , uma fonte pura de partículas beta altamente energéticas ($E_{\text{máx}} = 2,27$ MeV, $E_{\text{méd}} = 1,13$ MeV) (Mill *et al.*, 1996) foram relatados por Vulpis & Scarpa (1986), Hall & Wells (1988), Mill *et al.* (1996) e Oliveira *et al.* (2001), por meio das técnicas de aberrações cromossômicas, micronúcleo e cometa em amostras sanguíneas humanas.

O radionuclídeo ^{90}Sr é produzido pela fissão do ^{235}U e tem meia-vida física de 28,15 anos (Shapiro, 1990). O ^{90}Sr decai por emissão beta ($E_{\text{máxima}} = 0,54$ MeV), transformando-se em ^{90}Y ($E_{\text{máxima}} = 2,27$ MeV) que também decai por emissão beta (Harley *et al.*, 1988). Assim, o ^{90}Sr e o ^{90}Y formam um sistema e são, portanto, uma fonte de partículas beta altamente energéticas ($E_{\text{máxima}} = 2,27$ MeV; $E_{\text{média}} = 1,13$ MeV). Uma partícula beta de ^{90}Sr de energia máxima tem poder de alcance da ordem de 10 mm nos tecidos moles (UNSCEAR, 1977; Shapiro, 1990).

1.1. Avaliação do dano ao DNA – Técnica do micronúcleo (MN)

Uma das manifestações celulares que tem sido objeto de estudos de muitos pesquisadores, diz respeito ao processo de reparo das lesões no DNA (Powell & Mcmillan, 1990; Wallace, 1998). As células ativam uma cascata de enzimas que levam a um bloqueio temporário nas fases G_1 e G_2 do ciclo celular (*checkpoints*), permitindo assim o reparo por meio de um sistema enzimático antes de entrar nas fases de síntese e de mitose, respectivamente, e dessa maneira, já com danos reparados, passam a funcionar como células viáveis (Smith *et al.*, 1994).

No entanto, danos não reparados ou erros no reparo, podem levar às conseqüências de grande significado para a célula e para os descendentes como, por exemplo, morte celular, mutação, envelhecimento precoce, malformação embrionária e desenvolvimento de câncer (Hall, 2000).

Segundo vários autores (Price, 1993; Olive, 1998), as quebras das fitas duplas do DNA são as lesões mais difíceis de serem reparadas dentre várias lesões radioinduzidas. Em nível citogenético, esses danos não reparados ou reparados erroneamente podem ser expressos em forma de aberrações cromossômicas na metáfase e micronúcleos na intérfase, parâmetros esses amplamente utilizados em vários sistemas biológicos na avaliação quantitativa de dano genético induzido pela radiação (Stap & Aten, 1990; Devi & Streffer, 1992).

Os testes citogenéticos utilizam células expostas aos mutagênicos e carcinogênicos e, após cultivo celular, permitem detectar agentes clastogênicos - que produzem quebras cromossômicas (técnica de aberrações cromossômicas e micronúcleos), agentes aneugênicos - que interferem no fuso mitótico, provocando alterações na distribuição dos cromossomos durante a divisão celular (técnica do micronúcleo) e agentes alquilantes que

interagem diretamente com o DNA formando adutos covalentes (técnica de troca de cromátides-irmãs).

A técnica convencional de aberrações cromossômicas é bastante utilizada no biomonitoramento de indivíduos expostos à radiação ionizante. Nessa técnica, os cromossomos são analisados na metáfase e as frequências de aberrações estruturais e numéricas são avaliadas. No entanto, observa-se a desvantagem de ser muito trabalhosa, o que pode limitar a sua aplicação em pesquisas populacionais, ou seja, em grande escala.

Como alternativa para avaliar o dano cromossômico, a técnica do micronúcleo (MN) foi desenvolvida inicialmente por Schmid (1975) em células da medula óssea de camundongos. Já Countryman & Heddle (1976) foram os primeiros a mostrar uma relação quantitativa entre a dose de radiação e a frequência de MN em linfócitos humanos.

Os micronúcleos aparecem após uma divisão nuclear e são originários de fragmentos cromossômicos sem centrômeros (fragmentos acêntricos) e/ou cromossomos inteiros que não foram incorporados pelos núcleos-filhos na anáfase. Na telófase, um envelope nuclear se forma envolvendo os cromossomos e os fragmentos, e esses assumem gradualmente a morfologia de um núcleo na intérfase, sendo bem menores que o núcleo principal, daí o termo micronúcleo. A indução de MN pode ocorrer em qualquer tipo celular, desde que esse passe por uma divisão celular.

No entanto, a técnica do MN inicialmente utilizada apresentava a desvantagem de não distinguir as células que já haviam passado por uma divisão daquelas que ainda não haviam se dividido, tornando a contagem dos MN pouco precisa.

Em 1985, Fenech & Morley contornaram essa situação usando a citocalasina B (cito-B), substância que age impedindo a formação dos microfilamentos que contraem o citoplasma entre os núcleos filhos durante a citocinese. Assim, as células que completam uma divisão nuclear são bloqueadas quanto a citocinese, adquirindo um aspecto

binucleado. É na fase binucleada que são contados os micronúcleos, ou seja, somente após uma divisão nuclear. A técnica foi chamada de método do bloqueio citocinético ("cytokinesis block method"). A cito-B é uma substância isolada do fungo *Helminthosporium dematoideum* e é um inibidor de polimerização de actina. Portanto, a cito-B impede a divisão do citoplasma, mas não a divisão do núcleo. Dessa forma, as células bloqueadas pela cito-B assumem um aspecto binucleado característico, aumentando consideravelmente a sensibilidade e validade deste método pela limitação da contagem dos micronúcleos apenas nas células binucleadas.

Dependendo do tempo de cultivo, as células submetidas à ação da cito-B, podem passar por mais de uma divisão nuclear, porém sem a divisão do citoplasma, dando origem a células multinucleadas com 3 ou 4 núcleos.

Essa técnica tem sido desenvolvida em células de mamíferos de diferentes tecidos e espécies e aplicada em dosimetria biológica (IAEA, 2001). Sua importância está no papel indicativo de que frequências elevadas de micronúcleo podem estar correlacionadas com o aumento do risco de desenvolver câncer ou doenças genéticas, visto que está intimamente relacionado com o dano não reparado e com várias alterações patológicas tardias como as neoplasias.

1.2. Morte celular

Um dos desafios em radiobiologia é entender como as células respondem ao estresse oxidativo resultante de exposição à radiação ionizante e, conseqüentemente, o destino posterior de células irradiadas, isto é, se elas morrem por apoptose ou necrose ou sobrevivem e se proliferam. Esses caminhos alternativos refletem em profundas implicações para o organismo como um todo.

A apoptose vem recebendo atenção especial nestes últimos anos em virtude da sua reconhecida importância na morfogênese, no desenvolvimento embrionário, na metamorfose, na homeostase celular, na carcinogênese e na terapia do câncer (Langley *et al.*, 1995). É uma estratégia adotada pelos organismos multicelulares para impedir a propagação de células indesejáveis ao organismo pois elas carregam mutações.

O termo apoptose ou "morte celular programada" foi introduzido por Kerr, Wyllie & Currie em 1972 e consiste na morte auto destrutiva da célula.

Este processo pode ser consequência de um controle fisiológico normal, ou pode ser induzido por estresse como, por exemplo, a privação de fatores de crescimento, algumas substâncias químicas, hipertermia e exposição às radiações ionizantes e ultravioleta. Essa forma de morte celular é mediada geneticamente, na qual sinais externos e internos estimulam a célula a produzir enzimas que a levam à morte.

A célula apoptótica é caracterizada por uma seqüência de eventos morfológicos como contração citoplasmática, cromatina condensada, evaginações na membrana citoplasmática e quebra do DNA mediada pela endonuclease em múltiplos fragmentos de aproximadamente 200 pares de bases. É um processo ativo e progressivo que envolve a substituição e eliminação de células danificadas indesejáveis, incluindo aquelas que podem eventualmente escapar do controle da divisão celular (Blank *et al.*, 1997).

Sabe-se que vários tipos celulares podem sofrer processo apoptótico após a exposição a diferentes tipos de radiação ionizante. Há vários trabalhos realizados com timócitos, células da cripta intestinal, células da glândula parótida, células de carcinomas, algumas linhagens celulares linfóides (Szumiel, 1994; Nakano & Shinohara, 1994; Hendry *et al.*, 1995, Shu-Zheng *et al.*, 1996) e em linfócitos humanos, tanto *in vitro* (Hertveldt *et al.*, 1997) como *in vivo* de pacientes submetidos à radioterapia fracionada (Delic *et al.*, 1995).

Muitos genes e cascatas enzimáticas interdependentes estão envolvidos na resposta celular à radiação ionizante. Para indução de morte ou proliferação celular é necessária a ativação simultânea de muitos genes. Os principais genes envolvidos na apoptose são p53, ATM, c-myc, bcl-2 e Bax, e os caminhos que levam a morte apoptótica podem ser divididos em p53-dependente e p53 - independente.

Já a necrose é uma forma passiva de morte celular que ocorre quando as células são irreversivelmente danificadas por extremos de temperatura ou pH, hipóxia, concentração tóxica de uma variedade de agentes, indução de dano na membrana celular ou trauma físico (Kirsch-Volders & Fenech, 2001).

A necrose pode ser caracterizada pela perda da integridade da membrana seguido de uma degradação não específica do DNA, sem formação de vesículas citoplasmáticas, lise de organelas e que usualmente resulta num processo inflamatório (Pouget & Mather, 2001).

Altas doses de radiação tendem a produzir necrose, enquanto baixas doses causam apoptose (Lennon *et al.*, 1991). A ocorrência de apoptose vai depender muito do tipo celular, e é induzida rapidamente por radiações de alto LET do que pela de baixo LET (Meijer *et al.*, 1998). As linhagens celulares de fibroblastos em cultura tem maior

probabilidade de morrer por um processo necrótico, enquanto as células de linhagens linfóide e mielóide morrem preferencialmente por apoptose (Radford *et al.*, 1994).

Por outro lado, existe uma outra modalidade de morte celular chamada morte mitótica ou reprodutiva (Szumiel, 1994) que consiste na perda da integridade reprodutiva de células irradiadas, embora morfológica, fisiológica e metabolicamente elas se apresentem normais e é observável somente em células proliferativas, por exemplo, "stem cells" do sistema hematopoiético, células do epitélio intestinal ou células em cultura. A morte reprodutiva é geralmente determinada pela perda da habilidade das células de formarem colônias (Langley *et al.*, 1995).

Essa modalidade de morte celular é relevante particularmente na radioterapia de tumor pois esse para ser erradicado dos tecidos, é necessário que as células malignas sejam "mortas" no sentido de que se tornem incapazes de se dividirem e de propagarem a malignidade (Hall, 2000).

1.3. Células de ovário de hamster Chinês (CHO)

Além da indução de morte celular como resposta ao agente agressor, as células irradiadas, portadoras de danos não reparados, podem sobreviver como células transformadas viáveis que podem ser as iniciadoras de um complexo processo de múltiplas etapas que pode culminar na indução do câncer (Blank *et al.*, 1997). No entanto, em vista do intervalo de tempo relativamente longo entre a indução de dano molecular pela radiação e a expressão de um fenótipo alterado, muitas vezes, é difícil estabelecer uma relação de causa e efeito.

Assim sendo, uma série de parâmetros tem sido adotados em várias linhagens celulares de mamíferos para averiguar diferentes manifestações de dano pela radiação, por exemplo, em células ovarianas de hamster Chinês, CHO (Hsie & Schenley, 1983) e V79 (Stap & Aten, 1990; Trott *et al.*, 1998), em células leucêmicas de camundongos L5178Y (Tauchi & Sawada, 1994) e em várias células humanas (Grosovsky & Little, 1983; Guo *et al.*, 1998).

Neste contexto, as células CHO têm sido apontadas como um sistema biológico adequado para o estudo da instabilidade genômica induzida por agentes físicos ou químicos. São células que apresentam uma série de características vantajosas, em relação, por exemplo, aos linfócitos humanos, amplamente utilizados nos ensaios de genotoxicidade (Dean & Danford, 1984). As células CHO pertencem a uma linhagem celular, geneticamente estabelecida (Roos *et al.*, 2000), e não se tornam senescentes com passagem por muitas gerações, ao contrário de células primárias.

As células CHO apresentam um bom crescimento em substrato sólido ou em suspensão com uma boa eficiência de clonagem, permitindo, portanto, que sejam semeadas com números conhecidos de células e facilmente contadas para a análise de morte

reprodutiva por meio do número de colônias formadas, o que é inviável com os linfócitos sanguíneos. Apresentam um cariótipo relativamente estável com $2n = 22 \pm 2$ cromossomos composto de metacêntricos e submetacêntricos (Ray & Mohandas, 1976). A taxa de crescimento é relativamente rápida com duração do ciclo celular de aproximadamente 12 a 14 horas (IAEA, 2001), que é significativamente mais curta que a de linfócitos humanos (em torno de 40 a 48 horas).

Essas e outras características inerentes das células CHO fazem deste tipo celular um sistema biológico bastante promissor nas mais diversas áreas de estudo, como, na engenharia genética, em carcinogênese, nos testes de mutagenicidade, citotoxicidade e genotoxicidade, entre outros.

Assim, há uma quantidade considerável de trabalhos publicados sobre efeitos citogenéticos da radiação γ (Johnston *et al.*, 1997; Guo *et al.*, 1997; Chapman *et al.*, 1999), raios-X (Johnston *et al.*, 1998; Tian *et al.*, 2002), partículas α (Nelson *et al.*, 1996; Trott *et al.*, 1998) e nêutrons (Schwartz *et al.*, 1991; Trott *et al.*, 1998). Todavia, há poucas informações sobre os efeitos da partícula β em células CHO, podendo mencionar, no entanto, os trabalhos de Dikomey & Franzke (1986) e Dikomey (1988) que analisaram morte celular e reparo de quebras nas fitas do DNA em células expostas às partículas β de ^3H timidina. Não há dados na literatura sobre o efeito do ^{90}Sr em células CHO-K1.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo analisar efeitos genotóxico e citotóxico de raios γ de ^{60}Co e partículas β de ^{90}Sr em células CHO-K1, utilizando como parâmetros:

- ✓ indução de morte reprodutiva pela análise de formação de colônias;
- ✓ indução de mortes necrótica e apoptótica;
- ✓ formação de micronúcleos.

A escolha desses parâmetros se justifica pelo seu significado biológico, além de serem prontamente observáveis e mensuráveis em células irradiadas. Os micronúcleos estão intimamente relacionados com danos não reparados, mais especificamente quebras na fita dupla do DNA, além de ser uma técnica relativamente simples, rápida e de boa sensibilidade.

A implementação de técnicas que permitam avaliar diferentes modalidades de morte celular (reprodutiva, necrótica e apoptótica) em linhagens celulares geneticamente estabelecidas como a CHO-K1, virá ampliar o conhecimento para melhor compreensão dos processos de dano e reparo, da necrose e da apoptose que estão diretamente relacionados com o envelhecimento celular e com o desenvolvimento de tumores.

Apesar de todas as aplicações da radiação beta em diversos campos, os efeitos em nível celular são pouco conhecidos. Dessa forma, o conhecimento dos efeitos biológicos da radiação beta é de grande importância.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento de todo o trabalho foi realizado no Departamento de Metrologia das Radiações (NM) e no Centro de Biologia Molecular (CBM) do IPEN-CNEN/SP.

3.1. Células CHO-K1

Foram utilizadas células CHO-K1, subclones de células de ovário de hamster Chinês (*Cricetulus griseus*), em fase exponencial de crescimento. As células foram mantidas em garrafas de cultura contendo meio RPMI 1640 (GIBCO), suplementado com 10% de soro fetal bovino (CULTILAB, Campinas - SP), acrescido de penicilina e estreptomicina (SIGMA) a 1%, sob a atmosfera de 5% de CO₂, a 37° C (FIGURA 1).

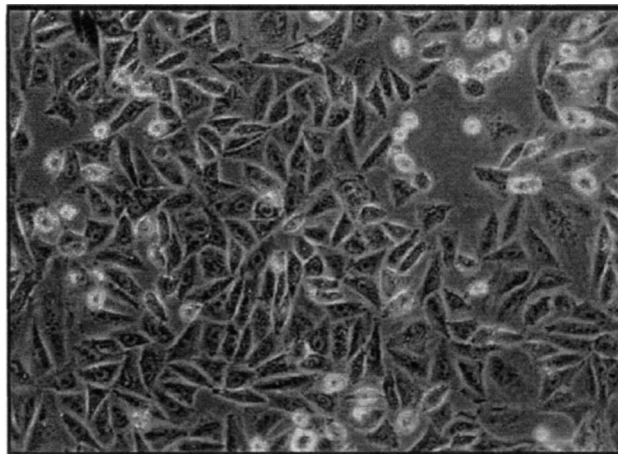


FIGURA 1 - Fotomicrografia de células CHO-K1 em cultura (10 x).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Condições de Irradiação

As células CHO-K1 suspensas em PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline) foram expostas à radiação γ de ^{60}Co , uma fonte do tipo panorâmico (YOSHIZAWA KIKO COMPANY Ltd.), com atenuador de chumbo de 70%, com taxa de dose de $0,34 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$, nas doses de 1,0; 2,5; 5,0 e 7,5 Gy, na presença de O_2 molecular e à temperatura ambiente. A calibração da fonte de ^{60}Co panorâmica foi realizada utilizando-se um dosímetro do tipo FRICKE/ALANINA (LABORATÓRIO DE DOSIMETRIA/MERCK) e a leitura realizada por espectrofotômetro (HITASHI 100-40).

Para a irradiação com partículas β , nas mesmas doses, foi utilizada uma fonte de $^{90}\text{Sr} / ^{90}\text{Y}$ ($E_{\text{máxima}} = 2,27\text{MeV}$; $E_{\text{média}} = 1,13\text{MeV}$) (AMERSHAM BUCHLER), fonte pura de partículas β altamente energéticas com taxa de dose de $0,23 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$.

A adaptação da fonte de ^{90}Sr , a montagem do sistema e a dosimetria física da fonte para a irradiação das células foram feitas pelo Departamento de Metrologia das Radiações do IPEN/CNEN - SP. A calibração da fonte foi realizada utilizando uma câmara de extrapolação 23391 (PT-FREIBURG).

Levando-se em consideração o pequeno poder de penetração das partículas β (1 m no ar e cerca de 1 a 3 mm nos tecidos moles) (Wootton, 1993), o aparato para a irradiação das células (FIGURAS 2 e 3) foi confeccionado em acrílico por apresentar densidade próxima à da água e similar ao do tecido biológico e por possuir baixo número atômico que impede a produção de raios-X secundários quando da interação com a partícula β .

O aparato é formado por duas partes: uma para o encaixe da fonte de ^{90}Sr e uma gaveta na parte inferior, onde as células foram acondicionadas em dispositivos

confeccionados em "nylon" (7 mm de altura X 25 mm de diâmetro) formando uma fina camada de células (cerca de 1 mm) foram colocadas, para que no momento da irradiação, estas estivessem posicionadas exatamente embaixo da fonte, sendo que a distância entre a fonte e as células era de 41,6 mm.

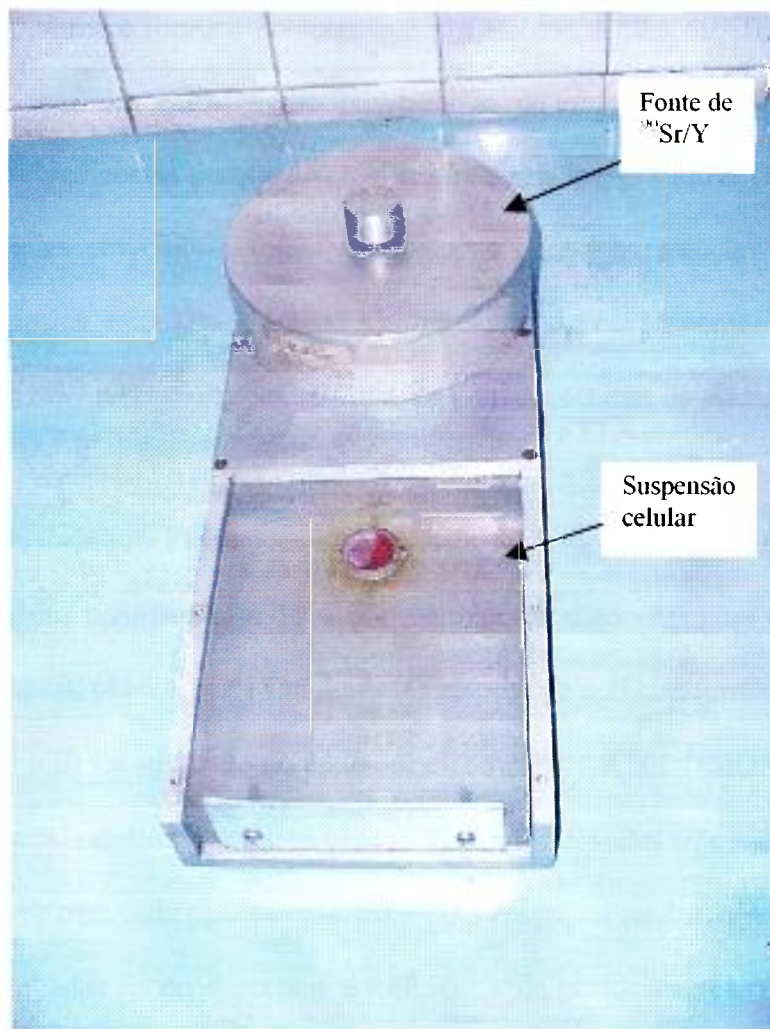


FIGURA 2 - Irradiador de amostras biológicas com fonte de $^{90}\text{Sr}/\text{Y}$.

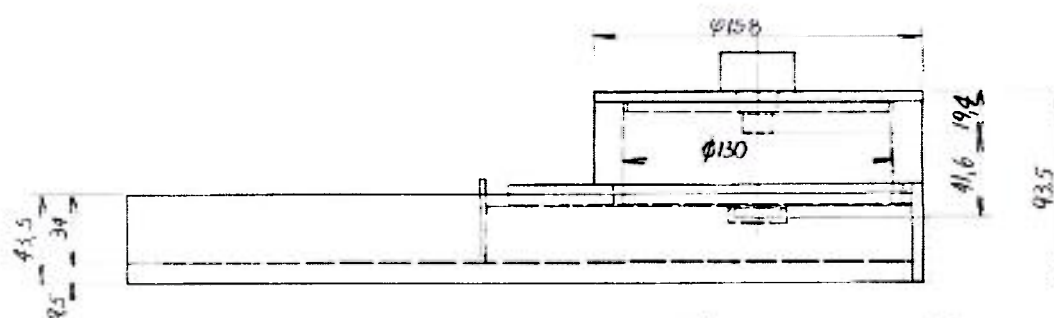


FIGURA 3 - Esquema do aparato utilizado para a irradiação das células com partículas β de ^{90}Sr (medidas em mm - vista transversal).

3.2.2. Teste de formação de colônias

A eficiência de plaqueamento e a fração de sobrevivida celular foram determinadas pelo teste convencional de formação de colônias. Neste teste as células semeadas viáveis se dividem várias vezes e formam colônias que são visíveis a olho nu. Todas as células que formam cada uma das colônias são provenientes de uma única célula ancestral e são chamadas de sobreviventes porque mantêm sua integridade reprodutiva (Hall, 2000).

As células em cultura foram tripsinizadas com uma solução de tripsina-EDTA (0,25% de tripsina e 0,02% de EDTA), irradiadas numa suspensão de 3 a 4 x 10⁴ células/mL de PBS e semeadas numa placa de Petri de 60 mm de diâmetro, contendo 300 células/placa. As placas foram incubadas sob a atmosfera de 5% de CO₂, a 37°C por cerca de 10 a 14 dias após as irradiações onde o meio foi removido e as células foram lavadas com PBS, fixadas com formol a 10% por 30 minutos e coradas com Giemsa a 20% em solução fisiológica, pH 6,8 por 15 minutos. O número de colônias formadas para cada dose de radiação (γ e β) foi analisado no contador de colônias CP 600 (PHOENIX). As colônias com menos de 50 células foram desprezadas. Foram executados três ensaios independentes para cada dose e para cada tipo de radiação e cada ensaio foi realizado em triplicata.

Os resultados foram expressos em eficiência de plaqueamento (EP) e em fração de sobrevivida (FS), segundo fórmulas descritas por Hall (2000):

$$EP = (\text{número de colônias contadas} / \text{número de células semeadas}) \times 100$$

$$FS = (\text{número de colônias contadas} / \text{número de células semeadas}) \times (EP_{\text{controle}} / 100)$$

3.2.3. Técnica de coloração diferencial

Para a análise citotóxica dos tratamentos com ^{60}Co e ^{90}Sr foi utilizado o método de coloração diferencial descrito por Gorman *et al.* (1996) que se baseia fundamentalmente na capacidade das células de incorporar ou não corantes fluorescentes de DNA, além dos sinais morfológicos característicos de apoptose e necrose. A avaliação foi feita nos diferentes tempos após as exposições, isto é, 24, 48, 72 e 96 horas com várias doses de radiação (1,0; 2,5; 5,0 e 7,5 Gy).

Para tanto, 1 μL das soluções estoques de corantes fluorescentes de DNA, acridina orange (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e brometo de etídio (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (v/v 1:1) foi adicionado a 25 μL de suspensão celular de CHO-K1 (10^6 células/mL de PBS). A mistura foi homogeneizada, permanecendo por 2 minutos a temperatura ambiente. A seguir, 10 μL dessa suspensão celular foram pipetados em lâminas histológicas previamente siliconizadas (solução a 2% de dimetildiclorosilano em 1,1,1-tricloroetano) cobertas com lamínulas e examinadas ao microscópio.

Essa técnica permite através da coloração diferencial, detectar não só as células apoptóticas nas fases inicial e tardia, que se coram em verde com a cromatina condensada e em vermelho com cromatina fragmentada, respectivamente, assim como as células viáveis (coradas em verde com a cromatina organizada) e necróticas (coradas em vermelho com a cromatina organizada).

As células tornam-se esverdeadas, pois a membrana plasmática permanece íntegra e permeável somente à acridine-orange. Adquirem a coloração avermelhada quando ocorre a perda da integridade da membrana plasmática, tornando-se permeável ao brometo de etídio e à acridine orange.

Foram realizados três ensaios independentes para cada tipo de radiação, γ e β , onde cerca de 500 células foram analisadas para cada dose e nos diferentes tempos após as exposições (24, 48, 72 e 96 horas).

3.2.4. Técnica do micronúcleo (MN)

Para a detecção dos micronúcleos (MN) foi utilizado o método do bloqueio citocinético proposto por Fenech & Morley (1986), utilizando a citocalasina B. Neste método, os MN são contados apenas nas células que completaram uma divisão nuclear, após as irradiações. Essas células são reconhecidas pela sua aparência binucleada depois do bloqueio da citocinese pela citocalasina-B.

Para a obtenção de células binucleadas foi adotado o procedimento descrito por Guo *et al.* (1998) em células tumorais humanas e em linhagens celulares de roedores. As células CHO-K1 ($3 - 4 \times 10^4$ células/mL de PBS) foram irradiadas com ^{60}Co e ^{90}Sr e foram semeadas em placas de Petri de 60 mm de diâmetro contendo 5mL de meio de cultura RPMI 1640 (GIBCO), suplementado com 10% de soro fetal bovino (CULTILAB), acrescido de penicilina e estreptomicina (SIGMA). Imediatamente após as exposições, adicionou-se citocalasina B (SIGMA) na concentração final de 2 $\mu\text{g/mL}$. Após 48 horas de cultivo, as células foram tripsinizadas, transferidas para tubos Falcon com capacidade para 15 mL, lavadas com PBS e fixadas com ácido acético e metanol (1:3), adicionando 5 ml da solução fixadora a cada centrifugação (3 vezes). Finalmente, as suspensões celulares foram gotejadas em lâminas histológicas e fixadas a 65°C numa atmosfera úmida e coradas com Giemsa (10%) em tampão Sorensen pH 6,8 por 15 minutos.

Os MN foram identificados segundo critérios adotados por Countryman & Heddle (1976): os MN foram contados somente em células com citoplasma preservado, não confluentes, no mesmo plano focal, apresentando diâmetro de até 1/3 e com a mesma coloração do núcleo principal. Foi levado em consideração somente células binucleadas (CB) contendo até 5 MN. Para cada dose de radiação (γ e β) foram analisadas cerca de 500

células binucleadas, contando-se também células mono (CM) e multinucleadas (Cmu) para o cálculo do índice de proliferação (IP) (Eastmond & Tucker, 1989):

$$\text{I.P.} = (\text{número de CM} + 2 \cdot \text{número de CB} + 3 \cdot \text{número de Cmu}) / \text{total de células}$$

Foram realizados três ensaios independentes para cada tipo de radiação (^{60}Co e ^{90}Sr).

3.2.5. Análise das lâminas

A análise das lâminas para o teste de coloração diferencial foi realizada no microscópio de fluorescência CARL ZEISS com filtro de excitação DAPI/FITC/TEXAS RED (400, 495, 570) e filtro de barreira TBP (410, 505, 585) sob aumento de 400 vezes. Para o teste do micronúcleo, a análise das lâminas citogenéticas foi realizada no microscópio óptico CARL ZEISS, também no aumento de 400 vezes.

3.2.6. Análise estatística

Todas as análises estatísticas dos dados obtidos com células CHO-K1 foram realizadas com auxílio do programa *GraphPad Prism* versão 2.0.

As curvas de sobrevivência de células irradiadas com ^{60}Co e ^{90}Sr foram ajustadas pelo modelo linear-quadrático, $Y = a + bD + cD^2$, onde Y é a fração de sobrevivência; a , b e c são constantes do modelo e D é a dose de radiação em gray (Gy).

As curvas dose-resposta obtidas para os dados de coloração diferencial (células necróticas e apoptóticas) e para os dados de micronúcleos foram ajustadas pelo modelo de regressão linear, $Y = a + bD$, onde Y é a frequência de MN ou morte celular.

Tanto as frequências basais de MN como as radioinduzidas bem como os índices de proliferação nas diferentes doses foram comparados entre os dois tipos de radiação pelo teste não paramétrico *Mann Whitney* e teste F com intervalo de confiança de 95%. O valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo.

Para a comparação de frequências basais de células necróticas e apoptóticas obtidas com ^{60}Co e ^{90}Sr , nos diferentes tempos de incubação foi utilizado o teste não paramétrico ANOVA.

4. RESULTADOS

4.1. Averiguação de morte reprodutiva pela formação de colônias

Os resultados dos experimentos sobre a formação de colônias em CHO-K1 após os tratamentos com raios gama e partículas beta estão expressos nas TABELAS 1 e 2, respectivamente.

A eficiência de plaqueamento (EP) foi relativamente alta que, no entanto, diminuiu com o aumento da dose, tanto para radiação gama quanto para partículas beta.

A FIGURA 4 mostra as curvas de sobrevivência para ^{60}Co e ^{90}Sr , determinadas pelo teste de formação de colônias, com “shoulder” característico na região de baixas doses que tendem a uma exponencial à medida que aumenta a dose de radiação. As duas curvas foram ajustadas pelo modelo linear-quadrático. As equações das curvas para ^{60}Co e ^{90}Sr , onde Y é a fração de sobrevivência e D a dose em gray, se mostraram similares.

$$Y = (0,9809 \pm 0,0549) - (0,180 \pm 0,040)D + (0,008 \pm 0,005)D^2 \text{ para } ^{60}\text{Co}$$

$$Y = (0,9568 \pm 0,0316) - (0,165 \pm 0,023)D + (0,006 \pm 0,003)D^2 \text{ para } ^{90}\text{Sr}$$

Os valores do R^2 obtidos ($R^2 = 0,9192$ para ^{60}Co e $R^2 = 0,9689$ para ^{90}Sr) mostraram que os dados se ajustaram adequadamente ao modelo.

TABELA 1 - Eficiência de plaqueamento e fração de sobrevivida das células CHO-K1 após a irradiação com ^{60}Co .

Tipo de Radiação	Dose (Gy)	Número do Experimento	Número de colônias contadas	Média \pm DP	Eficiência de Plaqueamento (%)	Média \pm DP	Fração de sobrevivida (FS)	Média \pm DP
^{60}Co	0	1	260,7		86,9		1,00	
		2	291,0	266,7 \pm 22,0	97,0	88,9 \pm 7,3	1,00	1,00 \pm 0,00
		3	248,3		82,8		1,00	
	1,0	1	241,0		80,3		0,92	
		2	186,4	211,6 \pm 27,5	62,2	70,5 \pm 9,2	0,64	0,80 \pm 0,15
		3	207,3		69,1		0,83	
	2,5	1	186,3		62,1		0,71	
		2	129,0	146,0 \pm 35,0	43,0	48,7 \pm 11,7	0,44	0,55 \pm 0,14
		3	122,7		40,9		0,49	
5,0	1	104,0		34,7		0,40		
	2	36,0	81,2 \pm 39,2	12,0	27,1 \pm 13,1	0,12	0,31 \pm 0,16	
	3	103,7		34,6		0,42		
7,5	1	13,3		4,4		0,05		
	2	15,0	14,0 \pm 0,9	5,0	4,7 \pm 0,3	0,05	0,05 \pm 0,00	
	3	13,7		4,6		0,06		

EP = (número de colônias contadas / número de células semeadas) X 100

FS = (número de colônias contadas / número de células semeadas) X (EPcontrole / 100)

TABELA 2 - Eficiência de plaqueamento e fração de sobrevivência das células CHO-K1 após a irradiação com ⁹⁰Sr.

Tipo de Radiação	Dose (Gy)	Número do Experimento	Número de colônias contadas	Média ± DP	Eficiência de Plaqueamento (%)	Média ± DP	Fração de sobreviventes (FS)	Média ± DP
⁹⁰ Sr	0	1	270,0		90,0		1,00	
		2	272,0	270,9 ± 1,0	90,7	90,3 ± 0,3	1,00	1,00 ± 0,00
		3	270,7		90,2		1,00	
	1,0	1	214,0		71,3		0,79	
		2	202,7	201,8 ± 12,7	67,6	67,3 ± 4,2	0,75	0,74 ± 0,05
		3	188,7		62,9		0,70	
	2,5	1	184,3		61,4		0,68	
		2	132,7	152,9 ± 27,6	44,2	51,0 ± 9,2	0,49	0,56 ± 0,10
		3	141,7		47,2		0,52	
5,0	1	97,3		32,4		0,36		
	2	85,7	92,7 ± 6,1	28,6	30,9 ± 2,0	0,32	0,34 ± 0,02	
	3	95,0		31,7		0,35		
7,5	1	19,0		6,3		0,07		
	2	19,0	18,0 ± 1,7	6,3	6,0 ± 0,6	0,07	0,07 ± 0,01	
	3	16,0		5,3		0,06		

EP = (número de colônias contadas / número de células semeadas) X 100

FS = (número de colônias contadas / número de células semeadas) X (EP controle / 100)

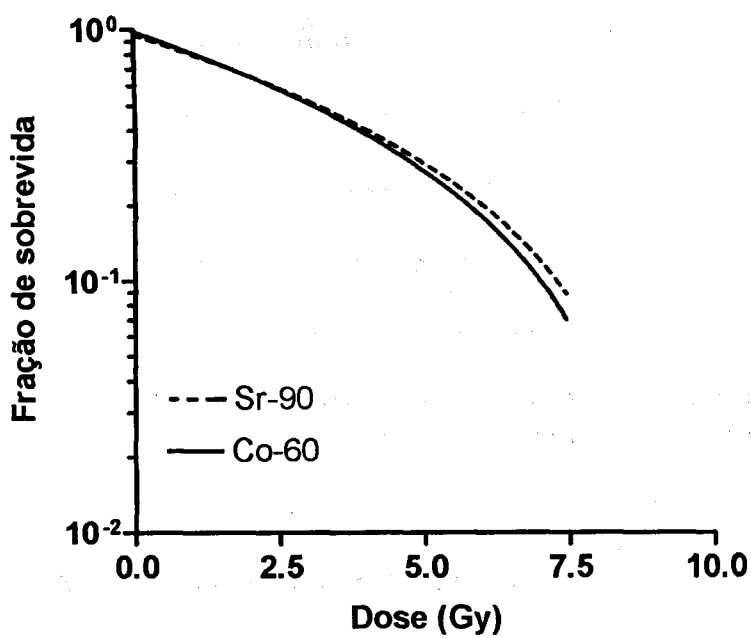


FIGURA 4 - Curvas de sobrevivência de células CHO-K1, irradiadas com diferentes doses de radiação γ de ^{60}Co e β de ^{90}Sr . As curvas foram ajustadas ao modelo linear-quadrático ($Y = a + bD + cD^2$).

4.2. Averiguação da indução de micronúcleos (MN)

A FIGURA 5 mostra uma célula CHO-K1 binucleada, decorrente do tratamento com Citocalasina B, apresentando dois micronúcleos no citoplasma, resultantes da irradiação com 2,5 Gy de ^{60}Co .

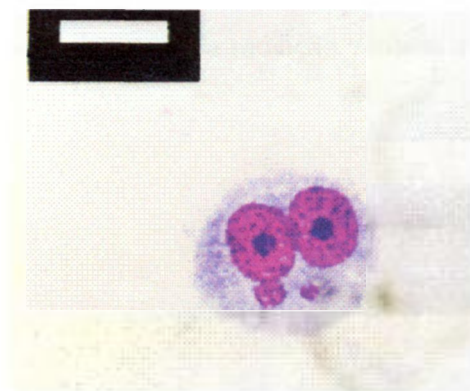


FIGURA 5 - Fotomicrografia de célula de CHO-K1 binucleada com 2 micronúcleos, irradiada com 2,5 Gy de ^{60}Co . O retângulo à esquerda mede 10 micrometros.

As TABELAS 3 e 4 expressam os dados referentes às frequências e à distribuição de MN induzidos pelas radiações γ e β , respectivamente, em células binucleadas de CHO-K1. A representação gráfica dos dados referentes a indução de MN está apresentada na FIGURA 6.

As curvas dose-resposta obtidas após a exposição com ^{60}Co e ^{90}Sr , melhor se ajustaram ao modelo de regressão linear. Pode-se verificar que tanto a proporção de células danificadas (células micronucleadas) como a magnitude de lesões radioinduzidas, demonstrada pela análise de distribuição de micronúcleos, isto é, células menos danificadas (contendo somente um MN) e mais severamente danificadas (contendo vários MN) foram significativamente mais altas em células irradiadas com ^{60}Co do que com ^{90}Sr . A análise estatística mostrou que as curvas de indução de MN pelos dois tipos de radiação diferem entre si ($p < 0,001$). Os valores dos coeficientes do modelo estão representados na TABELA 5 com seus respectivos valores do R^2 .

Os valores basais de células contendo 1 ou mais MN bem como o número de MN/célula binucleada estão apresentados na TABELA 6. A análise estatística mostrou que não há diferença significativa entre os valores basais nos dois experimentos (^{60}Co e ^{90}Sr).

A TABELA 7 e a FIGURA 7 mostram os índices de proliferação obtidos a partir das frequências de células mono, bi e multinucleadas encontradas em células irradiadas com ^{60}Co e ^{90}Sr , os quais não diferiram estatisticamente entre si ($P = 0,12$). Isso significa que, sob condições similares de cultivo celular, tanto a radiação γ como a partícula β não interferem na cinética da proliferação celular.

TABELA 3 – Frequência e distribuição de micronúcleos (MN) em células binucleadas (CB) de CHO-K1 irradiadas com ^{60}Co .

Tipo de radiação	Número do experimento	Dose (Gy)	Total de CB analisadas	CB com MN					Número de CB com 1MN com IMN (%)	Número de CB com 2 ou mais MN (%)	Número de CB com MN (%)	Número total de MN (MN/CB)
				1	2	3	4	5				
$\gamma^{60}\text{Co}$	1	0,0	500	34	8	3	0	0	34 (6,80)	11 (2,20)	45 (9,00)	59 (0,118)
		1,0	501	100	34	15	1	0	100 (19,96)	50 (9,98)	150 (29,94)	217 (0,433)
		2,5	500	105	54	8	2	2	105 (21,00)	66 (13,20)	171 (34,20)	255 (0,510)
		5,0	500	114	58	23	6	4	114 (22,80)	91 (18,20)	205 (41,00)	343 (0,686)
		7,5	501	140	112	26	9	2	140 (27,94)	149 (29,74)	289 (57,68)	488 (0,974)
	2	0,0	500	29	0	1	0	0	29 (5,80)	1 (0,20)	30 (6,00)	32 (0,064)
		1,0	500	93	15	2	0	0	93 (18,60)	17 (3,40)	110 (22,00)	129 (0,258)
		2,5	433	109	18	5	0	0	109 (25,17)	23 (5,31)	132 (30,48)	160 (0,370)
		5,0	500	128	51	13	4	5	128 (25,60)	73 (14,60)	201 (40,20)	310 (0,620)
		7,5	500	122	65	23	5	5	122 (24,40)	98 (19,60)	220 (44,00)	366 (0,732)
	3	0,0	502	23	11	0	0	0	23 (4,58)	11 (2,19)	34 (6,77)	45 (0,090)
		1,0	507	58	19	3	1	0	58 (11,44)	23 (4,54)	81 (15,98)	109 (0,215)
		2,5	500	74	24	5	3	0	74 (14,80)	32 (6,40)	106 (21,20)	149 (0,298)
		5,0	508	122	46	13	4	1	122 (24,02)	64 (12,60)	186 (36,61)	274 (0,539)
		7,5	505	113	58	27	5	5	113 (22,38)	95 (18,81)	208 (41,19)	355 (0,703)
Média ± DP	0,0	1502	86	19	4	0	0	86 (5,73 ± 1,11)	23 (1,53 ± 1,15)	109 (7,26 ± 1,56)	136 (0,091 ± 0,027)	
	1,0	1508	251	68	20	2	0	251 (16,67 ± 4,58)	90 (5,97 ± 3,52)	341 (22,64 ± 7,00)	455 (0,302 ± 0,115)	
	2,5	1433	288	96	18	5	2	288 (20,32 ± 5,22)	121 (8,30 ± 4,28)	409 (28,63 ± 6,70)	564 (0,393 ± 0,108)	
	5,0	1508	364	155	49	14	10	364 (24,14 ± 1,40)	228 (15,13 ± 2,84)	592 (39,27 ± 2,34)	927 (0,615 ± 0,074)	
	7,5	1506	375	235	76	19	12	375 (24,91 ± 2,81)	342 (22,72 ± 6,10)	717 (47,62 ± 8,82)	1209 (0,803 ± 0,149)	

TABELA 4 - Frequência e distribuição de micronúcleos (MN) em células binucleadas (CB) de CHO-K1 irradiadas com ⁹⁰Sr.

Tipo de radiação	Número do experimento	Dose (Gy)	Total de CB analisadas	CB com MN					Número de CB com IMN (%) com MN (%)	Número de CB com 2 ou mais MN (%)	Número total de MN (MN/CB)	
				1	2	3	4	5				
β ⁹⁰ Sr	1	0,0	494	36	9	1	1	0	36 (7,29)	11 (2,23)	47 (9,51)	61 (0,123)
		1,0	503	59	26	4	5	0	59 (11,73)	35 (6,96)	94 (18,69)	143 (0,284)
		2,5	501	99	46	9	2	0	99 (19,76)	57 (11,38)	156 (31,14)	226 (0,451)
		5,0	500	115	77	24	10	2	115 (23,00)	113 (22,60)	228 (45,60)	391 (0,782)
		7,5	405	127	66	23	9	3	127 (31,36)	101 (24,94)	228 (56,30)	379 (0,936)
		0,0	504	25	4	0	0	0	25 (4,96)	4 (0,79)	29 (5,75)	33 (0,065)
2	1,0	502	42	18	12	2	0	42 (8,37)	32 (6,37)	74 (14,74)	122 (0,243)	
	2,5	501	66	19	10	1	1	66 (13,17)	31 (6,19)	97 (19,36)	143 (0,285)	
	5,0	507	60	41	12	2	1	60 (11,83)	56 (11,05)	116 (22,88)	191 (0,377)	
	7,5	510	75	27	18	4	2	75 (14,71)	51 (10,00)	126 (24,71)	209 (0,410)	
	0,0	503	21	6	0	0	0	21 (4,17)	6 (1,19)	27 (4,17)	33 (0,066)	
	1,0	535	49	9	4	0	0	49 (9,16)	13 (2,43)	62 (9,16)	79 (0,148)	
3	2,5	518	77	19	6	0	0	77 (14,86)	25 (4,83)	102 (14,86)	133 (0,257)	
	5,0	504	84	33	18	2	4	84 (16,67)	57 (11,31)	141 (16,67)	232 (0,460)	
	7,5	528	151	71	24	8	6	151 (28,60)	109 (20,64)	260 (28,60)	427 (0,809)	
	0,0	1501	82	19	1	1	0	103 (6,48 ± 2,74)	82 (5,47 ± 1,62)	21 (1,40 ± 0,74)	127 (0,085 ± 0,033)	
	1,0	1540	150	53	20	7	0	230 (14,2 ± 4,79)	150 (9,75 ± 1,76)	80 (5,25 ± 2,46)	344 (0,225 ± 0,070)	
	2,5	1520	242	84	25	3	1	355 (21,79 ± 8,41)	242 (15,93 ± 3,42)	113 (7,47 ± 3,46)	502 (0,331 ± 0,105)	
Média ± DP	5,0	1511	259	151	54	14	7	485 (28,38 ± 15,23)	259 (17,17 ± 5,60)	226 (14,99 ± 6,59)	814 (0,540 ± 0,214)	
	7,5	1443	353	164	65	21	11	614 (36,54 ± 17,23)	353 (24,89 ± 8,92)	261 (18,53 ± 7,69)	1015 (0,718 ± 0,274)	

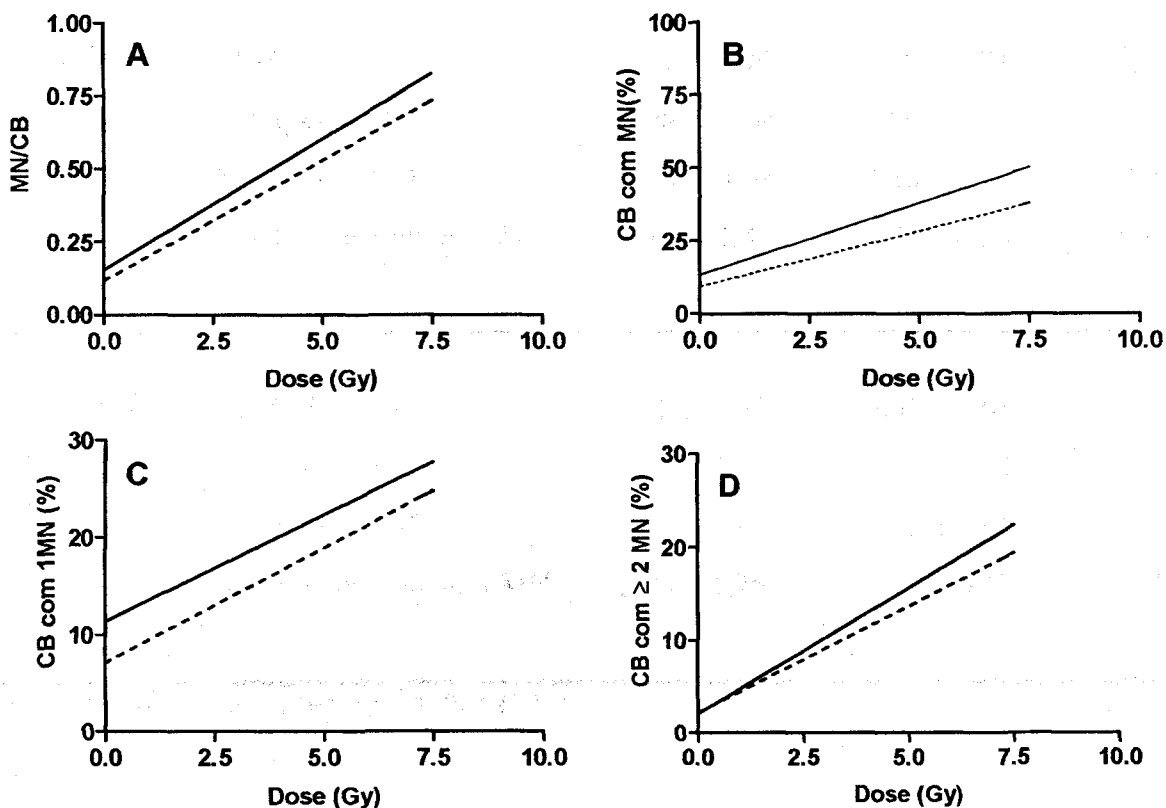


FIGURA 6 - Curvas dose-resposta ajustadas pelo modelo de regressão linear para indução de micronúcleos (MN) em células binucleadas (CB) de CHO-K1 após a exposição com ^{60}Co (—) e ^{90}Sr (---). A = número de MN/CB; B = número de células binucleadas com MN; C = número de células binucleadas com um MN e D = número de células binucleadas com dois ou mais MN.

TABELA 5 - Estimativa dos coeficientes do modelo de regressão linear utilizados para o ajuste das curvas dose-resposta para a indução de micronúcleos em células CHO-K1 irradiadas com ^{60}Co e ^{90}Sr .

Experimento	Parâmetro	A	B	R ²
γ ^{60}Co	MN/CB	0,15 ± 0,04	0,09 ± 0,01	0,87
	% CB com MN	13,44 ± 2,66	4,89 ± 0,63	0,82
	% CB com 1 MN	11,38 ± 1,96	2,18 ± 0,46	0,63
	% CB com 2 ou mais MN	2,06 ± 1,40	2,71 ± 0,33	0,84
β ^{90}Sr	MN/CB	0,12 ± 0,06	0,08 ± 0,01	0,73
	% CB com MN	9,31 ± 3,49	4,64 ± 0,83	0,71
	% CB com 1 MN	7,11 ± 1,91	2,35 ± 0,45	0,67
	% CB com 2 ou mais MN	2,20 ± 1,76	2,29 ± 0,42	0,70

Mann Whitney gama x beta $p < 0,001$ (***)

TABELA 6 - Frequências basais de células binucleadas de CHO-K1 com micronúcleos (MN) nos experimentos com ^{60}Co e ^{90}Sr .

Experimento	CB com MN (%)	CB com 1 MN (%)	CB com 2 ou mais MN (%)	MN/CB
γ ^{60}Co	7,26 ± 1,56	5,73 ± 1,11	1,53 ± 1,15	0,091 ± 0,027
β ^{90}Sr	6,48 ± 2,74	5,47 ± 1,62	1,40 ± 0,74	0,085 ± 0,033

Mann Whitney gama x beta (n.s.)= não significativo

TABELA 7 - Frequências de células mono, bi e multinucleadas e índice de proliferação encontradas em células CHO-K1 obtidas 48h após as irradiações com ^{60}Co e ^{90}Sr .

Experimento	Dose (Gy)	Células Mononucleadas (%)	Células Binucleadas (%)	Células Multinucleadas (%)	Índice de Proliferação
γ ^{60}Co	0,0	48,39 ± 11,57	47,86 ± 8,62	3,75 ± 2,97	1,55 ± 0,14
	1,0	46,41 ± 6,68	47,82 ± 4,46	5,77 ± 2,55	1,59 ± 0,09
	2,5	43,53 ± 5,84	48,13 ± 3,19	8,35 ± 2,94	1,65 ± 0,08
	5,0	41,04 ± 9,31	50,17 ± 7,59	8,78 ± 2,17	1,68 ± 0,11
	7,5	44,86 ± 4,46	42,80 ± 3,17	12,35 ± 1,46	1,67 ± 0,06
β ^{90}Sr	0,0	42,71 ± 10,29	54,53 ± 8,89	2,76 ± 1,74	1,60 ± 0,12
	1,0	45,09 ± 12,98	51,73 ± 11,67	3,18 ± 1,33	1,58 ± 0,14
	2,5	49,84 ± 5,97	46,92 ± 4,37	3,28 ± 2,40	1,54 ± 0,08
	5,0	48,98 ± 14,28	46,76 ± 12,21	4,26 ± 2,08	1,55 ± 0,16
	7,5	49,71 ± 9,86	45,98 ± 7,69	4,32 ± 2,24	1,55 ± 0,12

Teste Mann-Whitney, gama x beta, $P = 0,12$ (n.s.)

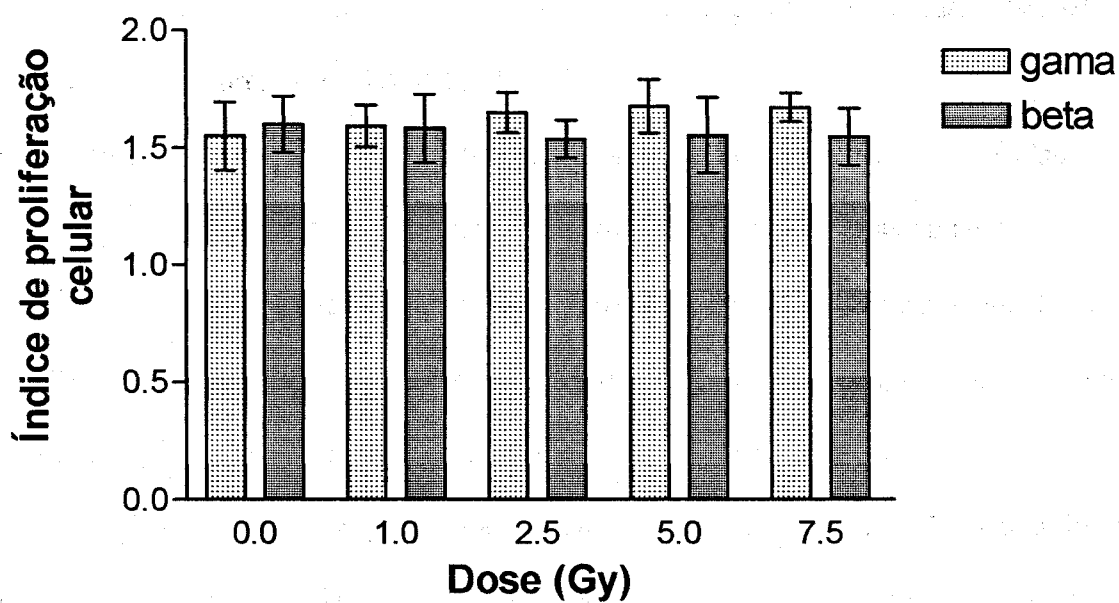


FIGURA 7 - Histograma mostrando índices de proliferação celular obtidos 48h após as irradiações com ^{60}Co e ^{90}Sr .

4.3. Averiguação de apoptose e necrose pela técnica de coloração diferencial

Nesse experimento foram avaliadas viabilidade e mortes celulares, necrótica e apoptótica, em células CHO-K1 irradiadas, por meio da técnica de coloração diferencial. Os dados obtidos estão ilustrados nas TABELAS 8 e 9, para ^{60}Co e ^{90}Sr , respectivamente. A FIGURA 8 mostra as curvas dose-resposta ajustadas para indução de morte celular pelos dois tipos de radiação, nos diferentes tempos após as exposições (24 a 96 horas). Os coeficientes das curvas estão expressos na TABELA 10.

Tanto para amostras irradiadas com ^{60}Co como com ^{90}Sr , a viabilidade celular diminuiu gradativamente, ao passo que o número de células necróticas aumentou em função da dose de radiação. Pode-se verificar que a partícula β foi mais danificante que a radiação γ em células CHO-K1 ($P < 0,001$) em todos os intervalos de tempo analisados após as exposições, induzindo mais morte necrótica, afetando a viabilidade celular.

Já em relação a apoptose, somente uma fração muito pequena de células irradiadas morrem por esse processo ($< 1,5\%$), mostrando, de um modo geral, uma ligeira tendência ao aumento em função da dose de radiação. Os dados obtidos indicam que a apoptose não é a principal modalidade de morte em células CHO-K1 frente ao insulto genotóxico.

Na TABELA 11 estão sumarizados os valores basais de células viáveis, necróticas e apoptóticas encontrados em amostras não irradiadas em função do tempo de incubação. Houve uma pequena oscilação nas porcentagens de células viáveis ($81,5 \pm 3,1$ a $85,7 \pm 5,1\%$ para os experimentos com ^{60}Co e $80,4 \pm 0,5$ a $82,1 \pm 3,1\%$ com ^{90}Sr) e de células necróticas ($13,4 \pm 4,8$ a $18,1 \pm 2,8\%$ para os experimentos com ^{60}Co e $17,9 \pm 3,1$ a $19,1 \pm 2,0\%$ com ^{90}Sr), não havendo diferença estatisticamente significativa entre os diferentes tempos de incubação, o que indica que o período de incubação não interferiu na viabilidade e na indução

de morte celular necrótica. Houve uma diferença estatisticamente significativa somente em relação a células apoptóticas nos experimentos com ^{90}Sr ($P = 0,02$).

A TABELA 12 e a FIGURA 9 expressam a relação entre células micronucleadas e necróticas, 48 horas após as irradiações. Pode-se verificar que as frequências de células micronucleadas foram mais altas em amostras irradiadas com ^{60}Co ($P = 0,002$), enquanto que as frequências de células necróticas foram mais elevadas, em amostras expostas com ^{90}Sr ($P = 0,02$). No entanto, quando se analisam conjuntamente esses dois parâmetros, tanto o ^{60}Co como o ^{90}Sr produziram, aparentemente, proporções similares de células afetadas ($P = 0,71$) em função da dose de radiação.

TABELA 8 - Frequências de células viáveis, necróticas e apoptóticas avaliadas pela técnica de coloração diferencial em células CHO-K1 irradiadas com raios γ de ^{60}Co .

Tipo de radiação	Tempo após a irradiação	Dose (Gy)	Total de células analisadas	Viabilidade			Necrose			Apoptose		
				Total de células viáveis	% viáveis	Total de células necróticas	% necróticas	Total de células apoptóticas	% apoptóticas			
				Média \pm DP	Média \pm DP	Média \pm DP	Média \pm DP	Média \pm DP				
$\gamma^{60}\text{Co}$	24 h	0,0	1515	1298	85,7 \pm 5,1	203	13,4 \pm 4,8	14	0,9 \pm 0,9			
		1,0	1516	1233	81,3 \pm 5,9	269	17,8 \pm 5,7	14	0,9 \pm 0,6			
		2,5	1518	1183	77,9 \pm 8,5	316	20,8 \pm 8,0	19	1,3 \pm 1,0			
		5,0	1520	1088	71,5 \pm 12,5	411	27,1 \pm 11,8	21	1,4 \pm 1,1			
		7,5	1511	966	63,9 \pm 15,5	523	34,6 \pm 15,1	22	1,5 \pm 1,3			
	48 h	0,0	1518	1262	83,1 \pm 5,2	238	15,7 \pm 4,7	18	1,2 \pm 0,9			
		1,0	1519	1254	82,5 \pm 6,3	247	16,3 \pm 6,0	18	1,2 \pm 0,5			
		2,5	1522	1195	78,5 \pm 5,9	318	20,9 \pm 5,9	9	0,6 \pm 0,5			
		5,0	1510	1139	75,4 \pm 6,8	363	24,1 \pm 6,5	8	0,5 \pm 0,4			
		7,5	1516	1063	70,1 \pm 11,8	436	28,8 \pm 11,5	17	1,1 \pm 0,4			
	72 h	0,0	1528	1245	81,5 \pm 3,1	277	18,1 \pm 2,8	6	0,4 \pm 0,4			
		1,0	1516	1150	75,9 \pm 3,1	354	23,3 \pm 2,6	12	0,8 \pm 0,7			
2,5		1510	1074	71,1 \pm 4,6	423	28,0 \pm 4,3	13	0,9 \pm 0,7				
5,0		1526	1084	71,0 \pm 3,8	421	27,6 \pm 3,4	21	1,4 \pm 0,8				
7,5		1511	1054	69,7 \pm 3,3	448	29,7 \pm 3,2	9	0,6 \pm 0,5				
96 h	0,0	1527	1251	81,9 \pm 5,6	267	17,5 \pm 5,6	9	0,6 \pm 0,3				
	1,0	1518	1184	78,0 \pm 6,1	332	21,9 \pm 6,2	2	0,1 \pm 0,1				
	2,5	1518	1110	73,1 \pm 4,7	400	26,3 \pm 4,9	8	0,6 \pm 0,2				
	5,0	1518	1108	73,0 \pm 8,0	401	26,4 \pm 8,0	9	0,6 \pm 0,3				
	7,5	1518	1000	65,9 \pm 2,3	510	33,6 \pm 2,5	8	0,5 \pm 0,2				

TABELA 9 - Frequências de células viáveis, necróticas e apoptóticas avaliadas pela técnica de coloração diferencial em células CHO-K1 irradiadas com partículas β .

Tipo de radiação	Tempo após a irradiação	Dose (Gy)	Total de células analisadas	Viabilidade		Necrose		Apoptose	
				Total de células viáveis	% viáveis Média \pm DP	Total de células necróticas	% necróticas Média \pm DP	Total de células apoptóticas	% apoptóticas Média \pm DP
$\beta^{90}\text{Sr}$	24 h	0,0	1512	1216	80,4 \pm 0,5	289	19,1 \pm 0,4	7	0,5 \pm 0,2
		1,0	1516	1158	76,4 \pm 2,7	351	23,1 \pm 2,3	7	0,5 \pm 0,4
		2,5	1510	1088	72,0 \pm 1,5	412	27,3 \pm 0,9	10	0,7 \pm 0,6
		5,0	1524	1048	68,8 \pm 2,8	469	30,8 \pm 2,9	7	0,4 \pm 0,5
		7,5	1528	983	64,3 \pm 2,5	536	35,1 \pm 2,5	9	0,6 \pm 0,2
	48 h	0,0	1521	1228	80,8 \pm 2,2	291	19,1 \pm 2,0	2	0,1 \pm 0,2
		1,0	1521	1170	76,9 \pm 4,2	343	22,6 \pm 4,3	8	0,5 \pm 0,1
		2,5	1523	1113	73,1 \pm 4,1	407	26,7 \pm 3,8	3	0,2 \pm 0,3
		5,0	1521	1026	67,5 \pm 3,5	484	31,8 \pm 3,7	11	0,7 \pm 0,4
		7,5	1533	956	62,4 \pm 4,5	562	36,6 \pm 4,5	15	1,0 \pm 0,2
	72 h	0,0	1518	1246	82,1 \pm 3,1	272	17,9 \pm 3,1	0	0,0 \pm 0,0
		1,0	1519	1132	74,5 \pm 4,3	381	25,1 \pm 4,3	6	0,4 \pm 0,2
		2,5	1523	1041	68,4 \pm 1,9	476	31,2 \pm 1,4	6	0,4 \pm 0,5
		5,0	1517	949	62,6 \pm 1,4	557	36,7 \pm 1,7	11	0,7 \pm 0,5
		7,5	1526	868	56,9 \pm 1,3	640	41,9 \pm 1,4	18	1,2 \pm 0,9
96 h	0,0	1521	1222	80,3 \pm 4,0	289	19,0 \pm 4,2	10	0,7 \pm 0,3	
	1,0	1527	1126	73,7 \pm 3,0	391	25,6 \pm 3,8	10	0,7 \pm 0,5	
	2,5	1530	1053	68,8 \pm 4,5	468	30,6 \pm 4,7	9	0,6 \pm 0,4	
	5,0	1523	969	63,6 \pm 5,7	537	35,2 \pm 5,9	17	1,1 \pm 0,5	
	7,5	1528	851	55,7 \pm 6,8	661	43,2 \pm 5,6	16	1,1 \pm 0,6	

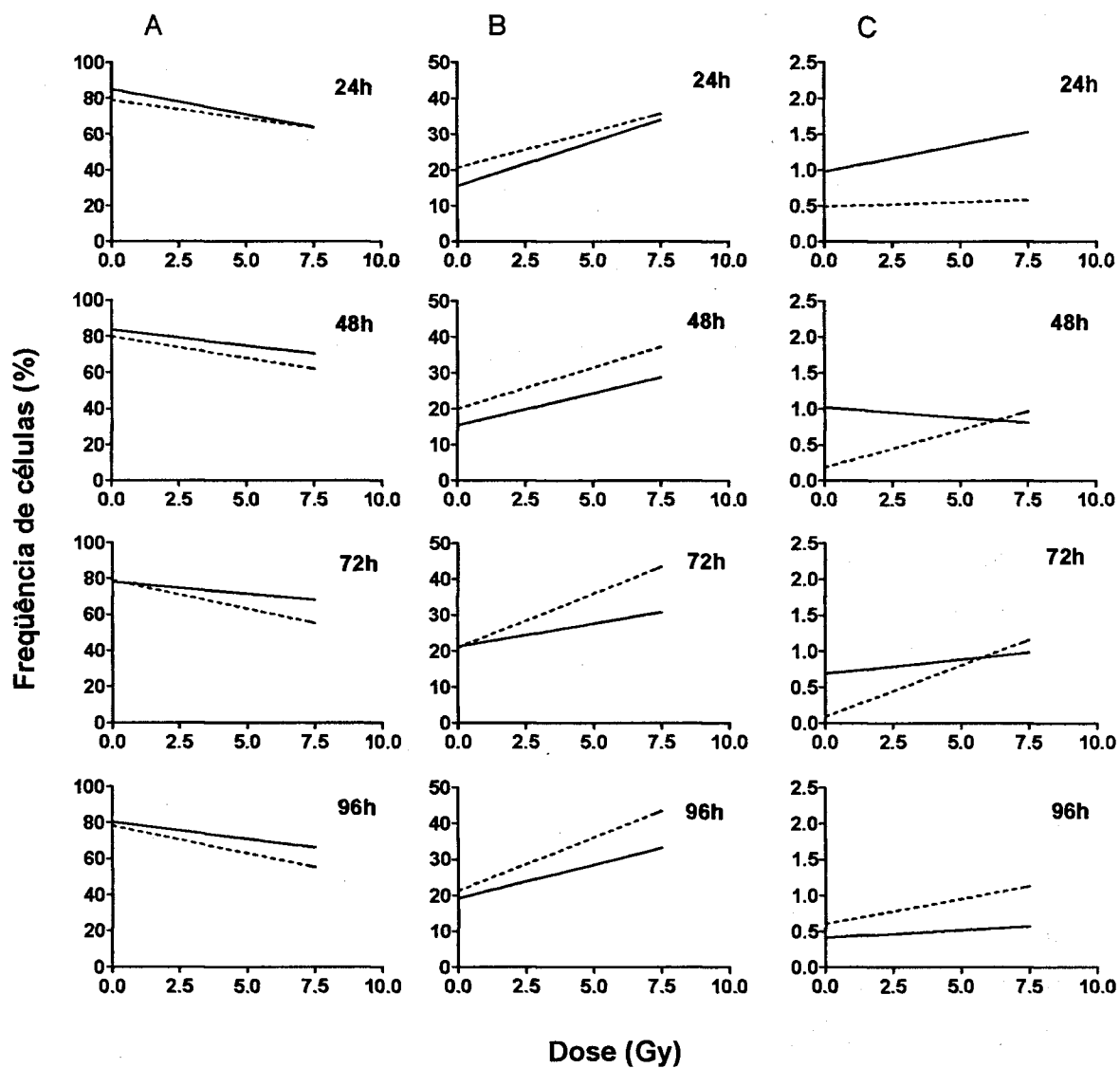


FIGURA 8 - Curvas dose-resposta ajustadas pelo modelo de regressão linear para indução de apoptose e necrose, analisadas 24, 48, 72 e 96 horas após a irradiação com ^{60}Co (—) e ^{90}Sr (----). A = células viáveis; B = células necróticas e C = células apoptóticas.

TABELA 10 - Coeficientes das curvas ajustadas pelo modelo de regressão linear, $Y = a + bD$, para $\gamma^{60}\text{Co}$ e $\beta^{90}\text{Sr}$.

Tipo de radiação	Parâmetro	Tempo após a irradiação	a (\pm SE)	b (\pm SE)
$\gamma^{60}\text{Co}$	Viabilidade	24 horas	85,00 \pm 3,60	-2,80 \pm 0,86
		48 horas	83,54 \pm 2,66	-1,75 \pm 0,63
		72 horas	78,10 \pm 1,62	-1,33 \pm 0,39
		96 horas	80,44 \pm 2,10	-1,89 \pm 0,50
	Necrose	24 horas	15,52 \pm 3,60	2,46 \pm 0,85
		48 horas	15,45 \pm 2,56	1,78 \pm 0,61
		72 horas	21,23 \pm 1,49	1,29 \pm 0,35
		96 horas	19,17 \pm 2,12	1,87 \pm 0,50
	Apoptose	24 horas	0,98 \pm 0,36	0,07 \pm 0,08
		48 horas	1,02 \pm 0,24	-0,03 \pm 0,06
		72 horas	0,69 \pm 0,26	0,04 \pm 0,06
		96 horas	0,41 \pm 0,12	0,02 \pm 0,03
$\beta^{90}\text{Sr}$	Viabilidade	24 horas	78,86 \pm 0,90	-2,02 \pm 0,21
		48 horas	79,76 \pm 1,35	-2,39 \pm 0,32
		72 horas	78,94 \pm 1,28	-3,15 \pm 0,30
		96 horas	78,18 \pm 1,76	-3,04 \pm 0,42
	Necrose	24 horas	20,66 \pm 0,84	2,01 \pm 0,20
		48 horas	20,05 \pm 1,35	2,29 \pm 0,32
		72 horas	20,97 \pm 1,27	3,00 \pm 0,30
		96 horas	21,21 \pm 1,83	2,97 \pm 0,43
	Apoptose	24 horas	0,50 \pm 0,15	0,01 \pm 0,04
		48 horas	0,19 \pm 0,12	0,10 \pm 0,03
		72 horas	0,09 \pm 0,19	0,14 \pm 0,04
		96 horas	0,60 \pm 0,17	0,07 \pm 0,04

TABELA 11 - Frequências basais de células CHO-K1 viáveis (%), necróticas (%) e apoptóticas (%) nos diferentes tempos de incubação

Experimento	Tempo (h)	Células viáveis (%)	Células necróticas (%)	Células apoptóticas (%)
$\gamma^{60}\text{Co}$	24	85,7 ± 5,1	13,4 ± 4,8	0,9 ± 0,9
	48	83,1 ± 5,2	15,7 ± 4,7	1,2 ± 0,9
	72	81,5 ± 3,1	18,1 ± 2,8	0,4 ± 0,4
	96	81,9 ± 5,6	17,5 ± 5,6	0,6 ± 0,3
ANOVA	P	0,84 (n.s.)	0,73 (n. s.)	0,54 (n. s.)
$\beta^{90}\text{Sr}$	24	80,4 ± 0,5	19,1 ± 0,4	0,5 ± 0,2
	48	80,8 ± 2,2	19,1 ± 2,0	0,1 ± 0,2
	72	82,1 ± 3,1	17,9 ± 3,1	0,0 ± 0,0
	96	80,3 ± 4,0	19,0 ± 4,2	0,7 ± 0,3
ANOVA	P	0,86 (n.s.)	0,84 (n. s.)	0,02 (*)

n.s. = não significativo

* = significativo ($p < 0,05$)

TABELA 12. Relação entre células micronucleadas e necróticas de CHO-K1, 48h após a exposição com ^{60}Co e ^{90}Sr .

Tipo de radiação	Dose	Células micronucleadas (%)	Células necróticas (%)	Células micronucleadas + necróticas (%)
γ ^{60}Co	0,0	7,26 ± 1,56	15,7 ± 4,7	22,96
	1,0	22,64 ± 7,00	16,3 ± 6,0	38,94
	2,5	28,63 ± 6,70	20,9 ± 5,9	49,53
	5,0	39,27 ± 2,34	24,1 ± 6,5	63,37
	7,5	47,62 ± 8,82	28,8 ± 11,5	76,42
β ^{90}Sr	0,0	6,48 ± 2,74	19,1 ± 2,0	25,58
	1,0	14,20 ± 4,79	22,6 ± 4,3	36,80
	2,5	21,79 ± 8,41	26,7 ± 3,8	48,49
	5,0	28,38 ± 15,23	31,8 ± 3,7	60,18
	7,5	36,54 ± 17,23	36,6 ± 4,5	73,14

Mann Whitney, gama x beta, $P < 0,001$ (***)

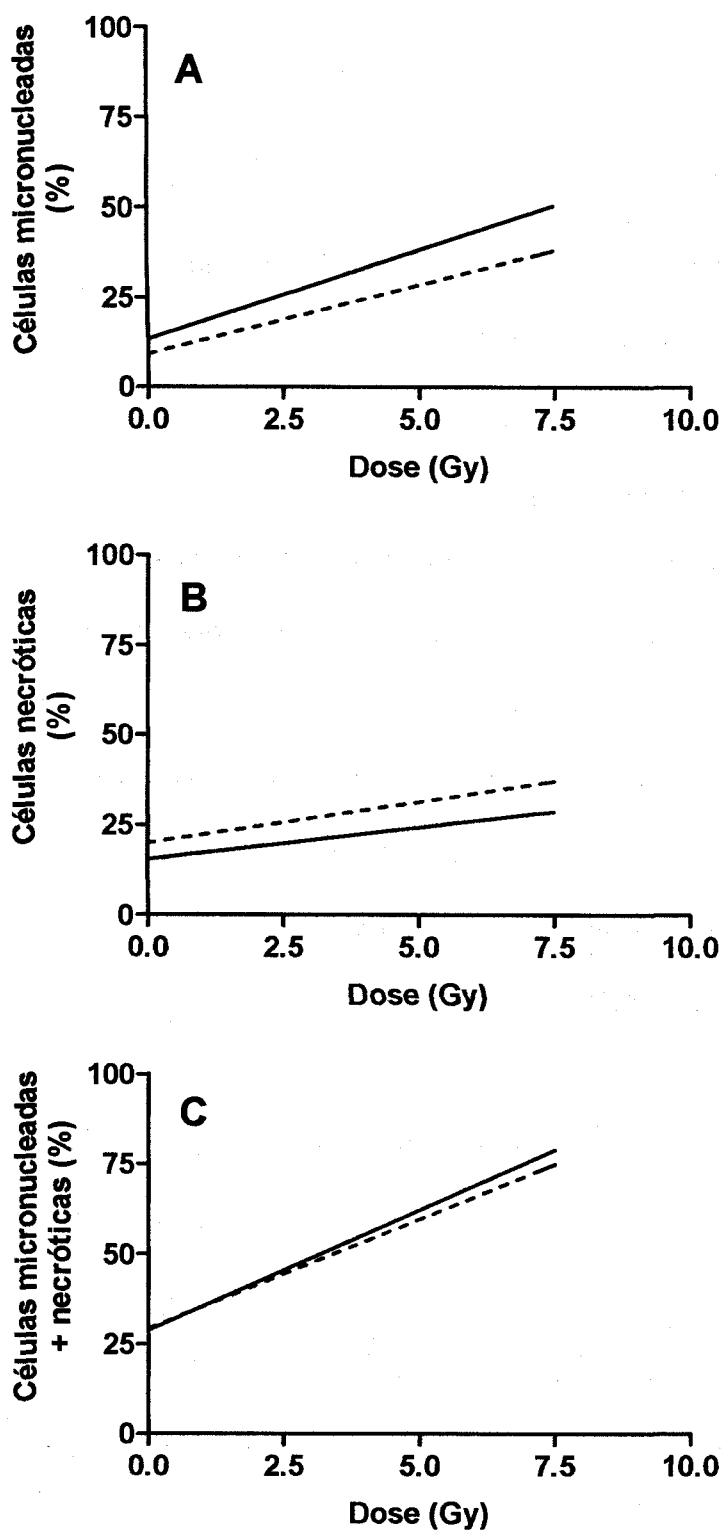


FIGURA 9 - Curvas dose-resposta ajustadas pelo modelo de regressão linear para indução de células micronucleadas (A), células necróticas (B) e células micronucleadas + necróticas (C), 48hs após a exposição com ^{60}Co (—) e ^{90}Sr (----).

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho foram analisados efeitos citotóxico e genotóxico das radiações gama e beta em células CHO-K1, por meio de testes citogenético, coloração diferencial e formação de colônias.

Os MN representam danos não reparados, mais especificamente, quebras ocorridas na fita dupla do DNA, uma das lesões mais significativas do efeito da radiação ionizante. As mortes necrótica, apoptótica e clonogênica representam diferentes manifestações celulares ao agente agressor e estão envolvidas em malformação, envelhecimento e indução de câncer.

Uma série de metodologias tem sido adotadas para detectar e quantificar células apoptóticas, como citometria de fluxo (Hertveldt *et al.*, 1997), teste do cometa (Olive *et al.*, 1993), TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase – mediated dUTP nick end-labeling*) (Guo *et al.*, 1998), análise eletroforética de fragmentação do DNA (Tauchi & Sawada, 1994) e outros. Análises baseadas nas características morfológicas e na permeabilidade da membrana apresentam a vantagem de ser relativamente simples e rápidas e, além disso, permitem discriminar entre células apoptóticas e necróticas nos estádios precoces e tardios do processo de morte celular (Kerr *et al.*, 1972; Olive & Durand, 1997).

Os dados obtidos mostraram que a necrose foi a principal modalidade de morte interfásica em células CHO-K1 irradiadas. Resultados análogos foram relatados por Fenech *et al.* (1999) em linfócito humano exposto ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A radiação beta foi mais danificante que a gama, induzindo significativamente mais morte necrótica, independentemente do período de tempo após as irradiações. Os valores basais de células necróticas variaram de 13 a 19% dentro do intervalo de tempo de 24 a 96 horas. Fenech *et al.*

(1999) obtiveram uma taxa basal relativamente mais alta, em torno de 23% em linfócitos humanos submetidos ao H_2O_2 *in vitro*.

A necrose pode resultar de lesão nas membranas celulares com conseqüente liberação descontrolada de enzimas que levam à degradação de organelas celulares como lisossomos, as quais podem causar digestão de biomoléculas como ácidos nucléicos, proteínas, lípidos, carboidrato etc (Fenech *et al.*, 1999). O dano nas estruturas membranosas pode ser ocasionado pelo estresse oxidativo induzido pela radiação ionizante, via produção de radicais livres (OH , H) provenientes da radiólise da água e pela produção de espécies reativas de oxigênio como $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 . Por serem extremamente oxidantes todos esses espécimes podem reagir prontamente com moléculas orgânicas das células, com a formação de radicais peroxilas e produtos de peroxidação lipídica intracelulares entre outros, afetando a estrutura e as propriedades físico-químicas das membranas (Limoli *et al.*, 1998).

Por outro lado, a morte apoptótica foi raramente encontrada em células CHO-K1 irradiadas (< 2%); uma grande maioria de populações celulares expostas tanto com a radiação gama quanto com as partículas beta, não mostrou suscetibilidade à apoptose, o que corrobora os dados obtidos por Guo *et al.* (1998). Assim sendo, uma análise comparativa entre os efeitos de dois tipos de radiação na indução de apoptose torna-se difícil.

A apoptose é específica do tipo celular (Vral *et al.*, 1998; Akudugu & Bohn, 2001), visto que muitas linhagens linfóides e mielóides humanas e de roedores, também timócitos são suscetíveis à apoptose (Szumiel, 1994; Tauchi & Sawada, 1994; Shu-Zheng *et al.*, 1996; Olive & Durand, 1997), enquanto que várias linhagens tumorais humanas (Yount *et al.*, 1996), fibroblastos cultivados (Olive & Durand, 1997), incluindo células V79 (Radford *et al.*, 1994) e CHO-K1, morrem preferencialmente pela necrose.

Os fatores que predisõem à apoptose em células submetidas ao insulto são pouco compreendidos. No entanto, um dos fortes candidatos é o gene supressor tumoral, o p53, que

representa um papel primordial na indução de morte apoptótica em resposta ao dano induzido no DNA, no controle da progressão do ciclo celular e na manutenção da integridade do genoma de mamíferos (Lee *et al.*, 1997). Células deficientes em p53 geralmente são resistentes a apoptose radioinduzida (Langley *et al.*, 1995; Olive & Durand, 1997).

Estudos moleculares mostraram que as células CHO-K1 apresentam uma mutação no códon 211 (no exon 6) no p53, com alteração de Thr (ACA) para Lys (AAA), dentro da região de "binding" do DNA (Lee *et al.*, 1997; Hsu *et al.*, 1999). Os autores mostraram também uma alteração na proteína p53 tanto estrutural como funcional: não houve aumento no nível da proteína p53 após o dano no DNA, o que ocorre prontamente com o tipo selvagem (Kastan *et al.*, 1991), tampouco foi verificado um "checkpoint" na fase G1 do ciclo celular para permitir o reparo necessário.

Do mesmo modo, células V79 apresentam mutações nos codons 136 e 138 (Hsu *et al.*, 1999) com defeito no gene p53 (Bartkowiak *et al.*, 2001) mostrando uma baixa incidência de apoptose (Olive & Durand, 1997). Por outro lado, células F9, uma linhagem celular de teratocarcinoma de roedor morrem preferencialmente pela apoptose e possuem p53 selvagem não mutado (Langley *et al.*, 1995) o que pode explicar sua propensão a essa modalidade de morte, visto que o p53 selvagem é considerado fundamental na indução de apoptose pela radiação.

Com base nessas observações, é possível que uma baixa incidência de apoptose verificada em células CHO-K1, possa estar associada de alguma maneira com a mutação no p53. No entanto, em certos tipos celulares, a morte apoptótica parece não depender do "status" do p53 (Kadhim *et al.*, 1996; Olive & Durand, 1997). Langley *et al.* (1995) observaram em tímócitos originários de camundongos deficientes em p53, uma predisposição à apoptose induzida pelo glicocorticóide, sugerindo que há caminhos dependente e independente de p53 na indução do processo apoptótico (Blank *et al.*, 1997). Do mesmo

modo, o relato de que a radiação ionizante induz apoptose em células HL-60, que apresentam uma deleção homozigota do cromossomo 17p e, portanto, com ausência do p53, sugere que a radiação ionizante também pode induzir apoptose via rota independente de p53 (Pouget & Mather, 2001). Assim, a apoptose pode ocorrer em células mutantes ou mesmo em células com deleção de p53 (Olive & Durand, 1997; Limoli *et al.*, 1998). Os eventos moleculares e celulares envolvidos na morte celular são complexos e pouco compreendidos e, portanto, há necessidade de futuras investigações.

Em relação a análise de danos cromossômicos, observou-se uma frequência significativamente mais alta de MN em células irradiadas com ^{60}Co do que com ^{90}Sr , quando se levou em consideração a proporção de células danificadas e a extensão de dano radioinduzido pela análise de distribuição de MN. Uma possível explicação para esse fato pode ser decorrente de uma incidência mais alta de necrose induzida pela radiação beta, demonstrada pela técnica de coloração diferencial. As células mais severamente danificadas pelo ^{90}Sr , podem ser eliminadas da população via necrose, antes de se expressar dano em forma de MN, resultando assim, numa frequência mais baixa de células micronucleadas.

Oliveira *et al.* (2001) verificaram que o ^{90}Sr produziu mais danos ao DNA em linfócitos periféricos humanos em relação ao ^{60}Co (Nascimento *et al.*, 2001) quando analisados imediatamente após as exposições, detectados pela técnica do cometa. No entanto, quando analisados citogeneticamente por meio da técnica de aberrações cromossômicas, o ^{60}Co induziu mais danos cromossômicos que ^{90}Sr .

É possível que a radiação beta em virtude da sua natureza particulada e pequeno poder de penetração nos tecidos pode ter causado uma complexidade maior de lesões em sítios multiplamente danificados em relação à radiação eletromagnética, produzindo lesões mais difíceis de serem reparadas, particularmente, quebras nas fitas duplas do DNA, grandemente responsáveis pela letalidade celular (Yasui, 1992; Price, 1993; Olive, 1998).

Igualmente, Guo *et al.* (1998) ao analisarem a radiosensibilidade de cinco linhagens celulares de mamíferos verificaram que as células CHO-K1, SHIN-3 e DU-145 apresentaram frequências altas de MN, porém, baixa taxa de apoptose, ocorrendo o inverso com células F-9 e COLO 320DM. Os autores concluíram que um baixo número de MN em células F-9 e COLO 320DM pode ser decorrente da alta incidência de morte celular apoptótica.

O teste do MN mostrou ainda que sob condições similares de cultivo celular, tanto ^{60}Co como o ^{90}Sr , não interferem na cinética da proliferação celular, pelo menos na faixa de dose testada.

Uma outra modalidade de morte celular, a reprodutiva, foi avaliada por meio do teste clássico de formação de colônias. Mesmo passadas 10 a 14 dias após as irradiações, o que corresponde a várias gerações celulares, os descendentes de células expostas mostraram uma diminuição na clonogenicidade dependente de dose, ou seja, perda da habilidade de sofrer divisão e de se proliferar. Estudos empregando uma série de linhagens celulares de mamíferos têm demonstrado que a progênie de células expostas sobreviventes podem expressar danos tardiamente, em forma de mutações gênicas específicas e danos cromossômicos como aberrações cromossômicas e micronúcleos, além do comprometimento da integridade reprodutiva (Jamali & Trott, 1996; Kadhim *et al.*, 1996; Limoli *et al.*, 1998; Trott *et al.* 1998). Essa redução persistente na capacidade reprodutiva observada em descendentes de células irradiadas é conhecida como "morte reprodutiva tardia" (Chang & Little, 1991) e tem recebido uma considerável atenção, embora o seu mecanismo ainda não esteja totalmente elucidado.

Jamali & Trott (1996) e Trott *et al.* (1998) aventaram a hipótese de que a morte reprodutiva tardia que consiste na perda da capacidade de formar colônias, pode estar correlacionada com a instabilidade genômica induzida pela radiação e que pode persistir por muitas gerações celulares. A instabilidade genômica é caracterizada pelo aumento de

alterações no genoma de mamíferos, incluindo entre outras, anormalidades cariotípicas como rearranjos cromossômicos e/ou aneuploidia e mutação e amplificação gênicas (Fenech, 2002). A perda da integridade genômica em células tumorais é largamente aceita como um dos mais importantes aspectos do câncer (Leugauer *et al.*, 1998).

Vários autores (Stap & Aten, 1990; Hoper & Bao, 1995 e Jamali & Trott, 1996) verificaram um aumento na frequência de MN em células V79, RI e RUC irradiadas, mesmo um longo período de tempo após as exposições, encontrando uma íntima relação entre taxa de MN e inativação celular clonogênica. Os autores sugeriram que o mecanismo celular que leva à expressão de MN é também, pelo menos parcialmente, responsável pela perda da integridade reprodutiva de células irradiadas.

Por outro lado, Kriehuber *et al.* (1999) não observaram uma associação positiva entre morte reprodutiva tardia e frequência de MN em células de carcinoma humano SCL-II. Os autores levantaram a possibilidade do envolvimento de outras alterações herdáveis como apoptose tardia na morte reprodutiva clonogênica.

Com base nessas observações, pode-se conjecturar que as células incapazes de formar colônias (> 50 células), podem ser representadas por àquelas que sobrevivem por várias gerações celulares mas, por exemplo, que carregam dano cromossômico o que dificilmente formariam colônias (Jamali & Trott, 1996) ou, por células que simplesmente morrem por processo apoptótico ou necrótico (Limoli *et al.*, 1998), não contribuindo na formação de colônias. Uma íntima associação entre perda da capacidade reprodutiva e a indução de dicêntricos e fragmentos acêntricos tem sido relatado por vários autores (Carrano, 1973; Stap & Aten, 1990).

Existe a possibilidade também da indução de mutações letais tardias (Kadhim *et al.*, 1996; Limoli *et al.*, 1998) ou mesmo uma diminuição persistente na habilidade das células de

se aderirem ao substrato, o que pode ser transmissível por várias gerações celulares, assim sugerindo mutações radioinduzidas em genes específicos (Kriehuber *et al.*, 1999).

O mecanismo pelo qual essas manifestações celulares herdáveis persistem em células danificadas ainda não é conhecido. Levando em consideração que esses fenótipos são ocasionados por agentes que danificam o DNA, Kadhim *et al.* (1996) levantaram a hipótese sobre o envolvimento de alguma forma de dano reparado erroneamente ou um mecanismo de reparo comprometido, ambos conferem potencialmente uma instabilidade genômica. Segundo Ribas *et al.* (1999), a instabilidade genômica induzida pode ser oriunda de algum tipo de lesão subletal como por exemplo, os sítios de fragilidade no DNA. Esses sítios frágeis podem expressar danos numa frequência significativamente mais alta.

Há também dados que podem sugerir o envolvimento de efeitos epigenéticos como alterações em nível de membranas (Kriehuber *et al.*, 1999) ou mesmo efeito "bystander" que podem contribuir para a perda da integridade reprodutiva persistente ou tardia (Limoli *et al.*, 1998). Células não irradiadas circunvizinhas daquelas irradiadas podem desenvolver instabilidade genética. A irradiação pode induzir espécies reativas de O_2 solúveis extracelulares como $\cdot OH$ e $O_2^{\cdot -}$, criando um microambiente oxidativo, capaz de causar dano ao DNA em células adjacentes co-cultivadas (Pouget & Mather, 2001).

Os dados obtidos no presente trabalho mostraram que células micronucleadas e necróticas induzidas pelo ^{60}Co e ^{90}Sr representam, uma fração significativa da população celular irradiada de CHO-K1, e provavelmente, responsáveis pela baixa eficiência de plaqueamento.

Embora a radiação beta tenha produzido mais morte necrótica que a radiação gama e esta, por conseguinte, mais células micronucleadas, porém, no cômputo geral, no decurso de sucessivas divisões celulares, os descendentes de células irradiadas sobreviventes, provavelmente, produziram números similares de colônias, o que resultaram em curvas de

sobrevida análogas, que melhor se ajustaram ao modelo linear-quadrático clássico. Essas progênes de células expostas sobreviventes podem ser constituídas por células não afetadas pela radiação e/ou por células com algum tipo de lesão subletal, mas sem perda da integridade reprodutiva.

Essas observações mostram que é fundamental avaliar a resposta celular sob vários aspectos com a utilização de vários parâmetros correlacionados para uma melhor compreensão do impacto global do agente agressor em células. Obviamente, há necessidade também de investigações futuras com o emprego de outras metodologias, bioquímica e molecular para uma avaliação mais acurada do fenômeno radiobiológico.

6. CONCLUSÃO

Os dados obtidos sobre a análise genotóxica e citotóxica de raios γ de ^{60}Co e partículas β de ^{90}Sr em células de CHO-K1, irradiadas com doses de 1,0 a 7,5 Gy, utilizando as técnicas de micronúcleo, formação de colônias e coloração diferencial, permitiram concluir que:

✓ As curvas de sobrevivência obtidas para ^{60}Co e ^{90}Sr na indução de formação de colônias foram similares entre si. O modelo que melhor se ajustou foi o linear-quadrático ($Y = a + bD + cD^2$);

✓ A radiação β de ^{90}Sr foi menos eficiente na indução de MN do que ^{60}Co , quando se levou em consideração a proporção de células micronucleadas e a magnitude de lesões radioinduzidas demonstradas pela análise de distribuição de MN;

✓ As curvas dose-resposta para indução de MN em células binucleadas, obtidas após exposições com ^{60}Co e ^{90}Sr foram melhor ajustadas ao modelo de regressão linear ($Y = a + bD$);

✓ A radiação β de ^{90}Sr provocou mais morte necrótica que a radiação γ de ^{60}Co . A necrose foi a principal modalidade de morte celular em células CHO-K1 irradiadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AKUDUGU, J. M.; BÖHM. Micronuclei and apoptosis in glioma and neuroblastoma cell lines and role of other lesions in the reconstruction of cellular radiosensitivity. *Radiat. Environ. Biophys.*, v. 40, p. 295-300, 2001.
2. ALLEN, B.J.; BLAGOJEVIC, N. Alpha- and beta-emitting radiolanthanides in targeted cancer therapy: the potential role of terbium-149. *Nucl. Med. Comm.*, v. 17, p. 40-47, 1996.
3. BARTKOWIAK, D.; HOGNER, S.; NOTHDURFT, W.; ROTTINGER, E. Cell cycle and growth response of CHO cells to X-irradiation: threshold-free repair at low doses. *Int. J. Radiat. Oncology Biol. Phys.*, v. 50, n. 1, p. 221-227, 2001.
4. BLANK, K. R.; RUDOLTZ, M. S.; KAO, G. D.; MUSCHEL, R. J.; MCKENNA, W. G. The molecular of apoptosis and implications for radiation oncology. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 71, n. 5, p. 455-466, 1997.
5. CARRANO, A. V.; HEDDLE, J.A. The fate of chromosome aberrations. *J. Theor. Biol.*, v. 38, p. 289-304, 1973.
6. CASARETT, A. P. *Radiat. Biol.*. Prentice Hall, 1968.
7. CHANG, W. P.; LITTLE, J. B. Delayed reproductive death in X-irradiated Chinese hamster ovary cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 60, p. 483-496, 1991.
8. CHAPMAN, J. D.; STOBBE, C. C.; GALES, T.; DAS, I. J.; ZELLMER, D. L.; BRADE, S.; MATSUMOTO, Y. Condensed chromatin and cell inactivation by single-hit kinetics. *Radiat. Res.*, v. 151, p. 433-441, 1999.
9. COUNTRYMAN, P. J.; HEDDLE, J. A. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat. Res.*, v. 41, p. 321-332, 1976.
10. da SILVA, M.A.; SUZUKI, M.F.; GUIMARÃES, M.I.C.C.; BUCHIPIGUEL, C.A.; ROGERO, J.R.; YORIYAZ, H.; SIQUEIRA, P.T.D.; COELHO, P.R.P.; OKAZAKI, K. Comparative in vivo and in vitro study of the cytogenetic effects of ¹⁵³Sm-EDTMP in lymphocytes of patients with bone metastasis. *Cell. Mol. Biol.*, v. 48, n. 5, p. 493-500, 2002.
11. DEAN, B. J.; DANFORD, N. Assays for the detection of chemically-induced chromosome damage in cultured mammalian cells. In: *Mutagenicity testing. A practical approach*. Venitt, S. & Parry, J. M. (Eds.) IRL PRESS, p. 187-232, 1984.

12. DELIC, J.; MAGDELÉNAT, H.; BARBAROUX, C.; CHAILLET, M-P; DUBRAY, B.; GLUCKMAN, E.; FOURQUET, A.; GIRINSKY, T.; COSSET, J. M. *In vivo* induction of apoptosis in human lymphocytes by therapeutic fractionated total body irradiation. *Br. J. Radiol.*, v. 68, p. 997-1003, 1995.
13. DENG, W.; MORRISON, D.P.; GAALE, K.L.; LUCAS, J.N. Biological dosimetry of β ray exposure from tritium using chromosome translocations in human lymphocytes analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Radiat. Res.*, v. 150, p. 400-405, 1998.
14. DEVI, P. U.; STREFFER, C. Micronucleus induction in a mammalian cell line subjected to S-irradiation and hyperthermia as studied by cytokinesis block method. *Curr. Sci.*, v. 62, p. 691-693, 1992.
15. DIKOMEY, E. Effect of dose rate on cell killing and DNA strand break repair in CHO-K1 cells exposed to internal β -rays from incorporated [^3H] thymidine. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 53, n. 4, p. 667-678, 1988.
16. DIKOMEY, D.; FRANZKE, J. Three classes of DNA strand breaks induced by X-irradiation and internal beta rays. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 50, p. 893-908, 1986.
17. EASTMOND, D. A.; TUCKER, J. D. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody. *Environ. Mol. Mutag.*, v. 13, p. 34-43, 1989.
18. FENECH, M. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. *Drug Disc. Tod.*, v. 7, n. 22, p. 1128-1137, 2002. Review.
19. FENECH, M.; MORLEY, A. A. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of IN VIVO ageing and low-dose X-irradiation. *Mutat. Res.*, v. 161, n. 2, p. 193-198, 1986.
20. FENECH, M.; MORLEY, A. A. Measurement of micronucleus in lymphocytes. *Mutat. Res.*, v. 147, p. 29-36, 1985.
21. FENECH, M.; CROTT, J.; TURNER, J., BROWN S. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. *Mutagenesis*, v.14, n. 6, p 605-612, 1999.
22. GOODHEAD, D. T.; THACKER, J.; COX, R. Effects of radiations of different qualities on cells: molecular mechanisms of damage and repair. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 63, n. 5, p. 543-556, 1993.
23. GORMAN, A.; MCCARTHY, J.; FINUCANE, D.; REVILLE, W.; COTTER, T. Morphological assessment of apoptosis. In: COTTER, T. G.; MARTIN, S. G.; ABRAMS, J. *Techniques in apoptosis - a user's guide*. 1996. p. 8-9.
24. GROSOVSKY, A. J.; LITTLE, J. B. Mutagenesis and lethality following S phase irradiation of xeroderma pigmentosum and normal human diploid fibroblasts with ultraviolet light. *Carcinogenesis*, v. 4, n. 11, p. 1389-1393, 1983.

25. GUO, G. Z.; SASAI, K.; OYA, N.; TAKAGI, T.; SHIBUYA, K.; HIRAOKA, M. Simultaneous evaluation of radiation-induced apoptosis and micronuclei in five cell lines. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 73, n. 3, p. 297-302, 1998.
26. GUTIERREZ, S.; CARBONELL, E.; GALOFRÉ, P.; CREUS, A.; MARCOS, R. Micronuclei induction by ^{131}I exposure: study in hyperthyroidism patients. *Mutat. Res.* v. 373, p. 39-45, 1997.
27. HALL, E. J. *Radiobiology for the Radiologist*. Lippincot Williams & Wilkins, 2000. cap. 3, cell survive curves. p. 33-50.
28. HALL, E. J.; VARMA, M. An integrated model for radiation induced cancer. *Rad. Protect. Dosim.*, v. 52, n. 4, p. 477-483, 1994.
29. HALL, C.; WELLS, J. Micronuclei in human lymphocytes as a biological dosimeter: preliminary data following beta irradiation *in vitro*. *J. Radiol. Prot.*, v.8, p. 97-102, 1988.
30. HARLEY, J. H.; SCHMIDT, G. D.; SILINI, G. *Radionuclides in the food chain*. Springer-Verlag, 1988.
31. HENDRY, J. H.; POTTEN, C. S.; MERRITT, A. Apoptosis induced by high and low LET radiation. *Radiat. Environ. Biophys.*, v. 34, p. 59-62, 1995.
32. HERTVELDT, K.; PHILIPPÉ, J.; THIERENS, H; CORNELISSEN, M.; VRAL, A.; DE RIDDER, L. Flow cytometry as a quantitative and sensitive method to evaluate low dose radiation induced apoptosis *IN VITRO* in human peripheral blood lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 71, n. 4, p. 429-433, 1997.
33. HOPER, K.G.; BAO, S.-P. Low-LET and high-LET radiation action of ^{125}I decays in DNA: effect of cysteamine on micronucleus formation and cell killing. *Radiat. Res.*, v. 141, p. 183-192, 1995.
34. HSIE, A. W.; SCHENLEY, R. L. Utilization of Chinese hamster cells *in vitro* and *in vivo* in genetic toxicology: a multiphasic approach. *Environ. Mutag.*, v. 5, p. 733-744, 1983.
35. HSU, C. M.; MILLER, G. M.; RIDDER, M. J.; AARDEMA, A. Characterization of p53 in Chinese hamster cell lines CHO-K1, CHO-WBL and CHL: implications for genotoxicity testing. *Mutat. Res.*, v. 426, p. 51-62, 1999.
36. IAEA - INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY *Cytogenetic analysis for radiation dose assesment: a manual*. In: Technical Reports Series n. 405, p. 74-88, IAEA, Vienna 2001.
37. JAMALI, M., TROTT, K. -R. Increased micronucleus frequency in the progeny of irradiated Chinese hamster cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 69, p. 301-307, 1996.

38. JOHNSTON, P. J.; MACPHAIL, S. H.; STAMATO, T. D.; KIRCHGESSNER, C. U.; OLIVE, P. L. Higher-order chromatin structure-dependent repair of DNA double-strand breaks: Involvement of the V(D)J recombination double-strand break repair pathway. *Radiat. Res.*, v. 149, p. 455-462, 1998.
39. JOHNSTON, P. J.; STOPPARD, E.; BRYANT, P. E. Induction and distribution of damage in CHO-K1 and the X-ray-sensitive hamster cell line xrs5, measured by the cytochalasin-b-cytokinesis block micronucleus assay. *Mutat. Res.*, v. 385, p. 1-12, 1997.
40. KADHIM, M. A.; WALKER, C. A.; PLUMB, M. A.; WRIGHT, E. G. No association between p53 status and alpha-particle-induced chromosomal instability in human lymphoblastoid cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 69, n. 2, p. 167-174, 1996.
41. KASTAN, M. B.; ONYEKWERE, O. SIDRANSKY, D.; VOLGELSTEIN, B.; CRAIG, R. W. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.*, v. 51, p. 6304-6311, 1991.
42. KERR, J. F. K.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. H. Apoptosis, a basic biological phenomenon with wider implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, v. 26, p. 239-245, 1972.
43. KIRSCH-VOLDERS, M.; FENECH, M. Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. *Mutagenesis*, v. 16, p. 51-58, 2001.
44. KRIEHLER, R.; SIMKÓ, M.; SCHIFFMANN, D.; TROTTS, K.-R. Delayed cytotoxic and genotoxic effects in a human cell line following X-irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 75, p. 1021-1027, 1999.
45. LANGLEY, R. E.; QUARTUCCIO, S. G.; KENNEALEY, P. T.; COLEMAN, C. N.; BUMP, E. A. Effects of cell cycle stage, dose rate and repair of sublethal damage on radiation-induced apoptosis in F9 teratocarcinoma cells. *Radiat. Res.*, v. 144, p. 90-96, 1995.
46. LEE, H-S.; PARK, H. J.; LYONS, J. C.; GRIFFIN, R. J.; AUGER, E. A.; SONG, C. W. Radiation-induced apoptosis in different pH environments *in vitro*. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, v. 38, p. 1079-1087, 1997.
47. LENGAUER, C.; KINZLER, K.W.; Vogelstein, B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, v. 396, p. 643 - 649, 1998.
48. LENNON, S. V.; MARTIN, S. J.; COTTER, T. G. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumor cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif.*, v. 24, n. 2, p. 203-214, 1991.
49. LEWINGTON, V. J. Targeted radionuclide therapy for bone metastases. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 20, p. 66-74, 1993.

50. LIMOLI, C. L.; HARTMANN, A.; SHEPHARD, L.; YANG, C.; BOOTHMAN, D. A.; BARTHOLOMEW, J.; MORGAN, W. F. Apoptosis, reproductive failure, and oxidative stress in Chinese Hamster Ovary cells with compromised genomic integrity. *Cancer Res.*, v. 58, p. 3712-3718, 1998.
51. MEIJER, A. E.; KROQUIST, U-S. E.; LEWENSOHN, R.; HARMS-RINGDAHL, M. RBE for the induction of apoptosis in human peripheral lymphocytes exposed in vitro to high-LET radiation generated by accelerated nitrogen ions. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 73, p. 169-177, 1998.
52. MILL, A. J.; FRANKENBERG, D.; BETTEGA, D.; HIEBER, L.; SARAN, A.; ALLEN, L. A.; CALZOLARI, P.; FRANKENBERG-SCHWAGER, M.; LEHANE, M. M.; MORGAN, G. R.; PARISET, L.; PAZZAGLIA, S.; ROBERTS, C. J.; TALLONE, L. Transformation of C3H 10T1/2 cells by low doses of ionising radiation: a collaborative study by six European laboratories strongly supporting a linear dose-response relationship. *J. Radiol. Prot.*, v. 18, n. 2, p. 79-100, 1998.
53. M'KACHER, R.; LEGAL, J.D.; SCHLUMBERGER, M.; VOISIN, P.; AUBERT, B.; GAILLARD, N.; PARMENTIER, C. Biological dosimetry in patients treated with ^{131}I for differentiated thyroid carcinoma. *J. Nucl. Med.*, v. 37, v. 18, p. 60-64, 1996.
54. NAKANO, H.; SHINOHARA, K. X-ray-induced cell death: apoptosis and necrosis. *Radiat. Res.*, v. 140, p. 1-9, 1994.
55. NASCIMENTO, P. A.; DA SILVA, M. A.; OLIVEIRA, E. M.; SUZUKI, M. F.; OKAZAKI, K. Evaluation of radioinduced damage and repair capacity in blood lymphocytes of breast cancer patients. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 34 (2) p. 165-176, 2001.
56. NELSON, J. M.; BROOKS, A. L.; METTING, N. F.; KHAN, M. A.; BUSCHBOM, R. L.; DUNCAN, A.; MIICK, R.; BRABY, L. A. Clastogenic effects of defined numbers of 3.2 MeV alpha particles on individual CHO-K1 cells. *Radiat. Res.*, v. 145, p. 568-574, 1996.
57. OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P. Detection of DNA double-strand breaks through the cell cycle after exposure to X-rays, bleomycin, etoposide and ^{125}I dUrd. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 64, n. 4, p. 349-358, 1993.
58. OLIVE, P. L. The role of DNA single-and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation. *Radiat. Res.*, v. 150 (Supl.), p. 542-551, 1998.
59. OLIVE, P. L.; DURAND, R. E. Apoptosis: na indicator of radiosensitivity *in vitro*?. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 77, n. 6, p. 695-707, 1997.
60. OLIVEIRA, E. M.; SUZUKI, M. F.; NASCIMENTO, P. A.; SILVA, M. A.; OKAZAKI, K. Evaluation of the effect of ^{90}Sr β -radiation on human blood cells by chromosome aberration and single cell gel electrophoresis (comet assay) analysis. *Mutat. Res.*, v. 476, p. 109-121, 2001.

61. POUGET, J-P.; MATHER, S. J. General aspects of the cellular response to low- and high-LET radiation. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 28, p. 541-561, 2001.
62. POWELL, S.; McMILLAN, T. J. DNA damage and repair following treatment with ionizing radiation. *Radiot. Oncol.*, v. 19, p. 95-108, 1990.
63. PRICE, A. The repair of ionizing radiation-induced damage to DNA. *Sem. Cancer Biol.*, v. 4, p. 61-71, 1993.
64. RADFORD, I. R.; MURPHY, T. K.; RADLEY, J. M.; ELLIS, S. L. Radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines. Part II. Apoptotic death is shown by all lines examined. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 65, p. 217-227, 1994.
65. RAY, M.; MOHANDAS, T. Proposed banding nomenclature for the Chinese hamster chromosomes (*Cricetulus griseus*). *Cytogenet. Cell Genet.*, vol. 16, p. 83-91, 1976.
66. REGULLA, D. F. Importance of exposure to beta particles in practical radiation protection. *Rad. Protec. Dos.*, v. 14, n. 2, p. 95-100, 1986.
67. RIBAS, M.; MIRÓ, R.; GELABERT, A.; EGOZCUE, J. Chromosome instability in lymphocytes from two patients affected by three sequential primary cancers: the role of fragile sites. *Cancer Genet. Cytogenet.*, v. 110, p. 133-135, 1999.
68. ROOS, W. P.; BINDER, A.; BOHM, L. Determination of the initial DNA damage residual DNA damage remaining after 12 hours of repair in eleven cell lines at low doses of irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 76, n. 11, p. 1493-1500, 2000.
69. SCHIMD, W. – The micronucleus test. *Mutat. Res.*, v. 31, p. 9-15, 1975.
70. SCHWARTZ, J. L.; ASHMAN, C. R.; ATCHER, R. W.; SEDITA, B. A.; SHADLEY, J. D.; TANG, J.; WHITLOCK, J. L.; ROTMENSCH, J. Differential locus sensitivity to mutation-induction by ionizing-radiations of different LETS in Chinese hamster ovary K1 cells. *Carcinogenesis*, v. 12, p. 1721-1726, 1991.
71. SHAPIRO, J. *Radiation protection*. 3.ed. Harvard College, 1990.
72. SHU-ZHENG, L.; YING-CHUN, Z.; YING, M.; XU, S.; JIAN-XIANG, L. Thymocyte apoptosis in response to low-dose radiation. *Mutat. Res.*, v. 358, p. 185-191, 1996.
73. SMITH, M. L.; CHEN, I. T.; ZHAN, Q.; BAE, I.; CHEN, C. Y.; GILMER, T. M.; KASTAN, M. B.; O'CONNOR, P. M.; FORNACE, A. J. Jr. Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science*, v. 266, n. 5189, p. 1376-1380, 1994.
74. STAP, J.; ATEN, J. A. Comparison of radiation sensitivity for three cell lines as measured by the cloning assay and the micronucleus test. *Strahlenther. Onkol.*, v. 166, p. 761-763, 1990.

75. SUZUKI, M. F.; da SILVA, M. A.; MURAKAMI, D.; GUIMARÃES, M. I. C. C.; OKAZAKI, K. Induction of micronuclei by ^{153}Sm -EDTMP in lymphocytes of patients with bone metastases. *Cell. Mol. Biol.*, v. 48, n. 5, p. 487-492, 2002.
76. SZUMIEL, I. Ionizing radiation-induced cell death. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 66, n. 4, p. 329-341, 1994.
77. TANAKA, K.; SAWADA, S.; KAMADA, N. Relative biological effectiveness and dose rate effect of tritiated water on chromosomes in human lymphocytes and bone marrow cells. *Radiat. Res.*, v. 323, p. 53-61, 1994.
78. TAUCHI, H.; SAWADA, S. Analysis of mitotic cell death caused by radiation in mouse leukaemia L5178Y cells: apoptosis is the ultimate form of cell death following mitotic failure. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 64, n. 4, p. 449-455, 1994.
79. TIAN, K.; McTIGUE, M.; de los SANTOS, C. Sorting the consequences of ionizing radiation: processing of 8-oxoguanine/abasic site lesions. *DNA Repair*, v. 1, n. 12, p. 1039-1049, 2002.
80. TROTT, K. R.; JAMALI, M.; MANTI, I.; TEIBE, A. Manifestations and mechanisms of radiation-induced genomic instability in V-79 Chinese hamster cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 74, n. 6, p. 787-791, 1998.
81. UNSCEAR - UNITED NATIONS SCIENTIFIC COMMITTEE ON THE EFFECTS OF ATOMIC RADIATION. *Sources and effects of ionizing radiation*. New York, 1977.
82. VRAL, A.; CORNELISSEN, M.; THIERENS, G.; LOUAGIE, H.; PHILIPPÉ, J.; STRIJCKMANS, K.; DE RIDDER, L. Apoptosis induced by fast neutrons versus ^{60}Co γ rays in human peripheral blood lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 73, p. 289-295, 1998.
83. VULPIS, N. The induction of chromosome aberrations in human lymphocytes by *in vitro* irradiation with β particles from tritiated water. *Radiat. Res.*, v. 97, p. 511-518, 1984.
84. VULPIS, N.; SCARPA, G. Induction of chromosome aberrations by ^{90}Sr β particles in cultured human lymphocytes. *Mutat. Res.*, v. 163, p. 277-283, 1986.
85. WALLACE, S. S. Enzymatic processing of radiation-induced free radical damage in DNA. *Radiat. Res.*, v. 150, p. 560-579, 1998.
86. WATANABE, N.; YOKOYAMA, K.; KINUYA, S.; SHUKE, N.; SHIMIZU, M.; MICHIGISHI, T.; TONAMI, N.; SETO, H.; GOODWIN, D.A. Radiotoxicity after Strontium-89 therapy for bone metastases using the micronucleus assay. *J. Nucl. Med.* v. 39, p. 2077-2079, 1998.
87. WOOTTON, R. *Nature of ionizing radiation and its interaction with tissue – Radiation Protection of Patients*. Cambridge University Press, 1993.

88. WUTTKE, K.; STREFFER, C.; MULLER, W.-U.; REINERS, C.; BIKO, J.; DEMIDCHIK, E. Micronuclei in lymphocytes of children from the vicinity of Chernobyl before and after ^{131}I therapy for thyroid cancer. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 69, p. 259-268, 1996.
89. YASUI, L. S. Cytotoxicity of ^{125}I decay in the DNA double strand break repair deficient mutant cell line xrs-5. *Int. J. Radiat. Biol.*, v.62, p.613-618, 1992.
90. YOUNT, G. L.; HAAS-KOGAN, D. A.; VIDAIR, C. A.; HAAS, M.; DEWEY, W. C. Cell cycle synchrony unmasks the influence of p53 function on radiosensitivity of human glioblastoma cells. *Cancer Res.*, v. 56, n. 3, p. 500-506, 1996.