



CNEN/SP

ipen *Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares*

GOVERNO DO BRASIL

**EFEITOS DA RADIAÇÃO IONIZANTE EM CÉLULAS
NOÇÕES BÁSICAS**

Kayo OKAZAKI

IPEN-Pub-399

FEVEREIRO/1995

SÃO PAULO

**EFEITOS DA RADIAÇÃO IONIZANTE EM CÉLULAS
NOÇÕES BÁSICAS**

Kayo OKAZAKI

SUPERVISÃO DE RADIOBIOLOGIA

52686

CNEN/SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
SAO PAULO BRASIL



Série PUBLICAÇÃO IPEN

INIS Categories and Descriptors

C15 00

BIOLOGICAL RADIATION EFFECTS

ANIMAL CELLS

MUTATIONS

CHROMOSOMAL ABERRATIONS

CARCINOGENESIS

CELL KILLING

HORMESIS

IPEN Doc 5663

Aprovado para publicação em 10/11/94

Nota: A redação, ortografia, conceitos e revisão final são de responsabilidade do(s) autor(es)

**EFEITOS DA RADIAÇÃO
IONIZANTE EM CÉLULAS
NOÇÕES BÁSICAS**

Kayo OKAZAKI

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA
NUCLEAR
INSTITUTO DE PESQUISAS
ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Caixa Postal 11049 - Pinheiros
05422-970 - SÃO PAULO - BRASIL

RESUMO

O uso crescente da radiação ionizante pela sociedade moderna torna necessário o conhecimento de seus efeitos nos seres vivos para uma avaliação mais acurada dos riscos biológicos envolvidos. Embora existam muitas lacunas no conhecimento dos efeitos da radiação ionizante em níveis celular e molecular, são apresentados no presente trabalho, ainda que de maneira sucinta, os importantes aspectos da interação da radiação com a matéria viva e as manifestações biológicas decorrentes, bem como os vários fatores que intervêm na expressão final do dano radiobiológico. Um enfoque é dado sobre a morte celular, mutação e indução de câncer, cuja compreensão não somente trará informações úteis à biologia celular, mas também será de considerável importância para o desenvolvimento da radioterapia e para a proteção contra a exposição acidental à radiação ionizante. Uma abordagem é feita também sobre outro aspecto da radiação ionizante, a hormese, como um possível efeito benéfico da baixa dose de radiação.

**EFFECTS OF IONIZING
RADIATION ON CELLS
BASIC APPROACHES**

Kayo OKAZAKI

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA
NUCLEAR
INSTITUTO DE PESQUISAS
ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Caixa Postal 11049 - Pinheiros
05499-970 - SÃO PAULO - BRASIL

ABSTRACT

The increasing use of ionizing radiation by modern society has made necessary the knowledge of its effects on living beings for a more accurate evaluation of the biological risks involved. Although there are many gaps in the knowledge concerning the effects of ionizing radiation at the cellular and molecular levels, the important aspects of radiation interaction with the living matter and the resultant biological manifestation, as well as several factors that interfere in the final expression of radiobiological damage are briefly presented in this review. An approach is given about cell death, mutation and cancer induction, whose understanding will not only bring useful informations to cell biology, but also will be of considerable importance for developments in radiotherapy and in protection against accidental exposure to ionizing radiation. Also another aspect of ionizing radiation the hormesis, is considered analyzing the possible beneficial effect related with low doses of radiation.

SUMARIO

| | | | |
|------|---|--|----|
| I | | INTRODUÇÃO | 1 |
| II | | CADEIA DE EVENTOS | 1 |
| III | | FATORES QUE MODIFICAM OS EFEITOS BIOLÓGICOS DA RADIAÇÃO | 2 |
| | 1 | Fatores físicos que influenciam o efeito da radiação | 2 |
| | 2 | Fatores químicos que influenciam o efeito da radiação | 3 |
| | 3 | Fatores celulares que influenciam o efeito da radiação | 4 |
| IV | | CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE MORTE CELULAR | 5 |
| | 1 | Teoria do Alvo | 6 |
| V | | CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE MUTAÇÃO | 7 |
| | 1 | Mutação de ponto ou genica | 8 |
| | 2 | Mutação cromossômica ou aberração cromossômica estrutural | 8 |
| | 3 | Mutação genômica ou aberração cromossômica numérica | 8 |
| | 4 | Significado das mutações | 8 |
| VI | | ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS | 9 |
| | 1 | Tipos de aberrações cromossômicas | 9 |
| | 2 | Aberrações cromossômicas estáveis e instáveis | 10 |
| | 3 | Mecanismo de formação de aberrações cromossômicas | 10 |
| VII | | INDICADORES BIOLÓGICOS | 11 |
| | 1 | Método convencional de análise de aberrações cromossômicas | 11 |
| | 2 | Método do micronúcleo | 13 |
| | 3 | Método de trocas entre cromátides irmãs | 13 |
| VIII | | CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE CARCINOGENESE | 14 |
| | 1 | Etapas da carcinogênese | 14 |
| | 2 | -Oncogenes e genes supressores do tumor | 15 |
| | 3 | Susceptibilidade genética ao câncer | 16 |
| | 4 | Curvas de dose resposta para a indução de cancer | 16 |
| IX | | HORMESE | 17 |
| X | | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 18 |

I INTRODUÇÃO

A potencialidade da radiação ionizante para produzir danos em seres vivos é conhecida desde a descoberta dos raios X e da radioatividade natural no fim do século passado. Já se conheciam também os casos de indução de câncer pela radiação no início deste século.

Em 1927 H J Muller trabalhando com *Drosophila* foi o primeiro a demonstrar que a radiação ionizante pode afetar o patrimônio genético induzindo mutações. A maioria das mutações apresenta efeitos nocivos podendo afetar não somente o indivíduo exposto mas também os seus descendentes.

A extensão do dano produzido pela radiação ionizante só foi avaliada mais pormenorizadamente após a II Guerra Mundial sendo então reconhecida a necessidade de proteção contra esses efeitos.

O estudo dos efeitos biológicos da radiação ionizante recebeu um enfoque maior nestas últimas décadas em consonância com a maior utilização de vários tipos de radiação nas mais diversas finalidades como por exemplo na medicina, na indústria, na agricultura e na geração de energia. É necessário portanto conhecer melhor a radiação para poder usufruir dos numerosos benefícios que a energia nuclear pode oferecer ao homem com o mínimo de exposição.

Num sentido amplo os efeitos biológicos da radiação são resultantes da absorção de energia da radiação pelos organismos vivos. Em outras palavras, esses efeitos são determinados pela transferência da energia da radiação para as moléculas biologicamente importantes das células. Essas moléculas podem ser proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos, carboidratos etc. Se a radiação passa através do sistema sem depositar energia, nenhum efeito biológico será produzido.

De acordo com L.H Gray a energia de raios X necessária para matar uma célula de mamíferos é aproximadamente equivalente a energia do calor numa xícara de chá. Neste caso o calor da bebida não é danoso porque a sua energia não é transferida da mesma maneira que a da radiação ionizante que a deposita em forma de quanta capaz de romper as ligações químicas das biomoléculas (Gillies 1987).

Sob o ponto de vista da radiobiologia as radiações de baixas doses são de grande interesse particularmente para a estimativa de risco. Isto porque as doses por mais baixas que sejam podem induzir algum tipo de efeito por exemplo mutação e indução de câncer. Esses efeitos são chamados de estocásticos porque a gravidade da resposta biológica não depende da dose, porém a probabilidade de ocorrência é uma função da dose, não existindo limiar (Hall 1991).

II CADEIA DE EVENTOS

Dada a complexidade do fenômeno radiobiológico pouco se sabe ainda hoje dos eventos envolvidos entre a interação da radiação ionizante com a célula viva e os efeitos biológicos resultantes, isto é, a interrelação entre os fenômenos físicos, químicos, bioquímicos e biológicos.

Contudo cronologicamente os principais eventos envolvidos na indução de danos radiobiológicos podem ser descritos da seguinte maneira (figura 1). O primeiro fenômeno que ocorre é FÍSICO e consiste na ionização

e excitação de átomos da matéria viva com a absorção de energia da radiação. Na ionização o elétron é ejetado do átomo e na excitação o elétron ganha energia passando a uma órbita mais energética. A energia transferida pela radiação ionizante resulta na formação de moléculas excitadas e espécies ionizadas (FENÔMENO FÍSICO QUÍMICO). Assim as lesões produzidas por exemplo no DNA a principal molécula alvo do dano da radiação podem ser classificadas em efeitos diretos e indiretos. Os efeitos diretos resultam da interação direta da energia da radiação com o DNA causando quebras de fitas simples e dupla destruição das bases, rompimento das pontes de hidrogênio, hidratação das bases e pontes entre proteínas e DNA. Os efeitos indiretos consistem na transferência da energia da radiação para moléculas intermediárias presentes no meio celular que interagem com o DNA. Como por exemplo a água cuja quebra gera radicais livres como hidroxila (OH), hidrogênio (H) e o elétron hidratado (e_{aq}). Estes radicais provenientes da radiólise de água podem interagir entre si ou com moléculas próximas levando a formação de espécies ativas de oxigênio como peróxido de hidrogênio (H₂O₂), oxigênio no estado singleto e o radical superóxido (O₂⁻). Todos eles constituem espécies químicas extremamente difusíveis e reativas que podem atingir as moléculas biologicamente ativas e desse modo danificá-las (FENÔMENO BIOQUÍMICO). Não há ainda uma comprovação de que a molécula alvo é danificada direta ou indiretamente. Porém é mais plausível admitir que a maioria dos danos radiobiológicos seja uma consequência da ação indireta da radiação já que células e tecidos são compostos aproximadamente de 70 a 90% de água. De qualquer forma seja direta ou indiretamente os produtos formados passam a reagir posteriormente com os demais constituintes celulares de tal maneira que as funções biológicas das moléculas podem ser alteradas e essas interações poderão resultar em efeitos biológicos (FENÔMENO BIOLÓGICO).

Enquanto que os eventos anteriores se processam num intervalo de tempo extremamente pequeno e portanto raramente detectados diretamente a manifestação dos efeitos biológicos pode levar minutos, horas, anos e até mesmo décadas.

Os efeitos biológicos são comumente classificados em somáticos e hereditários. Os efeitos somáticos afetam somente a pessoa exposta enquanto que os hereditários os descendentes da pessoa exposta. Por sua vez os efeitos somáticos podem ser divididos em agudos e tardios dependendo do tempo de manifestação dos efeitos que é função da dose absorvida quanto maior a dose menor e o intervalo de tempo entre a exposição e o aparecimento do efeito.

Os efeitos agudos da radiação são observáveis em apenas horas, dias ou semanas após a exposição do indivíduo a uma alta dose de radiação em um pequeno intervalo de tempo. A existência de um limiar de dose e talvez a característica mais importante dos efeitos agudos também classificados como efeitos não estocásticos. Após a exposição de corpo inteiro a uma quantidade suficiente de radiação pode ocorrer uma série de sintomas como a náusea, vômitos, diarreia, fadiga, febre, queda de cabelos, alterações sanguíneas, letargia e convulsões. Este conjunto de sintomas característicos e conhecido como síndrome da radiação aguda. Algumas síndromes podem resultar

inevitavelmente em morte outras podem ou não ser letais dependendo da extensão do dano aos tecidos

As síndromes da radiação em mamíferos podem ser classificadas em hematopoiética, gastrointestinal e do sistema nervoso central dependendo fundamentalmente da dose recebida e do tempo que leva a morte Na síndrome hematopoiética, pode-se verificar a ocorrência de morte em animais dentro de 10-30 dias após a irradiação de corpo inteiro com doses de 2-10 Gy na gastrointestinal dentro de 3-5 dias com doses na faixa de 10-100 Gy e na síndrome do sistema nervoso central dentro de 1-2 dias após a exposição com doses acima de 100 Gy (Coggle 1971) Doses superiores a 1000 Gy causam morte molecular ou morte instantânea, pois acarretam inativação de moléculas essenciais para os processos metabólicos das células

A maioria dos sintomas da síndrome hematopoiética ocorre em decorrência do dano na medula óssea A queda no número de células precursoras da medula para manter o suprimento de células sanguíneas circulantes são as principais causas de infecções e hemorragias que podem levar a morte

Na síndrome gastrointestinal a causa primária de sintomas é a perda do epitélio gastrointestinal náuseas vômitos e diarreias podem ocorrer dentro de algumas horas após a exposição Este quadro pode levar a desidratação ocasionando desequilíbrio de fluidos e eletrólitos infecções e deficiência nutricional

O cérebro é o principal órgão afetado na síndrome do sistema nervoso central e os sintomas característicos incluem letargia e convulsões

No homem a exposição aguda de corpo inteiro produz o mesmo espectro de sintomas e as mesmas modalidades de morte que ocorrem nos animais Além dos danos no sistema nervoso central epitélio gastrointestinal e medula óssea, as lesões as gônadas e a pele (eritema, formação de bolhas alterações na pigmentação queda de cabelos e necrose) são também significativas

Todos os tecidos do indivíduo são atingidos pela irradiação de corpo inteiro e a classificação de causas predominantes de morte não é rígida pois os sintomas de um tipo de síndrome ao outro muitas vezes se sobrepõem

Os efeitos tardios aparecem em pessoas irradiadas com doses relativamente baixas mas crônicas em um longo intervalo de tempo ou em pessoas que receberam dose alta não letal e que aparentemente se recuperaram Estes efeitos são indução de câncer diminuição da longevidade envelhecimento precoce e são de natureza estocástica ou probabilística

É importante enfatizar que não existem efeitos biológicos específicos da radiação ionizante outros agentes físicos ou químicos podem determinar o mesmo efeito O que se verifica é um aumento na incidência destes efeitos em relação a taxa espontânea e portanto toda a análise é feita estatisticamente

III FATORES QUE MODIFICAM OS EFEITOS BIOLÓGICOS DA RADIAÇÃO

Dada a complexidade dos eventos envolvidos entre a absorção inicial de energia da radiação e a manifestação biológica, vários fatores podem modular a expressão final do dano da radiação

1 FATORES FÍSICOS QUE INFLUENCIAM O EFEITO DA RADIAÇÃO

1.1 DOSE

De modo geral a medida que aumenta a dose de radiação há um aumento no dano biológico Esta relação nem sempre é verdadeira porque outros parâmetros como a taxa de dose fracionamento de dose e a qualidade de radiação podem modificar a extensão do dano biológico

1.2 TAXA DE DOSE

Em geral o efeito produzido por uma dada dose de radiação diminui com o decrescimento da taxa de dose O termo taxa de dose é definido como a quantidade de radiação liberada ao sistema por unidade de tempo

Um dos critérios bastante utilizados para comparar a eficácia de diferentes taxas de dose tem sido a DL_{50} que corresponde a dose letal para 50% dos integrantes da população exposta de corpo inteiro Geralmente a radiação deliberada numa taxa rápida é mais eficiente do que quando dada vagarosamente numa baixa taxa de dose Este efeito de taxa de dose é interpretado com base no reparo do dano subletal da radiação Se uma certa quantidade de injúrias se acumulam para expressar um certo efeito e se a recuperação se inicia logo a lesão é produzida, muitos dos danos iniciais serão reparados antes da quantidade letal ser produzida Assim sendo quanto maior o tempo de exposição maior o tempo disponível para qualquer mecanismo de reparo biológico atuar embora a energia total transferida ao sistema seja a mesma Ao nível celular ou sub celular estas observações são sugestivas de uma cinética de múltiplos eventos

1.3 FRACIONAMENTO DE DOSE

Similarmente o fracionamento de uma dose em 2 ou mais frações separadas por um intervalo de tempo resulta geralmente em menos danos biológicos do que com uma única exposição de radiação A explicação para este fenômeno é que as células são capazes de recuperar de uma certa quantidade de dano produzido pela primeira dose antes da segunda ser dada ao sistema

1.4 TIPO DE RADIAÇÃO

Dependendo também da natureza da radiação haverá uma diferença quantitativa considerável na resposta biológica produzida, embora a quantidade total de energia liberada e o número de pares de íons formados no sistema sejam os mesmos

Há uma forte correlação entre estes efeitos e a transferência linear de energia (TLE) que é definida como a quantidade de energia depositada na matéria por unidade de comprimento do trajeto expressa em keV/μm As radiações corpusculares como partícula alfa nêutron e fragmentos de fissão apresentam um percurso curto com uma alta concentração de pares de íons portanto com valores altos de TLE Por outro lado as radiações eletromagnéticas produzem trajetórias mais longas com ionizações distribuídas mais esparsamente É o caso de raios X e gama, com valores baixos de TLE

Desde que a eficácia biológica de uma partícula ou fóton está relacionada com a quantidade de ionização e a distribuição espacial desta em suas trajetórias as radiações com alta TLE geralmente são mais danificantes por unidade de dose que as radiações de

baixa TLE A TLE de radiação tem uma marcada influência na sua eficácia biológica relativa (EBR) A EBR é usada para comparar a eficácia de 2 tipos de radiação na produção de um dado efeito É definida como a relação entre a dose de radiação necessária para produzir um dado efeito biológico e a dose de um outro tipo de radiação necessária para induzir o mesmo efeito

2 FATORES QUÍMICOS QUE INFLUENCIAM O EFEITO DA RADIAÇÃO

Os agentes químicos que modificam o efeito da radiação podem ser divididos em 2 grupos sensibilizadores e protetores Os agentes sensibilizadores são aqueles que potencializam o efeito de uma dada dose de radiação dos quais o O_2 e as pirimidinas halogenadas são os mais conhecidos Em contraste os agentes que minimizam o efeito de uma dada dose de radiação são chamados de protetores e incluem compostos como cisteína, cisteamina e glutatona todos eles contendo grupo sulfidril SH

2.1 RADIOSENSIBILIZADORES

2.1.1 OXIGÊNIO

Na presença de O_2 molecular todos os sistemas biológicos tornam-se mais sensíveis a radiação gama ou raios X do que quando são irradiados nas condições de hipóxia ou anoxia Esta capacidade do O_2 em potencializar a eficácia de uma dada dose de radiação é conhecida como o efeito do oxigênio e constitui um dos mais importantes fenômenos em radiobiologia O oxigênio modifica quantitativamente o dano da radiação mas não o altera qualitativamente ele metaforicamente reduz a dose de radiação necessária para produzir um dado efeito biológico Além disso o O_2 precisa estar presente no momento da irradiação o tratamento pré ou pós irradiação com O_2 é ineficaz para aumentar o dano biológico

Uma concentração muito pequena de O_2 é suficiente para produzir um efeito radiobiológico A tensão de O_2 na maioria dos tecidos normais que está na faixa de 20-40 mmHg é similar àquela do sangue venoso ou da linfa Do ponto de vista de radiobiologia tecidos normais são considerados geralmente como sendo bastante oxigenados

O mecanismo exato do efeito do O_2 não está totalmente compreendido e uma série de hipóteses são aventadas para explicar este fenômeno Admite-se que o aumento da eficácia da radiação na presença do O_2 seja resultante de sua ação ao nível de lesões químicas iniciais o O_2 age diretamente sobre a molécula alvo irradiada e impede o processo de reparo Mas a hipótese de maior aceitação é a de que o O_2 possivelmente age ao nível de radicais livres aquosos produzindo mais radicais livres danificantes por exemplo os peróxidos orgânicos que são considerados como os principais responsáveis pelo efeito do O_2 Neste sentido pode-se dizer que o O_2 potencializa a lesão induzida pela radiação

2.1.2 PIRIMIDINAS HALOGENADAS

Além do O_2 os grupos de agentes sensibilizadores importantes são os compostos químicos conhecidos como pirimidinas halogenadas Os mais importantes são a 5 iododesoxiuridina (IdU), 5 bromodesoxiuridina (BrdU) e 5 clorodesoxiuridina (CldU) que apresentam

um halogênio substituído no lugar do grupo metila A incorporação desses compostos na estrutura do DNA ocasionaria uma fragilidade na cadeia que resultaria numa maior radiosensibilidade celular

2.1.3 OUTROS AGENTES RADIOSENSIBILIZADORES

Os compostos químicos de natureza bastante diversa como antibióticos antineoplásicos (actinomicina D, bleomicina, adriamicina) agentes alquilantes (mostardas nitrogenada e sulfurada) e antimetabólitos (metotrexato e 5 fluoruracil) podem também potencializar os efeitos letais da radiação quando administrados conjuntamente Eles agem provavelmente por meio de mecanismos diversos por exemplo interferindo nas sínteses de proteína e DNA que tendem a aumentar os efeitos da radiação Todos esses sensibilizadores são utilizados em combinação com a radiação para a terapia de tumores

2.2 RADIOPROTETORES

A adição de agentes protetores reduz a eficácia de uma determinada dose de radiação subsequente Estes para serem efetivos necessitam estar presentes próximo ou no momento da irradiação e ao redor dos sítios críticos do dano da radiação O tratamento após a irradiação é relatado como sendo pouco efetivo

Os radioprotetores não podem impedir a absorção extremamente rápida de energia da radiação pelas moléculas de água e macromoléculas da célula A habilidade de radioprotetores exercem seus efeitos seria portanto o resultado de sua capacidade para inibir e reparar os danos causados e propiciar a recuperação de populações celulares afetadas pela radiação

2.2.1 AMINOPIÓIS

O principal grupo de agentes protetores são os aminorios contendo grupamentos SH e NH_2 e incluem entre outros cisteína, cisteamina (2 mercaptoetilamina ou MEA), cistamina, 2 mercaptoetilguanidina (MEG), 5,2 aminoetilshoureira (AET) e glutatona (GSH) Os compostos contendo SH são protetores eficientes para a radiação de ionizações esparsas como raios X e gama seu efeito protetor é negligenciável para a radiação de ionizações densas

Os mecanismos pelos quais estes compostos exercem efeitos protetores em células de mamíferos não estão claramente elucidados e várias teorias foram propostas Admite-se que uma série de mecanismos operam nos 3 níveis de organização celular: molecular, bioquímico fisiológico e tecidual (Grambarresi & Jacobs 1987)

A AO NÍVEL MOLECULAR

Os radioprotetores podem exercer seus efeitos por meio de interações físico-químicas tais como scavenging de radicais livres, doação de átomo de H, ligação direta com as biomoléculas e formação de dissulfetos mistos

a) SCAVENGING DE RADICAIS LIVRES A hipótese do scavenger de radical, uma das mais aceitas, admite que a ação indireta da radiação e de importância primária O scavenging de radicais livres se refere à habilidade de radioprotetores em competir pelos produtos altamente reativos da radiólise da H_2O antes que eles possam reagir e danificar as

moléculas de importância biológica. Em essência, este processo seria uma reação entre os radioprotetores e os radicais livres em competição com o O_2 ($R + O_2 \rightarrow RO_2$). Isto significa que os sítios biológicos vitais podem escapar do ataque dos radicais livres. Esta hipótese explica um fenômeno notável associado com este grupo de compostos onde o efeito protetor tende a ser paralelo ao do O_2 sendo máximo para a radiação de baixa TLE e mínimo para a de alta TLE.

b REPARO POR DOAÇÃO DE ÁTOMO DE HIDROGÊNIO: Um outro fenômeno fundamental que pode contribuir para a radioproteção e o da transferência ou doação de H. Este constitui um processo de reparo onde a perda de átomo de H de uma molécula biologicamente importante (R-H) pela absorção direta de energia de radiação ($R-H \rightarrow R + \cdot H$) ou pela reação indireta com os radicais livres ($\cdot OH + R-H \rightarrow R + H_2O$) seria compensada pela doação de um átomo de H por um protetor contendo grupamento sulfidrilo (P-H) ($R + P-H \rightarrow R-H + \cdot P$) restaurando a ao estado original. Na ausência do protetor o radical livre $\cdot R$ poderá sofrer várias reações com outros radicais livres ou com o O_2 produzindo mais espécies danificantes.

c FORMAÇÃO DE DISSULFETOS MISTOS: A hipótese de dissulfetos mistos envolve a formação reversível de pontes de dissulfeto entre grupos tióis de proteínas teciduais e radioprotetores. A formação de dissulfetos mistos preserva a integridade de enzimas e proteínas estruturais que são dependentes de grupos sulfidrilo e dissulfetos intactos para a função biológica normal.

B AO NÍVEL BIOQUÍMICO FISIOLÓGICO

Alem da interação direta entre os produtos da radiação e as moléculas alvo os radioprotetores podem operar em nível mais complexo induzindo alterações fisiológicas e bioquímicas que podem atenuar os efeitos letais da radiação ionizante. As principais hipóteses que foram desenvolvidas para explicar a radioproteção incluem hipoxia, choque bioquímico e hipotermia.

a HIPOXIA: Desde que a extensão do dano da radiação num tecido está diretamente relacionada com o grau de oxigenação compostos ou tratamentos que podem reverter este efeito do oxigênio poderão resultar numa radioproteção significativa. Uma grande variedade de agentes com habilidade radioprotetora pode induzir hipoxia geral ou localizada por vários mecanismos interferência na liberação de O_2 nos tecidos irradiados por meio de indução de alterações hemodinâmicas cardiovasculares bloqueio da função de hemoglobina, aumento do consumo de O_2 por meio de reações químicas e bioquímicas e depressão dos centros respiratórios. De todos os conceitos de ação de radioproteção a indução de hipoxia apresenta a aplicação mais difundida.

b CHOQUE BIOQUÍMICO: O termo choque bioquímico foi usado para descrever várias alterações bioquímicas reversíveis que ocorrem consistentemente em célula na tentativa de se adaptar a uma infusão maciça de radioprotetores tióis. O evento desencadeador da seqüência de processos que culmina em choque bioquímico e a formação de dissulfetos mistos entre os radioprotetores e os grupos sulfidrilo da membrana celular. Isto induz alterações ultraestruturais pronunciadas em mitocôndrias e em outras organelas que resultam em uma síndrome característica de alterações bioquímicas. Estas incluem

ruptura do estado redox celular aumento da glicogenólise no fígado inibição da glicólise bloqueio das sínteses de proteína e DNA e retardo da divisão celular. Falta a evidência de como estas mudanças levam a radiorresistência celular. Todavia, um componente importante nesta síndrome e a inibição da síntese de DNA e retardo mitótico. Este fenômeno pode permitir a célula um tempo mais longo para o reparo do dano da radiação antes do próximo ciclo de síntese.

c HIPOTERMIA: Pode ocorrer uma redução da temperatura corpórea após a administração de radioprotetores. A hipotermia pode mediar radioproteção por meio de 2 mecanismos básicos pode ser acompanhada por uma queda na atividade metabólica para permitir um reparo mais eficiente do dano da radiação ou as reações produzidas pelo dano após a absorção de energia da radiação podem ser mais lentas e menos completas resultando em uma diminuição da sensibilidade celular.

C AO NÍVEL DE ÓRGÃOS

Neste caso a radioproteção pode ser decorrente do aumento do processo de recuperação dos tecidos e da renovação de populações de células primordiais que foram afetadas pela radiação.

2.2.2 OUTROS AGENTES RADIOPROTETORES

Existem outros agentes que atenuam os efeitos da radiação em virtude da sua capacidade por um mecanismo ou por outro em diminuir a tensão de O_2 dos tecidos radiosensíveis. Neste grupo de protetores figuram os inibidores respiratórios (KCN, NaN_3), depressores respiratórios (morfina, heroína, álcool), agentes farmacológicos (epinefrina, serotonina, acetilcolina, histamina), metahemoglobinizantes (CO) e quelantes (EDTA).

Os mecanismos de radioproteção química são complexos e várias hipóteses foram lançadas. Embora alguns fatores possam representar um papel mais significativo (radical scavenger e hipoxia) que outros (hipotermia) nenhuma das hipóteses pode ser atribuída inteiramente aos efeitos protetores. Em vez disso vários fatores combinados podem estar envolvidos no fenômeno da radioproteção.

3 FATORES CELULARES QUE INFLUENCIAM O EFEITO DA RADIAÇÃO

3.1 ESTADO PROLIFERATIVO

Em geral as células tendem a ser mais sensíveis a radiação quando se encontram no estado proliferativo ativo e são do tipo indiferenciado. Já no início do século em 1906 dois radiobiologistas Bergonie e Tribondeau trabalhando com células de mamíferos reconheceram que vários tipos de células de rato diferiam grandemente em sua radiosensibilidade. Com base numa série de experimentos realizados eles postularam que as células são radiosensíveis se apresentam uma taxa mitótica elevada e se são morfológica e funcionalmente do tipo indiferenciado. Estas generalizações são conhecidas como lei de Bergonie e Tribondeau a radiosensibilidade celular ou tecidual é diretamente proporcional a sua atividade proliferativa e inversamente proporcional ao seu grau de especialização. Embora algumas exceções a esta lei são conhecidas esta regra se aplica a maioria dos sistemas biológicos.

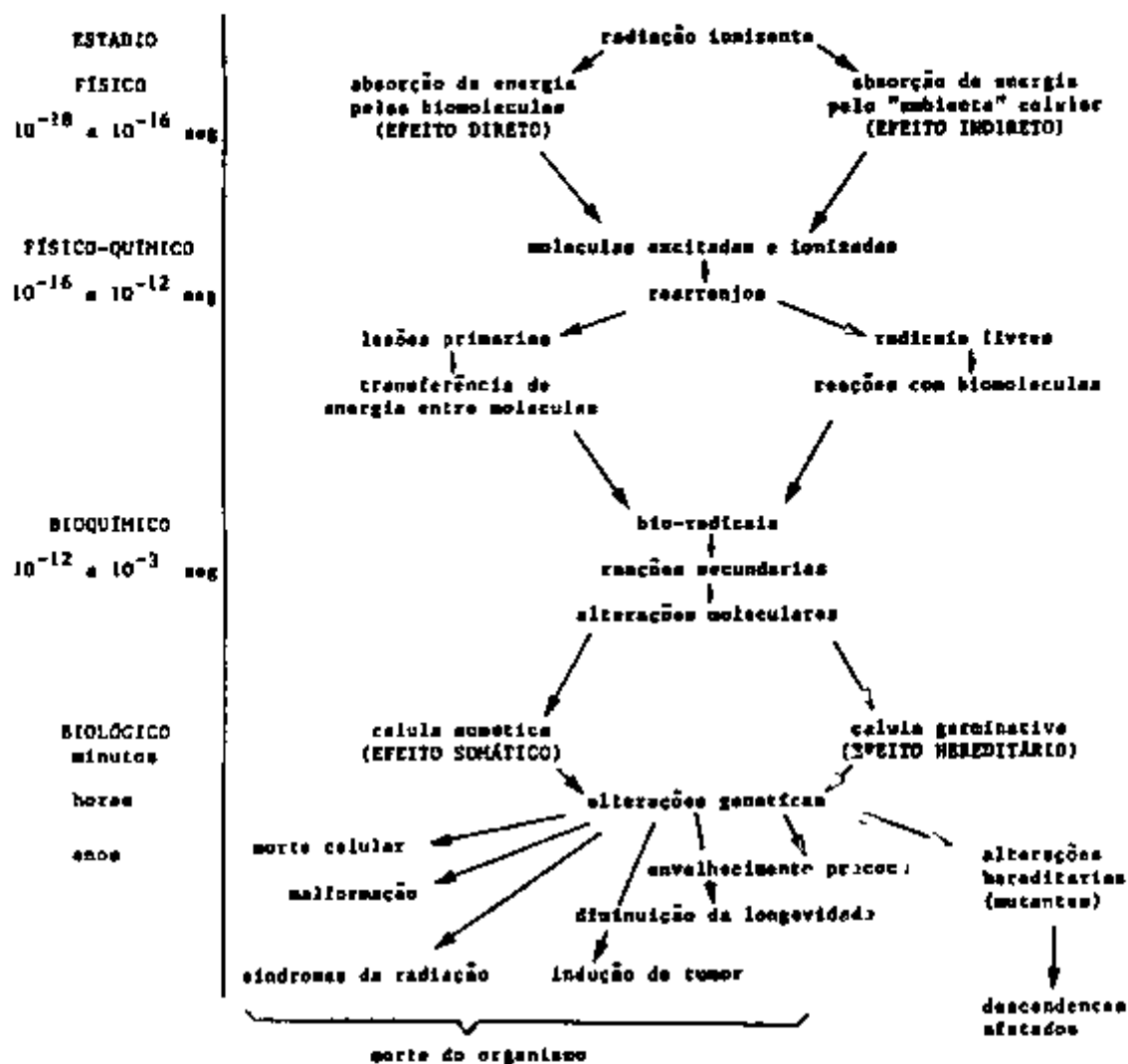


Figura 1 Principais eventos envolvidos na indução de danos radiobiológicos

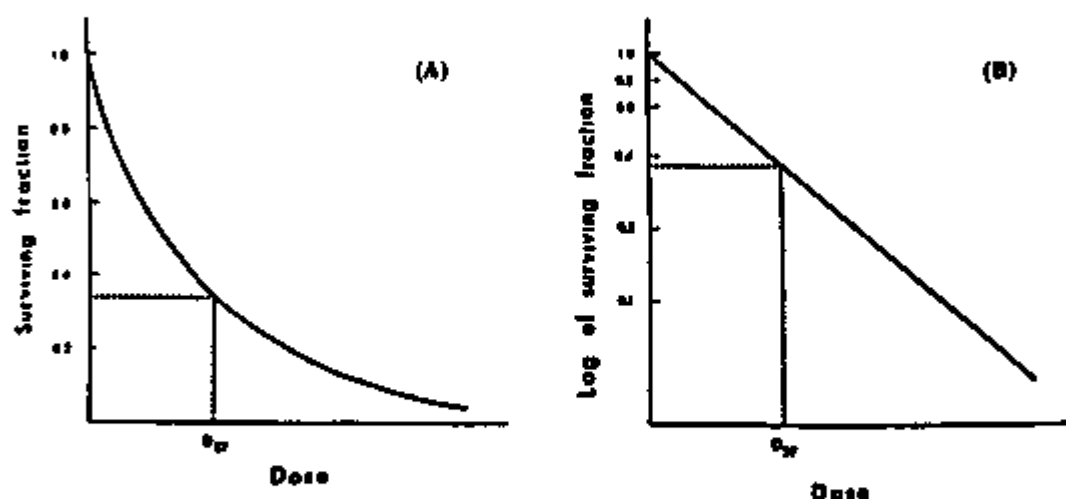


Figura 2 Relação entre dose e fração de sobrevivência de organismos nas escalas linear (A) e logarítmica (B) (CASARETT, A. P. Radiation Biology, Englewood Cliffs, NY, Prentice-Hall, 1968)

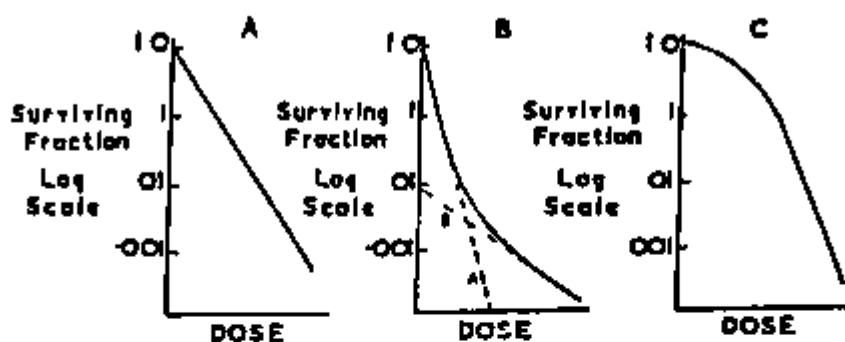


Figura 3 Curvas de sobrevivência de bactérias (A) curva exponencial, (B) curva bifásica, (C) curva de múltiplos eventos (COGGLE, J. E. Biological Effects of Radiation, London, Wykeham, 1971)

3.2 FASE DO CICLO CELULAR

Da mesma maneira o estágio do ciclo celular no momento da irradiação constitui um fator importante na determinação da radiosensibilidade de um tipo celular específico. As células em mitose ou em G_2 são as mais sensíveis enquanto que as células na fronteira G_1/S são as mais resistentes com uma diferença na radiosensibilidade por um fator de 4 ou 5 (Chapman & Allalunis Turner 1991).

Os mecanismos que regem esta diferença de radiosensibilidade dentro do ciclo celular não estão totalmente elucidados. Admite-se que a variação de radiosensibilidade resulta em parte de alterações nas concentrações intracelulares de compostos endógenos contendo grupos SH sulfidrilos como a glutatona (GSH). Porém estudos recentes com células tumorais e células de roedores tanto *IN VIVO* como *IN VITRO* indicaram que o conteúdo de glutatona não variou significativamente através do ciclo celular.

Outra hipótese talvez a mais aceita esta relacionada com a configuração ou com o estado de condensação do DNA cromossômico das células mitóticas. Quanto mais fortemente compactado o material genético as regiões danificadas se tornariam menos acessíveis ao reparo enzimático enquanto que durante a fase sintética as alças do DNA estariam mais disponíveis à ação das enzimas do reparo e dessa maneira seriam menos radiosensíveis.

3.3 OCORRÊNCIA DE MÚLTIPLAS COPIAS DE MOLÉCULAS E ORGANELAS

Grande parte da energia depositada em células após a irradiação pode não ser deletéria dependendo da quantidade de componentes intracelulares e da sua taxa normal de substituição.

Para células que contêm muitas moléculas e organelas em concentrações relativamente altas como H_2O , glutatona, RNA, lisossomos, mitocôndrias etc. e provável que os processos normais de turnover se encarregassem pela remoção de moléculas e organelas danificadas pela radiação e pela substituição por outras não danificadas para a manutenção da sua integridade. Um dos exemplos que talvez ilustrem esta influência da composição citoplasmática na radiosensibilidade celular seria aquele dos pequenos linfócitos do sangue periférico que representam uma das inconsistências da lei de Bergonie e Tribondeau. São células especializadas que normalmente não se dividem e são extremamente radiosensíveis apresentando uma relação volume nuclear e citoplasmático grande. A sua escassez em organelas contrasta por exemplo com as células musculares ou hepáticas que contêm uma grande quantidade de organelas particularmente mitocôndrias e são bastante radioresistentes.

3.4 PROCESSO DE REPARO CELULAR

Enquanto que a formação de radicais livres e a ação de scavenger de radicais ocorrem dentro de um tempo extremamente pequeno após a interação da radiação com a matéria os processos de reparo celular podem levar várias horas para a sua expressão.

Todos os processos enzimáticos associados com a detecção e remoção de dano de DNA resssintese, ligação das fitas quebradas do DNA fazem parte do reparo.

Os mecanismos de reparo enzimático são particularmente importantes para uma molécula como o DNA que ocorre em uma única cópia. Pelo fato da informação genética estar codificada no DNA sua integridade estrutural e funcional e de suma importância para manter o seu potencial replicativo.

Admite-se que a ampla variação de radiosensibilidade intrínseca observada em células humanas *IN VITRO* seja predominantemente uma consequência de diferentes níveis de indução de lesão de DNA e da eficiência de reparo de várias células (Chapman & Allalunis Turner 1991). No entanto para as células não proliferativas até que ponto a indução de lesão no DNA e o reparo estão envolvidos na expressão do dano da radiação ainda não estão esclarecidos.

IV CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE MORTE CELULAR

A morte celular é um dos critérios mais utilizados em radiobiologia na avaliação da sensibilidade de um determinado sistema irradiado. No entanto ela apresenta conotações diferentes conforme o tipo celular em questão.

Para células diferenciadas que não se dividem ou que raramente se dividem como aquelas do rim, músculo ou neurônios a morte pode ser definida como a perda de uma função específica ou uma lise celular. Esta modalidade de morte é chamada de morte interfásica ou morte não mitótica (Coggins 1971).

Para células proliferativas como as precursoras do sistema hematopoiético ou células em cultura a morte consiste na perda da capacidade de células irradiadas de sofrer divisões ilimitadas embora morfológica, fisiológica e metabolicamente elas possam parecer normais. Esta perda da integridade reprodutiva é chamada de morte reprodutiva ou morte mitótica porque a célula pode até estar fisicamente presente e aparentemente intacta mas ela é incapaz de se reproduzir.

Estas modalidades de morte são relevantes em radiobiologia particularmente para a radioterapia do tumor. Primeiramente a morte é um parâmetro facilmente mensurável e passível de comparação quantitativa pela observação da capacidade de formar colônias de células cultivadas *IN VITRO* ou de iniciar o crescimento tumoral *IN VIVO*. Em segundo lugar para um tumor ser erradicado dos tecidos é necessário que as células malignas sejam mortas no sentido de que elas sejam incapazes de se dividir e de propagar a malignidade.

Geralmente uma dose de alguns cGy é suficiente para causar a perda da capacidade proliferativa enquanto que doses mais altas da ordem de algumas centenas de Gy são necessárias para destruir uma função celular em sistemas não proliferativos (Hall 1978).

Várias evidências experimentais apontam o núcleo ou o DNA como o alvo primário para a morte reprodutiva induzida pela radiação em sistemas proliferativos. De fato o número de quebras das fitas duplas de DNA não reparadas e sua expressão como aberrações cromossômicas na mitose esta fortemente correlacionada com a perda da capacidade de proliferação celular. Em sistemas não proliferativos as alterações no DNA causadas pela radiação podem também ser importantes na expressão de dano celular.

No entanto em vista do lapso de tempo relativamente longo entre a indução do dano molecular pela radiação e a expressão de um fenotipo celular alterado muitas vezes é difícil estabelecer uma relação de causa e efeito. Os resultados de alguns estudos sugerem que as membranas celulares podem ser o alvo da radiação para a morte interfásica, onde os seus efeitos podem ser observados sem a necessidade da replicação do DNA (Chapman & Allalums Turner 1991)

As membranas celulares são particularmente vulneráveis ao ataque dos radicais livres isto decorre do processo de peroxidação lipídica uma reação em cadeia na qual um radical livre pode causar a produção de outros resultando na formação de peróxidos lipídicos (Lohr 1991). A produção de peróxidos lipídicos nas membranas pode alterar as suas propriedades causando mudança na permeabilidade decrescendo a fluidez e formação de poros de peróxidos que permitem o escoamento de Ca^{++} outros ions e moléculas de baixo peso molecular que podem levar diretamente a morte celular.

Uma das membranas particularmente importantes neste aspecto é a membrana interna da mitocôndria, onde ocorre a cadeia de transporte de eletrons, de dessa maneira esta constantemente exposta a formação de radicais livres. Igualmente lesões nas membranas dos lisossomos podem levar a citólise pela liberação descontrolada de enzimas degradativas hipótese defendida por Bacq e Alexander (1961). Os autores salientaram o significado e a importância da barreira intracelular na manutenção da integridade e viabilidade da célula como uma explicação para a morte interfásica induzida pela radiação.

Esta hipótese não foi satisfatoriamente comprovada e ficou abandonada por muito tempo mas autores como Szekely e colaboradores (1982) e Koteles (1986) sustentam a validade desta teoria.

1 TEORIA DO ALVO

Por volta de 1930 a 1940 os biofísicos tentaram explicar quantitativamente a curva de sobrevivência de organismos usando a teoria da probabilidade. Eles observaram uma relação direta entre a dose de radiação e o número de organismos mortos. Como resultado de vários estudos realizados foi estabelecida a teoria do alvo desenvolvida por D E Lea, em 1946.

A teoria do alvo é aplicável somente dentro de condições específicas e a parte de certas suposições básicas como a produção de ionização em uma molécula ou estrutura em particular (alvo) que seria a responsável pelo efeito biológico mensurável. O alvo pode ser uma célula inteira, parte de uma célula ou uma molécula crítica. A produção de um evento efetivo no alvo é chamada de hit. Admite-se também que cada evento ionizante ocorre ao acaso em um sistema irradiado. Assim existe uma chance estatística de que qualquer alvo em particular receba um hit.

1.1 CURVA EXPONENCIAL DE SOBREVIVÊNCIA

Na forma mais simples da teoria do alvo um hit é suficiente para produzir um efeito mensurável em um organismo.

Com baixas doses de radiação o número de alvos com hit será diretamente proporcional a quantidade de radiação isto é se a dose duplica duplica também os alvos que recebem hit e dessa maneira duplica o número de organismos afetados.

A teoria do alvo quando aplicada a uma população celular na qual o efeito medido é a letalidade a fração da população que sobrevive é representada como mostra a figura 2 A. Cada aumento de dose inativa a mesma proporção de organismos sobreviventes e assim, o número de organismos viáveis decresce numa progressão geométrica. Pode-se dizer então que a curva de sobrevivência é exponencial. Se a fração de sobrevivência é representada numa escala logarítmica obtém-se uma linha reta (figura 2 B).

A relação numérica da teoria do alvo pode ser expressa da seguinte maneira. Se N_0 = número de organismos inicialmente presentes e N = número de organismos sobreviventes após a dose D cada incremento de dose (dD) o N decrescerá por um fator (dN) que será proporcional ao número presente N .

$$-\frac{dN}{dD} = kN \quad \text{ou} \quad \frac{dN}{N} = -k dD \quad \text{integrando}$$

tem-se

$$\ln \frac{N}{N_0} = -kD \quad \text{ou} \quad \frac{N}{N_0} = e^{-kD}$$

Se a fração de células sobreviventes é S então

$$S = e^{-kD} \quad \text{ou} \quad \ln S = -kD$$

A inclinação da curva de sobrevivência é k , uma constante de proporcionalidade. Se admitir que a distribuição de hits segue a distribuição de Poisson pode ser mostrado que a constante de proporcionalidade (k) é igual a $1/D_0$, onde D_0 é a dose que dá em média um hit por alvo.

Quando a dose D tem sido tal que $D/D_0 = 1$ e desde que $e^{-1} = 0,37$ isto equivale a 37% ou a dose e^{-1} .

$$S = e^{-D/D_0} = e^{-1} = 0,37 \quad \text{portanto} \quad N = 0,37N_0$$

Assim sendo quando há em média um hit por alvo isto é o número de hits é igual ao número de alvos (um hit e um alvo) 37% do número original de organismos sobrevivem (Casareit 1968).

Na prática esta relação é usada de modo reverso a dose necessária para reduzir o número de indivíduos da população a 37% pode ser determinada diretamente da curva de sobrevivência. É a D_0 ou a dose D_{37} que é usada para comparar a sensibilidade de diferentes sistemas a radiação.

Certos sistemas biológicos respondem a radiação de acordo com a cinética preconizada pela teoria do alvo simples isto é os dados de sobrevivência se ajustam melhor a uma curva exponencial e não há efeito apreciável de taxa de dose. Estes sistemas podem ser considerados como se eles apresentassem alguma região do alvo ou um sítio sensível onde uma ionização resultasse direta ou indiretamente numa inativação.

São os casos encontrados na inativação de certas moléculas como enzimas na sobrevivência de vírus e de algumas bactérias e em certos casos de células de mamíferos.

1.2 CURVA BIFÁSICA DE SOBREVIVÊNCIA

Diferentes cepas de bactérias podem apresentar diferentes tipos de curvas de sobrevivência. A figura 3A mostra uma curva simples exponencial similar aquela da inativação viral. A D_0 que é o parâmetro de sensibilidade medida da inclinação da reta, depende da cepa de bactérias e geralmente oscila entre 1 a 250 Gy ao passo que a de vírus fica em torno de 500 Gy (Coggle 1971).

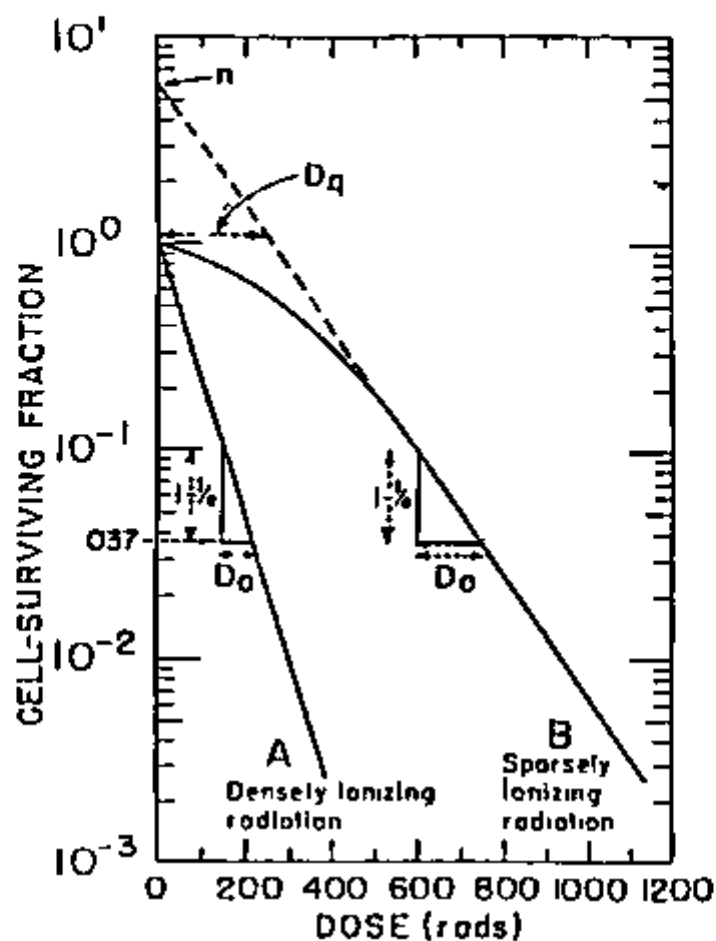
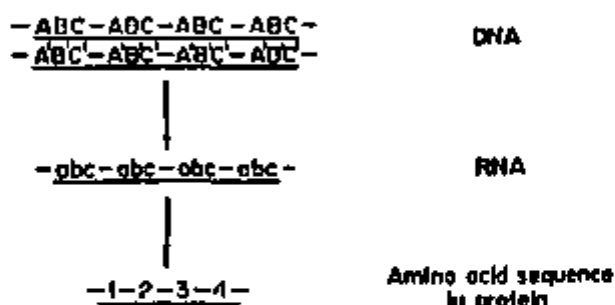
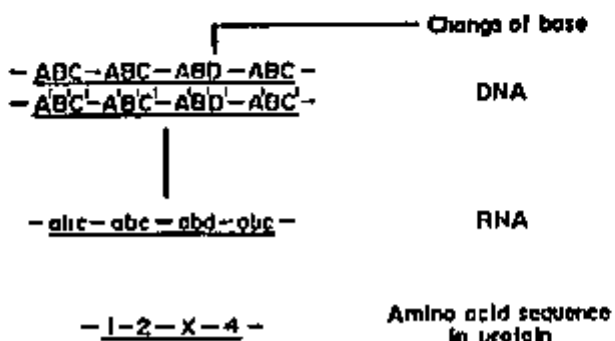


Figura 4 Curvas de sobrevivência típicas de células de mamíferos expostas a radiação de ionizações densas (A) e esparsas (B) (HALL, E J Radiobiology for the Radiobiologist, 2ª ed., Hagerstown, Md, Harper & Row, 1978)

Transcription and translation of genetic information



Base substitution mutation



Frameshift mutation

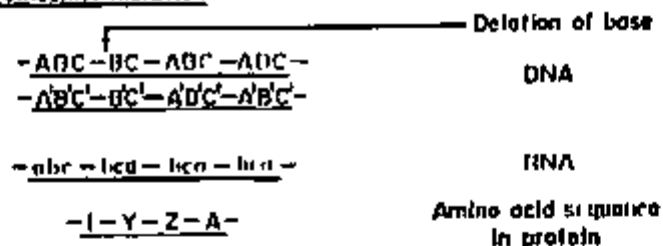


Figura 5 Indução de mutação gênica (PARRY, J M & WATERS, E M Carcinogenic, mutagenic and teratogenic biologicals in ROBINSON, C W & HOWELL, J A EDS Comprehensive Biotechnology, New York, NY, Pergamon, 1985 v 4 p569-85)

A figura 3B representa uma curva de sobrevivência bifásica. Pode ser o resultado da irradiação de 2 populações de bactérias, cada uma tendo uma diferente radiosensibilidade (D_0 diferente) ou de uma mistura de 2 tipos de células, um que se divide rapidamente e portanto mais sensível e outro na fase estacionária que é menos sensível.

A figura 3C representa uma curva com um shoulder nas baixas doses e torna-se exponencial somente nas doses mais altas. Este tipo de curva é típica de células de mamíferos.

1.3 CURVA SIGMOIDAL DE SOBREVIVÊNCIA

As curvas de sobrevivência de células de mamíferos são geralmente apresentadas na forma mostrada na figura 4, dose representada na escala linear e fração de sobrevivência na escala logarítmica.

Para radiações de alta TLE como partícula alfa ou neutrão, a curva de sobrevivência se ajusta melhor a uma função exponencial (curva A). A TLE associada a estes tipos de radiação é alta de modo que o trajeto resultante produziria ionizações suficientes para ocasionar a morte ao atravessar a célula. Com o aumento da dose de radiação, mais trajetos serão formados e portanto mais células serão atingidas de acordo com a cinética da teoria do alvo.

Para uma determinada linhagem celular exposta a este tipo de radiação, a curva de sobrevivência é caracterizada praticamente por um parâmetro, a inclinação da reta ou D_0 . Na prática, a D_0 é determinada pela porção reta da curva de dose-resposta como a dose necessária para reduzir o número de células sobreviventes a 37%. Por exemplo, de 0.1 a 0.037 ou de 0.01 a 0.0037.

No caso de radiações esparsas como raios X ou gama, a curva de sobrevivência geralmente apresenta uma forma característica (curva B), um shoulder nas doses baixas e a medida que aumenta a dose de radiação, tende a uma exponencial (Hall, 1978). A curva que resulta é característica de múltiplos eventos.

Este modelo sugere que a região do shoulder na curva de sobrevivência indicaria um acúmulo de danos subletais. Com o aumento da dose de radiação, aumentaria a probabilidade de que mais alvos no interior da célula sejam atingidos e causaria assim a sua morte. Estas observações sugerem um dano cumulativo da radiação.

Uma outra interpretação atribui a presença do shoulder ao processo de recuperação e o aumento da letalidade com o incremento da dose de radiação seria em virtude de uma menor eficiência da recuperação.

Para definir uma curva deste tipo pelo menos 2 parâmetros precisam ser caracterizados. O primeiro é a inclinação da porção retilínea da curva, expresso como D_0 . O segundo parâmetro é o número n que é obtido pela extrapolação da porção retilínea da curva até a sua interseção com o eixo da fração de sobrevivência isto é, da dose zero. O número de extrapolação é importante porque ele é a medida da extensão do shoulder. Se há um shoulder pequeno o número de extrapolação será pequeno (1.5 ou 2.0) se há um shoulder grande o n será também alto (10 ou mesmo 20).

Originalmente, o n era considerado o número de alvos, mas havia muita controvérsia na sua interpretação e atualmente refere-se somente como o número de extrapolação.

Alguns autores preferem utilizar dose-quase-treshold ou D_q que é usada como uma medida do reparo. A D_q pode ser obtida pelo intercepto da porção exponencial da curva com o eixo da ordenada, quando se tem 100% de sobrevivência.

Os 3 parâmetros n , D_0 e D_q podem ser expressos pela equação $\log n = D_q/D_0$.

Observe-se que os neutrões são muito mais eficientes para induzir a morte celular que os raios X ou gama. Uma vez que a curva de sobrevivência para a radiação de alta TLE é exponencial e falta o shoulder, o fracionamento de dose não produzirá um efeito reduzido na morte celular. A recuperação torna-se difícil com a radiação de alta TLE.

A curva de sobrevivência exponencial para a inativação viral foi descrita como um modelo de um hit, um alvo e as de células de mamíferos como modelo de múltiplos eventos. De fato, muitas curvas de sobrevivência de células de mamíferos se ajustam melhor ao modelo teórico de múltiplos alvos, um hit. De acordo com este modelo, certos sistemas apresentariam mais do que um alvo e cada um desses alvos necessitariam receber um hit para produzir um efeito biológico detectável.

O modelo alternativo de múltiplos hits, um alvo, postula que 2 ou mais hits são necessários para um único alvo para a sua inativação.

Infelizmente, os dados experimentais com células de mamíferos raramente oferecem a possibilidade de permitir a distinção entre modelos de múltiplos alvos, um hit e múltiplos hits, um alvo. Todavia, sabe-se hoje que estas interpretações da forma de curva de sobrevivência são super-simplificações e que a aplicação da teoria de alvo para certas situações nem sempre leva a análises corretas. Há vários fatores como a ação indireta dos radicais livres, reparo biológico, mutações, condições físicas de irradiação, estado fisiológico das células, estado do ciclo celular que podem alterar o shoulder ou a inclinação da porção reta da curva de sobrevivência.

A despeito da imprecisão dos termos hit e alvo quando aplicados às células de mamíferos, a teoria do alvo continua sendo uma maneira útil para analisar a curva de sobrevivência celular e conveniente descrever as curvas de sobrevivência por expressões razoavelmente simples mesmo que sejam utilizadas como aproximações. O modelo tem sido extremamente valioso como um meio de descrever as cinéticas de resposta de certos organismos à radiação e com modificações tem dado uma ideia dos mecanismos de ação da radiação numa variedade ampla de populações compostas de células.

V CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE MUTAÇÃO

Todos os organismos vivos são constituídos de células que representam a sua menor unidade morfo-funcional e independente. No núcleo celular estão alojados os cromossomos que são estruturas filamentosas formadas essencialmente por moléculas de DNA e proteínas. O DNA por sua vez contém os genes que se dispõem linearmente nos cromossomos e são os responsáveis pelas informações genéticas. A integridade destas informações é mantida por um mecanismo complexo envolvendo importantes funções celulares que são a replicação, reparo e recombinação. A mutação, alteração no conteúdo informacional do

DNA transmissível a gerações seguintes pode ser o resultado de erros que ocorrem em qualquer um desses processos.

As mutações podem ocorrer espontaneamente como resultado do próprio metabolismo celular ou das interações com o meio ambiente. Em geral as mutações novas são nocivas, isso porque as benéficas já foram incorporadas pela seleção natural ao longo da evolução.

As alterações no conteúdo informacional da célula podem ocorrer de várias maneiras e em diferentes níveis desde a mudança na estrutura molecular dos genes até as mudanças envolvendo o número de cromossomos completos do genoma. Assim as mutações podem ser classificadas em 3 grandes grupos gênicas, cromossômicas e genômicas.

1 MUTAÇÃO DE PONTO OU GÊNICA

Quando a mutação ocorre ao nível do próprio gene envolvendo alterações em um ou mais nucleotídeos dentro de um códon, tem-se mutação pontual. Estruturalmente a mutação pode ser consequente a substituição de um dos pares de base da cadeia polinucleotídica (base substitution mutation) ou ao deslocamento do quadro de leitura por adição ou perda de um ou alguns pares de base (frame shift mutation) (figura 5).

Mutação por substituição de bases: dois tipos de substituição de bases podem ocorrer: transição e transversão. Uma transição corresponde à troca de uma base purínica por outra purínica ou de uma base pirimídica por outra pirimídica. Na transversão uma base purínica é substituída por uma pirimídica ou vice-versa.

Mutação por deslocamento do quadro de leitura: adição ou deleção de nucleotídeos do DNA levam a um deslocamento do quadro de leitura. Consequentemente esta mudança conduz a transcrição de um RNAm fora de fase alterando a seqüência de aminoácidos na proteína sintetizada.

As mutações gênicas de modo geral são causadas por alterações muito pequenas no DNA. Na maioria das vezes elas são detectáveis através de seus efeitos sobre o fenótipo, mas algumas podem não provocar alteração no fenótipo (mutações silenciosas). Neste caso o codon modificado especifica o mesmo aminoácido (código degenerado) ou a troca de um ou mais aminoácidos não altera a função da proteína ou ainda pode ser compensada por uma supressão. Assim sendo a taxa de mutações detectadas geralmente é menor que a frequência real de mutações presentes.

2 MUTAÇÃO CROMOSSÔMICA OU ABERRAÇÃO CROMOSSÔMICA ESTRUTURAL

Este tipo de mutação é identificada pela alteração da própria estrutura cromossômica, o que acarreta, consequentemente a modificação da seqüência de genes ou a produção de uma seqüência incompleta de genes. Este tipo de alteração resulta de quebra e reunião errônea de material cromossômico durante o ciclo celular. A perda do DNA ou seu reposicionamento durante este processo pode resultar em consequências drásticas para a expressão gênica e em muitos casos as mutações cromossômicas são letais para a célula.

3 MUTAÇÃO GENÔMICA OU ABERRAÇÃO CROMOSSÔMICA NUMÉRICA

Este tipo de mutação envolve uma alteração no número de cromossomos levando a um desvio do

cariótipo normal característico da espécie. Podem ser de 2 tipos: aneuploidia quando ocorre uma alteração numérica de um ou mais cromossomos do genoma (monossomia, trissomia, tetrasomia etc.) e euploidia, quando ocorre a perda de todo um conjunto do genoma da espécie originando indivíduos haplóides (n) ou o acréscimo de um ou mais conjuntos do genoma, dando indivíduos triploides ($3n$), tetraploides ($4n$) ou poliploides.

As mutações cromossômicas e genômicas são comumente denominadas de aberrações cromossômicas estruturais e numéricas respectivamente e são geralmente detectáveis pelo simples exame microscópico de células fixadas e coradas na metáfase.

4 SIGNIFICADO DAS MUTAÇÕES

Uma série de anomalias congênitas que ocorrem na população humana são atribuídas às mutações e incluem tanto as gênicas como as cromossômicas e genômicas. As mutações genômicas incluem monossomias (síndrome de Turner) e várias trissomias nas quais o indivíduo afetado tem 3 em vez de 2 cópias de um cromossomo particular. Exemplos dessas síndromes são Down (trissomia do 21), Edwards (trissomia do 18) e Patau (trissomia do 13) (Beiguelman 1982).

Uma reavaliação feita pela UNSCEAR (1986) estima que cerca de 40% dos abortos espontâneos, 6% das mortes neonatais e 5% das anomalias congênitas estão associados a problemas cromossômicos tanto de estrutura como de número.

Populações expostas à radiação ionizante (sobreviventes da bomba atômica) ou a genotóxicos químicos apresentam frequências aumentadas de aberrações cromossômicas em seus linfócitos. Muitos tipos de cânceres humanos estão relacionados a aberrações cromossômicas específicas e não específicas (Yunis 1983). Várias doenças hereditárias humanas (ataxia telangectasia, anemia de Fanconi, síndrome de Bloom) estão associadas com frequências altas de aberrações cromossômicas e de incidências de câncer.

Efeitos de mutações gênicas podem resultar em condições dominantes autossômicas como a Corea de Huntington (0,1 - 0,22 por 1000 nascimentos vivos) ou recessivas autossômicas como a doença de Tay Sachs (0,001 - 0,003 por 1000 nascimentos vivos) (Venitt & Parry 1984).

A doença de Huntington é um defeito neurodegenerativo progressivo cujo gene afetado se situa no cromossomo 4. Os primeiros sintomas desta doença geralmente ocorrem na terceira a quarta década de idade e a doença é caracterizada por anomalia motora progressiva, deterioração intelectual acompanhada de um quadro psiquiátrico proeminente incluindo depressão grave.

A doença de Tay Sachs por sua vez afeta crianças por volta de 6 meses de idade e progride até 2 ou 3 anos culminando em morte. Caracteriza-se por apresentar cegueira progressiva, paralisia e distúrbio mental em virtude do acúmulo de lipídeos no cérebro. Um sinal bastante proeminente é o aparecimento de um ponto vermelho-cereja na mácula da retina. A grande maioria das crianças acometidas são judias.

Uma mutação dominante que resulta na morte prematura ou que impede a reprodução não será transmitida às gerações futuras e portanto o gene mutado é eliminado da população. Todavia, mutações dominantes que são expressas tardiamente na vida

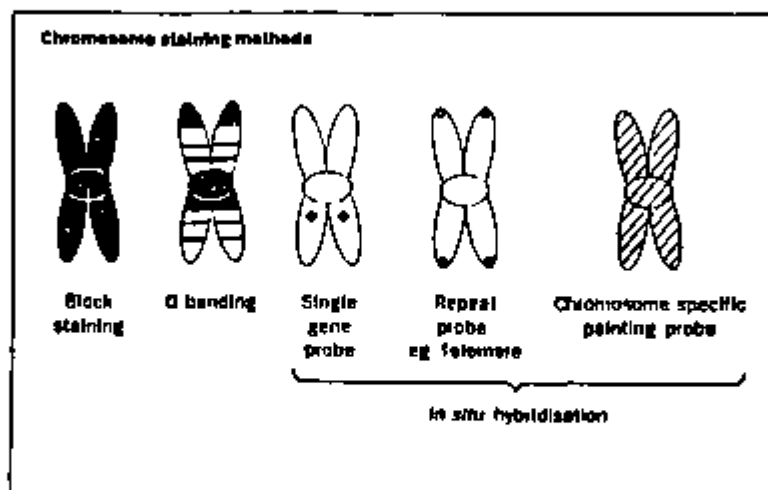


Figura 6 Vários métodos de coloração cromossômica (BOUFFLER, S D Molecular cytogenetics and radiation research Radiol Prot Bull, 134 15-21, 1992)

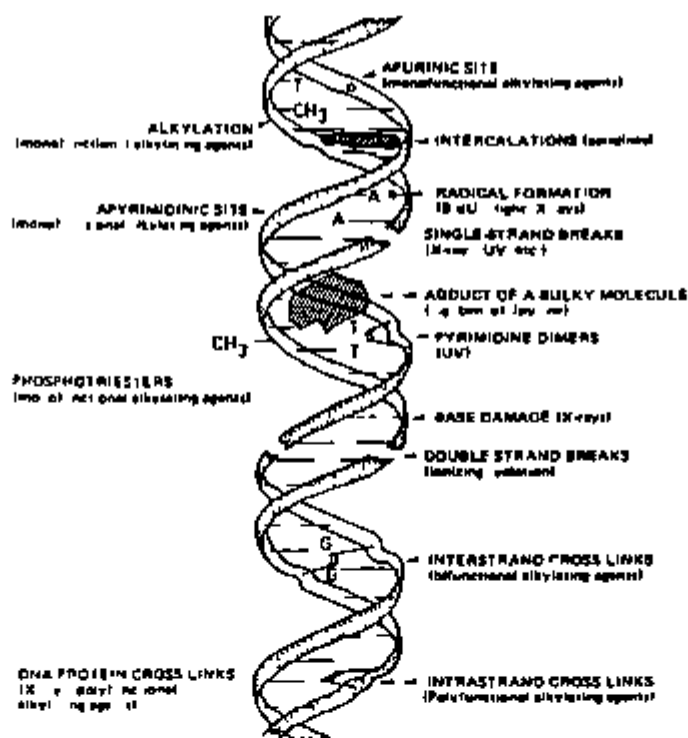


Figura 7 Lesões primárias identificáveis no DNA após o tratamento com carcinógenos mutagênicos (INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY Biological dosimetry Chromosomal aberration analysis for dose assessment Vienna, 1986 (Technical Report Series, 260))

| | (A) | (B) | | (C) | | (D) | |
|------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|---------------|------------------------|
| | Single break | Inte arm int exchange | | Interarm | Intraexchange | Symmetrical | Asymmetrical |
| Interphase | | | | | | | |
| Metaphase | | | | | | | |
| Anaphase | | | | | | | |
| | Terminal Deletion | Interstitial Deletion | Paracentric Inversion | Pericentric Inversion | Deletion and Rings | Translocation | Dicentric and Deletion |

Figura 8 Aberrações do tipo cromossômico, mostrando as lesões que ocorrem na interfase e alguns tipos de interações entre as extremidades quebradas. O resultado dessas interações são apresentadas na metafase e na anafase. As lesões dos tipos (B), (C) e (D) envolvem 2 quebras (CASARETT, A P. Radiation Biology Englewood Cliffs, NY, Prentice-Hall, 1968)

| | (A) | (B) | (C) | (D) | |
|-----------|-------------------|------------------------|-----------------------|---------------|------------------------|
| | Single break | Dimer Union | Interarm Int exchange | Symmetrical | Asymmetrical |
| Prophase | | | | | |
| Metaphase | | | | | |
| Anaphase | | | | | |
| | Terminal Deletion | Dicentric and Deletion | Ring and Deletion | Translocation | Dicentric and Deletion |

Figura 9 Aberrações do tipo cromatídico. Estas lesões são produzidas quando as células são irradiadas na interfase tardia ou na profase. Interações entre as extremidades quebradas e o rearranjo resultante são apresentados na metafase e na anafase. As lesões dos tipos (B), (C) e (D) envolvem 2 quebras (CASARETT, A P. Radiation Biology Englewood Cliffs, NY, Prentice-Hall, 1968)

serão transmitidas. Em contraste mutações recessivas estão dormentes na população na condição de heterozigose e somente serão expressas quando a homozigose for atingida.

Os efeitos de uma mutação dominante serão aparentes na primeira geração após a sua indução enquanto que as mutações recessivas podem ser expressas após transcorridas muitas gerações. A frequência de herança dominante observável na população é um reflexo destas mutações induzidas nos gametas de geração parental. Todavia a frequência de heranças recessivas numa população representa o resultado do acúmulo de mutações induzidas em muitas gerações após ser atingido o estado de homozigose.

A origem de genes mudados na população humana é matéria de controversia. Admite-se que uma boa parte deles se origina de exposição aos mutagênicos ambientais.

As mutações induzidas pela radiação ionizante diferem em alguns aspectos daquelas induzidas por outros agentes ambientais. Enquanto que as mutações radioinduzidas geralmente envolvem todo o cromossomo a radiação ultravioleta e clastogênicos químicos afetam somente uma das cromátides do cromossomo. Ao nível molecular a radiação ionizante é mais eficiente em produzir deleções e rearranjos cromossômicos do que substituições de pares de base que são os eventos mais comuns após a ação de mutagênicos químicos (Harris 1991).

Em vista do potencial clastogênico da radiação ionizante em células eucarióticas a análise cromossômica é muito utilizada por exemplo na predição da susceptibilidade dos sistemas ao dano genético induzido pela radiação. Particularmente em dosimetria biológica as aberrações cromossômicas são utilizadas como um parâmetro valioso na estimativa de dose absorvida em pessoas expostas acidental ou ocupacionalmente à radiação.

VI ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

A primeira evidência de que os raios X podem induzir aberrações cromossômicas veio de estudos pioneiros de Muller em 1927 com *Drosophila*. A produção de aberrações cromossômicas pela radiação ionizante e pela ultravioleta foi confirmada posteriormente em várias espécies de plantas e animais.

Já no final da década de 40 havia sido feita uma classificação estrutural de diferentes tipos de aberrações cromossômicas. Além da mera descrição morfológica alguns pesquisadores analisaram aspectos quantitativos de diferentes tipos de aberrações produzidas por uma dada dose de radiação.

Nas décadas de 50 e 60 verificou-se que os agentes químicos são também capazes de induzir aberrações e uma ênfase maior foi dada à capacidade das células de reparar os danos cromossômicos causados por clastogênicos ambientais.

Um avanço significativo na área de citogenética ocorreu no final da década de 60 e no início de 70 graças à técnica de bandamento que não somente permitiu identificar regiões específicas do cromossomo como também possibilitou visualizar uma estreita associação entre alterações cromossômicas e certos tipos de cânceres. Mais recentemente a citogenética acoplada às técnicas de biologia molecular

tem proporcionado uma maior resolução da análise cromossômica. Um exemplo é a técnica de hibridização *IN SITU* (figura 6) que detecta genes específicos ou outras seqüências de DNA ou cromossomos individuais em preparações metafásicas ou mesmo em núcleos interfásicos (Bouffler 1992).

1 TIPOS DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

Sabe-se que diferentes tipos de lesões podem ser induzidas no DNA celular pelos mutagênicos físicos e químicos (figura 7). Dentre eles a radiação ionizante produz essencialmente 4 tipos de lesões no DNA: quebras na fita simples, quebras na fita dupla, danos de base e ligações cruzadas entre DNA-DNA, DNA-proteínas etc. Muitas dessas lesões primárias são contudo reparadas rapidamente para reverter a configuração original pela maquinaria de reparo celular com a participação de vários tipos de enzimas. Somente uma quantidade muito pequena de lesões não reparadas ou erros nesse reparo dão origem a aberrações cromossômicas produzindo respectivamente deleções terminais e vários tipos de aberrações por rearranjo.

Dessa maneira as aberrações cromossômicas não são meramente o resultado de uma interação direta entre um mutagêneo e o DNA celular. Sua produção envolve também o processo de reparo. Uma aberração cromossômica é portanto o resultado de conjunto da ação de um agente clastogênico e dos eventuais erros causados pelos mecanismos de reparo celular quando agem sobre as lesões primárias induzidas. Uma exceção a este conceito pode ser uma quebra direta na dupla fita do DNA que se não reparada permanece como uma quebra no cromossomo resultando em uma deleção terminal.

As aberrações cromossômicas podem ser induzidas em qualquer fase do ciclo celular. Elas são melhor visualizadas porém na metafase ou na anafase quando os cromossomos estão no seu estado de máxima condensação e facilmente identificados e caracterizados como estruturas independentes.

As aberrações são classificadas de acordo com a porção afetada dos cromossomos: tipo cromossômico quando envolve ambas as cromátides irmãs, tipo cromatídico somente uma das cromátides irmãs e tipo sub-cromatídico menos frequente do que os anteriores que envolve apenas pequenas porções de cromátides formando pequenas pontes características. Todos esses tipos de aberrações exigem quebras nos cromossomos para a sua formação.

Assim quando células vegetais ou animais são expostas à radiação ionizante ou a certas substâncias químicas diferentes tipos de aberrações são produzidos dependendo do estado do ciclo celular no momento da exposição: aberrações do tipo cromossômico quando a célula é irradiada em G_0 ou G_1 (figura 8), tipo cromatídico em G_2 (figura 9), uma mistura destes 2 tipos em S e do tipo sub-cromatídico na fase tardia (Carrano & Natarajan 1987).

As radiações ionizantes são portanto agentes S independentes pois as aberrações induzidas não necessitam passar pela fase de síntese do DNA para se manifestarem. Já os agentes S dependentes como a radiação ultravioleta e agentes alquilantes induzem aberrações do tipo cromatídico em todas as fases do ciclo celular as aberrações para serem visualizadas

necessitam passar por uma fase sintética entre a exposição e a observação do efeito

Do ponto de vista da análise ao microscópio óptico definem-se os seguintes tipos de aberrações quebras isto é descontinuidades maiores que a largura da própria cromátide e gaps ou falhas acromáticas Os gaps diferem das quebras por apresentarem descontinuidades menores do que a largura de uma cromátide e cuja porção distal permanece na mesma direção da porção proximal Originalmente as falhas foram classificadas como quebras mas uma vez que elas não produzem fragmentos acêntricos na anáfase deixaram de ser consideradas como descontinuidades verdadeiras No entanto muitos autores sustentam a hipótese de que as falhas devam ser incluídas entre as aberrações cromossômicas estruturais e que se não são quebras verdadeiras devem ser locais predispostos a essas lesões

2 ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS ESTAVEIS E INSTAVEIS

Existem 2 classes principais de aberrações cromossômicas que são induzidas pela radiação ionizante em linfócitos periféricos humanos São as aberrações instáveis e estáveis

Os fragmentos acêntricos aneis cêntricos e acêntricos e os dicêntricos pertencem ao grupo de aberrações instáveis (figura 10) pelo fato deles serem perdidos durante a divisão celular De fato os fragmentos acêntricos visto não apresentarem centrômero são impossibilitados de se orientarem no fuso mitótico e muitas vezes não são incorporados no núcleo celular (figura 11) Já os dicêntricos frequentemente resultam na formação de pontes na anáfase podendo interferir na separação física das duas células filhas (figura 12) Assim sendo estes tipos de aberrações podem ser eliminados seletivamente da população de células proliferativas (Braselman *et al* 1986)

Estimativas da taxa de eliminação de dicêntricos realizadas em vários sistemas IN VITRO mostram uma perda de cerca de 50% em cada geração celular (Carrano & Heddle 1973) Quanto a taxa de eliminação de fragmentos acêntricos os valores obtidos por diferentes autores apresentam discordâncias perda de cerca de 70% (Sasaki & Norman 1967) 50% (Carrano 1973) ou 20% (Bauchinger *et al* 1986) de fragmentos acêntricos durante a primeira divisão celular após a irradiação

Embora os processos que levam a morte celular após a irradiação sejam pouco elucidados muitos autores apontam a ocorrência destes tipos de aberrações em sistemas irradiados como as prováveis causas da morte reprodutiva

Não obstante estas observações a análise citogenética realizada em linfócitos periféricos de sobreviventes de Nagasaki e Hiroshima e de pessoas acidentalmente expostas a radiação mostrou que aberrações cromossômicas instáveis podem persistir por vários anos Um dos exemplos extremos são as anomalias citogenéticas complexas observadas nos sobreviventes da bomba atômica 20 ou mesmo 35 anos após a exposição

Por outro lado as translocações recíprocas e inversões aparentemente não causam uma dificuldade mecânica na divisão celular e são chamadas de

aberrações estáveis pelo fato delas poderem se perpetuar por várias gerações

Análises do cariótipo de células tumorais tem mostrado que certas translocações estão intimamente envolvidas em neoplasias (Solomon *et al* 1991)

Ha ainda evidência crescente de que quebras cromossômicas espontâneas ou induzidas quimicamente ou por radiação não ocorrem ao acaso no genoma de mamíferos Existem nos cromossomos certas regiões mais susceptíveis os sítios frágeis que podem expressar danos numa frequência significativamente elevada (Cox 1991 Barros *et al* 1989) Vários autores tem encontrado uma íntima associação entre posições cromossômicas de sítios frágeis localização dos protooncogenes e pontos de quebras para os rearranjos específicos da neoplasia (figura 13) O significado desta correlação e o possível envolvimento de sítios frágeis na determinação de susceptibilidade humana a neoplasia e todavia matéria de controversia Mas argumenta-se de que em certos casos os sítios de instabilidade cromossômica podem representar um papel central na gênese de neoplasia (Shafik *et al* 1990) Estas regiões são portanto consideradas como verdadeiros hot points tanto para as aberrações espontâneas como para as induzidas (Barros *et al* 1989)

3 MECANISMO DE FORMAÇÃO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

Dentre os diferentes tipos de lesões induzidas no DNA pela radiação as quebras na fita dupla são apontadas como as principais lesões envolvidas na produção de aberrações cromossômicas Contudo pouco se sabe ainda hoje sobre o mecanismo de formação de aberrações cromossômicas

Ha basicamente duas hipóteses que tentam explicar como se origina uma mudança estrutural A primeira hipótese lançada foi a de quebra e reunião (breakage and reunion) proposta por Sax (1938) Esta hipótese propõe que a radiação ionizante produz uma quebra física nos cromossomos As extremidades quebradas dos cromossomos podem reconstituir a configuração original e dessa maneira os cromossomos aparecem normais fundir-se com outra extremidade quebrada proxima para dar origem a uma aberração de rearranjo ou permanecer abertas aparecendo como quebras cromossômicas ou cromatídicas na metáfase As principais características desta hipótese são o evento primário e uma quebra nos cromossomos a quebra e reunião são eventos independentes separados no tempo e as deleções terminais envolvem somente uma quebra enquanto que os rearranjos duas quebras

A segunda hipótese a de troca (exchange) foi formulada por Revell (1974) Postula a passagem de um partícula ionizante nos cromossomos causando uma lesão menos drástica uma instabilidade local nos cromossomos Quando duas dessas lesões estiverem proximas uma da outra no tempo e no espaço elas eventualmente poderão se associar e ocorrendo uma interação recíproca entre os eventos primários produzir uma troca que podera ser acompanhada por uma quebra no ponto de troca Dois locais de danos em diferentes cromossomos podem produzir um rearranjo Porém quando a instabilidade ocorrer em ambas as cromátides irmãs ou numa mesma cromátide num ponto onde ela forma uma alça a troca podera eventualmente resultar em uma deleção A teoria proposta por Revell difere da

Figura 10 Formação de aberrações instáveis

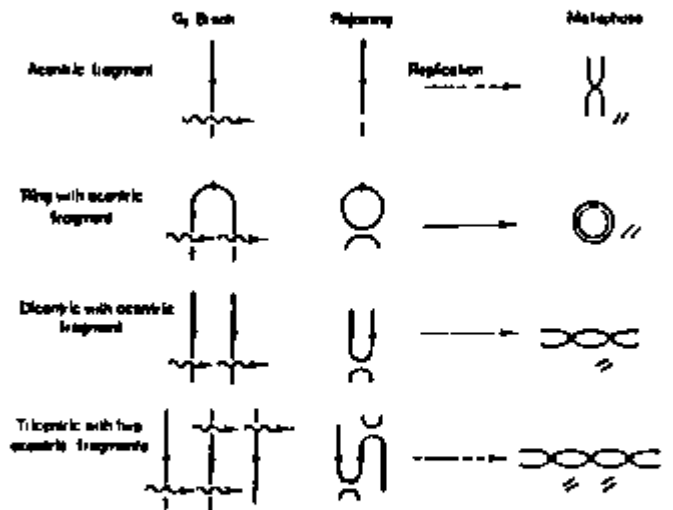


Figura 11 Possíveis destinos de fragmentos acêntricos durante a divisão celular I Perda de fragmentos para ambas as células-filhas, II incorporação de fragmentos acêntricos em uma ou ambas as células-filhas, III Incorporação de fragmentos em um dos núcleos-filhos

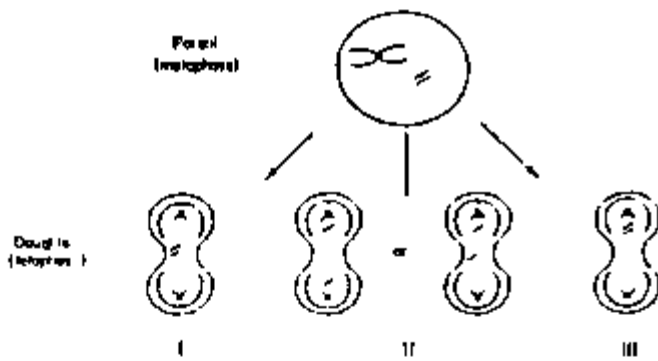
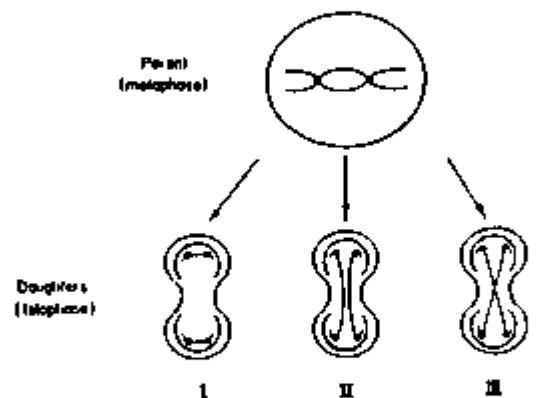


Figura 12 Possíveis destinos de um cromossomo dicêntrico durante a divisão celular I Incorporação nos núcleos filhos, II e III formação de pontes (CARRANO, A V & HEDDLE, J A J Ther Biol, 38 289-304, 1973)



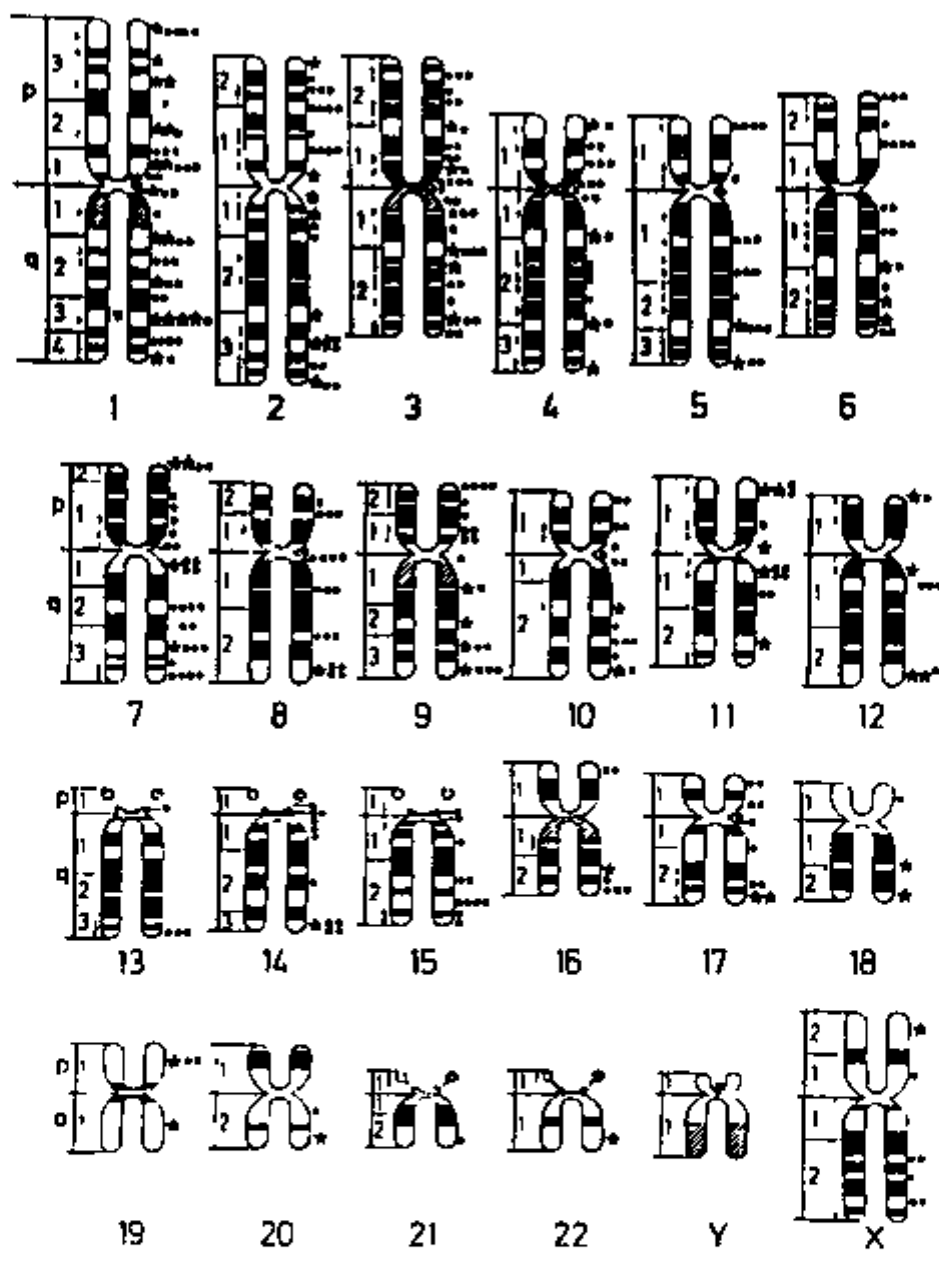


Figura 13 Distribuição de pontos de quebras em cromossomos, induzidas pela radiação * 5 pontos de quebra, ● um ponto de quebra (BARRIOS *et al* Cytogenetic effects of radiotherapy Breakpoint distribution in induced chromosome aberrations *Cancer Genet Cytogenet*, 41 61-70, 1989)

anterior em dois aspectos principais o evento primário da radiação não é meramente uma quebra mas sim uma lesão inicial num estado ativado que conduz a instabilidade local e que todas as aberrações induzidas incluindo deleções terminais originam-se de interação entre duas regiões danificadas.

Muito se discute sobre a validade dessas duas hipóteses e embora elas tenham sido propostas como formas alternativas aceitam-se ambas como válidas para explicar os mecanismos de formação de aberrações cromossômicas (Preston 1989).

VII INDICADORES BIOLÓGICOS

Quando células são expostas à ação de mutágenos físicos ou químicos as alterações citogenéticas como aberrações cromossômicas micronúcleos ou trocas entre cromátides irmãs (TCI) podem ser prontamente detectadas. Estes tipos de manifestações citogenéticas são utilizadas como parâmetros biológicos sensíveis em indivíduos expostos a carcinógenos genotóxicos.

1 MÉTODO CONVENCIONAL DE ANÁLISE DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

Dentre os vários tipos de aberrações cromossômicas induzidas pela radiação ionizante as aberrações instáveis principalmente os dicêntricos são utilizados como os melhores indicadores de dano por radiação por serem facilmente identificados sem necessitar de uma técnica específica de bandamento cromossômico. Por esta razão estes tipos de aberrações são empregadas na avaliação quantitativa de doses absorvidas de radiação para a dosimetria biológica.

A estimativa de dose se baseia na comparação da frequência de aberrações cromossômicas induzidas pela radiação em linfócitos de indivíduos expostos com a frequência observada em linfócitos irradiados *IN VITRO* com doses conhecidas. Para tanto há necessidade de elaboração de curvas de dose resposta.

A dosimetria biológica teve avanço significativo nestas últimas décadas graças a dois grupos de pesquisadores no início da década de 60 Moorhead *et al* (1960) descobriram que os linfócitos de sangue periférico humano um tipo celular que normalmente não se divide podem ser induzidos em cultura se as células eram estimuladas adequadamente com um extrato vegetal o de feijão (*Phaseolus vulgaris*) chamado de fitohemaglutina.

Os linfócitos se encontram no estado pressintético (G_0) e sob a ação do mitógeno sofrem uma transformação blástica e entram no estágio G_1 do ciclo celular.

Embora aberrações cromossômicas radioinduzidas tenham sido estudadas anteriormente em células humanas cultivadas e em células da medula óssea *IN VIVO* foi o desenvolvimento de técnica de cultivo de linfócitos *IN VITRO* por Moorhead e colaboradores que possibilitou aos citogeneticistas um acesso fácil a amostras de células humanas em divisão permitindo portanto o rápido desenvolvimento de citogenética da radiação e suas aplicações em dosimetria biológica.

A descoberta de que aberrações cromossômicas podem ser usadas como um dosímetro biológico foi primeiro estabelecido por Alan Conger em 1951 (Conger 1954) em *Tradescantia*. Ele foi capaz de demonstrar que as doses estimadas biologicamente por meio do número de aberrações induzidas por radiação

em plantas coincidia com as doses medidas pelos métodos físicos convencionais.

Em 1962 Bender e Goebel foram os primeiros a propor este método para a avaliação quantitativa de dose absorvida de radiação no homem baseados na consistência da relação entre a dose aplicada e a frequência de aberrações tanto *IN VITRO* como *IN VIVO* em linfócitos humanos.

A literatura tem relatado vários casos em que há coerência entre os valores estimados de dose por métodos físicos após a exposição de corpo inteiro de indivíduos e aqueles avaliados por métodos citogenéticos (Dolphin *et al* 1973 IAEA 1986).

Dessa forma os linfócitos são considerados ao lado da dosimetria física os tipos celulares adequados para serem utilizados como dosímetros biológicos em virtude de sua alta radiosensibilidade por constituírem uma população naturalmente sincronizada de células e por serem facilmente coletados.

Se aberrações do tipo instável (dicêntricos e fragmentos acêntricos) são usadas como uma medida quantitativa de dano por radiação é essencial que as células sejam escolhidas na primeira mitose após a indução isto é antes que ocorra qualquer perda de dano. Uma vez que as células se dividem e as aberrações são perdidas a avaliação quantitativa da dose nem sempre será correta.

A técnica citogenética utilizada para a obtenção de cromossomos metafásicos em linfócitos é relativamente simples e consiste basicamente em irradiar as amostras sanguíneas coletadas por punção venosa com várias doses de radiação ionizante. O sangue irradiado é cultivado em meio rico (RPMI 1640 ou HAM F 10) suplementado com soro fetal bovino mais a fitohemaglutina e mantido a 37 °C por 2-3 dias. Cerca de 2 horas antes do tratamento hipotônico a colchicina é adicionada à cultura para se obter um maior número de células em metáfase e estas são fixadas em metanol mais ácido acético e coradas com Giemsa. As frequências de aberrações cromossômicas são registradas para cada dose de radiação.

No entanto o estudo da cinética do ciclo celular de linfócitos em cultura tem mostrado variações decorrentes tanto de condições de cultivo como de diferenças entre os indivíduos. Portanto cada laboratório deve se munir de suas próprias curvas padrão dentro de condições específicas.

A sensibilidade da técnica é boa permite fazer estimativa inequívoca da dose da ordem de 5 cGy de radiação de baixa TLE (Wolff 1991). Nestas últimas décadas este método continua sendo aplicado rotineiramente de todos os casos suspeitos de exposição a radiação em vários laboratórios do mundo.

Mais recentemente com acesso às técnicas de biologia molecular tornou-se possível corar especificamente os cromossomos permitindo detectar genes específicos ou outros segmentos do DNA ou mesmo de cromossomos inteiros por meio da técnica de hibridização *IN SITU* por fluorescência (Método do FISH).

Uma das principais vantagens desta técnica é a rápida detecção de translocações cromossômicas como tem sido demonstrado recentemente nos estudos de vítimas de acidentes de Goiânia (Natarajan *et al* 1991) análises que até então dependiam do método laborioso de bandamento G. Além do mais alguns estudos (Lucas *et al* 1989 Natarajan *et al* 1992) têm

demonstrado que as translocações recíprocas são eventos mais frequentes do que os dicêntricos quando expostos a radiação ionizante

Assim sendo análises das translocações podem fornecer informações bastante precisas do dano genético da radiação. Outra vantagem em adotar como parâmetro as translocações em vez de dicêntricos particularmente a dosimetria biológica e que as primeiras são alterações estáveis as células com translocações permanecem viáveis através de muitas divisões celulares em contraste a células com dicêntricos que têm uma vida curta na circulação sanguínea. Isto permite a detecção de dano em linfócitos por um tempo mais longo após a exposição.

1.1 CURVAS DE DOSE RESPOSTA

Vários laboratórios de dosimetria biológica determinam a curva de dose resposta para a indução de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos submetidos a várias doses de radiação *IN VITRO*. Estas curvas descrevem a frequência relativa de aberrações cromossômicas induzidas por unidade de dose de radiação e servem como padrões de referência para estimar a dose em pessoas expostas acidental e ocupacionalmente.

Todos os tipos de radiação ionizante induzem o mesmo tipo de aberrações cromossômicas em células expostas ou seja os seus efeitos são qualitativamente similares ao nível cromossômico.

Todavia a frequência de aberrações induzidas depende da dose que está diretamente relacionada com a quantidade de energia depositada pela radiação. O termo que descreve a quantidade e distribuição de energia de ionização e excitação liberada ao longo do trajeto de um fóton ou de uma partícula carregada e a transferência linear de energia (TLE). A TLE é um importante parâmetro para descrever as formas das curvas de dose resposta e a eficiência relativa de diferentes tipos de radiação na indução de aberrações e a distribuição de danos cromossômicos em células afetadas.

1.1.1 RADIAÇÃO IONIZANTE DE BAIXA TRANSFERÊNCIA LINEAR DE ENERGIA

A ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS RESULTANTES DE UMA QUEBRA

As frequências de aberrações que resultam de uma quebra simples num segmento cromossômico (fragmentos acêntricos) aumentam em função linear da dose após a exposição aguda a radiação de baixa TLE. A medida que aumenta a dose aumenta também o número de quebras. Assim sendo aumenta também o número de fragmentos acêntricos que vai ser proporcional a dose. Isso mostra que um único evento ionizante é suficiente para produzir este tipo de aberração.

A ocorrência deste tipo de aberração não é afetada pela taxa de dose e nem pelo fracionamento de dose. Se o evento ionizante ocorre a 1/segundo ou a 1/minuto e se cada evento produzir uma quebra após 1 minuto ou 1 hora nas mesmas taxas de dose a dose total produzirá o mesmo número de quebras.

A relação dose-efeito para a produção de fragmentos acêntricos pode ser expressa pelo modelo linear $Y = \alpha_0 + \alpha_1 D$ onde Y é a frequência de aberrações D dose de radiação α_0 taxa de aberrações

espontâneas e α_1 é o coeficiente de termo linear que define a indução de quebras duplas do DNA produzidas pela ação de um evento ionizante.

B ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS RESULTANTES DE DUAS QUEBRAS

Em contraste com os fragmentos acêntricos as frequências de aberrações por rearranjo (dicêntricos e aneis) que resultam de 2 quebras induzidas independentemente aumentam em função quadrática da dose. A forma da curva é sigmoidal (figura 14) e a frequência de aberrações varia com a taxa de dose isto é quanto mais alta a taxa de dose mais alta será a frequência de rearranjos. Esta relação pode ser descrita pelo modelo quadrático $Y = \alpha_0 + \beta D$ ou linear quadrático $Y = \alpha_0 + \alpha_1 D + \beta D^2$ onde β é o coeficiente do termo quadrático que descreve a indução de quebras duplas produzidas pela ação de 2 trajetos ionizantes independentes.

Os processos biofísicos e moleculares envolvidos na formação de aberrações cromossômicas após a exposição são complexos e pouco elucidados. Porém é possível interpretar a equação de dose resposta para a radiação de baixa TLE em termos mais simples.

Para a produção de um dicêntrico são necessários danos produzidos em 2 cromossomos diferentes de tal maneira que estes cromossomos danificados possam sofrer um rearranjo. Além disso as 2 lesões cada uma na dupla hélice do DNA de 2 cromossomos necessitam estar suficientemente próximas no espaço dentro de uma região chamada zona de rejunção para que elas sejam capazes de interagir para dar origem a uma aberração de rearranjo por erro no reparo. Admite-se que esta região de rejunção seria $< 0,1 \mu m$ e é considerada como um verdadeiro target na indução de aberrações (IAEA 1986). Do mesmo modo as 2 quebras precisam ocorrer intimamente relacionadas no tempo de maneira que a primeira quebra produzida não se rejunta antes da segunda ser produzida.

A radiação de ionizações esparsas caracteriza-se por apresentar pequeno número de ionizações por unidade de comprimento do trajeto. Assim sendo nas doses mais baixas ($< 0,5 Gy$) a probabilidade de que 2 trajetos ionizantes atravessarem a zona de rejunção é suficientemente baixa de modo que os dicêntricos serão produzidos quase que exclusivamente por um único trajeto ionizante numa frequência baixa. A medida que a dose aumenta há a maior probabilidade de interação de lesões do DNA induzidas por 2 ou mais trajetos independentes. Neste caso muitos dicêntricos resultarão de eventos de 2 trajetos e suas frequências vão variar primariamente com a função quadrática da dose. Assim a contribuição de dicêntricos induzidos por 2 trajetos ionizantes aumenta. A curva de dose resposta para dicêntricos produzidos por radiação de baixa TLE será a combinação de eventos de 1 e 2 trajetos ionizantes independentes sendo o primeiro mais frequente nas doses mais baixas e o segundo nas doses mais altas. A frequência de dicêntricos produzidos por um trajeto ionizante será proporcional a dose (função linear da dose) enquanto que a frequência de dicêntricos produzidos por 2 ou mais trajetos independentes será proporcional ao quadrado da dose (função quadrática da dose).

1.1.2 RADIAÇÃO IONIZANTE DE ALTA TRANSFERÊNCIA LINEAR DE ENERGIA

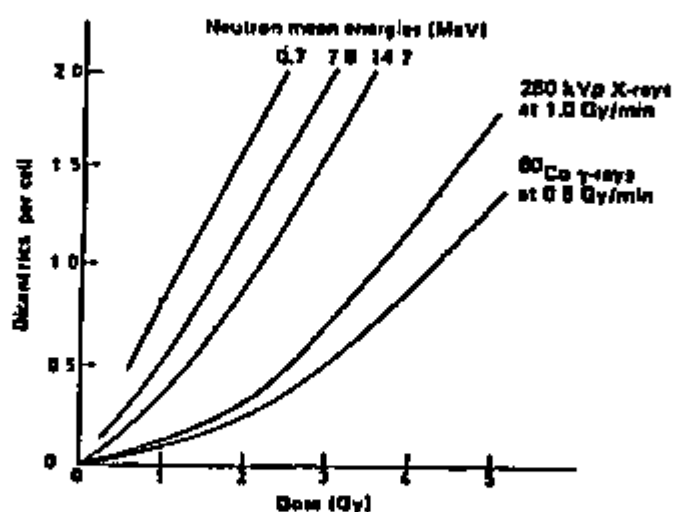


Figura 14 Relação entre frequência de dicêntricos e exposição aguda de varios tipos de radiação (LLOYD, D C An overview of radiation dosimetry by conventional cytogenetic methods in EISERT, W G & MENDELSON, M L eds *Biological Dosimetry*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1984, p 15 - 24)



Figura 15 Expressão de micronúcleos numa célula em divisão Células que não se dividem são incapazes de se manifestar os danos cromossômicos como micronúcleos (FENECH, M Optimisation of micronucleus assays for biological dosimetry New Horizons in Biological Dosimetry, Wiley-Liss, 1991, P 373 -86)

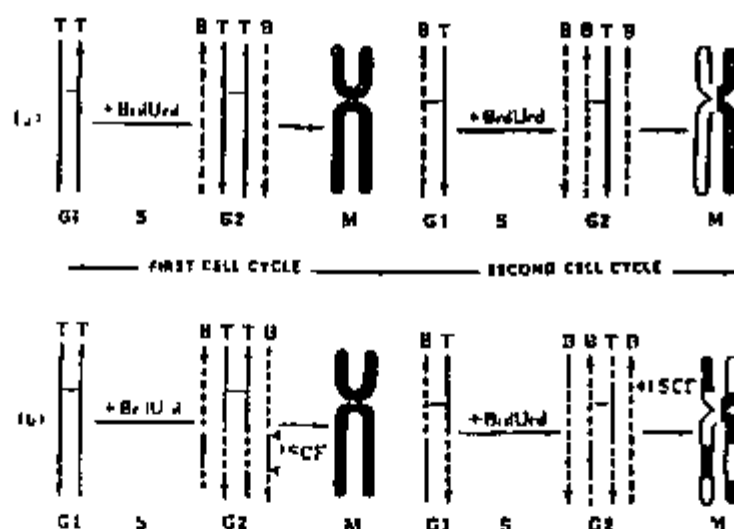


Figura 16 Diferenciação entre cromatides-irmãs (a) e trocas entre cromatides-irmãs (b) produzidas em cromossomos metafásicos de células cultivadas na presença de BrdU por 2 ciclos de divisão celular As linhas pontilhadas representam fitas de DNA, com a incorporação de BrdU As trocas entre cromatides-irmãs são visualizadas como extensões alternadas de claro e escuro (KUSHIMA, T SCE enigma methodology, mechanism and meaning of sister chromatid exchange Annu Rep Res React Inst Kyoto Univ , 22 57-77, 1989)

Para a radiação de ionizações densas todos os tipos de aberrações cromossômicas se ajustam melhor a um modelo linear. Neste caso há um aumento na probabilidade de que 2 quebras sejam produzidas por uma simples partícula ionizante. Isto sugere que uma partícula ionizante individual pode formar múltiplas quebras nos cromossomos ao longo do percurso e estas podem estar suficientemente próximas uma da outra de modo que permitam a interação de extremidades quebradas e assim formar uma aberração de rearranjo.

Para a produção de fragmentos acêntricos por radiação de alta TLE a inclinação da reta da curva de dose resposta pode ser mais acentuada do que para a radiação de ionizações difusas para a mesma faixa de dose.

A frequência de aberrações induzidas por radiação de alta TLE não depende da taxa de dose e nem do fracionamento de dose.

2 MÉTODO DO MICRONUCLEO

A estimativa de dose pelo método convencional de aberrações cromossômicas envolve uma quantidade considerável de análises cromossômicas (várias centenas de metafases) para se obter resultados estatisticamente significativos principalmente a níveis baixos de exposição a radiação. O tempo necessário para analisar um número suficiente de células metafásicas para a estimativa de dose da ordem de 0,1 Gy tem propiciado o desenvolvimento de outros métodos citogenéticos.

O método do micronúcleo (MN) foi proposto por ser relativamente simples e sensível e por ser um bom indicador biológico de danos genéticos induzidos por radiação ionizante ou por agentes químicos tanto *IN VIVO* como *IN VITRO* (Fenech 1991). A análise do dano citogenético é mais rápida do que pelo método convencional demanda menos tempo na avaliação da dose em caso de exposição acidental a radiação pois permite a leitura de um número maior de células em espaço de tempo mais curto.

Os micronúcleos (MN) aparecem como pequenas partículas geralmente arredondadas que permanecem próximas ao núcleo da célula e medem cerca de 1/20 a 1/5 de diâmetro do núcleo principal (figura 15).

Admite-se que os MN originam-se pela condensação de fragmentos cromossômicos ou mesmo de cromossomos inteiros que não foram incorporados nos núcleos filhos durante a anáfase. Evidências indiretas mostram ainda que lesões no centrômero ou no fuso mitótico podem contribuir para a formação de MN (Heddle *et al* 1991). São portanto indicadores da indução de aberrações cromossômicas tanto por agentes clastogênicos como por aneugênicos.

A técnica do MN foi desenvolvida inicialmente por Schmid (1975) em células da medula óssea de camundongos e os primeiros resultados mostrando uma relação quantitativa entre a dose de radiação e a frequência de MN foram relatados por Countryman e Heddle (1976) em linfócitos humanos.

No entanto a técnica do MN utilizada inicialmente apresentava a desvantagem de não discriminar as células que já haviam se dividido daquelas que não se dividiram o que tornava a contagem do MN pouco precisa. Isto se explica pelo fato de que os MN somente se manifestam em células que tenham completado uma divisão nuclear. Se a frequência de MN é utilizada como um indicador de dano

cromossômico a contagem do MN deve ser limitada somente aquelas células que tenham completado uma e somente uma divisão nuclear após a estimulação mitogênica.

Para contornar esta situação Fenech e Morley em 1985 propuseram o uso de citocalasina B (cito B) método conhecido como o de bloqueio citocinético (cytokinesis block method). A cito B é uma substância isolada do fungo *Helminthosporium dematoudeum* e é um inibidor de polimerização de actina componente do microfilamento responsável pela citocinese. Portanto a cito B impede a divisão do citoplasma mas não a divisão do núcleo. Conseqüentemente as células tratadas e bloqueadas pela cito B são facilmente reconhecidas pelo seu aspecto binucleado característico e dessa maneira os MN podem ser identificados entre elas.

O método do MN bem como o de aberrações cromossômicas são utilizados não somente para a estimativa quantitativa de dose de radiação (Balasem & Ali 1991) mas também para a detecção de agentes genotóxicos ambientais em uma variedade de tipos celulares por exemplo em células esfolhadas dos tecidos alvos de certos carcinógenos como da mucosa bucal do esôfago do pulmão da cavidade nasal do trato urinário e da cervix (Rosin 1992). Os MN podem ser identificados em qualquer tipo de célula do organismo que tenha sofrido uma divisão mitótica.

No entanto o teste do MN não permite obter todas as informações que o método convencional oferece. Pelo fato do MN resultar tanto de quebras cromossômicas como de perturbações do fuso mitótico a observação de um aumento na frequência de MN não detecta o mecanismo responsável por sua origem (Heddle *et al* 1991). Além disso há um alto e variável background de MN 10 a 12 MN por 1000 células binucleadas (Fenech & Morley 1986) enquanto que a frequência espontânea de dicêntricos é somente da ordem de 0,55 por 1000 células (Wolff 1991).

Todavia a sua importância está no seu papel indicativo de que frequências aumentadas de MN podem estar correlacionadas com o aumento do risco de desenvolver câncer ou de doenças genéticas.

3 MÉTODO DE TROCAS ENTRE CROMATIDES IRMÃS

As trocas entre cromatides irmãs (TCI) são manifestações citológicas de quebras e rejunções da dupla fita do DNA nos locos homólogos de 2 cromatides de um cromossomo aparentemente sem acarretar mudanças morfológicas do cromossomo.

Elas podem ocorrer espontaneamente e aumentam consideravelmente quando as células são tratadas com agentes genotóxicos que ou reagem diretamente com o DNA por exemplo formando adutos covalentes ou que interferem na síntese, metabolismo e reparo do DNA (Ikushima 1989). Frequências espontâneas altas de TCI são encontradas em células de pacientes com síndrome de fragilidade cromossômica como a de Bloom.

A indução de TCI pode ser visualizada em células cultivadas na presença de bromodeoxiuridina (BrdU) análogo da timidina coradas com Hoechst 33258 e Giemsa (método de fluorescência mais Giemsa) e que tenham sofrido 2 ciclos de replicação do DNA (figura 16). Quando células passam por apenas um ciclo de divisão celular ambas as cromatides de um cromossomo são substituídas unifilarmente com BrdU

da mesma maneira e são coradas em escuro. Quando estas células sofrem mais um ciclo de incorporação de BrdU resulta em um cromossomo contendo cromátides irmãs que são quimicamente diferentes: uma apresenta ambas as fitas do DNA substituídas com BrdU e se coram mais fracamente e é sempre a irmã (fita recém replicada) da outra cromátide que apresenta somente uma fita substituída que se cora mais intensamente. Assim sendo quaisquer trocas que ocorram entre cromátides irmãs podem ser detectadas e contadas na metáfase pela extensão alternada de claro e escuro ao longo das cromátides.

Não se sabe ainda se os eventos de quebras e rejunções de 4 fitas do DNA (2 duplas hélices) envolvidas na produção de TCI ocorrem fielmente ou seja, sem produzir qualquer modificação no código genético.

As TCI são consideradas como o mais sensível indicador de exposição a agentes químicos. São dependentes em células de mamíferos visto que a luz ultravioleta, agentes alquilantes e crosslinking são extremamente eficientes na indução de TCI. O mesmo já não ocorre com a radiação ionizante e substâncias radiomiméticas (Wolff 1991). Embora quebras cromossômicas e rejunções sejam eventos frequentes após a exposição a radiação ionizante a indução de TCI é relativamente insensível a radiação ionizante em todo o ciclo celular.

Estas observações sugerem que as TCI podem não estar relacionadas com as aberrações cromossômicas e que elas podem se originar por diferentes mecanismos (Ikushima 1989). As taxas de TCI e de aberrações cromossômicas induzidas são diferentes para cada um dos agentes genotóxicos o que sugere que cada tipo de lesão formada pode ser processada diferentemente pela célula para formar uma TCI ou uma aberração. E é também possível que a mesma lesão seja capaz de produzir estes 2 eventos (Carrano & Natarajan 1987).

O mecanismo molecular responsável pela TCI não é conhecido mas uma vez que é imprescindível a síntese de DNA para a sua expressão aventa-se o envolvimento deste processo na indução de TCI.

Nenhum dos parâmetros citogenéticos mencionados acima pode ser utilizado como dosímetro biológico no caso de mutagênicos químicos (Wolff 1991). Um aumento nas suas frequências indica meramente a ocorrência de uma exposição a agentes genotóxicos. Os compostos químicos de modo geral sofrem uma conversão metabólica *IN VIVO* o que dificulta por exemplo a determinação das concentrações reais do agente químico que atingem as células. Assim sendo os resultados obtidos *IN VIVO* e em *IN VITRO* para mutagênicos químicos podem não ser diretamente comparáveis.

VIII CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE CARCINOGENESE

Um dos problemas fundamentais em carcinogênese é a natureza do evento inicial que leva à produção de células proliferativas anormais. Dados epidemiológicos e de tumorigênese experimental mostram evidências de que os fatores ambientais representam um papel fundamental na origem de muitos tumores no homem.

Recentes avanços em biologia molecular vêm fortalecer a teoria da mutação somática como a principal causa do câncer. Esta teoria é bastante

consistente com a evidência experimental tanto com a radiação como com o agente químico.

Mas um argumento que favorece esta teoria é que muitos agentes conhecidos que causam câncer induzem alterações genéticas e vice-versa. Existe portanto uma íntima associação entre carcinogênese e mutagênese.

I ETAPAS DA CARCINOGENESE

A carcinogênese é um processo bastante complexo. Ela envolve um conjunto de eventos genéticos e epigenéticos que ocorrem progressivamente num simples clone de células como conseqüências de alterações de genes específicos do tumor: os proto-oncogenes e os genes supressores do tumor.

Estes genes existem normalmente nos genomas de organismos superiores e quando inapropriadamente ativados ou inativados causam desregulação do crescimento e diferenciação aumentando a probabilidade de transformação neoplásica.

De acordo com a teoria da mutação somática, a carcinogênese envolve pelo menos 3 etapas sucessivas de iniciação, promoção e progressão e todo o processo pode levar a maior parte da vida de um indivíduo (figura 17).

A etapa de iniciação envolve a exposição de células normais aos carcinógenos que causam uma alteração genética irreversível originando células com resposta alterada ao seu microambiente e que exibem uma vantagem seletiva na expansão clonal em relação as células normais circunvizinhas. O carcinógeno que inicia um processo tumoral é dito iniciador do tumor e este pode ser um agente químico físico ou biológico.

Porém uma simples exposição ao iniciador geralmente não induz o tumor ou qualquer outra anomalia visível. Assim sendo o iniciador sozinho pode não ser capaz de desencadear o processo maligno. Ele necessita de um potencializador chamado promotor do tumor que ele próprio pode não ser mutagênico mas que por um mecanismo epigenético é capaz de desencadear ou levar adiante o processo de malignidade (figura 18).

O efeito imediato do promotor aparentemente é de estimular a divisão celular ou induzir a divisão em células que normalmente sofrem uma diferenciação terminal. Provavelmente o promotor age induzindo a expressão de alguns genes que direta ou indiretamente afetam a proliferação celular desmascarando as mutações iniciais camufladas.

Pouquíssimo se sabe também sobre os mecanismos responsáveis pela progressão tumoral isto é a transformação de tumor benigno em maligno. A progressão tumoral pode ser definida como uma evolução gradual de células alteradas para o aumento da autonomia por sucessivos danos genéticos caracterizada pelo descontrole da proliferação, heterogeneidade, instabilidade do cariótipo, invasibilidade e metástase.

Especula-se que a radiação ionizante funcione como um iniciador e promotor de carcinogênese ao mesmo tempo (Coggle 1985, Kondo 1988). A radiação será, portanto um carcinógeno completo e não requererá outros agentes biológicos físicos ou químicos como sinérgicos ou antagonísticos para a indução de tumor (Sanders & Kathren 1983).

Estes aspectos da neoplasia envolvendo fases de iniciação, promoção e progressão tumoral têm sido conceitualmente importantes mas sabe-se que

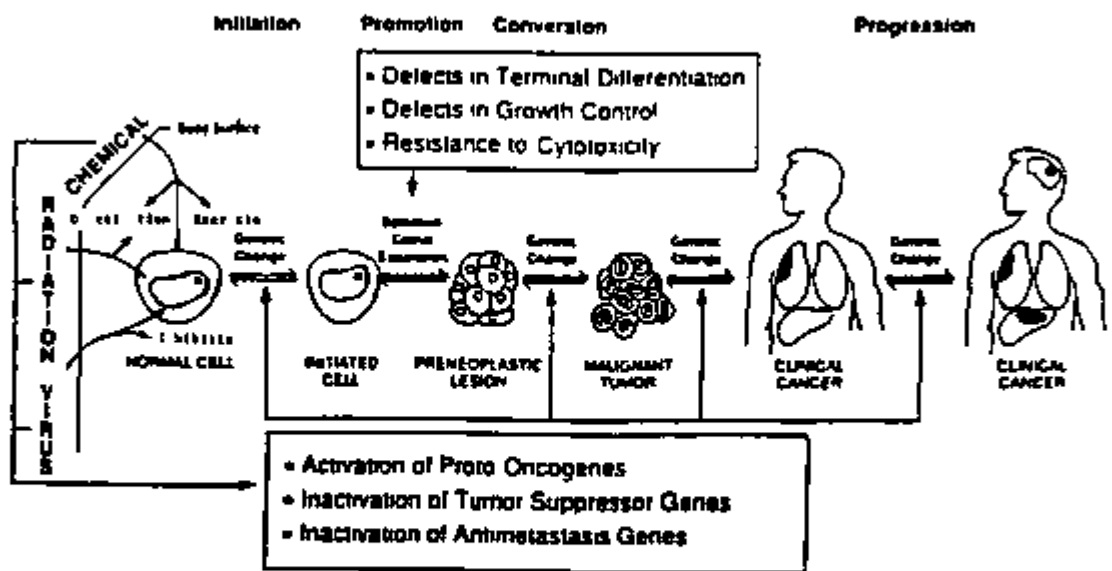


Figura 17 Etapas da carcinogênese envolvendo varios eventos geneticos e epigeneticos (HARRIS, C C Chemical and physical carcinogenesis advances and perspectives for the 1990s Cancer Res (Suppl), 51 5023s-44s, 1991)

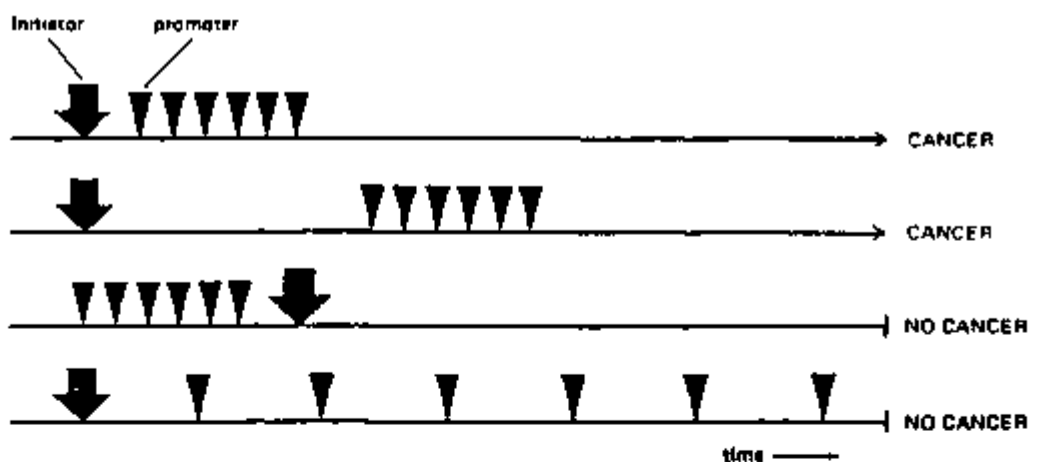


Figura 18 Representação esquematica de exposições ao iniciador e ao promotor tumorais A indução de câncer ocorre somente se a estimulação com o promotor for apos a ação do iniciador e se a intensidade de exposição com o promotor exceder a um certo limiar A indução de câncer pode ocorrer tambem como o resultado de exposições repetidas de iniciador somente (ALBERTS *et al* Molecular Biology of the Cell 2 ed , New York, NY, Garland, 1989)

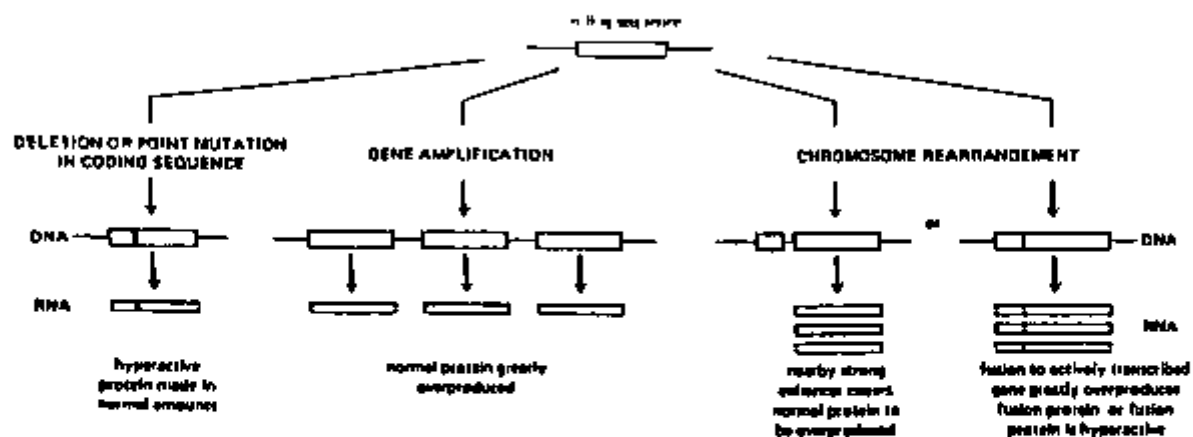


Figura 19 Diferentes maneiras pelas quais um proto-oncogene pode ser convertido em um oncogene (ALBERTS *et al* Molecular Biology of the cell, 2 ed, New York, NY, Garland 1989)

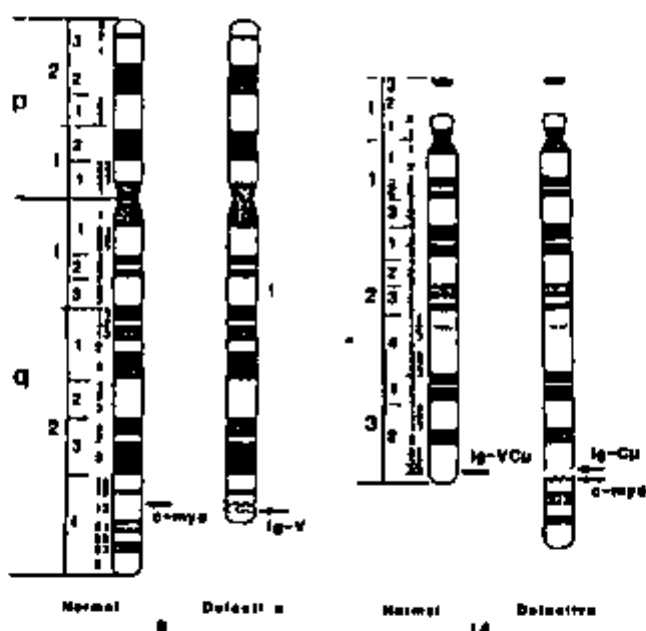


Figura 20 Localizações de oncogene c-myc e genes das porções variavel (V) e constante μ ($C\mu$) da cadeia pesada de imunoglobulina nos cromossomos 8 e 14, normais e defeituosos de linfoma de Burkitt. O cromossomo 8 defeituoso perde o c-myc e ganha os genes V. O cromossomo 14 defeituoso ganha o c-myc do cromossomo 8 que se torna contiguo ou proximo ao gene $C\mu$. As setas apontam as localizações desses genes (YUNIS, J.J. The chromosomal basis of human neoplasia Science, 221 227-36, 1983)

dependendo do tipo de câncer o número de eventos genéticos e epigenéticos independentes envolvidos podem chegar a mais de 6 (Harris 1991)

2 ONCOGENES E GENES SUPRESSORES DO TUMOR

Sabe-se que a proliferação celular é regulada pelas moléculas estimuladora e inibidora. O interesse cada vez maior sobre os aspectos moleculares da carcinogênese propiciou a descoberta de um grupo de genes reguladores chamados de proto-oncogenes que codificam componentes relevantes no controle do crescimento normal e diferenciação celular.

Além desses genes foi possível desvendar a existência de outro grupo de genes antagonistas que cujos produtos inibem o crescimento celular e/ou induzem uma diferenciação terminal as células. São chamados genes supressores do tumor ou anti-oncogenes que bloqueiam a evolução e o crescimento de células tumorais.

Esses 2 grupos de genes podem ser alterados por várias rotas mutacionais que podem levar ao descontrole da proliferação celular que é característico de câncer. Os proto-oncogenes podem ser ativados a oncogenes por mutação de ponto, translocação cromossômica ou amplificação gênica (Alberts *et al.* 1989) (figura 19). Igualmente os genes supressores podem ser inativados por mecanismos de substituição de base, deleção, não-disjunção cromossômica, recombinação mitótica e outros.

Enquanto que a ativação oncogênica envolve mutação dominante a perda de gene supressor apresenta um efeito recessivo isto é ambas as cópias do gene celular precisam estar inativadas para liberar a célula da inibição para que ocorra a indução do tumor.

Dessa maneira os proto-oncogenes e os genes supressores funcionam como verdadeiros alvos moleculares na indução do tumor pelos carcinógenos (Garle & Burns 1991). Cerca de 60 proto-oncogenes já foram descobertos e cada um deles podem se transformar em um oncogene que representa a parte dominante na indução de vários tipos de câncer. Dada a multiplicidade e complexidade do controle do crescimento e diferenciação estima-se que deva existir mais de 300 proto-oncogenes no genoma de mamíferos (Weinstein 1988). Baseado também nas múltiplas funções de genes supressores tumorais o seu número pode ser igual ao de oncogenes (Harris 1991).

1.1 ATIVAÇÃO DE ONCOGENES

1.1.1 POR MUTAÇÃO GÊNICA

Um carcinógeno iniciador pode induzir a substituição de base do DNA. Estudos de sequenciamento de bases de regiões do DNA que codificam a proteína dos oncogenes *c-ras* mostraram que a diferença entre o proto-oncogene normal e *ras* e o oncogene ativado foi a substituição de uma simples base do nucleotídeo resultando numa mudança de um simples aminoácido no produto proteico.

Essas mutações de ponto nos genes *c-ras* ocorrem próximos aos codons 12 (também 13) ou 61 (ou 59) assumindo substituição por exemplo de glicina para valina ou de glutamina para lisina. Estes tipos de mutação pode ocorrer *IN VIVO* em vários tipos de câncer. Há evidência de que 90% dos tumores de pele induzidos em camundongos pelo carcinógeno químico iniciador di-metil-benzo-antraceno (DMBA) e certos

tumores no homem estão associados com a substituição de base adenina para timina no local específico da família do oncogene *Ha-ras*.

1.1.2 POR TRANSLOCAÇÃO CROMOSSÔMICA

Em quase todos os pacientes com leucemia mieloide crônica as células leucêmicas mostram a mesma translocação entre os cromossomos 9 e 22 originando um cromossomo chamado de Philadelphia. Estudos de sequenciamento do DNA mostraram que a translocação converte o proto-oncogene em um oncogene ativado pela fusão do proto-oncogene *c-abl* com um outro gene *bcr* no cromossomo 22 de tal maneira que ocorre a produção de proteína alterada. A proteína resultante tem um amino-terminal da proteína *bcr* fundido com o grupo carboxil terminal de *c-abl* e que passa a orientar a proliferação excessiva de um determinado clone de células hematopoiética na medula óssea.

Em outros casos a translocação move um proto-oncogene em um ambiente cromossômico inapropriado que ativa a sua transcrição de tal maneira que a proteína normal é produzida em excesso. É o caso de linfoma de Burkitt (figura 20). Do mesmo modo neste caso também ocorre uma translocação entre o cromossomo 8 que contém proto-oncogene *c-myc* com um dos três cromossomos (14, 2, 22) que contém genes que codificam moléculas do anticorpo. O oncogene celular *c-myc* localizado no cromossomo 8 se ativa quando rearranjado com os genes das cadeias pesada ou leve de imunoglobulina do cromossomo 14 ou com os genes das cadeias leves de imunoglobulina dos cromossomos 2 e 22.

1.1.3 POR AMPLIFICAÇÃO GÊNICA

Alternativamente pode ocorrer a expressão exagerada de um gene particular num loco específico do cromossomo pela amplificação gênica. Esta consiste no aumento no número de cópias por um processo que provavelmente começa com uma replicação anômala de cromossomos. Os genes *myc* pertencem muitas vezes a oncogenes amplificados. A amplificação do oncogene resulta no excesso de template do DNA que pode levar a produção excessiva de RNA específico para o oncogene e para o produto proteico.

A amplificação parece ocorrer inicialmente com uma duplicação gênica porém o mecanismo não está bem elucidado. Uma vez que ocorre a duplicação gênica as trocas entre cromátides irmãs desiguais resultantes de recombinação entre as cópias de genes idênticos no curso de replicação do DNA podem posteriormente amplificar o número de cópias do gene ate o cromossomo conter dezenas ou centenas delas. Quando muitos DNA repetidos estão presentes o segmento que os contém pode se tornar visível como região homogênea corada no cromossomo ou pode ainda através de um outro evento de recombinação ser cortado do seu locus original e dar origem aos duplos minútuos ambos detectáveis citogeneticamente. A sequência do DNA que se torna repetitiva por este mecanismo de amplificação pode atingir mais de 100.000 pares de nucleotídeos.

1.2 INATIVAÇÃO DE GENES SUPRESSORES

Os genes supressores do tumor podem ser inativados ou deletados do cromossomo. As mutações de deleção que ocasionam a perda de genes

supressores estão envolvidos em certos tumores humanos incluindo retinoblastoma tumor de Wilm câncer do pulmão e do colorretal.

No caso de mutação que da origem ao oncogene basta somente uma cópia do gene ser alterada para apresentar o seu efeito no comportamento celular mesmo na presença de uma cópia normal do correspondente proto-oncogene. No caso de genes supressores do câncer a condição de homozigose recessiva é um pré-requisito para a tumorigenicidade.

Um bom exemplo é o do câncer raro que ocorre em crianças conhecido como retinoblastoma no qual o tumor se desenvolve de células precursoras neurais na retina imatura. Há duas formas de doenças hereditária e não hereditária (figura 21). Na forma hereditária ambos os olhos são afetados e origina múltiplos tumores independentes e algumas vezes ocorrem também no osso (osteosarcoma). Na forma não hereditária somente um olho é afetado e origina somente um tipo de tumor. Em ambas as formas de retinoblastoma, os pacientes apresentam um cariótipo visivelmente anormal com uma deleção de uma banda específica no cromossomo 13 (del 13 q14) o que aponta a perda de um gene supressor tumoral gene do retinoblastoma ou Rb.

No caso de retinoblastoma hereditário uma simples mutação somática que inutiliza a cópia normal do gene retinossente em um dos milhões ou mais de células da retina em crescimento será então suficiente para iniciar a tumorigênese pela proliferação excessiva de células.

Em crianças sem a predisposição genética, o retinoblastoma será muito raro porque ele requer a coincidência de duas mutações somáticas numa mesma célula da retina para inativar ambas as cópias do gene Rb. O gene Rb foi clonado e mostrou que ele codifica uma proteína que normalmente se expressa na retina. As sondas de DNA preparadas do gene Rb clonado foram usadas para confirmar que as células tumorais diferem de suas vizinhas não transformantes por apresentarem deleções ou inativação do Rb em ambos os cromossomos materno e paterno. A perda pode ocorrer por uma variedade de mecanismos.

Processos similares envolvendo outros genes foram encontrados em outros tipos de cânceres como o de tumor de Wilm do rim que apresenta também um componente genético. Embora estes cânceres sejam raros há evidência crescente para mostrar que a perda ou a inativação de genes supressores representa um papel relevante em muitos processos tumorais que ocorrem na vida adulta.

3 SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA AO CÂNCER

Existem certas doenças genéticas raras transmitidas por genes recessivos autossômicos que apresentam uma deficiência no reparo do DNA e uma alta predisposição genética ao câncer. Estas doenças são conhecidas como síndromes de fragilidade cromossômica por apresentarem uma alta incidência de quebras cromossômicas e incluem xeroderma pigmentosum ataxia telangiectasia, síndrome de Bloom e anemia de Fanconi (Sasaki 1989 Taylor 1983).

Os pacientes com xeroderma pigmentosum por exemplo desenvolvem vários tumores de pele na área exposta ao sol e são deficientes no reparo por excisão de DNA danificado pela radiação ultravioleta. O defeito gênico sozinho não dá origem ao tumor de pele porém a ação do carcinógeno (luz solar) produz danos no DNA que

não é removido eficientemente como em pessoas normais em consequência do defeito gênico.

Admite-se que os pacientes com ataxia telangiectasia caracterizados pela alta sensibilidade à radiação ionizante e bleomicina uma substância radiomimética sejam deficientes no reparo de alguma forma de quebra na fita do DNA (Taylor 1983).

Do mesmo modo uma alta instabilidade genética apresentada em pacientes com síndrome de Bloom manifestada por uma alta frequência de trocas entre cromatídeos irmãos pode estar correlacionada com um defeito na ligase I do DNA (Willis *et al.* 1987).

A evidência citogenética aponta a possibilidade de que as células de anemia de Fanconi sejam deficientes no reparo de ligações cruzadas do DNA uma vez que elas foram sensíveis especificamente a agentes bi ou polifuncionais como mitomicina C busulfan mostarda nitrogenada e acetaldedo (Cohen *et al.* 1982 Sasaki 1989) e não aos agentes monofuncionais como etilmetanossulfonato (EMS) metilmetanossulfonato (MMS) e nitrosoguanidina (Chaganti & Houldsworth 1991).

Estas descobertas tiveram um grande impacto no estudo de mutação e câncer no homem e forneceram uma forte evidência do envolvimento de reparo do DNA e da origem mutacional do câncer humano (Sasaki 1989).

Ao mesmo tempo este achado propiciou o estudo de defeitos bioquímicos associados com os genes mutantes que são responsáveis pelas doenças hereditárias de alta susceptibilidade ao câncer.

Embora estes pacientes bem como aqueles com cânceres hereditários retinoblastoma e tumor de Wilm sejam portadores de doenças genéticas raras esta predisposição genética se estende para outros tipos de cânceres mais comuns por exemplo o de mama (Roberts 1993) do colo retal (Peltonen *et al.* 1993) e do trato digestivo superior (Bondy *et al.* 1993).

4 CURVAS DE DOSE-RESPOSTA PARA A INDUÇÃO DE CÂNCER

O desenvolvimento de tumores malignos constitui sem dúvida um dos mais significativos efeitos estocásticos da radiação ionizante. Consequentemente uma grande quantidade de estudos foram realizados para caracterizar os efeitos de dose taxa e fracionamento de dose tipos de radiação e outros fatores na indução de câncer em modelos animais e em populações humanas expostas a radiação.

No entanto são poucas as evidências capazes de estabelecer uma relação de causa e efeito particularmente entre baixas doses de radiação e o aparecimento do tumor. Nem sempre os efeitos observados com doses altas são extrapoláveis para a radiação de baixas doses. Há muita incerteza e até mesmo controvérsia sobre os riscos de desenvolver câncer associados com a radiação de baixa dose e baixa taxa de dose (Kondo 1988) (figura 22).

Em vista deste fato vários modelos hipotéticos foram propostos na tentativa de minimizar a incerteza estatística inerente na estimativa de riscos de indução de câncer a baixo nível de exposição a radiação.

A figura 23 mostra vários modelos de dose-incidência de câncer induzido por radiação. Estas curvas teóricas podem ser comparadas com os dados experimentais e epidemiológicos para verificar se

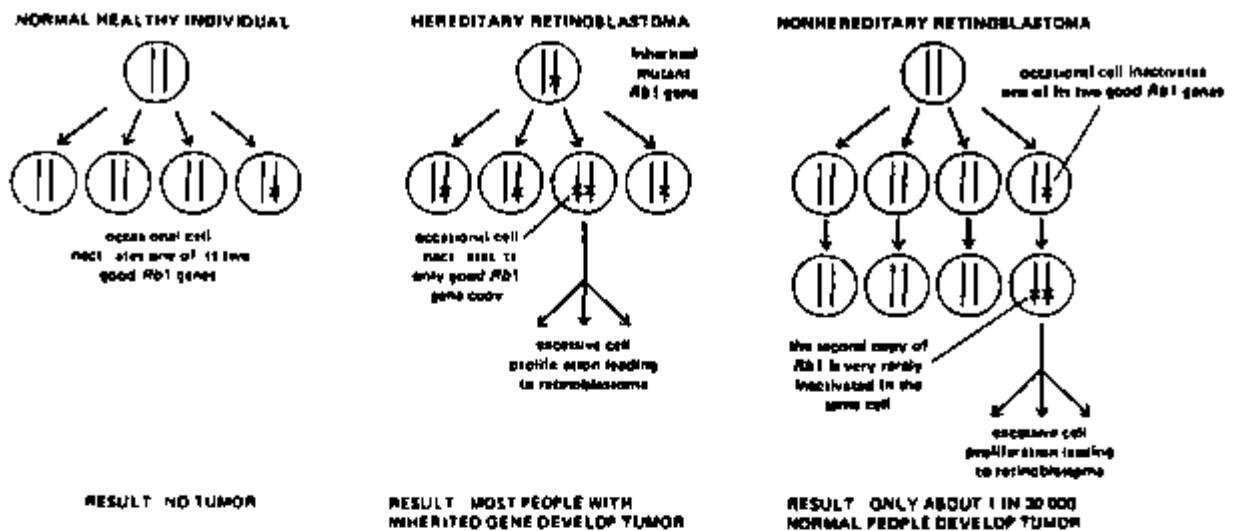


Figura 21 Mecanismo genético de retinoblastoma Na forma hereditária, todas as células do corpo são deficientes em uma das 2 cópias normais do gene supressor tumoral. O tumor se desenvolve quando a cópia remanescente é perdida ou inativada por uma mutação somática. Na forma não hereditária, inicialmente todas as células contêm 2 cópias funcionais do gene e o tumor se desenvolve se ambas as cópias são perdidas ou inativadas pela coincidência de 2 mutações somáticas na mesma célula (ALBERTS *et al* In *Molecular Biology of the cell* 2ª ed, New York, NY, Garland, 1989)

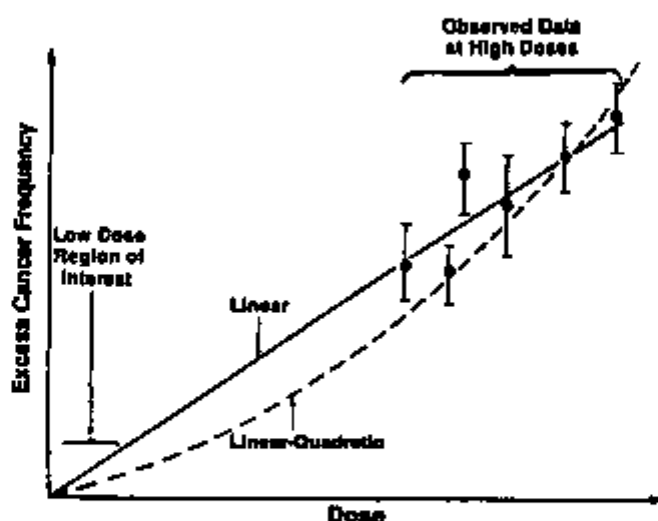


Figura 22 O gráfico mostra dois modelos matemáticos usados para extrapolar dados de situações de doses altas para as de doses baixas para a estimativa de risco, na indução de câncer ● dados hipotéticos de indução de câncer observados em grupos expostos a doses relativamente altas de radiação — extrapolação linear, --- extrapolação linear-quadrática entre frequência e dose Enquanto que ambos os modelos ajustam bem aos dados de dose alta, a estimativa de risco na região de baixa dose é diferente, de acordo com o modelo escolhido para a extrapolação (Hall, E J Scientific view of low-level radiation risks RadioGraphics, 11 509-18, 1991)

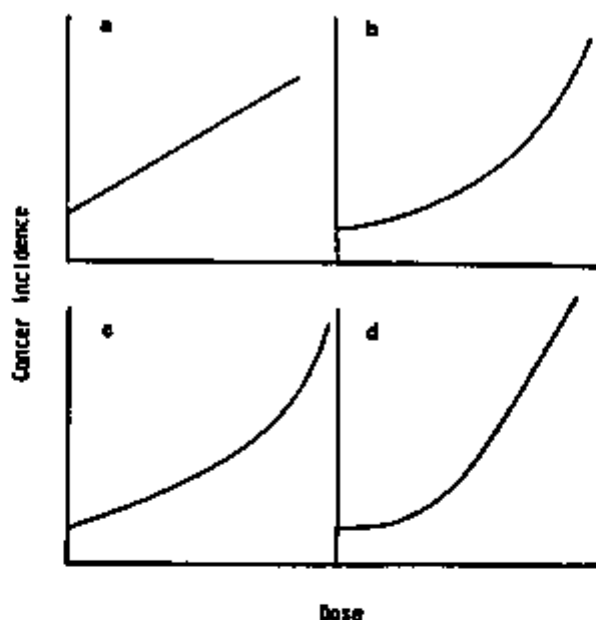


Figura 23 Curvas teóricas de dose - resposta para a indução de câncer por radiação a) linear, b) quadrática, c) linear-quadrática, d) curvilínea com limiar (COGGLE, J E Radiation Carcinogenesis In FARMER, P B & WALKER, J M, eds The molecular basis of Cancer Croom Helm, 1985)

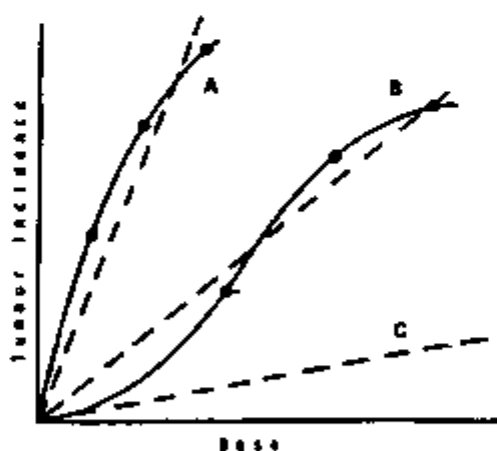


Figura 24 Curvas teóricas de incidência de câncer, após a exposição com radiações de alta (curva A) e baixa TLE (curva B) A curva C mostra a eficácia reduzida de radiação de baixa TLE com baixa taxa de dose (COGGLE, J E Radiation Carcinogenesis In FARMER, P B & WALKER, J M eds The molecular basis of cancer Croom Helm, 1985)

alguns dos modelos são consistentes com a evidência empírica

As curvas obtidas de incidência de câncer no homem como nos animais mostram uma ampla variedade de formas de linear a altamente curvilínea algumas com platô e pico e outras com limiar

Quando se considera a complexidade do processo carcinogênico e a multiplicidade de fatores que podem intervir entre o evento(s) iniciador(s) e a manifestação final do câncer não é surpreendente que as curvas de dose resposta sejam altamente variáveis. A expressão final de células transformadas pode ser modulada por vários fatores como imunológico hormonal vascular e metabólico bem como constituição genética cinética da proliferação celular e interação homeostática entre células tumorais e normais os quais podem influenciar a incidência final do câncer

Outras variáveis que dificultam a análise da relação dose incidência de câncer induzido pelos carcinógenos são

período de latência longo que pode levar de 30 a 40 anos para certos tipos de câncer

interações pouco definidas entre agentes causadores de câncer que podem ser aditivos sinérgicos ou antagonísticos em seus efeitos combinados

o fato do ambiente humano conter milhares de agentes muitos dos quais são conhecidos por modular os efeitos dos outros

a existência de cinética não linear no metabolismo de certos carcinógenos químicos

a evidência de que alguns agentes se manifestam primariamente através de mecanismos que presumivelmente operam somente nos níveis de doses altas (Upton 1988)

Em virtude da variabilidade de relação dose incidência não é possível com base no conhecimento atual a extrapolação precisa de diferentes espécies grupos populacionais doses e condições de exposição para a estimativa de riscos de indução de câncer por um carcinógeno em particular em população humana exposta a baixa dose

Para o propósito da proteção radiológica no entanto os principais comitês nacionais e internacionais adotam como modelo de extrapolação a relação linear sem limiar para a estimativa de risco carcinogênico de baixo nível de exposição no homem (Coggle 1985 Sanders & Kahren 1983 Upton 1988) Isto porque o ajuste linear não somente o mais simples e administrativamente conveniente mas também este modelo tem sido consistente com muitos dados epidemiológicos e experimentais como por exemplo para leucemia aguda tumores da tireoide e câncer de mama

A figura 24 mostra os efeitos de radiação de alta e baixa TLE. Como nos casos de outros efeitos radiobiológicos há uma considerável evidência experimental que mostra que a radiação de alta TLE é mais efetiva na indução de câncer do que a radiação de baixa TLE. O mesmo vale também para a radiação de alta taxa de dose. Embora as doses fracionadas de radiação de baixa TLE são conhecidas por serem biologicamente menos eficazes na indução de câncer do que as doses agudas para a mesma dose total alguns dados com animais indicam que para a radiação de alta TLE as doses fracionadas são mais eficazes do que quando administradas em doses únicas (Coggle 1985)

IX HORMESE

A maioria da opinião científica, expressa há muitos anos pelo Comitê Científico das Nações Unidas sobre os Efeitos da Radiação (UNSCEAR 1962) e unânime em admitir que o risco de saúde varia de acordo com a dose e que a radiação mesmo que seja extremamente baixa apresenta efeitos adversos

Existem no entanto grupos de cientistas que a despeito destas considerações são defensores da hipótese sobre uma possível existência de efeitos benéficos de doses baixas de radiação ionizante fenômeno este conhecido como hormese. Eles partem das observações de que os mecanismos comumente aceitos para a indução de câncer não são consistentes com o conceito de dose limiar acima da qual pode ocorrer o desenvolvimento de câncer e abaixo da qual não há risco. Admitem também que qualquer risco de baixa dose de radiação é tão pequeno que é difícil de ser mostrado epidemiologicamente. Além disso não há evidência direta de que baixas doses de radiação (<100 mSv) são maléficas à saúde

O termo hormese descreve num sentido amplo um fenômeno geral em organismos vivos nos quais exposição a traços ou a baixos níveis de agentes físicos ou químicos danosos estimulam os mecanismos fisiológicos de defesa natural numa maneira que beneficia a saúde e a sobrevivência

Em outras palavras o organismo pode ser estimulado por exemplo por uma pequena dose de veneno que nas altas doses são letais. Por exemplo digitalis usado medicinalmente é um estimulante do coração em pequenas concentrações mas em grandes quantidades causam convulsões e mesmo a morte. Uma série de metais como Cu Cd Zn e Se são elementos essenciais à saúde humana em quantidades diminutas mas são totalmente tóxicos a altas concentrações. Similarmente exposição ao desafio tóxico de alguns microorganismos danosos pode estimular o sistema imune para produzir anticorpos protetores que defendem contra ataques futuros

Alguns toxicologistas aceitam a hipótese de hormese baseados na observação de que muitos agentes ambientais (luz solar vitaminas álcool etc) raramente apresentam uma resposta linear em sistemas biológicos

Há cerca de mil artigos científicos publicados que indicam que doses extremamente baixas de radiação podem apresentar um efeito hormético (Brown 1988)

O termo hormese é de origem relativamente recente. Foi primeiramente usado em 1942 para descrever o estímulo no crescimento de um fungo a baixas concentrações de um antibiótico natural que a altas concentrações suprime o crescimento do fungo

Atualmente tem-se evidência de uma grande variedade de agentes sintéticos e naturais que são estimuladores a baixas concentrações como cloroformio elementos traços essenciais pesticidas metais pesados bifenil policlorados antibióticos hidrocarbonetos álcoois e óleos

Além destes agentes que podem apresentar efeitos horméticos as espécies biológicas que respondem a estes agentes são também numerosas e amplas incluindo desde bactérias leveduras protozoários células em cultura invertebrados e vertebrados

Os exemplos melhor conhecidos de efeitos benéficos de doses baixas de radiação em plantas e

animais são o aumento na germinação de sementes, aceleração no crescimento, aumento da longevidade, melhoramento de fertilidade, prevenção de tumores e aumento de resistência a infecção (Brown 1988).

Várias evidências sugerem que doses baixas e contínuas de radiação prolongam a vida de certos organismos como *Drosophila*, animais marinhos, mamíferos e inclusive o homem. Não há dúvida de que exposição a alta dose de radiação aumenta o risco de desenvolver câncer. Porém se a exposição e da faixa de dose ocupacional (menos de 0,05 *Ci*/ano) é assunto controverso. Esta incerteza vem de observações diretas de populações expostas a doses baixas de radiação que mostram uma redução nas taxas esperadas de câncer por exemplo em sobreviventes de bomba atômica em comparação com as populações não expostas de duas cidades japonesas em populações que vivem ao redor de instalações nucleares na Inglaterra e em populações que vivem em áreas geográficas com alto background de radiação (China, Índia, USA) (Webster 1993).

O mecanismo de ação da hormese não é compreendido mas especula-se que ele esteja relacionado com a produção de radicais livres, reparo e substituição celulares (Sagan 1991).

Os radicais livres em altas concentrações produzem danos aos tecidos por meio de interações por exemplo com o DNA, proteínas e lipídeos das membranas celulares produzindo peróxidos lipídicos. Admite-se que algumas doenças são resultantes de exposição excessiva de radicais livres. Envelhecimento é considerado como uma consequência de radicais livres acumulados durante a vida do indivíduo (Lohr 1991).

Estudos recentes sugerem todavia que baixas concentrações de radicais livres podem ser benéficas e mesmo necessárias para o crescimento celular. O organismo vivo dispõe de um sistema defensivo contra os efeitos de radicais livres gerados pela radiação ou pelos outros agentes por uma série de antioxidantes incluindo enzimas catalase, peroxidase, superóxido dismutase (SOD) e certos íons metálicos. Reações entre estes agentes oxidantes e antioxidantes são complexas e pouco compreendidas. Admite-se que a extensão de dano nos tecidos seja decorrente do equilíbrio entre os radicais livres gerados e o sistema defensivo de proteção com os antioxidantes. Estas observações sugerem uma possível explicação para a proteção resultante de radiação de dose baixa ou outros agentes que produzem os radicais livres (Loken & Fernández 1993). Se a radiação estimula a síntese de antioxidantes tem-se então um aumento geral na sua produção contra os oxidantes. Vários autores têm mostrado que um desses antioxidantes a timidina kinase é aumentada pela radiação de dose baixa.

Um segundo possível mecanismo protetor proposto é quanto a eficiência dos mecanismos de reparo do DNA. Exposições a doses extremamente baixas de radiação ionizante aparentemente estimula o processo de reparo resultando num aumento de resistência de células tratadas e dessa maneira a subsequente exposição de altas doses de radiação (Webster 1993).

Uma outra possibilidade seria a de impedir a propagação de danos induzidos em células proliferativas pela eliminação ou morte programada de células lesadas. Esta estratégia pode também explicar a morte do embrião defeituoso antes de sua implantação no útero.

No caso específico de efeitos horméticos de radiação ionizante as baixas doses não são necessariamente sempre benéficas. Em vez disso se os efeitos não tóxicos ou estimuladores ocorrerem a baixas doses, esses efeitos podem não excluir a coexistência de efeitos adversos, ambos os efeitos podem coexistir (Sagan 1991). São os casos de certos agentes que simultaneamente provocam efeitos danosos e benéficos como o Ni, Cr e Se que são elementos necessários a nutrição e que ao mesmo tempo figuram como elementos com potencial carcinogênico.

AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho particularmente a amiga e colaboradora Tania Helena Ochi Lohmann aos Dr. Jose Roberto Rogero, Dr. Paolo Bartolini e Dr. Heitor F. Andrade Jr. e Dra. Maria Nazareth Rabello Gay e aos amigos Patrick J. Spencer, Erika Paula Andriani e Monica Beatriz Mathor.

X REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS B, BRAY D, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WATSON J D. Cancer. In ALBERTS B, BRAY D, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WATSON J D. eds. Molecular Biology of the Cell. 2 ed. New York, NY: Garland 1989.
- BACQ Z M & ALEXANDER P. Fundamentals of Radiobiology. 2 ed. New York, NY: Pergamon 1961.
- BALASEM A N & ALI A S K. Establishment of dose response relationships between doses of Cs 137 gamma rays and frequencies of micronuclei in human peripheral blood lymphocytes. *Mutat Res* 259: 133-8 1991.
- BARRIOS L, MIRO R, CABALLÍN M R, FUSTER C, GUEDEA F, SUBIAS A, EGOZCUE J. Cytogenetic effects of radiotherapy. Breakpoint distribution in induced chromosome aberrations. *Cancer Genet Cytogenet* 41: 61-70 1989.
- BAUCHINGER M, SCHMID E, BRASELMANN H. Cell survival and radiation induced chromosome aberrations. 2. Experimental findings in human lymphocytes analysed in first and second post irradiation metaphases. *Radiat Environ Biophys* 25: 253-60 1988.
- BEIGUELMAN B. Citogenética humana. Guanabara Koogan 1982.
- BENDER M A & GOOCH P C. Types and rates of X ray induced chromosome aberrations in human blood irradiated *IN VITRO*. *Proc Natl Acad Sci USA* 48: 522-32 1962.
- BRASELMANN H, BAUCHINGER M, SCHMID E. Cell survival and radiation induced chromosome aberrations. I. Derivation of formulae for the determination of transmission and survival parameters of aberrations. *Radiat Environ Biophys* 25: 243-51 1986.
- BONDY M L, SPITZ M K, HALABI S, FUEGER J J, SCHANTZ S P, SAMPLE D, HSU T C. Association between family history of cancer and mutagen sensitivity in upper aerodigestive tract cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prevention* 2: 103-6 1993.
- BOUFFLER, S D. Molecular cytogenetics and radiation research. *Radiol Prot Bull* 134: 15-21 1992.
- BROWN K. Does a little radiation do you good? *Atom*, 378: 26-7 1988.
- CARRANO A V. Chromosome aberrations and radiation induced cell death. I. Transmission and survival parameters of aberrations. *Mutat Res* 17: 341-53 1973.
- CARRANO A V & HEDDLE J A. The fate of chromosome aberrations. *J Theor Biol* 38: 289-304 1973.
- CARRANO A V & NATARAJAN A T. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. International Commission for protection against environmental mutagens and carcinogens. *Mutat Res* 00: MTR04381.1. 28 1987 (ICPEMC Publication n. 14).
- CASARETT A P. Radiation Biology. Eaglewood Cliffs NY: Prentice Hall 1968.

- CHAGANTI R.S.K. & HOULDSWORTH J. Fanconi anemia: a pleiotropic mutation with multiple cellular and developmental abnormalities. *Ann Genet.* 34 (3-4) 206-11 1991
- CHAPMAN J.D. & ALLALUNIS TURNER, M.J. Cellular and molecular targets in normal tissue radiation injury. In GUTIN P.H. LEIBEL S.A. SHELINE, G.E. eds. *Radiation injury to the nervous system*. New York, NY: Raven 1991 p 315
- COGGLE, J.E. *Biological Effects of Radiation*. London: Wykeham, 1971
- COGGLE, J.E. Radiation carcinogenesis. In FARMER, P.H. WALKER, J.M. eds. *The molecular basis of cancer*. Croon Helm, 1985
- COHEN M.M. FRUCHTMAN C.E. SIMPSON S.J. MARTIN A.O. The cytogenetic response of Fanconi's anemia lymphoblastoid cell lines to various clastogens. *Cytogenet. Cell Genet.* 34 230-40 1982
- CONGER, A.D. Radiobiological studies with Tradescantia at nuclear test detonations. *Annals.* 88 215-24 1954
- COUNTRYMAN P.I. & HEDDLE, J.A. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat. Res.* 41 321-32 1976
- COX R. Radiation chromosome damage and cancer. *Radiol. Prot. Bull.* 121 5-10 1991
- DOLPHIN G.W. LLOYD D.C. PURROTT R.J. Chromosome aberration analysis as a dosimetric technique in radiological protection. *Health Phys.* 25 7-13 1973
- FENECH M. Optimisation of micronucleus assays for biological dosimetry. In *New Horizons in Biological Dosimetry*. Wiley-Liss 1991 p 373-86
- FENECH, M. & MORLEY A.A. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effects of *IN VIVO* ageing and low dose X irradiation. *Mutat. Res.* 161 193-98 1986
- GARTE, S.J. & BURNS F.J. Oncogenes and radiation carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* 93 45-9 1991
- GILLIES N.E. Basic molecular and cell biology: Effects of radiations on cells. *Br Med J.* 295 1390-1 1987
- GIAMBARRESI, L. & JACOBS, A.J. Radioprotectants. In CONKLIN J.J. & WALKER, R.I. eds. *Military Radiobiology*. London: Academic 1987 p 265-301
- HALL E.J. *Radiobiology for the Radiologist*. 2. ed. Hagerstown Md: Harper & Row 1978
- HALL E.J. Scientific view of low level radiation risks. *Radio Graphs* 11 509-18 1991
- HARRIS C.C. Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990's. *Cancer Res. (Suppl.)* 51 5023a-44s 1991
- HEDDLE J.A. CIMINO M.C. HAYASHI, M. ROMAGNA F. SHELBY M.D. TUCKER, J.D. VANPARYS P.H. MACGREGOR, J.T. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. *Environ. Mol. Mutagen.* 18 277-91 1991
- IKUSHIMA T. SCE enigma: methodology, mechanism and meaning of sister chromatid exchange. *Annu. Rep. Res. React. Inst. Kyoto Univ.* 22 57-77 1989
- INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Biological dosimetry: Chromosomal aberration analysis for dose assessment*. Vienna, 1986. (Technical Report Series 260)
- KONDO S. Mutation and cancer in relation to the atomic bomb radiation effects. *Jpn J. Cancer Res.* 79 785-99 1988
- KOTELES G.Y. The plasma membrane as radiosensitive target. *Acta Biochim. Biophys. Hung.* 21/1-2/ 81-97 1986
- LLOYD D.C. An overview of radiation dosimetry by conventional cytogenetic methods. In EISERT W.G. & MENDELSON M.L. eds. *Biological Dosimetry*. Berlin Heidelberg: Springer Verlag 1984 p 15-24
- LOHR J.B. Oxygen radicals and neuropsychiatric illness. *Arch. Gen. Psychiatr.* 48 1097-106 1991
- LOKEN M.J. & FEINENDEGEN L.E. Radiation hormesis: its emerging significance in medical practice. *Invest. Radiol.* 28(5) 446-50 1993
- LUCAS J.N. TENJIN T. STRAUME T. PINKEL D. MOORE D. LITT M. GRAY J.W. Rapid human chromosome aberration analysis using fluorescence *IN SITU* hybridization, 1989 p 35-44
- MOORHEAD P.S. NOWELL P.C. MELLMAN W.J. BATTIPS D.M. HUNGERFORD D.A. Chromosome preparations of leukocytes from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* 20(3) 613-16, 1960
- NATARAJAN A.T. VYAS R.C. DARROUDI, F. VERMEULEN, S. Frequencies of X ray induced chromosome translocations in human peripheral lymphocytes as detected by *IN SITU* hybridization using chromosome-specific DNA libraries. *Int. J. Radiat. Biol.* 61(2) 199-203 1992
- NATARAJAN A.T. VYAS R.C. WIEGANT J. CURADO M.P. A cytogenetic follow-up study of the victims of a radiation accident in Goiania (Brazil). *Mutat. Res.* 247 103-11 1991
- PARRY J.M. & WATERS E.M. Carcinogenic, mutagenic and teratogenic biologicals. In ROBINSON C. & HOWELL J.A. eds. *Comprehensive Biotechnology*. New York, NY: Pergamon 1985 v 4 p 569-85
- PELTOMAKI, P. AALTONEN L.A. SISTONEN P. PYLKKANEN L. MECKLIN J. P. JARVINEN H. GREEN J.S. JASS J.R. WEBER, J.L. LEACH, P.S. PETERSEN G.M. HAMILTON S.R. DE LA CHAPPELLE, A. VOGELSTEIN B. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science* 260 810-12 1993
- PRESTON R.J. A short journey from classical to molecular cytogenetics. *Environ. Mol. Mutagen.* 14 126-32, 1989
- REVELL S.H. The breakage and reunion theory and the exchange theory for chromosomal aberrations induced by ionizing radiation: a short history. *Adv. Radiat. Biol.* 4 367-416 1974
- ROBERTS L. Zerning is on a breast cancer susceptibility gene. *Science*, 259 622-25 1993
- ROSIN M.P. The use of the micronucleus test on exfoliated cells to identify anti-clastogenic action in humans: a biological marker for the efficacy of chemopreventive agents. *Mutat. Res.* 287 265-76 1992
- SAGAN L.A. Radiation hormesis: evidence for radiation stimulation and speculation regarding mechanisms. *Radiat. Phys. Chem.* 37(2) 313-17 1991
- SANDERS C.L. & KATHREN R.L. Radiation carcinogenesis. In SANDERS C.L. & KATHREN R.L. *Ionizing radiation: Tumorigenic and tumoricidal effects*. New York, NY: Battelle 1983
- SASAKI M.S. Cytogenetic aspects of cancer predisposing genes. *Jpn J. Human Genet.* 34 1-16 1989
- SASAKI M.S. & NORMAN A. Selection against chromosome aberrations in human lymphocytes. *Nature* 214 502-3 1967
- SAX, K. Chromosome aberrations induced by X rays. *Genetics* 23 494-516 1938
- SCHMIDT W. The micronucleus test. *Mutat. Res.* 31 9-15 1975
- SHAFIK H.M. AU W.W. WHORTON E.B. Jr. LEGATOR, M.S. Distribution of X ray induced chromosome breakpoints in Down syndrome lymphocytes. *Am. J. Med. Genet. (Suppl. 7)* 195-200 1990
- SOLOMON E. BORROW J. GODDARD A.D. Chromosome aberrations and cancer. *Science* 254 1153-60 1991
- SZEKELY J.G. RAAPHORST G.P. LOBREAU A.V. COPPA T.P. Effects of X irradiation and radiation modifiers on cellular ultrastructure. *AMP O'Hare Chicago IL. Scanning Electron Microscopy 1982* p 335-47
- TAYLOR, A.M.R. The effect of radiation on the chromosomes of patients with an unusual cancer susceptibility. In ISHIIHARA, T. & SASAKI M.S. eds. *Radiation-induced chromosome damage in man*. New York, NY: Alan R. Liss 1983
- UNITED NATIONS. Genetic and somatic effects of ionizing radiation: report to the general assembly on the effects of atomic radiation. New York, NY 1986
- UNITED NATIONS. Report of the UN Scientific Committee on the effects of atomic radiation. General Assembly 17. Session suppl 16 (A/5216). New York, NY 1962

- CPTON A C Are there thresholds for carcinogenesis? The theory problem of low level exposure. *Ann NY Acad Sci* 534: 863-84 1988
- VENITT S & PARRY J M Background to mutagenicity testing. In VENITT S & PARRY J M eds. *Mutagenicity testing: A practical approach*. Oxford: IRL, 1984. p 1-24
- WEBSTER E W Hormones and radiation protection. *Invest Radiol* 28(5): 451-53 1993
- WEINSTEIN I B The origins of human cancer: molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment: twenty-seventh G H A Clowes memorial award lecture. *Cancer Res* 48(15): 4135-43 1988
- WELLS A E WEKSBERG R TOMLINSON S LINDAHL T Structural alterations of DNA ligase 1 in Bloom syndrome. *Proc Natl Acad Sci* 84: 8016-20 1987
- WOLFF S Biological dosimetry with cytogenetic endpoints. In *NEW Horizons in Biological Dosimetry*. Wiley-Liss 1991. p 351-62
- YUNIS J J The chromosomal basis of human neoplasia. *Science* 221: 227-36 1983