

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE REPARO AO DANO INDUZIDO NO DNA PELA RADIAÇÃO IONIZANTE EM INDIVÍDUOS SADIOS E EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA.

Nascimento P.A.*, Suzuki M.F.*, Da Silva M.A.*, Oliveira E.M.*, Okazaki K.*

*Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN-CNEN/SP
Caixa Postal 11049
05422-970, São Paulo, Brasil
panascim@net.ipen.br

RESUMO

A população humana está exposta à ação de vários agentes mutagênicos, como por exemplo, fumo, álcool, medicamentos e radiações ionizantes, que produzem lesões no DNA. Essas lesões se não reparadas, podem levar a conseqüências de grande significado biológico como mutações, transformações neoplásicas e morte celular. Existem indivíduos com diferentes graus de eficiência nos mecanismos de reparo do DNA, ou seja, uma pessoa com deficiência no reparo do DNA está propícia a acumular mais mutações e danos celulares. A deficiência no reparo pode ser um fator de susceptibilidade ao desenvolvimento de muitos tipos de câncer. Este trabalho tem como objetivo principal o estudo do dano e reparo em células sanguíneas de indivíduos sadios e de pacientes com câncer de mama, submetidos à ação da radiação ionizante do ^{60}Co e comparar a capacidade de reparo destes indivíduos. Para tanto, foi empregado o teste do cometa, realizado 1, 3 e 24 horas após as irradiações. Os resultados mostraram que houve diferença nos dois grupos estudados quanto à capacidade de reparo; enquanto os doadores sadios repararam a maior parte dos danos radioinduzidos dentro de 3 horas, as pacientes com câncer de mama necessitaram de um tempo maior, sugerindo um sistema de reparo menos eficiente.

Palavras Chave: radiação γ , teste do cometa, leucócitos, câncer de mama, dano no DNA, reparo celular.

I. INTRODUÇÃO

Apesar de todos os avanços tecnológicos obtidos nas últimas décadas, ainda hoje, há grandes interrogações acerca dos agentes etiológicos determinantes da ocorrência da maioria dos tumores malignos.

O câncer é a segunda causa de morte por doença no Brasil e apresenta uma incidência elevada sobretudo, de cânceres de pele, estômago, pulmão, mama, colo de útero, próstata, cólon e reto. Entre as mulheres, o câncer de mama é uma das doenças mais comuns e importantes, sendo nos Estados Unidos, a principal causa de morte em mulheres com idades entre 40-49 anos [1].

Várias evidências indicam que 50 a 80 % dos cânceres humanos são evitáveis, porque os fatores que determinam a sua incidência são em grande parte exógenos. Uma variedade de tumores ocorrem como resultado direto

da exposição a agentes ambientais, como por exemplo, determinadas substâncias de uso industrial e agrícola, fumo, álcool e radiações ionizantes, que produzem lesões no DNA.

Essas lesões se não reparadas, podem levar a conseqüências importantes como mutações, transformações neoplásicas e morte celular.

Na população humana, existem indivíduos mais susceptíveis em desenvolver câncer do que outros. Os mecanismos responsáveis por essa diferença de resposta não estão ainda elucidados, mas a capacidade de reparo celular pode representar um fator fundamental na susceptibilidade genética à carcinogênese; pessoas com mecanismos de reparo deficientes podem acumular mais mutações em células somáticas e assim, apresentar um maior risco para desenvolver câncer [2].

A capacidade de reparo de um indivíduo, pode ser expressa em diferentes graus, desde deficiente a altamente eficiente.

A radiação ionizante é conhecida por causar uma variedade de danos ao DNA, como quebras nas fitas simples e duplas, ligações cruzadas DNA-DNA, DNA-proteínas e danos de bases púricas e pirimidínicas.

As avaliações de lesões ocorridas ao DNA e de reparo celular, constituem etapas essenciais na análise de seqüência de eventos que levam aos efeitos letais, mutagênicos e carcinogênicos da radiação ionizante.

Tecnicamente, uma variedade de metodologias genéticas, citogenéticas, bioquímicas, e outras vem sendo aplicadas com o intuito de avaliar as lesões induzidas ao DNA. O teste do cometa é um método bioquímico que possibilita a visualização direta do dano no DNA e reparo em nível de células individuais [3].

Nesta técnica, as células são embebidas em agarose, o material citoplasmático é lisado e os núcleos celulares remanescentes são expostos a um campo elétrico. Dependendo da quantidade de dano no DNA, “cometas” são observados após eletroforese, corados com um agente fluorescente.

No presente trabalho, a capacidade de reparo de indivíduos sadios e de pacientes com câncer de mama foi avaliada por meio do ensaio do cometa em leucócitos periféricos, irradiados com ^{60}Co e processados 1, 3 e 24 horas após as exposições.

II. MATERIAIS E MÉTODO

Foram utilizadas amostras sangüíneas de 3 doadores sadios (um do sexo masculino e dois do sexo feminino) com idades variando de 40 a 50 anos, não-fumantes, sem qualquer sintoma de doença na ocasião da coleta e de 2 doadoras com câncer de mama, com 42 e 72 anos de idade. Ambas as pacientes apresentavam câncer de mama do tipo ductal, eram mastectomizadas e estavam em um estágio primário da doença não apresentando, portanto, metástases. É importante ressaltar que as pacientes não haviam sofrido nenhum tipo de tratamento quimio ou radioterápico. As amostras sangüíneas dessas pacientes foram cedidas pelo “Instituto de Radioterapia de São Paulo”.

De cada doador, cerca de 3 ml de sangue foram coletados por punção venosa, fracionados e irradiados numa fonte de ^{60}Co (panorâmica e GAMMACELL 220) nas doses de 0,2; 0,6; 1,0; 2,0; 4,0 e 10,0 Gy (0,591 Gy/min.), na presença de oxigênio e à temperatura ambiente, sendo que uma das amostras foi mantida como controle (não-irradiada).

Imediatamente após as irradiações, as amostras sangüíneas foram mantidas a 4°C por 1 hora (para avaliação do dano radioinduzido ao DNA) e por 3 e 24 horas a 37°C (para avaliação do reparo do DNA) e foram processadas para o teste do cometa (teste de eletroforese de microgel) conforme descrito por Singh e colaboradores [3].

As amostras sangüíneas (5 μl) foram embebidas entre duas camadas de gel de agarose (300 μl de agarose “normal melting” 0,7% e 90 μl de agarose “low melting” 0,5% em tampão PBS), montadas em lâminas histológicas foscas.

Após a solidificação dos géis, as células foram tratadas com uma solução de lise (2,5 M de NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM de Tris, 1% de sarcosinato de Na pH 10, 1% de triton X-100, 10% DMSO) por 2 horas a 4°C , para remoção de todas as proteínas.

A seguir, as células embebidas em gel de agarose foram imersas em tampão alcalino de eletroforese (1 mM de EDTA pH10, 300 mM de NaOH) por 20 minutos, para expressão das quebras nas fitas simples e de sítios alcalilábeis do DNA e submetidas a uma corrida eletroforética (25 V; 300 mA) por 20 minutos.

Após a eletroforese, as células foram neutralizadas com 0,4 M de Tris, pH 7,5, coradas com 50 μl de brometo de etídio (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e os “cometas” resultantes foram analisados e fotografados ao microscópio de fluorescência (CARL ZEISS, objetiva de 20x), equipado com filtro de excitação de 515-560 nm e um filtro de barreira de 590 nm.

A análise foi feita no próprio negativo (filme T-MAX 400 da Kodak), projetando-se as imagens dos cometas por meio de um projetor de slides.

Para cada doador foram analisados cerca de 50 cometas escolhidos ao acaso para cada dose de radiação. O dano no DNA foi quantificado para cada célula individualmente, medindo-se o comprimento total do cometa (cabeça + cauda) em μm .

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados referentes aos efeitos da radiação γ do ^{60}Co em leucócitos sangüíneos de 3 doadores sadios e de 2 pacientes com câncer de mama processados 1, 3 e 24 horas após a irradiação, estão representados graficamente na figura 1.

As curvas dose-respostas (figura 1) mostram que há um aumento da migração do DNA em função da dose de radiação nos dois grupos estudados: sadios (figura 1a) e pacientes com câncer de mama (figura 1b). Isto porque com o aumento da dose de radiação, ocorre um maior número de lesões ao DNA e os filamentos danificados migram de maneira pronunciada em sentido ao anodo numa corrida eletroforética, dando origem às caudas do cometa. A distância e a quantidade de DNA que migra da “cabeça” está diretamente relacionada com a magnitude do dano ocorrido.

Pode-se verificar que os dois grupos de indivíduos (figura 1a e b) mostram um comportamento análogo quando as células são processadas 1 hora após as exposições. A figura 1 mostra ainda uma considerável redução do comprimento total do cometa em amostras processadas 3 e 24 horas, quando comparadas com as amostras de 1 hora após as exposições.

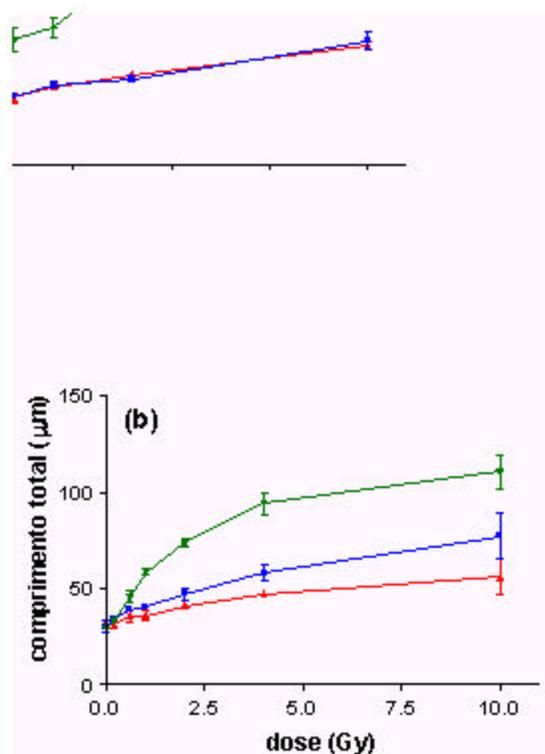


Figura 1. Curvas dose-respostas para migração de DNA em leucócitos do sangue humano processados 1, 3 e 24 horas após as irradiações. (a) Doadores sadios (b) Pacientes com câncer de mama. As barras representam o desvio padrão da média dos doadores analisados.

Vários estudos utilizando linfócitos sanguíneos de doadores sadios, indicam que cerca de 50% dos danos causados pela irradiação são reparados dentro de 15 minutos e que a maioria do reparo é efetuado dentro de 2 horas [4, 5].

Em indivíduos sadios (figura 1a) as curvas de 3 e 24 horas são praticamente iguais, sugerindo que muitas dessas lesões radioinduzidas são eficientemente reparadas dentro de 3 horas, principalmente nas doses baixas, onde a média do comprimento total dos cometas é próxima dos valores controle (amostras não-irradiadas).

Em pacientes com câncer de mama (figura 1b), o mesmo não é observado; apesar de ocorrer redução do dano ao DNA, muitas lesões ainda permanecem após 3 horas.

Comparando a cinética de reparo entre as células de indivíduos sadios e de pacientes com câncer de mama, pode-se observar que a restituição da integridade do DNA é mais lenta nos indivíduos com câncer, o que pode ser melhor visualizado na figura 2 (curvas geradas 3 horas após as irradiações).

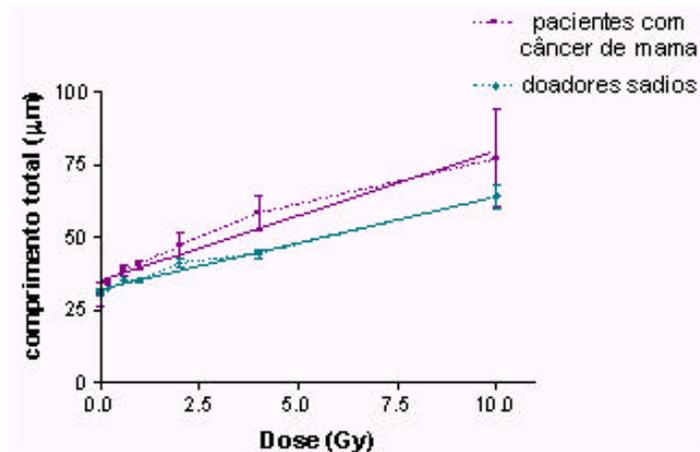


Figura 2. Comparação entre os dois grupos estudados, com relação ao reparo de 3 horas após a irradiação com ^{60}Co . As duas curvas foram ajustadas segundo o modelo de regressão linear.

Os resultados obtidos corroboram com os de Parshad e colaboradores [6], que observaram que a frequência de quebras cromatídicas em linfócitos sanguíneos de doadores com câncer de mama e com história familiar de câncer de mama, foi 2 a 3 vezes maior após a irradiação, do que as células de doadores sadios com nenhuma história familiar de câncer de mama. Os autores concluíram que o reparo deficiente do DNA, manifestado pela frequência alta de dano ao DNA induzido por radiação, pode ser um fator de predisposição ao câncer de mama e em certos cânceres de mama esporádicos.

IV. CONCLUSÕES

A indução e o reparo de quebras nas fitas do DNA em células sanguíneas de 3 doadores sadios e de 2 pacientes com câncer de mama foram analisados e comparados após a exposição *in vitro* com várias doses de radiação gama de ^{60}Co .

O dano radioinduzido no DNA foi mais pronunciado 1 hora após a irradiação, e apresentou um aumento da migração de DNA em função da dose de radiação nos dois grupos estudados.

No grupo de doadores sadios, 3 horas após a irradiação a quantidade de dano residual no DNA foi próxima dos valores controle (amostras não-irradiadas).

As pacientes com câncer de mama apresentaram uma capacidade de reparo mais lenta em relação ao grupo de doadores sadios.

O teste do cometa empregado mostrou ser uma ferramenta extremamente valiosa que permite quantificar as

radiolesões induzidas no DNA e o reparo em nível de células individuais.

AGRADECIMENTOS

A Dra. Regina M. Godoy Lopes e a Dra. Mary A. Wiltgen Teixeira do Instituto de Radioterapia de São Paulo, por terem cedido as amostras de sangue de pacientes com câncer de mama.

REFERÊNCIAS

[1] SULLIVAN, D. C. & ZERN, R. T., **National institutes of health Consensus development conference statement: Breast cancer screening for women ages 40-49, january 21-23, 1997**, Journal of the national cancer institute, vol. 89 (14), p. 1015-1020, 1997.

[2] HSU, T. C., JOHNSTON, D. A., CHERRY, L.M., RAMKISSOON, D., SCHANTZ, S. P., JESSUP, J. M., WINN, R. J., SHIRLEY, L., AND FURLONG, C., **Sensitivity to genotoxic effects of bleomycin in humans : possible relationship to environmental carcinogenesis**, Int. J. Cancer, vol. 43, p. 403-409, 1989.

[3] SINGH, N. P., MCCOY, M. T., TICE, R. R. AND SCHNEIDER, E. L., **A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells**, Exp. Cell Research, vol. 175, p 184-191, 1988.

[4] SINGH, N. P., DANNER, D. B., TICE R. R., BRANT, L., SCHNEIDER, E. L., **DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes**, Mutation Research, vol. 237, p. 123-130, 1990.

[5] LANKINEN, M. H., VILPO, L. M., VILPO, J. A., **UV- and γ -irradiation-induced DNA single-strand breaks and their repair in human blood granulocytes and lymphocytes**, Mutation Research, vol. 352, p. 31-38, 1996.

[6] PARSHAD, R., PRICE, F. M., BOHR, V. A., COWANS, K. H., ZUJEWSKI, J. A., **Deficient DNA repair capacity, a predisposing factor in breast cancer**, British Journal of cancer, vol 74, p. 1-5, 1996.

ABSTRACT

The human population is exposed to the action of several mutagenic agents, as tobacco, alcohol, drugs and ionizing radiation, that cause DNA damages. These damages if do not repaired may lead to consequences of great biological importance as mutations, neoplastic transformation and cellular death. People have differences in the efficiency of DNA repair, i. e., an individual with repair

deficiency will accumulate much more mutations and cellular damages. The deficiency in the repair ability may be a factor of susceptibility to the development of many types of cancer. The main objective of this work is to study the damage and repair in blood cells of health donors and of breast cancer patients, when submitted to ionizing radiation of ^{60}Co source and compare the repair capacity of them. For this purpose the comet assay was applied 1, 3 and 24 hours after the irradiation. The results showed that there are differences in the capacity of repair of the two groups. While the health donors repaired most of the radiation induced damage in 3 hours, the breast cancer patients needed more time that suggests a repair system less efficient.