

ATENÇÃO

O ORIGINAL DESTE ÍTEM NÃO FORNECE CONDIÇÕES
PARA OBTER UMA CÓPIA DIGITALIZADA COM
MELHOR QUALIDADE



**AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO**

**AVALIAÇÃO DO DANO RADIOINDUZIDO E CAPACIDADE
DE REPARO DO DNA EM PACIENTES COM CÂNCER
DE MAMA POR MEIO DA TÉCNICA DO COMETA
("SINGLE CELL GEL ELECTROPHORESIS")**

PATRÍCIA ALVES DO NASCIMENTO

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

**Orientadora:
Dra. Kayo Okazaki**

**São Paulo
2000**

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

**AVALIAÇÃO DO DANO RADIOINDUZIDO E CAPACIDADE
DE REPARO DO DNA EM PACIENTES COM CÂNCER
DE MAMA POR MEIO DA TÉCNICA DO COMETA
("SINGLE CELL GEL ELECTROPHORESIS")**

PATRÍCIA ALVES DO NASCIMENTO



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

Orientadora:
Dra. Kayo Okazaki

São Paulo

2000

“Os homens cultivam mil rosas num mesmo jardim e não encontram o que procuram. E, no entanto, o que eles buscam, poderia ser encontrado numa só rosa”

Antoine de Saint-Exupéry

À minha Mãe Terezinha e ao meu Pai Raimundo, pelo amor, carinho e apoio dedicado a mim, pelas palavras de ânimo e conforto, pelo estímulo sempre renovado à minha escolha profissional e por fim, por acreditarem em mim.

Aos meus irmãos Ronaldo, Radige e Rodrigo, pessoas das quais muito me orgulho, e em especial ao meu irmão Claudinho, que mesmo estando distante é sempre tão presente em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial, à Dra. Kayo Okazaki, pelo profissionalismo e carinho com que me orientou, e pela valiosa amizade.

Aos colegas do Instituto de Radioterapia, Dra. Regina Godoy Lopes, Dra. Mary Teixeira, Dr. Fernando e Dr. Oswaldo Peres, por terem permitido o contato com as pacientes.

À Dra. Barbara Rzycki pela assistência dada na adequação da fonte panorâmica para a realização das irradiações.

À Beth e ao Carlos, pela atenção dispensada na irradiação das amostras sanguíneas.

Aos meus amigos do departamento, especialmente à Elaine, Nanci, Ieda, Paulo, Maria Helena, Regina, Malvina, Helena, Patrick e Johnny, por toda amizade e apoio, tanto profissional como pessoal.

À Cidinha, por todas as contribuições e pela ajuda na análise dos resultados.

À Míriam, pelo auxílio e amizade sempre presentes.

À Márcia, pelos favores sempre prestados com carinho, pelas palavras de estímulo e principalmente pela bonita e forte amizade.

A toda minha família, em especial a minha Mãe, que tanto contribuiu para o êxito desta pesquisa.

Ao Morgado, meu namorado, por seu amor, carinho, paciência e apoio.

As pacientes que permitiram a realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

DNA EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA POR MEIO DA TÉCNICA DO COMETA("SINGLE CELL GEL ELECTROPHORESIS")

Patrícia Alves do Nascimento

RESUMO

O dano genético induzido pela radiação ionizante e a capacidade de reparo de três pacientes com câncer de mama e de três indivíduos sadios foram investigados por meio do teste do cometa, utilizando dois parâmetros: medida do comprimento da cauda do cometa e classificação visual dos cometas. Para tanto, as amostras sanguíneas dos doadores foram irradiadas *in vitro* com radiação gama de ^{60}Co (0,722 Gy/min.), nas doses de 0,2 a 10 Gy e analisadas logo após, 3 e 24 horas após as exposições. O nível basal de dano foi mais alto em pacientes com câncer de mama em relação aos doadores sadios. Uma possível influência da idade, estado patológico da doença e capacidade de reparo foi aventada. Quanto aos danos radioinduzidos, os dados obtidos mostraram que os dois grupos apresentaram um comportamento similar quando analisados logo após as irradiações. Enquanto que os indivíduos sadios mostraram uma redução considerável de dano 3 horas após, as pacientes apresentaram uma quantidade de dano residual significativamente mais alta mesmo 24 horas após as exposições. Uma estimativa quantitativa de capacidade de reparo mostrou que os doadores sadios repararam a maior parte dos danos radioinduzidos dentro de 3 horas, ao passo que as pacientes apresentaram muitas lesões não reparadas mesmo após 24 horas. As metodologias adotadas mostraram-se ser bastante seguras, sensíveis e reprodutivas: as curvas dose-respostas obtidas para migração de DNA podem ser utilizadas, não somente para o estudo da radiosensibilidade celular, mas também para a dosimetria biológica. Os resultados obtidos permitiram concluir que, as pacientes com câncer de mama apresentaram uma radiosensibilidade inicial similar à de indivíduos sadios, porém um mecanismo de reparo menos eficiente que as tornam mais vulneráveis aos desafios genotóxicos ambientais.

EVALUATION OF THE RADIOINDUCED DAMAGE AND DNA REPAIR CAPACITY OF BREAST CANCER PATIENTS BY THE COMET ASSAY (SINGLE CELL GEL ELECTROPHORESIS)

Patrícia Alves do Nascimento

ABSTRACT

The genetic damage induced by ionising radiation and the repair capacity of three breast cancer patients and three health subjects were investigated by comet assay using two parameters: tail length and visual classification. Blood samples were exposed *in vitro* to ^{60}Co gamma rays ($0.6 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$), with 0.2 to 10 Gy and analysed just after the exposition, 3 and 24 hours later. The basal level of damage was higher in leukocytes of breast cancer patients than in health subjects. Maybe it could be affected by the age, disease stage and repair capacity. Concerning the radioinduced damage, the results showed that both groups presented a similar response when analysed just after the irradiation. But while the health subjects had a considerable reduction of the damage after 3 hours, the patients had a residual significant damage amount even 24 hours after the exposition. The repair capacity evaluation of health subjects were almost completed within 3 hours, in contrast to the patients who had many lesions not repaired even after 24 hours. The adopted parameters showed to be secure, sensible and reproducible. The dose-response curves obtained for DNA migration can be utilised not only for cellular radiosensitivity studies but also for biological dosimetry purpose. The results allowed us to conclude that the breast cancer patients presented a similar initial radiosensitivity to the health subjects, but a less efficient repair mechanism making them more vulnerable to environmental genotoxic agents.

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 considerações gerais sobre a radiação ionizante.....	7
1.2 considerações gerais sobre a suscetibilidade genética.....	13
1.3 considerações gerais sobre o câncer de mama.....	16
1.4 considerações gerais sobre a técnica do cometa.....	23
2. OBJETIVO.....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 material.....	29
3.1.1 indivíduos sadios.....	29
3.1.2 pacientes com câncer de mama.....	30
3.2 método.....	31
3.2.1 coleta.....	31
3.2.2 irradiação.....	31
3.2.3 ensaio do cometa.....	31
3.2.4 análise das lâminas.....	33
3.2.5 avaliação do dano e reparo.....	34
3.2.6 análise estatística.....	37
4. RESULTADOS.....	38
4.1 avaliação de células sanguíneas não irradiadas.....	38
4.2 avaliação do dano pela medição do cometa.....	41
4.3 avaliação do dano pela classificação visual do cometa.....	47
4.4 análise da distribuição do dano.....	58
4.5 avaliação do reparo celular.....	62
5. DISCUSSÃO.....	68
6. CONCLUSÕES.....	81
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

1. INTRODUÇÃO

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

Segundo dados da ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (1999), a cada ano o câncer atinge pelo menos 9 milhões de pessoas e mata cerca de 5 milhões, sendo atualmente a segunda causa de morte por doença na maioria dos países, subseqüente às doenças cardio-vasculares.

O Brasil classifica-se entre os países com maior incidência de câncer, em todo o mundo. Em mulheres, os tipos de câncer mais freqüentes em ordem decrescente são o de mama, colo do útero, cólon e reto, estômago, pulmão e boca. Já nos indivíduos do sexo masculino, os cânceres mais freqüentes são os de pulmão, próstata, estômago, cólon e reto, boca e bexiga (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 1999).

O desenvolvimento neoplásico não ocorre como resultado de um único evento e sim da ocorrência de várias alterações genéticas e epigenéticas em uma dada célula somática (SUGIMURA, 1992). As alterações ocorridas em certos genes ligados ao desenvolvimento neoplásico, como os proto-oncogenes, supressores de tumor, e genes envolvidos no mecanismo de reparo do DNA, podem desencadear uma série de eventos que podem resultar em uma transformação maligna (WEINSTEIN *et al.*, 1995).

Os proto-oncogenes estão envolvidos no controle da proliferação e diferenciação das células. Os proto-oncogenes são ativados em oncogenes em decorrência de alterações como mutações de ponto, amplificação gênica ou rearranjos cromossômicos, resultando em um crescimento celular descontrolado. Os oncogenes possuem um caráter dominante em nível celular; ou seja, basta um único alelo mutante para alterar o fenótipo de uma célula normal (ROSEN, 1995).

Enquanto os produtos dos proto-oncogenes favorecem a proliferação e a diferenciação celular, os dos genes de supressão tumoral normalmente bloqueiam o crescimento descontrolado e a transformação maligna, propiciando o processo carcinogênico apenas quando a função de ambos os alelos se perde: ao contrário das mutações nos proto-oncogenes que tem uma ação dominante, as mutações nos genes de supressão tumoral apresentam um caracter recessivo (LEVINE, 1995).

Mutações no gene supressor tumoral p53, por exemplo, são as alterações genéticas mais freqüentemente encontradas em uma variedade de cânceres humanos, como os de mama, cólon, esôfago, fígado, bexiga, ovário e na síndrome de Li-Fraumeni uma forma de câncer hereditário caracterizada pelo desenvolvimento de tumores em múltiplos órgãos principalmente mama e ovário (HOLLSTEIN *et al.*, 1991).

O gene p53 está localizado no cromossomo 17 p13.1. Esse gene codifica uma proteína nuclear que desempenha funções importantes ligadas ao controle

do ciclo celular, reparo do DNA, estabilidade genômica e apoptose (MURAKAMI *et al.*, 1995).

Além dos proto-oncogenes e dos genes supressores de tumor, um terceiro grupo de genes ligados ao desenvolvimento neoplásico são os genes envolvidos no reparo do DNA. Esses genes asseguram que cada fita de DNA com suas informações genéticas sejam corretamente copiadas durante a divisão celular (SANKARANARAYANAN & CHAKRABORTY, 1995). Mutações nesses genes de reparo geram uma instabilidade genômica que leva a um aumento na frequência de outras mutações que se acumulam no genoma de células somáticas, podendo dessa forma propiciar um processo carcinogênico (FEARON, 1997).

Didaticamente, o processo de carcinogênese pode evoluir em três fases: fases de iniciação ou fase celular, de promoção ou tecidual e de progressão ou sistêmica (HARRIS, 1991).

Na fase de iniciação, tanto fatores endógenos como exógenos podem, por um único evento, induzir um dano irreversível ao DNA de uma única célula, tornando-a diferenciada. Contudo, um único evento não é suficiente para induzir uma mudança maligna, necessitando posteriormente da ação de promotores tumorais.

Na etapa de promoção segue a expansão clonal da célula transformada, que sofre inúmeras divisões. Frequentemente os tumores são diagnosticados nesta fase.

Os carcinógenos podem ser agentes iniciadores ou promotores; alguns carcinógenos são classificados como completos porque atuam como iniciadores e promotores tumorais ao mesmo tempo (HARRIS, 1991).

A fase final é a de progressão, onde as células transformadas, adquirem outras alterações genéticas e epigenéticas, entram em um processo proliferativo ilimitado com um aumento do grau de malignidade; o tumor aumenta de tamanho e pode se espalhar formando focos secundários de tumor (metástase). As metástases caracterizam a fase sistêmica das neoplasias (HENDERSON *et al.*, 1996).

A transição entre esses estádios variam quanto ao período latente entre o evento inicial e a manifestação clínica do tumor, dependendo do tipo de tumor e do local afetado assim como da suscetibilidade individual.

Estudos experimentais *in vitro* e *in vivo*, assim como dados epidemiológicos, sugerem que a carcinogênese é o resultado de interações complexas entre vários fatores endógenos e exógenos durante o processo de múltiplas etapas e de múltiplos mecanismos. Nenhum fator isolado causa câncer (WEINSTEIN *et al.*, 1995).

Os fatores exógenos referem-se a fatores relacionados ao meio ambiente, no qual se encontra um grande número de fatores de risco; como agentes carcinogênicos físicos e químicos, vírus oncogênicos e outros fatores, tais como: tabagismo e alcoolismo. Os fatores endógenos estão ligados a fatores genéticos, hormonais e imunológicos (PERERA, 1997).

Um dos processos endógenos que pode estar envolvido no processo carcinogênico por causar danos ao DNA, é a produção de radicais livres e de metabólitos reativos de oxigênio, as chamadas espécies reativas de oxigênio (ROS - "reactive oxygen species"). As espécies reativas de oxigênio são geradas *in vivo* durante o metabolismo normal do oxigênio na mitocôndria e são potencialmente citotóxicas e mutagênicas podendo ter ação direta no DNA (BARNETT & KING, 1995; KING *et al.*, 1997).

Segundo AMES (1989), milhares de lesões são induzidas no DNA de uma célula por dia. A taxa de indução do dano assim como a permanência dessas lesões dependem da atividade e da eficácia de uma variedade de mecanismos de defesa, incluindo a presença de antioxidantes e a capacidade de reparo do DNA.

Os fatores endógenos são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinados e estão ligados à capacidade do organismo de se defender das agressões externas. Apesar de o fator genético exercer um importante papel na oncogênese, pois influencia a suscetibilidade individual, são raros os casos de cânceres que se devem exclusivamente a fatores hereditários, familiares e étnicos. Alguns tipos de câncer de mama, estômago e intestino parecem ter um forte componente familiar, embora não se possa afastar a hipótese de exposição dos membros da família a uma causa comum (WEINSTEIN *et al.*, 1995).

Contudo, 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 (LOPES *et al.*, 1992).

Numerosas substâncias químicas isoladas ou associadas a outras já foram identificadas como cancerígenas, como benzeno e asbestos, bastante utilizados na prática agrícola como pesticidas e herbicidas (HARRIS, 1991).

O tabaco também está relacionado com um número cada vez maior de enfermidades não só geradas como potencializadas pelo seu uso. A fumaça de cigarro é o maior multitóxico que o homem introduz voluntariamente no organismo. São cerca de 5.000 elementos diferentes, entre eles compostos aromáticos polinucleares, metais, resíduos de produtos agrícolas e nicotina. O hábito de fumar apresenta relação causal com câncer de pulmão, laringe, cavidade bucal, lábio, faringe, esôfago, pâncreas e bexiga (LOPES *et al.*, 1992).

Quanto aos agentes físicos, o potencial carcinogênico da radiação ionizante é conhecido desde o início do século, embora, o mecanismo de ação no desenvolvimento neoplásico ainda não esteja bem elucidado.

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A RADIAÇÃO IONIZANTE

A utilização de radiações nos diferentes campos de atividade humana comporta, simultaneamente, benefícios e riscos. Inúmeras evidências acumuladas desde o início da utilização das radiações para diversos fins indicaram que as mesmas são capazes de produzir vários tipos de câncer.

Os trabalhadores da área nuclear expostos a materiais radioativos apresentam alta incidência de leucemias e de diversos tipos de tumores sólidos (CARDIS *et al.*, 1995). O mesmo foi observado entre os sobreviventes das bombas atômicas nas cidades de Hiroshima e Nagasaki (THOMPSON *et al.*, 1994).

A exposição terapêutica a radiação ionizante (como na medicina nuclear, radioterapia e radiodiagnóstico) também tem sido associada com a indução de câncer de tireóide (HILLEBRANDT *et al.*, 1996) de pulmão (HOWE, 1995) e de mama (HELZLSOUER *et al.*, 1995).

A radiação ionizante é considerada um agente carcinogênico completo por atuar como um iniciador e promotor da carcinogênese (KONDO, 1988). É possível, então, que a radiação atue em vários dos múltiplos estádios da carcinogênese.

A radiação pode ser proveniente de diversas fontes naturais ou artificiais. As fontes de radiação natural podem ser representadas pela radiação cósmica e pela radiação proveniente de radionuclídeos contidos na crosta terrestre. Em relação as fontes artificiais de radiação, estão incluídos, os equipamentos de

raios X, fontes de ^{60}Co , aceleradores de partículas e reatores nucleares utilizados na medicina, pesquisa, operações industriais e na geração de energia elétrica.

Os raios cósmicos, a radiação gama, os raios X e a radiação ultravioleta, fazem parte das radiações eletromagnéticas. Uma das características das radiações eletromagnéticas é a alta energia associada a ausência de massa, o grande poder de penetração e a capacidade de promover ionizações e excitações no meio onde se propagam.

Dentro do espectro eletromagnético as microondas e as ondas de rádio são classificadas como não ionizantes. As radiações ultravioleta encontram-se em um nível intermediário, entre as radiações ionizantes e não ionizantes. Os raios cósmicos, a radiação gama e os raios X são classificados como radiações ionizantes (HALL, 1994).

Os diferentes tipos de radiação diferem na eficácia em produzir danos biológicos (IAEA, 1986). Todos os tipos de radiação induzem efeitos qualitativamente similares nos sistemas biológicos, porém implicam numa diferença quantitativa considerável na expressão da resposta biológica (HALL, 1994).

Os efeitos biológicos estão intimamente relacionados com o conceito de transferência linear de energia (LET), definido como uma medida da quantidade média de energia liberada em keV por μm de tecido atravessado ($\text{keV}/\mu\text{m}$). O

valor da LET varia com a velocidade, massa e carga da radiação ionizante (HALL, 1994).

De um modo geral, radiações de alta LET como as radiações particuladas alfa e neutrons são mais eficazes na produção de danos biológicos que as radiações de baixas LET, como as partículas beta, raios X e gama.

A interação da radiação ionizante com o material biológico gera uma variedade de lesões moleculares que ocorrem em organelas ou subcompartimentos celulares. Embora toda a molécula celular seja um candidato em potencial ao dano pela radiação ionizante, as lesões mais prejudiciais para a sobrevivência celular são aquelas envolvendo a estrutura do DNA, dado o papel desempenhado por ele no controle das diversas funções celulares.

A radiação ionizante pode danificar biomoléculas importantes como o DNA, por dois mecanismos básicos: por ação direta, quando há interação direta da energia da radiação com o DNA ou por ação indireta, quando ocorre transferência de energia da radiação primariamente às moléculas circundantes do DNA, especialmente água, levando a uma cadeia de reações que dissipam a energia dentro da célula produzindo várias espécies reativas, principalmente os radicais livres. Há uma variedade de radicais livres biologicamente relevantes, mas os radicais mais comuns são os produzidos pela radiólise da água como, os radicais hidroxilas ($\cdot\text{OH}$), elétron aquoso ($e^{-\text{aq}}$) e íon hidrogênio ($\cdot\text{H}$) (HALL, 1994).

Ambos os efeitos, diretos e indiretos, produzem uma variedade de lesões primárias, como quebras nas fitas simples e duplas do DNA, ligações cruzadas DNA-DNA, DNA-proteínas e danos de bases púricas e pirimidínicas. Essas alterações se não reparadas corretamente resultam em mutações gênicas, aberrações numéricas e estruturais (MENDIOLA-CRUZ & MORALES RAMÍREZ, 1999).

De modo geral, à medida que aumenta a dose de radiação, aumenta-se também o dano biológico. Um outro fator é a taxa de dose, que é definida como a quantidade de radiação liberada ao sistema por unidade de tempo. Uma mesma dose pode causar uma maior quantidade de dano se for aplicada em um tempo menor, ou seja, com uma taxa de dose alta (HALL, 1994).

As lesões ocorridas ao DNA de uma célula alvo são prontamente reparadas, as lesões não reparadas ou reparadas erroneamente podem resultar em uma célula mutada viável que pode ser a iniciadora de um longo e complexo processo que pode culminar, por exemplo, na indução de tumores malignos. Dependendo da quantidade e do tipo de dano ocorrido, uma célula normal pode seguir uma outra via e em vez de tentar reparar o dano, entra em processo de morte celular (DELIC *et al.*, 1995).

A manutenção da estabilidade genética depende entre outros fatores da eficiência de mecanismos de reparo. Há uma variedade de mecanismos de reparo, dependendo do tipo de lesão formada no DNA um específico mecanismo de reparo é acionado.

Ambos os efeitos, diretos e indiretos, produzem uma variedade de lesões primárias, como quebras nas fitas simples e duplas do DNA, ligações cruzadas DNA-DNA, DNA-proteínas e danos de bases púricas e pirimidínicas. Essas alterações se não reparadas corretamente resultam em mutações gênicas, aberrações numéricas e estruturais (MENDIOLA-CRUZ & MORALES RAMÍREZ, 1999).

De modo geral, à medida que aumenta a dose de radiação, aumenta-se também o dano biológico. Um outro fator é a taxa de dose, que é definida como a quantidade de radiação liberada ao sistema por unidade de tempo. Uma mesma dose pode causar uma maior quantidade de dano se for aplicada em um tempo menor, ou seja, com uma taxa de dose alta (HALL, 1994).

As lesões ocorridas ao DNA de uma célula alvo são prontamente reparadas, as lesões não reparadas ou reparadas erroneamente podem resultar em uma célula mutada viável que pode ser a iniciadora de um longo e complexo processo que pode culminar, por exemplo, na indução de tumores malignos. Dependendo da quantidade e do tipo de dano ocorrido, uma célula normal pode seguir uma outra via e em vez de tentar reparar o dano, entra em processo de morte celular (DELIC *et al.*, 1995).

A manutenção da estabilidade genética depende entre outros fatores da eficiência de mecanismos de reparo. Há uma variedade de mecanismos de reparo, dependendo do tipo de lesão formada no DNA um específico mecanismo de reparo é acionado.

As quebras nas fitas simples e os danos de bases ocorridos no DNA são reparados pela ação de enzimas do reparo por excisão de base (BER “base excision repair”). Danos que envolvem mudanças na estrutura da dupla hélice do DNA como os dímeros de pirimidinas, que podem ser formados por exposição de células a luz ultravioleta, são reparados pelo reparo por excisão de nucleotídeo (NER “nucleotide excision repair”). Já as quebras nas fitas duplas do DNA são reparadas por caminhos recombinacionais (PRICE, 1993; LANKINEN *et al.*, 1996; JEGGO, 1998).

Independente do mecanismo de reparo a ser realizado, o caminho básico para o reparo de DNA envolve praticamente três etapas, reconhecimento do dano e excisão do pedaço danificado, ressíntese e finalmente ligação (figura 1) (ALBERTS *et al.*, 1994).

A integridade das informações genéticas contidas na molécula do DNA, é um pré-requisito para o bom funcionamento das diversas funções exercidas pelo DNA, como replicação e transcrição. Danos não reparados podem resultar em morte celular, mutações e câncer.

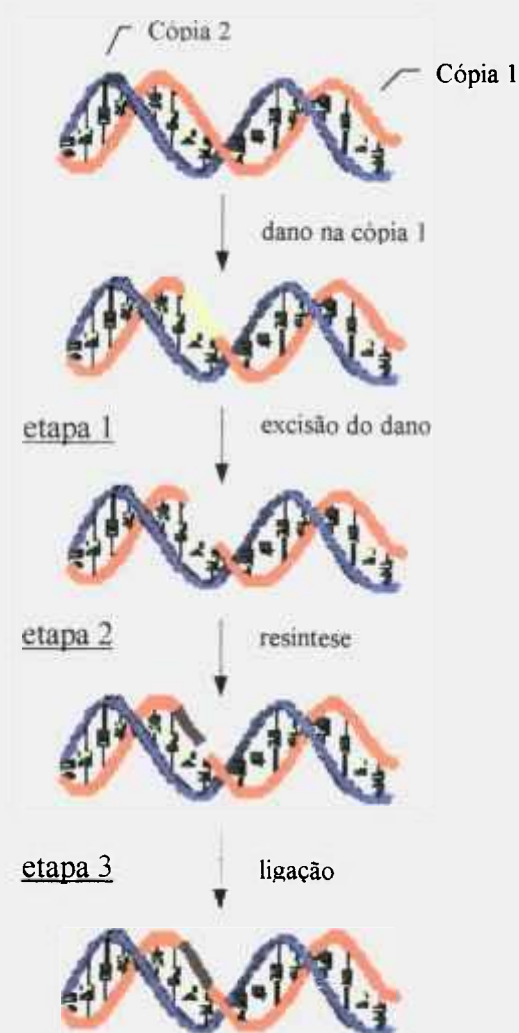


Figura 1 - As três etapas principais para o reparo do dano ocorrido ao DNA são etapa 1: a porção alterada na fita de DNA danificada é reconhecida e removida por enzimas chamadas *nucleases de reparo*, etapa 2: resíntese do pedaço danificado através da enzima *DNA polimerase* que utiliza a fita não danificada como molde das informações perdidas e etapa 3: ligação do pedaço recém sintetizado pela enzima *DNA ligase*.

1.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE SUSCETIBILIDADE GENÉTICA

O processo carcinogênico depende não somente da exposição aos agentes carcinogênicos, mas também do grau de suscetibilidade dos indivíduos. Essa suscetibilidade pode ser avaliada pela capacidade de reparo do dano induzido ao DNA.

Vários autores sugerem a existência de um amplo espectro na capacidade de reparo do DNA na população humana (COLLINS *et al.*, 1997; Mc.KAY & PETERS, 1997). Indivíduos com a capacidade de reparo reduzida, após a exposição aos mutagênicos ambientais podem acumular uma maior quantidade de danos genéticos do que os indivíduos com uma proficiência melhor, podendo vir a desenvolver câncer, sendo dessa forma classificados como grupo de risco (HSU, 1989). Bons exemplos disso, são os de alguns fumantes que desenvolvem câncer de pulmão e outros não, o mesmo ocorre com exposição ao sol e câncer de pele.

Em certas síndromes autossômicas recessivas, denominadas síndromes da fragilidade cromossômica como xeroderma pigmentoso, ataxia telangiectasia, síndrome de Bloom e anemia de Fanconi, os indivíduos afetados apresentam uma instabilidade genética associada a uma predisposição elevada ao câncer. Esta instabilidade genética é interpretada como conseqüência de mecanismos deficientes no reparo do DNA (SETLOW, 1978; BOHR, 1989; MACHADO & MENCK, 1997).

Muitas vezes, a instabilidade genética avaliada, por exemplo, por um aumento no índice de quebras cromossômicas, não é expressa espontaneamente, estando dessa forma oculta. Sua existência pode tornar-se aparente somente após exposição a um agente carcinogênico.

A tabela I mostra várias doenças hereditárias associadas com uma alta predisposição ao câncer e com um possível defeito no reparo do DNA.

Parece, portanto, de acordo com os dados mostrados na tabela I, que defeitos no reparo do DNA, podem ser um determinante causal no processo carcinogênico. O grau de defeitos em diferentes indivíduos pode ser o responsável pela suscetibilidade ou resistência aos mutagênicos ambientais.

Testes de sensibilidades aos mutagênicos podem fornecer uma estimativa da capacidade individual de reparar o dano do DNA, pois quanto maior a quantidade de lesões induzidas não reparadas, mais deficientes são os mecanismos de reparo (HSU, 1986). Vários trabalhos mostram a utilização de linfócitos do sangue periférico como célula alvo na verificação de alterações na eficiência de reparo do DNA em pacientes com câncer após exposição a radiação ou drogas quimioterápicas (RIGAUD *et al.*, 1990; SCHANTZ *et al.*, 1997; VENKATACHALAM *et al.*, 1999).

Tabela I. Doenças hereditárias humanas associadas com defeitos no reparo do DNA e predisposição ao câncer.

Doença	Características clínicas	Características celulares	Gene clonado	Localização cromossômica
Ataxia telangiectasia (AT)	Telangiectasia; Ataxia cerebelar; Imunodeficiência; Anormalidades neurológicas; Predisposição elevada a vários tipos de câncer, especialmente linfomas;	Hipersensibilidade à radiação ionizante e às drogas radiomiméticas; Rearranjos cromossômicos espontâneos; Deficiência no reparo de quebras na fita do DNA.	ATM	11q22
Anemia de Fanconi (FA)	Hipofunção da medula óssea Defeitos anatômicos Alta incidência de leucemia Risco elevado no desenvolvimento de tumores não-hematológicos.	Hipersensibilidade aos agentes alquilantes; Rearranjos cromossômicos espontâneos; Alta atividade recombinacional; Cinco grupos de complementação (A-E); Deficiência no reparo <i>crosslink</i>	FAA FAC	16q24.3 9q22.3
Síndrome de Bloom (BS)	Fotossensibilidade; Imunodeficiência; Alta incidência de tumores sólidos	Rearranjos cromossômicos espontâneos; Crescimento baixo em cultura Replicação do DNA afetada; Parece haver uma deficiência na ligase I.	BLM	15q26.1
Xeroderma pigmentoso (XP)	Fotossensibilidade; Anormalidades neurológicas; Alta incidência de câncer de pele.	Hipersensibilidade à luz UV e a alguns agentes químicos; Oito grupos de complementação (XPA-XPG); Defeito no reparo por excisão.	XPA XPB XPC XPD XPG	9q34.1 2q21 3q25 19q13.2 13q32

Referência: FEARON, 1997; SANKARANARAYANAN & CHAKRABORTY, 1995

1.3 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama tem sido alvo de atenção em todo o mundo, por ser uma das doenças mais comuns que afetam as mulheres. Nos Estados Unidos, a sociedade Americana de Cancerologia indica que uma em cada 10 mulheres tem a probabilidade de desenvolver câncer de mama durante a sua vida (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 1998).

No Brasil, o câncer de mama é o tumor maligno mais incidente e o que mais causa óbito em mulheres. Foi estimado para o ano de 1999, 31.200 novos casos e 7.300 óbitos (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 1999).

Embora seja uma das doenças mais freqüentes em mulheres, o homem também pode vir a desenvolver câncer de mama, numa proporção de 1 para 100 casos femininos (DICKSON & LIPPMAN, 1995).

Com relação aos padrões histológicos dos cânceres de mama, cerca de 80% são carcinomas ductais e 10% são carcinomas lobulares; os 10% restantes apresentam características variadas, como o tipo medular e os tumores raros como os cisto-sarcoma filóide e os angiosarcoma. O carcinoma ductal *in situ* e o carcinoma lobular *in situ* estão associados a um maior risco de desenvolver câncer de mama invasivo (HENDERSON *et al.*, 1996).

Além disso, o câncer de mama varia quanto as características histopatológicas, podendo ser classificado em estádios de I a IV, dependendo do tamanho e características do tumor, bem como comprometimento dos gânglios

linfáticos axilares. De uma forma geral, os estádios I e II são caracterizados por carcinomas *in situ* e se diferenciam em graus I ou II de acordo com o tamanho do tumor e com certas características como o padrão de crescimento: se é mais rápido, desordenado ou infiltrativo. No estágio III o tumor apresenta características invasivas e ocorre o comprometimento dos gânglios linfáticos axilares e no estágio IV, o tumor se metastatiza e se desenvolve para outras partes do corpo: os ossos, o fígado, o pulmão e o cérebro são os principais órgãos que podem apresentar metástases de câncer de mama. O prognóstico do câncer de mama e a sua resposta às terapias depende dessas características clínicas (HENDERSON *et al.*, 1996).

A etiologia do câncer de mama é multifatorial, envolvendo diversos fatores de risco como, ambientais, hormonais e hereditários (história familiar e fatores genéticos).

Entre os fatores ambientais, numerosos estudos mostram uma íntima relação entre exposição à radiação e a incidência de câncer mamário (VAN BEKKUM & BROERSE, 1991; BOICE *et al.*, 1991; HOFFMAN *et al.*, 1989). Segundo estimativas, no Japão a incidência de câncer de mama que era extremamente baixa, elevou-se radicalmente após a exposição da população a bomba atômica nas cidades de Hiroshima e Nagasaki, indicando que a radiação foi a maior causa na indução desse tipo de câncer nas mulheres japonesas (THOMPSON *et al.*, 1994).

Segundo HELZLSOUER (1995), exposição à radiação ionizante em indivíduos com idade pré-pubescente e pubescente é claramente um fator de risco.

Com relação aos fatores hormonais, menarca precoce (primeira menstruação antes dos 11 anos de idade), menopausa tardia (última menstruação após os 55 anos) e a primeira gravidez tardia (após os 30 anos), são considerados os três maiores fatores de riscos para o desenvolvimento do câncer de mama, provavelmente devido ao estímulo hormonal no tecido mamário, uma vez que a regulação do desenvolvimento normal da mama depende da ação de certos hormônios sexuais femininos como estrogênio e progesterona (PIKE *et al.*, 1983).

Outro fator importante é com relação a idade, quanto maior a idade maior o risco. A maioria dos casos ocorrem acima dos 50 anos. O câncer de mama tem sido subdividido em dois tipos, precoce e tardio, uma divisão que é baseada na incidência idade-específica em torno dos 50 anos (MIKI *et al.*, 1994).

Contudo, o fator mais consistente associado com o risco de mulheres ao desenvolvimento de câncer de mama é a história familiar da doença. A maior parte dos cânceres de mama são considerados esporádicos (mutações em células somáticas), cerca de 10% a 20% são familiares e aproximadamente 5% são genéticos (ambos com mutações germinativas) (HENDERSON *et al.*, 1996).

O câncer de mama hereditário com forte componente genético, é caracterizado por uma incidência muito alta ocorrendo em vários membros da

família em 3 ou mais gerações, geralmente se manifestando precocemente. Além disso, em muitos casos ocorre desenvolvimento de múltiplos tumores primários, enquanto no câncer esporádico a ocorrência de mais de um tumor primário é rara (THOMPSON *et al.*, 1993). Entre as síndromes hereditárias descritas com forte componente genético destaca-se a síndrome de Li-Fraumeni ligada ao gene supressor tumoral p53 (HOLLSTEIN *et al.*, 1991).

Câncer familiar é caracterizado por uma incidência alta nos parentes do indivíduo afetado e tendem a ser específicos em termos do local, tecido envolvido e características histológicas do tumor, geralmente o tumor se manifesta precocemente (THOMPSON *et al.*, 1993). No caso do câncer de mama familiar também pode ocorrer casos de bilateralidade do tumor de mama ou ovário (DICKSON & LIPPMAN, 1995).

História familiar de câncer de mama é associada com um aumento na suscetibilidade ao câncer de mama em indivíduos com um ou mais parentes de primeiro grau (pais, irmãos e filhos) com câncer de mama; ou ainda em indivíduos com dois ou mais parentes de segundo grau (avós, tios, sobrinhos, netos) com câncer de mama ou ovário, sendo pelo menos um com câncer de mama (PARSHAD *et al.*, 1996).

Estudos moleculares apontam a existência de vários genes ligados a suscetibilidade ao câncer de mama como os genes p53 e AT. As mutações no gene p53 são verificadas em cerca de 20% dos casos, e em cerca de 7% no caso do AT mutado (ATM), onde o risco para câncer de mama chega a ser cinco

vezes maior nos indivíduos heterozigotos para o gene ATM do que nos indivíduos não portadores (SWIFT 1994; SCHMUTZLER *et al.*, 1997).

Entretanto, os casos de câncer de mama ligados a esses genes são de riscos moderados ou baixos. A maioria dos casos envolve dois genes supressores tumorais que foram identificados como BRCA1 e BRCA2 (WOOSTER *et al.*, 1994).

De todos os genes identificados até agora, o BRCA1 e o BRCA2 são os mais importantes. Mutações em BRCA1 estão ligadas ao risco de aproximadamente 85% de desenvolvimento do câncer de mama e 50% de risco no desenvolvimento do câncer ovariano. Em BRCA2 o risco para câncer de mama é similar mas o risco para câncer de ovário é de aproximadamente 10%. No entanto, BRCA2 parece estar associado com um risco aumentado de câncer de mama nos homens (GARVIN *et al.*, 1997; HALL *et al.*, 1990).

Estudos de ligação utilizando famílias com incidência alta de câncer de mama, permitiram a localização, inicialmente do gene BRCA1 no cromossomo 17q21. Posteriormente, com o seqüenciamento do gene, identificou-se uma região codificante com 22 exons, distribuídos num trecho de aproximadamente 100 kb de DNA genômico, com um transcrito de 7.8 Kb. O gene codifica uma proteína com 1863 aminoácidos. As mutações até agora detectadas envolvendo BRCA1 incluem deleções, inserções, “*missense*” e “*nonsense*”, que resulta em uma proteína truncada interrompendo sua função (HALL *et al.*, 1990; MIKI *et al.*, 1994).

O gene BRCA2 está localizado no cromossomo 13q12, contém 27 exons codificantes com um transcrito de 10.5 kb e codifica uma proteína com 3418 aminoácidos (VENKITARAMAN, 1999).

As funções dos produtos protéicos BRCA1 e BRCA2 são pouco elucidadas. Entretanto, existem evidências da participação de ambos os genes no monitoramento e/ou reparo das lesões do DNA (BRUGAROLAS & JACKS, 1997).

A grande maioria dos casos de câncer de mama, são provavelmente induzidos por novas mutações nos genes por fatores ambientais e não herdados dos pais.

A compreensão da função exata do BRCA1 e do BRCA2 fornecerá uma base para o diagnóstico precoce e a prevenção nas mulheres portadoras de uma predisposição ao câncer de mama. Contudo mutações nesses genes, transmitidas ou adquiridas não se traduzem de forma imediata no desenvolvimento do câncer, sendo necessária a interação com outros fatores de riscos como hormonais, nutricionais, exposição aos agentes químicos, físicos etc.

Alguns estudos têm mostrado uma redução na capacidade de reparo do dano ao DNA induzido por diferentes genotóxicos, em células de indivíduos com câncer de mama.

PARSHAD e col. (1996), analisaram a frequência de quebras cromatídicas em linfócitos sanguíneos de pacientes com câncer de mama esporádico e familiar, cerca de 2 horas após a exposição *in vitro* com Raio-X.

Os autores encontraram uma frequência de quebras cromatídicas 2 a 3 vezes maior nas células das pacientes em comparação às células de doadores sadios com nenhuma história familiar de câncer de mama e concluíram que essas pacientes apresentam uma deficiência no processamento de danos ao DNA induzido por Raio-X. Resultados similares foram obtidos por HELZLSOUER e col. (1995).

JALOSZYNSKI e col. (1997), avaliaram a eficiência de reparo do dano no DNA induzido por bleomicina (um agente radiomimético) em linfócitos do sangue periférico de indivíduos sadios e de pacientes com câncer de mama, utilizando como metodologia o ensaio do cometa e encontraram uma diferença na capacidade de reparo; as pacientes com câncer de mama mostraram um reparo menos eficiente ao dano induzido por bleomicina.

Experimentos com mutagênicos podem fornecer uma estimativa da capacidade individual de reparo do DNA, pois quanto maior a quantidade de dano induzido não-reparado, mais deficientes são os mecanismos de reparo. Reparo menos eficiente pode ser um fator de predisposição ao câncer de mama (PARSHAD *et al.*, 1996, JALOSZYNSKI *et al.*, 1997)

1.4 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A TÉCNICA DO COMETA

Tecnicamente, uma variedade de metodologias citogenéticas e bioquímicas vem sendo aplicadas com o intuito de avaliar o dano ocorrido ao DNA e a capacidade de reparo dos indivíduos. Entre os métodos citogenéticos pode-se ressaltar a análise de aberrações cromossômicas (MOORHEAD *et al.*, 1960), trocas entre cromátides-irmãs (LATT, 1973), a técnica do micronúcleo (FENECH & MORLEY, 1985) e a técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (PINKEL *et al.*, 1986).

Dentre os métodos bioquímicos empregados para medir as quebras nas fitas do DNA induzidas pela radiação incluem-se gradientes alcalinos de sacarose, eluição alcalina ou neutra, eletroforese alcalina em gel, sedimentação de nucleóide e medidas viscoelásticas de DNA (Mc KELVEY-MARTIN *et al.*, 1993; FAIRBAIRN *et al.*, 1995). Porém, todas essas técnicas, freqüentemente, requerem uma quantidade razoável de células e/ou radiomarcagem do DNA.

O teste do Cometa (“single-cell gel electrophoresis”), também chamado de eletroforese de microgel foi primeiramente introduzido por ÖSTLING & JOHANSON (1984), como uma técnica microeletroforética para a direta visualização do dano no DNA em células individuais.

No entanto, as condições neutras originalmente utilizadas por estes autores para lise e eletroforese de células, permitem a detecção somente de quebras nas fitas duplas e não nas fitas simples do DNA.

Mais recentemente, SINGH e col. (1988) descreveram uma técnica de eletroforese alcalina que possibilita a detecção de quebras ocorridas tanto nas fitas simples como na fita dupla e também de sítios álcali lábeis (sítios apurínicos e apirimídínicos) que são convertidos em quebras nas fitas simples sob o tratamento alcalino.

Uma vez que a radiação ionizante produz danos de bases álcali lábeis e quebras nas fitas simples em frequências mais altas que quebras nas fitas duplas (POWELL & MCMILLAN, 1990), as condições alcalinas são consideradas mais sensíveis que as neutras, na detecção de lesões primárias radioinduzidas.

O teste do Cometa se baseia, fundamentalmente, no princípio de que o DNA nuclear de mamíferos está organizado em unidades muito compactas, ligadas à membrana do núcleo ou na matriz nuclear. Estima-se que as moléculas de DNA de células eucarióticas (50-100 cm de comprimento) estão condensadas 10^5 vezes para serem empacotadas dentro de um núcleo de 5-10 μm de diâmetro (McKELVEY-MARTIN *et al.*, 1993).

Assim sendo, quebras nas fitas do DNA ocasionariam efeitos drásticos na estrutura altamente organizada da cromatina, causando um relaxamento. O filamento de DNA danificado se apresentaria menos compacto e migraria do “núcleo” em direção ao ânodo quando submetido a um campo elétrico, apresentando a aparência de um cometa, enquanto que o DNA não danificado permaneceria dentro do “núcleo” (ÖSTLING & JOHANSON, 1987).

Admite-se que o estiramento e a migração de fitas isoladas explicaria o padrão de migração do DNA observado no teste do cometa (FAIRBAIRN *et al.*, 1995).

Dependendo da quantidade de dano no DNA, “cometas” são observados após eletroforese, corados com um agente fluorescente. A extensão da migração do DNA é diretamente relacionada com a intensidade de dano ocorrido ao DNA.

No ensaio do cometa, a avaliação quantitativa do dano ao DNA pode ser realizada de várias maneiras: por meio de métodos manuais ou por analisador de imagens.

Diferentes maneiras de análise manual tem sido reportados. Vários autores utilizam o comprimento total ou comprimento da cauda do cometa, através de imagens fotografadas ou diretamente através de uma escala calibrada na ocular do microscópio (VIJAYALAXMI *et al.*, 1993; HARTMANN & SPEIT, 1995; MALCOLMSON *et al.*, 1995; McCURDY *et al.*, 1997; VISVARDIS *et al.*, 1997). Outro método manual bastante utilizado é o da classificação visual, onde os cometas são contados e classificados em categorias de acordo com a quantidade de dano (GEDIK *et al.*, 1992; COLLINS *et al.*, 1995; VISVARDIS *et al.*, 1997; JALOSZYNSKI *et al.*, 1997).

O sistema de análise da imagem por computador, avalia parâmetros como a percentagem de DNA presente na cabeça e na cauda do cometa, área do cometa, além das medidas do comprimento da cauda e do comprimento total do

cometa e, momento da cauda (“tail moment”). O momento da cauda é um dos parâmetros mais utilizados: segundo o programa de análise de imagem “Comet Assay II” (PERCEPTIVE INSTRUMENTS), o momento da cauda é considerado como a percentagem de DNA na cauda do cometa multiplicado pelo seu comprimento (KREJA *et al.*, 1996a; McCARTHY *et al.*, 1997; HARTMANN *et al.*, 1998); pelo programa “Casys” (SYNOPTICS) é o produto da intensidade total pela distância entre o centro óptico da massa da cauda e o centro da cabeça (ANDREOLI *et al.*, 1999).

O método do cometa tem recebido uma grande aceitação por vários pesquisadores, por apresentar uma série de características vantajosas. A principal delas é a possibilidade de analisar diretamente o dano ao DNA em nível de célula individual, oferecendo a oportunidade de estudar diferentes sub-populações de células com diferentes susceptibilidades ao dano genético (OLIVE *et al.*, 1990; McKELVEY-MARTIN *et al.*, 1993; FAIRBAIRN *et al.*, 1995).

É um método relativamente fácil e sensível que permite detectar a extensão do dano ao DNA induzido por radiação de baixa LET, da ordem de 0,05 Gy (VIJAYALAXMI *et al.*, 1992).

Outras vantagens intrínsecas do teste do cometa são: requer uma quantidade muito pequena de células (~ 5 µl de amostra); relativa facilidade na obtenção de dados e não requer proliferação celular. Além disso, o teste pode ser aplicado em qualquer tipo de células de mamíferos com resultados

promissores, por exemplo, em células sanguíneas (VIJAYALAXMI *et al.*, 1993), fibroblastos (ARLETT *et al.*, 1993), espermátocitos (SINGH *et al.*, 1989), células tumorais (MÜLLER *et al.*, 1994) e em células de cultura (OLIVE & BANÁTH, 1993).

Essas características permitem o amplo uso da técnica do cometa em estudos de mecanismos básicos de danos do DNA e reparo, de dano oxidativo, em genética toxicológica e em biomonitoramento (OLIVE & BANÁTH, 1993; SINGH *et al.*, 1990; ANDERSON *et al.*, 1994; HARTMANN & SPEIT, 1995).

Em virtude destas características vantajosas, a aplicação da técnica de eletroforese alcalina em dosimetria biológica, será de grande valia como um adjunto às técnicas convencionais de aberrações cromossômicas e micronúcleos. No entanto não há relatos na literatura que associam a construção de curva dose-resposta para migração do DNA mediante técnica do cometa para o enfoque dosimétrico.

2. OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo principal analisar o dano induzido ao DNA e a capacidade de reparo de indivíduos sadios e de pacientes com câncer de mama, por meio do ensaio do cometa, em células sanguíneas irradiadas com ^{60}Co e processadas imediatamente, 3 e 24 horas após as exposições.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. MATERIAL

Foram utilizadas amostras sanguíneas de três doadores sadios e de três pacientes com câncer de mama. As amostras sanguíneas de pacientes com câncer de mama foram obtidas no “Instituto de Radioterapia de São Paulo”, mediante autorização por escrito. Este trabalho constituiu parte de um projeto que foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares sob nº 006/CEP-IPEN/SP em 12 de novembro de 1998.

3.1.1. INDIVÍDUOS SADIOS

O grupo de doadores sadios foi composto por indivíduos não-fumantes, que não estavam consumindo álcool ou qualquer medicamento e não apresentavam sintomas de quaisquer doenças no momento da coleta do sangue, além de não apresentar casos de câncer na família: doador A (sexo feminino, 49 anos), doador B (sexo feminino, 40 anos) e doador C (sexo masculino, 45 anos).

3.1.2. PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA

O grupo foi constituído por pacientes com câncer de mama do tipo ductal que se encontravam em um estágio primário da doença (grau I ou II) não apresentando, portanto, metástases. Todas as pacientes se encontravam na fase de pós-menopausa, eram mastectomizadas e não haviam sofrido qualquer tipo de tratamento quimio ou radioterápico: paciente D (47 anos), paciente E (72 anos) e paciente F (65 anos). As pacientes D e F apresentavam casos de câncer na família: paciente D – um tio com câncer de intestino, uma tia com câncer de mama e um irmão com câncer de pele; paciente F – um irmão com câncer de próstata e uma filha com câncer de ovário. A paciente E não apresentava casos de câncer na família.

Todos os doadores sadios e com câncer de mama foram submetidos a um questionário para a obtenção de informações adicionais relacionadas com o estilo de vida, por exemplo, hábitos alimentares, história médica e exposição aos agentes químicos e à radiação ionizante.

3.2. MÉTODO

3.2.1. COLETA

Cerca de 5 mL de sangue foram coletados de cada doador por punção venosa, em seringa previamente heparinizada.

3.2.2. IRRADIAÇÃO

As amostras sangüíneas foram fracionadas em “eppendorf” e irradiadas nas fontes de ^{60}Co , tipo panorâmico (Yoshizawa Kiko Company - LTD) e GammaCell 220 (“Irradiation Unit” da Comissão de Energia Nuclear do Canadá), nas doses de 0,2; 0,6; 1,0; 2,0; 4,0 e 10,0 Gy (0,722 Gy/min.), na presença de oxigênio e à temperatura ambiente, sendo que uma das amostras foi mantida como controle (amostra não-irradiada).

3.2.3. ENSAIO DO COMETA

Foi utilizado o método de eletroforese alcalina descrita por SINGH e col. (1988) com algumas modificações.

Para avaliar o dano inicial logo após as irradiações, as amostras sangüíneas foram conservadas em gelo para impedir o reparo do dano radioinduzido (tempo 0 de incubação).

Para o estudo do reparo após as irradiações, as amostras sanguíneas foram incubadas em uma estufa a 37⁰C por 3 e 24 horas. Esses tempos foram escolhidos com base nos dados da literatura sobre a cinética de reparo de dano induzido pela radiação de baixa transferência linear de energia (LET) em linfócitos do sangue periférico, que abrangeu intervalo de tempo desde alguns minutos até 30 - 40 horas (SINGH *et al.*, 1988; 1990; PRICE, 1993; TICE, 1995).

Para cada dose de radiação, lâminas histológicas inteiramente foscas (em duplicata) foram cobertas com 300 µl de agarose “normal melting” SIGMA (0,7% em tampão PBS livre de Ca²⁺ e Mg²⁺, a 65⁰C) e mantidas a 4⁰C por cerca de 15 minutos para solidificação do gel. A seguir, foi adicionada sobre esta camada 5µl da amostra sanguínea suspensos em 90 µl de agarose “low melting” SIGMA (0,5 % em tampão PBS livre de Ca²⁺ e Mg²⁺, a 37⁰C). Após a solidificação da camada a 4⁰C acrescentou-se mais 90 µl de agarose “low melting”.

Em seguida 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 sódio pH 10, 1% de Triton X-100, 10% DMSO) por 2 horas a 4⁰C para remoção de proteínas.

Após a lise, as lâminas foram colocadas lado a lado em uma cuba de acrílico para eletroforese horizontal (17x20cm PERMATRON) e imersas em tampão alcalino de eletroforese, pH > 12 (1 mM de EDTA pH 10, 300 mM de NaOH) por 30 minutos, para que ocorra a expressão de danos ao DNA e,

posteriormente foram submetidas a corrida eletroforética (25V; 300mA - PHARMACIA) por 30 minutos a 4°C.

A seguir, as lâminas foram neutralizadas três vezes por 5 minutos cada com tampão Tris (0,4 M; pH 7,5), coradas com 50 µl de brometo de etídio SIGMA (20 µg/ml), cobertas com lamínulas e mantidas em uma câmara úmida protegida da luz.

Todas as etapas após a lise foram conduzidas sem iluminação artificial, para impedir qualquer indução de dano adicional ao DNA.

3.2.4. ANÁLISE DAS LÂMINAS

As lâminas foram examinadas num microscópio de fluorescência (CARL ZEISS), no aumento de 200x, equipado com filtro de excitação de 515-560 nm e um filtro de barreira de 590 nm.

Foram analisados cerca de 50 a 70 cometas escolhidos ao acaso para cada dose de radiação. Todas as imagens resultantes (“cometas”) foram fotografadas usando filme KODAK T-MAX ASA 400, preto e branco.

3.2.5. AVALIAÇÃO DO DANO E REPARO

A avaliação do dano radioinduzido foi realizada de duas maneiras:

Pelo comprimento do cometa - A análise foi feita no próprio negativo, projetando as imagens dos cometas por meio de um projetor de slides (ZOOM CABIN 55~80 mm). O dano ao DNA foi quantificado para cada célula individualmente, medindo-se o comprimento do cometa (cabeça e cauda) em μm , de acordo com o critério adotado por McKELVEY-MARTIN e col. (1993) e VIJAYALAXMI e col. (1992; 1993).

Pela categoria de dano - A análise se baseou no aspecto visual dos cometas, agrupando-os em 5 classes (0, I, II, III, IV) pré-definidas de acordo com os critérios estabelecidos por ANDERSON e col. (1994); VISVARDIS e col. (1997), levando-se em consideração a quantidade de DNA na cauda do cometa, intensidade de fluorescência, comprimento da cauda e diâmetro da cabeça (Figura 2). Os cometas com cabeças brilhantes e sem caudas aparentes foram identificados como sendo classe-0 (células sem migração do DNA – figura 1a), cometas com cabeças muito pequenas e com caudas longas e difusas foram classificados como sendo classe-IV (células muito danificadas – figura 1e). Cometas com características intermediárias foram divididos e classificados como sendo das classes-I, II e III (figura 1b, c, d).

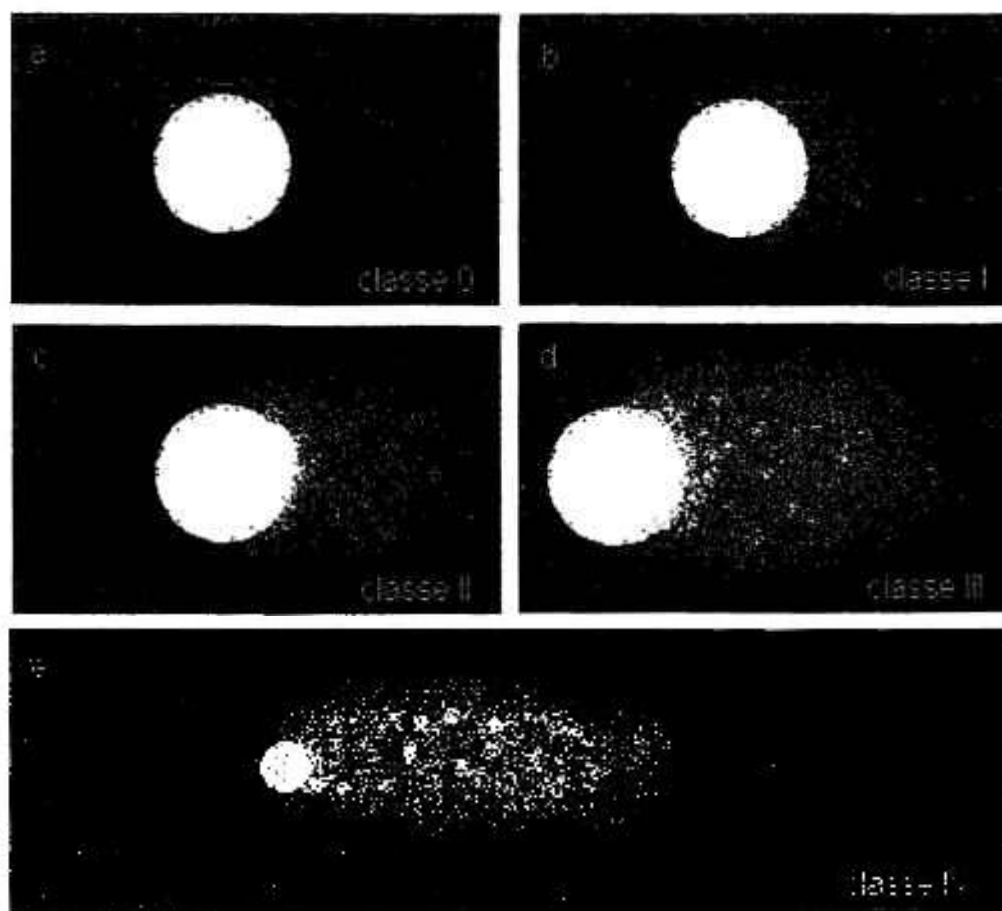


Figura 2. Desenho esquemático da classificação visual dos cometas por categoria de dano a) célula não danificada; b) célula com pouco dano; c) e d) células com muito dano; e) célula extremamente danificadas.

A estimativa quantitativa do dano ao DNA (DD) foi feita segundo a equação adotada por JALOSZYNSKI e col. (1997),

$$DD = (nI + 2nII + 3nIII + 4nIV) / (\Sigma / 100)$$

onde: nI - nIV = números de cometas nas categorias de I a IV

Σ = soma de todos os cometas contados (incluindo a categoria 0).

O valor DD foi expresso em unidade arbitrária (ua).

Assim sendo, os valores de DD abrangeram intervalos de 0 até 400 ua, isto é, desde situações onde todas as células se mostraram sem dano até aquelas onde todas se apresentaram extremamente danificadas.

Para a avaliação da capacidade de reparo do dano radioinduzido, 3 e 24 horas após as exposições nos dois grupos estudados, foi utilizada a seguinte fórmula (JALOSZYNSKI *et al.*, 1997):

$$R = [DD \text{ logo após} - DD \text{ após 3 ou 24 horas}] / [DD \text{ logo após} - DD0] \times 100\%$$

DD0 = dano ao DNA observado em amostras não irradiadas.

3.2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as comparações do dano radioinduzido ao DNA e da capacidade de reparo 3 e 24 horas após as irradiações entre os grupos, sadios (A, B, C) e pacientes com câncer de mama (D, E, F), foi utilizado o teste não paramétrico, análise de variância fator duplo (“two-way ANOVA”).

As curvas dose-resposta obtidas para a migração do DNA em células sangüíneas dos dois grupos de doadores estudados foram ajustadas de acordo com o modelo de regressão não-linear (“one phase exponential decay”) segundo a equação:

$$y = A \cdot e^{(-K \cdot D)} + B \quad \text{onde:}$$

y = comprimento da cauda do cometa (μm) ou dano no DNA (unidade arbitrária);

A, B, K = constantes do modelo;

D = dose em Gy.

As análises de variância e os ajustes das curvas foram feitas no programa de computador “*Graph-Pad Prisma*”.

4. RESULTADOS

Nesse estudo o dano radioinduzido em células sanguíneas de indivíduos sadios e de pacientes com câncer foi avaliado pela técnica de eletroforese alcalina de microgel. Células não irradiadas, processadas eletroforeticamente, mostraram uma matriz nuclear com um halo fluorescente, constituída pelo filamento de DNA que permaneceu confinado na área originalmente delimitada pelo núcleo da célula (nucleóide). O diâmetro médio do nucleóide foi cerca de 28,0 – 29,5 μm . Por outro lado, células irradiadas com várias doses de ^{60}Co mostraram um aspecto similar ao do cometa, composto de cabeça e cauda de diferentes comprimentos que variaram em função da dose de radiação.

A figura 3 apresenta fotomicrografias de cometas obtidos de amostras sanguíneas irradiadas e não-irradiadas, processadas pelo método da eletroforese de microgel.

4.1. AVALIAÇÃO DE CÉLULAS SANGÜÍNEAS NÃO IRRADIADAS

As amostras sanguíneas não irradiadas de doadores sadios e de pacientes com câncer de mama foram analisadas por meio das medidas dos cometas (comprimento da cauda) e pelos valores de dano ao DNA (DD_0), nos diferentes tempos após as irradiações (Tabela II).

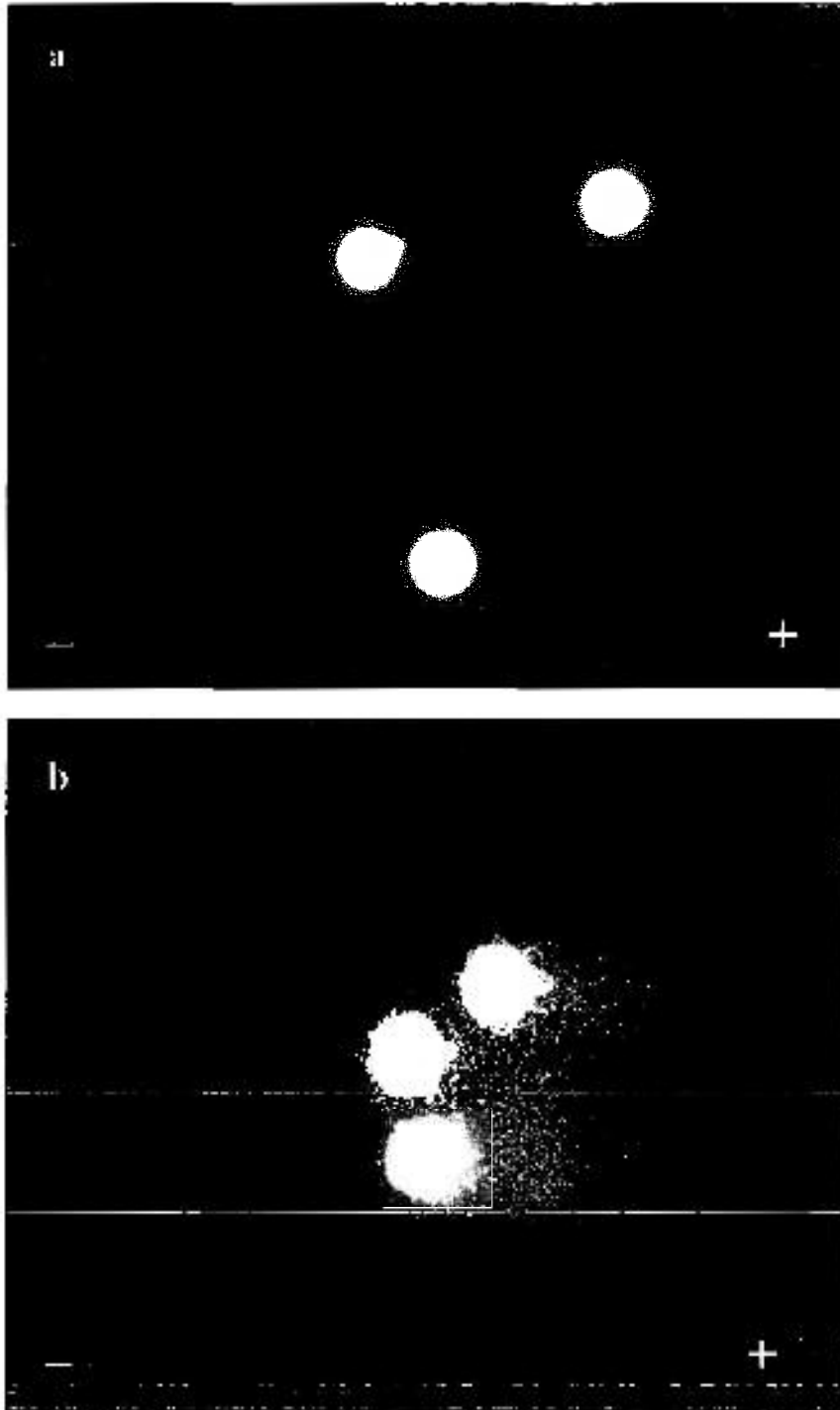


Figura 3. Fotomicrografias de células sangüíneas (a) não irradiadas, sem migração do DNA e (b) irradiadas com 4 Gy, mostrando a migração do DNA em sentido ao ânodo.

Tabela II: Média dos valores basais obtida de amostras sanguíneas de doadores sadios e de pacientes com câncer de mama com respectivos desvios padrões.

Grupo	Tempo	Comprimento da cauda (μm)	% de células com dano	Dano ao DNA (ua)	% de células com dano
Doadores sadios	Logo após	1,14 \pm 0,18	10,7	13,33 \pm 3,0	12,5
	3 horas	1,31 \pm 0,90	7,0	10,00 \pm 3,4	9,3
	24 horas	1,21 \pm 0,98	7,3	12,67 \pm 4,1	10,0
Pacientes com câncer de mama	Logo após	2,06 \pm 0,32	7,6	15,85 \pm 3,0	14,6
	3 horas	2,39 \pm 2,38	5,9	14,04 \pm 2,6	13,0
	24 horas	4,00 \pm 1,14	13,1	14,93 \pm 7,8	11,7

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa nos valores basais entre os dois grupos ($p=0,1728$) quando se levou em consideração a classificação visual do cometa, embora houvesse uma tendência a ser maior no grupo de pacientes com câncer. Já pelo comprimento da cauda, a diferença foi significativa entre os doadores sadios e as pacientes com câncer ($p=0,0167$).

Com relação ao tempo de incubação das amostras sanguíneas, os valores basais não diferiram entre os diferentes tempos utilizados, analisados pelas duas metodologias ($p=0,5752$ e $p=0,3614$).

4.2. AVALIAÇÃO DO DANO PELA MEDIÇÃO DO COMETA

Os dados referentes aos efeitos da radiação γ de ^{60}Co em leucócitos sanguíneos de doadores sadios (A, B, C) e de pacientes com câncer de mama (D, E, F) analisados nos diferentes tempos após as irradiações estão apresentados nas tabelas III e IV, respectivamente.

Nos dois grupos, tanto o comprimento total do cometa como o comprimento da cauda aumentaram em função da dose de radiação, sendo este aumento menos pronunciado nas amostras analisadas 24 horas após as exposições. Quanto ao diâmetro da cabeça do cometa houve uma tendência a diminuir com o aumento da dose de radiação.

No grupo de doadores sadios, a média do comprimento total dos cometas obtida logo após as irradiações com 10 Gy foi cerca de 3,7 vezes maior (112 μm) em relação ao controle não irradiado (30,16 μm), enquanto que aquelas obtidas 3 e 24 horas após foram 2 vezes maiores (Tabela III). No grupo de pacientes (Tabela IV), as médias obtidas com 10 Gy nos diferentes tempos após as exposições foram cerca de 3,5; 2,7 e 1,9 vezes maiores para amostras analisadas logo após, 3 e 24 horas, respectivamente, em relação às células não irradiadas.

Tabela III. Média dos valores obtidos de 3 doadores sadios com respectivos desvios padrões (DP) em amostras sanguíneas processadas logo após, 3 e 24 horas após as irradiações com ^{60}Co .

Logo após						
Dose (Gy)	N ^o médio de células contadas	Comprimento total (μm)	Comprimento da cabeça (μm)	Comprimento da cauda (μm) *	N ^o de células sem cauda (%)	N ^o de células com cauda (%)
0	56	30,16	29,02	1,14 \pm 0,18	50 (89,3)	6 (10,7)
0,2	63	46,14	28,67	17,47 \pm 6,58	18 (28,6)	45 (71,4)
0,6	54	54,84	28,10	26,74 \pm 14,89	11 (20,4)	43 (79,6)
1,0	51	65,54	29,16	36,38 \pm 10,10	7 (13,7)	44 (86,3)
2,0	54	72,10	28,74	43,35 \pm 7,40	1 (1,8)	53 (98,1)
4,0	59	104,40	27,75	76,65 \pm 19,41	0	59 (100)
10,0	60	112,00	22,36	89,64 \pm 10,01	0	60 (100)
3 horas						
Dose (Gy)	N ^o médio de células contadas	Comprimento total (μm)	Comprimento da cabeça (μm)	Comprimento da cauda (μm) *	N ^o de células sem cauda (%)	N ^o de células com cauda (%)
0	57	31,49	30,17	1,31 \pm 0,90	53 (93,0)	4 (7,0)
0,2	67	32,34	29,58	2,77 \pm 1,09	57 (85,0)	10 (15,0)
0,6	65	35,46	30,34	5,12 \pm 1,60	48 (73,8)	17 (26,1)
1,0	60	35,19	30,04	5,15 \pm 1,08	41 (68,3)	19 (31,7)
2,0	71	41,23	29,43	11,80 \pm 3,20	38 (53,5)	33 (46,5)
4,0	75	44,46	28,04	16,42 \pm 3,55	31 (41,3)	44 (58,7)
10,0	61	64,33	26,85	37,49 \pm 9,16	8 (13,1)	53 (86,9)
24 horas						
Dose (Gy)	N ^o médio de células contadas	Comprimento total (μm)	Comprimento da cabeça (μm)	Comprimento da cauda (μm) *	N ^o de células sem cauda (%)	N ^o de células com cauda (%)
0	55	30,60	29,39	1,21 \pm 0,98	51 (92,7)	4 (7,3)
0,2	65	33,33	28,60	4,73 \pm 3,49	50 (77,0)	15 (23,0)
0,6	57	36,69	27,44	9,25 \pm 2,96	37 (65,0)	20 (35,0)
1,0	51	35,03	27,18	7,85 \pm 2,87	31 (62,0)	19 (48,0)
2,0	66	40,97	27,09	13,88 \pm 0,96	35 (53,0)	31 (47,0)
4,0	69	47,07	26,16	20,91 \pm 2,75	28 (40,6)	41 (59,4)
10,0	62	62,30	25,73	36,57 \pm 3,73	13 (21,0)	49 (79,0)

* comprimento da cauda = comprimento total – comprimento da cabeça

Tabela IV. Média dos valores obtidos de 3 pacientes com câncer de mama com respectivos desvios padrões (DP) em amostras sanguíneas processadas logo após, 3 e 24 horas após as irradiações com ^{60}Co .

Logo após						
Dose (Gy)	N ^o médio de células contadas	Comprimento total (μm)	Comprimento da cabeça (μm)	Comprimento da cauda (μm) *	N ^o de células sem cauda (%)	N ^o de células com cauda (%)
0	66	29,98	27,91	2,06 \pm 0,32	61 (92,4)	5 (7,6)
0,2	56	34,72	27,47	7,25 \pm 2,56	37 (66,1)	19 (33,9)
0,6	64	46,31	26,88	19,43 \pm 3,81	21 (32,8)	43 (67,2)
1,0	60	58,07	25,77	32,29 \pm 2,80	3 (5,0)	57 (95,0)
2,0	62	71,60	25,97	45,63 \pm 3,46	0	62 (100)
4,0	56	91,79	25,18	66,61 \pm 6,00	0	56 (100)
10,0	60	106,54	21,47	85,08 \pm 9,02	0	60 (100)
3 horas						
Dose (Gy)	N ^o médio de células contadas	Comprimento total (μm)	Comprimento da cabeça (μm)	Comprimento da cauda (μm) *	N ^o de células sem cauda (%)	N ^o de células com cauda (%)
0	68	30,28	27,89	2,39 \pm 2,38	64 (94,1)	4 (5,9)
0,2	66	36,32	27,55	8,78 \pm 3,00	43 (65,1)	23 (34,8)
0,6	54	43,50	26,55	16,95 \pm 5,06	26 (48,1)	28 (51,8)
1,0	57	45,36	26,45	18,90 \pm 5,42	31 (54,4)	26 (45,6)
2,0	73	49,71	26,70	23,02 \pm 4,23	29 (39,7)	44 (60,3)
4,0	57	67,28	26,03	41,25 \pm 14,52	12 (21,0)	45 (79,0)
10,0	58	83,36	24,40	58,96 \pm 15,30	3 (5,2)	55 (94,8)
24 horas						
Dose (Gy)	N ^o médio de células contadas	Comprimento total (μm)	Comprimento da cabeça (μm)	Comprimento da cauda (μm) *	N ^o de células sem cauda (%)	N ^o de células com cauda (%)
0	61	32,10	28,10	4,00 \pm 1,14	53 (86,9)	8 (13,1)
0,2	60	33,37	27,79	5,58 \pm 2,04	47 (78,3)	13 (21,7)
0,6	54	37,02	27,01	10,01 \pm 3,26	39 (72,2)	15 (27,8)
1,0	62	42,03	26,94	15,08 \pm 9,82	38 (61,3)	24 (38,7)
2,0	62	45,46	26,40	19,06 \pm 7,49	30 (48,4)	32 (51,6)
4,0	62	52,72	26,30	26,42 \pm 8,85	24 (38,7)	38 (61,3)
10,0	63	60,69	25,20	35,49 \pm 12,66	14 (22,2)	49 (77,8)

* comprimento da cauda = comprimento total – comprimento da cabeça

A figura 4 mostra as curvas dose-resposta para migração de DNA, ajustadas pelo modelo de regressão não linear, segundo a equação

$y = A \cdot e^{(-K \cdot D)} + B$, que foi o modelo que melhor se ajustou aos dados obtidos.

Tanto no grupo de doadores sadios como no de pacientes com câncer de mama, houve um aumento significativo na migração de DNA em função da dose de radiação nos três tempos estudados ($p < 0,0001$).

Pode-se verificar também que os dois grupos de indivíduos mostraram um comportamento similar quando as células foram processadas logo após as exposições.

A análise de variância utilizada para comparar os dados entre pacientes e doadores sadios, mostrou que não houve diferença significativa entre os dois grupos ($p = 0,0902$), quando analisados logo após as irradiações.

A figura 4 (b e c) mostra ainda uma considerável redução do comprimento da cauda do cometa nas amostras de 3 e 24 horas em todas as doses de radiação estudadas, em relação às amostras processadas logo após as exposições, nos dois grupos.

A análise estatística mostrou que houve diferença significativa entre os grupos de doadores sadios e pacientes quando analisados 3 ($p < 0,0001$) e 24 horas ($p = 0,0304$) após as exposições.

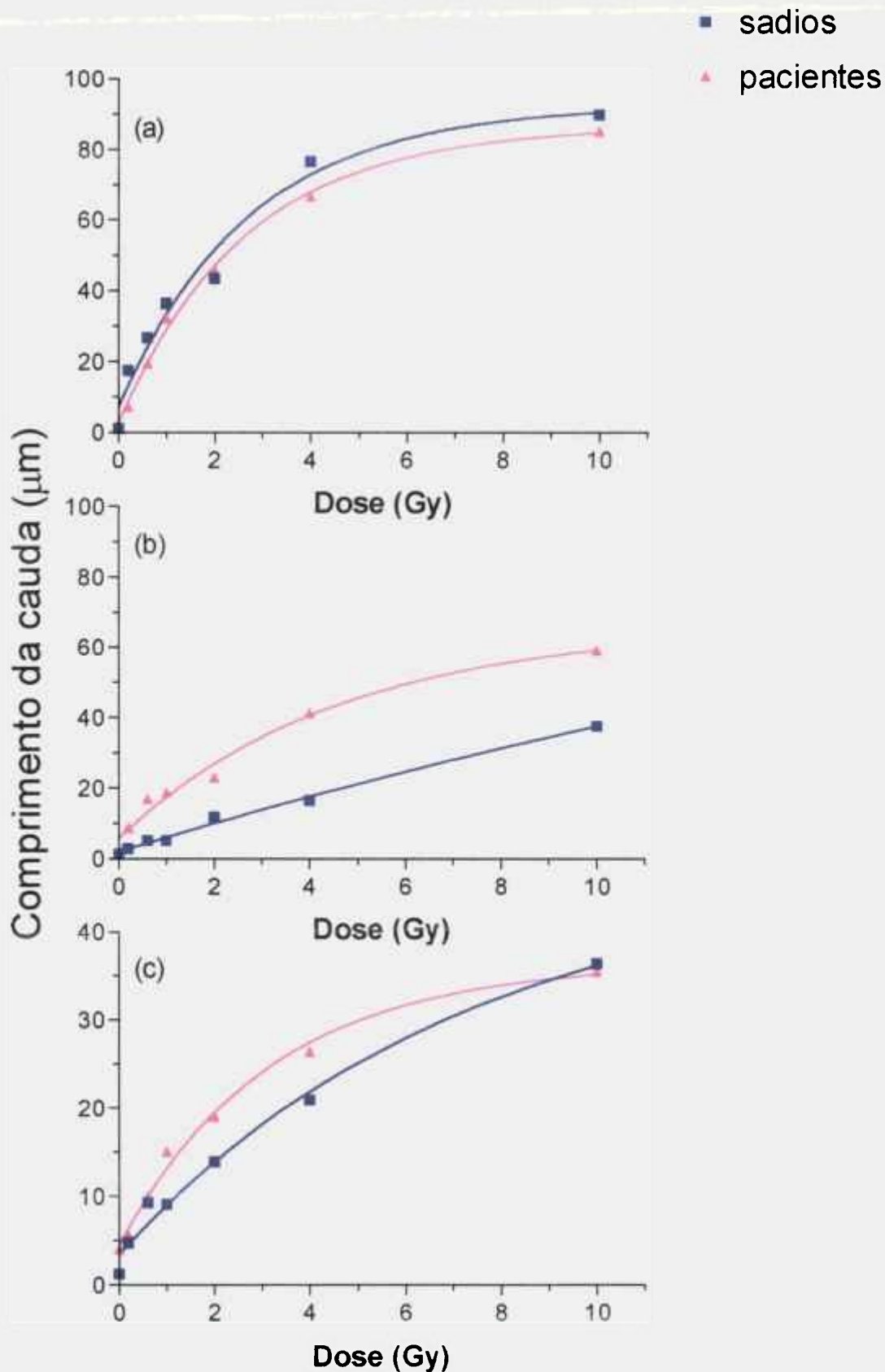


Figura 4. Curvas dose-resposta para migração do DNA em leucócitos sanguíneos de indivíduos sadios e de pacientes com câncer de mama em função do tempo após as irradiações: a) Logo após, b) 3 horas e c) 24 horas após as exposições.

As estimativas dos parâmetros do modelo de regressão não linear, utilizado para o ajuste das curvas e os coeficientes de ajuste do modelo (r^2) para os grupos sadios e pacientes com câncer, encontram-se na tabela V.

Tabela V: Estimativas do modelo dose-resposta para migração de DNA (comprimento da cauda) nos diferentes tempos após as irradiações, para os doadores sadios e pacientes com câncer de mama, por meio do método de regressão não linear

Grupo	Tempo	Parâmetro	Estimativa	Erro padrão	r^2
Sadios	Logo após	A	- 85,53	\pm 8,032	0,8862
		B	92,38	\pm 7,773	
		K	0,3689	\pm 0,09230	
	3 horas	A	-126,4	\pm 171,6	0,9215
		B	128,4	\pm 172,3	
		K	0,03286	\pm 0,05299	
	24 horas	A	- 44,17	\pm 7,339	0,9468
		B	47,51	\pm 7,767	
		K	0,1355	\pm 0,04341	
Pacientes	Logo após	A	- 83,94	\pm 3,255	0,9782
		B	86,34	\pm 3,128	
		K	0,3779	\pm 0,03905	
	3 horas	A	- 60,23	\pm 9,603	0,8493
		B	65,86	\pm 10,30	
		K	0,2159	\pm 0,08385	
	24 horas	A	- 32,07	\pm 5,336	0,7372
		B	36,43	\pm 5,375	
		K	0,3175	\pm 0,1400	

Os coeficientes de ajuste indicam que o modelo se ajustou satisfatoriamente aos dados ($r^2 > 0,7372$) para cada uma das curvas.

4.3. AVALIAÇÃO DO DANO PELA CLASSIFICAÇÃO VISUAL DO COMETA

Os resultados da análise baseada na classificação visual dos cometas estão sumariados nas tabelas VI (doadores sadios - A, B, C) e VII (pacientes com câncer de mama - D, E, F).

Pode-se observar que nas amostras não irradiadas foram encontradas cerca de 86 – 92 % de cometas da classe 0 nos doadores sadios e cerca de 82 – 96 %, nas pacientes com câncer. Cometas de diferentes classes são mostrados na figura 5.

Nas amostras processadas logo após a irradiação, tanto de doadores sadios como de pacientes com câncer, foi verificado um aumento no número de células danificadas (classes I a IV) em função da dose de radiação.

No grupo de doadores sadios (tabela VI), 3 horas após a exposição foi possível observar uma mudança da categoria de cometas, passando para classes com menos dano com o aumento concomitante de células da classe-0 sem dano, em todas as doses de radiação estudadas. Vinte quatro horas após a irradiação, pode-se notar praticamente um padrão similar de classes de cometas observado em amostras de 3 horas.

Em contraste, nos pacientes com câncer de mama (tabela VII), 3 horas após a exposição, pode-se observar que, apesar de ocorrer mudança da categoria de cometas passando para classes com menos dano, a população de células sem dano (classe 0) cresceu vagarosamente em relação aos doadores sadios, principalmente nas doses mais altas (2, 4 e 10 Gy).

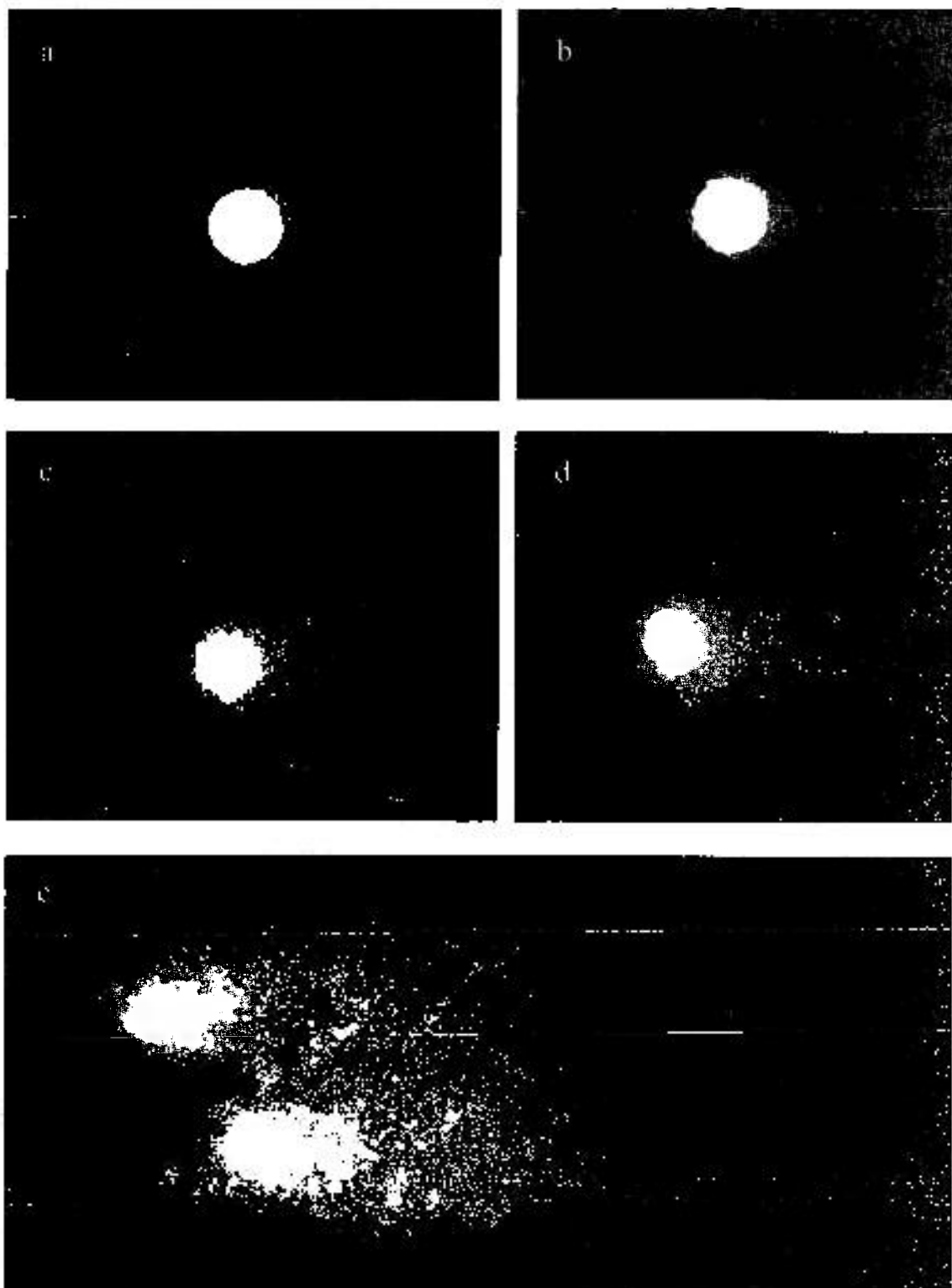


Figura 5. Fotomicrografias de células processadas pelo teste do cometa mostrando diferentes graus de migração do DNA. a) célula sem migração do DNA (classe 0) b) célula com pouca migração do DNA (classe I) c) e d) células com muito dano (classes II e III) e) células extremamente danificadas com intensa migração do DNA (classe IV).

Tabela VI. Resultado da análise pela classificação visual (classes 0, I, II, III, IV) dos leucócitos de doadores sadios processados logo após; 3 e 24 horas após as irradiações com ^{60}Co

Doador A															
Dose (Gy)	Logo após					3 horas					24 horas				
	0	I	II	III	IV	0	I	II	III	IV	0	I	II	III	IV
0	43	7	0	0	0	47	3	0	0	0	45	3	2	0	0
0.2	21	19	11	1	0	43	6	1	0	0	40	10	0	0	0
0.6	0	11	35	6	0	39	8	7	0	0	36	8	7	0	0
1.0	0	2	38	12	0	32	15	5	0	0	32	12	6	0	0
2.0	0	0	29	23	0	26	13	9	2	0	27	12	11	2	0
4.0	0	0	2	41	8	22	5	20	5	0	26	10	6	8	0
10.0	0	0	0	17	35	2	0	24	27	0	8	0	14	27	2

Doador B															
Dose (Gy)	Logo após					3 horas					24 horas				
	0	I	II	III	IV	0	I	II	III	IV	0	I	II	III	IV
0	45	5	0	0	0	44	6	0	0	0	42	4	2	0	0
0.2	15	16	21	0	0	38	9	3	0	0	30	15	5	0	0
0.6	2	14	34	2	0	26	12	11	1	0	29	10	8	3	0
1.0	0	0	32	20	0	31	15	4	0	0	28	10	10	2	0
2.0	0	0	41	11	0	23	12	9	6	0	15	14	15	6	0
4.0	0	0	10	40	0	18	15	6	11	0	15	10	12	13	0
10.0	0	0	0	24	28	12	6	9	22	1	5	5	17	18	6

Doador C															
Dose (Gy)	Logo após					3 horas					24 horas				
	0	I	II	III	IV	0	I	II	III	IV	0	I	II	III	IV
0	43	6	1	0	0	45	4	1	0	0	46	4	0	0	0
0.2	9	25	16	0	0	33	10	7	0	0	38	12	0	0	0
0.6	9	21	13	6	0	31	9	6	2	0	37	12	2	0	0
1.0	5	19	14	12	0	29	11	5	5	0	35	14	1	0	0
2.0	0	7	20	23	0	26	12	9	3	0	34	10	5	1	0
4.0	0	0	13	34	3	14	16	14	5	3	13	18	11	3	5
10.0	0	0	0	10	40	0	2	14	13	21	11	25	3	3	8

Tabela VII. Resultado da análise pela classificação visual (classes 0, I, II, III, IV) em leucócitos de pacientes com câncer de mama processados logo após; 3 e 24 horas após a irradiação com ^{60}Co

Doador D															
Dose (Gy)	Logo após					3 horas					24 horas				
	0	I	II	III	IV	0	I	II	III	IV	0	I	II	III	IV
0	52	10	1	0	0	49	10	0	0	0	58	7	3	0	0
0.2	22	27	1	0	0	35	15	8	0	0	45	10	3	1	0
0.6	0	28	18	4	0	16	18	13	3	0	34	14	2	0	0
1.0	0	14	32	2	2	15	18	15	1	0	21	21	6	2	0
2.0	0	3	37	10	0	1	10	30	9	0	27	15	18	8	0
4.0	0	0	4	36	10	0	1	12	37	0	2	12	22	14	0
10.0	0	0	0	10	40	0	0	0	15	35	0	0	9	22	19

Doador E															
Dose (Gy)	Logo após					3 horas					24 horas				
	0	I	II	III	IV	0	I	II	III	IV	0	I	II	III	IV
0	42	8	0	0	0	63	5	2	0	0	48	1	1	0	0
0.2	25	17	8	0	0	30	13	5	2	0	42	10	1	1	0
0.6	9	24	14	3	0	26	14	7	3	0	46	0	11	0	0
1.0	0	9	35	6	0	19	22	3	6	0	34	6	3	7	0
2.0	0	0	27	23	0	22	23	5	8	0	29	4	4	13	0
4.0	0	0	14	36	0	14	13	12	11	0	25	4	11	10	0
10.0	0	0	0	1	49	0	0	4	25	21	11	8	8	18	5

Doador F															
Dose (Gy)	Logo após					3 horas					24 horas				
	0	I	II	III	IV	0	I	II	III	IV	0	I	II	III	IV
0	57	6	1	0	0	57	8	0	0	0	51	8	2	0	0
0.2	15	31	4	0	0	17	27	6	0	0	34	12	3	1	0
0.6	8	35	9	0	0	18	11	7	3	0	23	18	3	5	1
1.0	11	32	9	0	0	18	26	2	0	0	33	2	5	10	0
2.0	0	2	29	21	0	0	9	33	8	0	29	7	12	15	0
4.0	0	0	6	46	0	0	0	13	33	4	0	5	9	25	11
10.0	0	0	0	4	46	0	0	6	35	10	0	0	7	12	32

A estimativa quantitativa do dano radioinduzido ao DNA (DD) é mostrada nas tabelas VIII (doadores sadios) e IX (pacientes com câncer).

Em todos os doadores, sadios e pacientes, os valores de DD aumentaram em função da dose de radiação, com uma tendência ao decréscimo à medida que aumentou o tempo após as exposições.

As médias dos valores obtidos dos três doadores sadios e das três pacientes com câncer são mostradas na tabela X. Os valores de DD variaram de 10 a 367 ua no grupo de doadores sadios e de 14 a 390 ua, no grupo de pacientes com câncer.

Tabela VIII. Estimativa quantitativa de dano ao DNA (DD) em leucócitos irradiados de doadores sadios.

Doador A			
Dose (Gy)	Dano ao DNA (ua)		
	Logo após	3 horas	24 horas
0	14,00	6,00	14,00
0.2	84,62	16,00	20,00
0.6	190,38	40,74	43,14
1.0	219,23	48,08	48,00
2.0	244,23	74,00	76,92
4.0	311,76	115,38	92,00
10.0	367,31	243,40	229,41

Doador B			
Dose (Gy)	Dano ao DNA (ua)		
	Logo após	3 horas	24 horas
0	10,00	12,00	16,00
0.2	111,54	30,00	50,00
0.6	169,23	74,00	70,00
1.0	238,46	46,00	72,00
2.0	221,15	96,00	124,00
4.0	280,00	120,00	146,00
10.0	353,85	188,00	229,41

Doador C			
Dose (Gy)	Dano ao DNA (ua)		
	Logo após	3 horas	24 horas
0	16,00	12,00	8,00
0.2	114,00	48,00	24,00
0.6	132,65	56,25	31,37
1.0	166,00	72,00	32,09
2.0	232,00	78,00	46,00
4.0	280,00	136,54	138,00
10.0	380,00	306,00	144,00

Tabela IX. Estimativa quantitativa de dano ao DNA (DD) em leucócitos irradiados de pacientes com câncer de mama.

Doador D			
Dose (Gy)	Dano ao DNA (ua)		
	Logo após	3 horas	24 horas
0	19,05	16,95	19,12
0.2	58,00	53,45	32,20
0.6	152,00	106,00	36,00
1.0	184,00	104,08	78,00
2.0	214,00	194,00	110,29
4.0	312,00	272,00	196,00
10.0	380,00	370,00	320,00

Doador E			
Dose (Gy)	Dano ao DNA (ua)		
	Logo após	3 horas	24 horas
0	16,00	12,86	6,00
0.2	66,00	58,00	27,78
0.6	122,00	74,00	38,60
1.0	194,00	92,00	66,00
2.0	246,00	98,28	102,00
4.0	272,00	140,00	112,00
10.0	398,00	334,00	196,00

Doador F			
Dose (Gy)	Dano ao DNA (ua)		
	Logo após	3 horas	24 horas
0	12,50	12,31	19,67
0.2	78,00	78,00	42,00
0.6	106,00	87,18	86,00
1.0	100,00	65,22	84,00
2.0	246,00	198,00	120,63
4.0	300,00	282,00	284,00
10.0	392,00	314,00	356,00

Tabela X. Médias dos valores de dano ao DNA (DD), obtidas de três doadores sadios e de três pacientes com câncer de mama com respectivos desvios padrões, em amostras sanguíneas processadas logo após; 3 e 24 horas após as irradiações com ^{60}Co .

SADIOS			
Dano ao DNA (ua)			
Dose (Gy)	Logo após	3 horas	24 horas
0	13,33 ± 3,0	10,00 ± 3,4	12,67 ± 4,1
0.2	103,38 ± 16,1	31,33 ± 16,0	31,33 ± 16,2
0.6	164,09 ± 28,8	57,00 ± 16,5	48,17 ± 19,9
1.0	207,90 ± 37,3	55,36 ± 14,4	50,67 ± 20,1
2.0	232,46 ± 11,5	82,67 ± 11,7	82,31 ± 39,2
4.0	290,59 ± 18,4	123,97 ± 11,5	125,33 ± 29,1
10.0	367,05 ± 13,0	245,80 ± 50,1	200,94 ± 49,0

PACIENTES			
Dano ao DNA (ua)			
Dose (Gy)	Logo após	3 horas	24 horas
0	15,85 ± 3,0	14,04 ± 2,6	14,93 ± 7,8
0.2	67,33 ± 10,0	63,15 ± 13,2	33,99 ± 7,2
0.6	126,67 ± 23,3	89,06 ± 16,0	53,53 ± 28,0
1.0	159,33 ± 51,6	87,10 ± 19,9	76,00 ± 9,1
2.0	235,33 ± 18,4	163,43 ± 57,8	110,98 ± 9,5
4.0	294,67 ± 20,5	231,33 ± 81,9	197,33 ± 86,0
10.0	390,00 ± 9,1	339,37 ± 28,3	290,67 ± 83,9

(ua) = unidade arbitrária

A figura 6 mostra a relação entre os valores de DD e a dose de radiação para cada grupo de doadores, nos diferentes tempos após as irradiações. As curvas dose-respostas foram ajustadas pelo modelo de regressão não linear, segundo a equação $y = A \cdot e^{(-K \cdot D)} + B$, que foi o modelo que melhor se ajustou aos dados obtidos.

Pode-se verificar que os 2 grupos, sadios e pacientes, apresentaram uma resposta similar quanto ao dano radioinduzido no DNA em amostras sangüíneas processadas logo após as irradiações ($p = 0,0810$). Já nas amostras analisadas 3 horas (figura 6b) e 24 horas após as exposições (figura 6c), houve uma diferença significativa entre os doadores sadios e pacientes com câncer de mama ($p < 0,0001$ para 3 horas e $p = 0,0121$ para 24 horas). As pacientes com câncer de mama apresentaram uma quantidade de dano maior em relação aos doadores sadios.

As estimativas dos parâmetros do modelo de regressão não linear, utilizado para o ajuste das curvas e os coeficientes de ajuste do modelo (r^2) para os grupos sadios e pacientes com câncer, são expressas na Tabela XI.

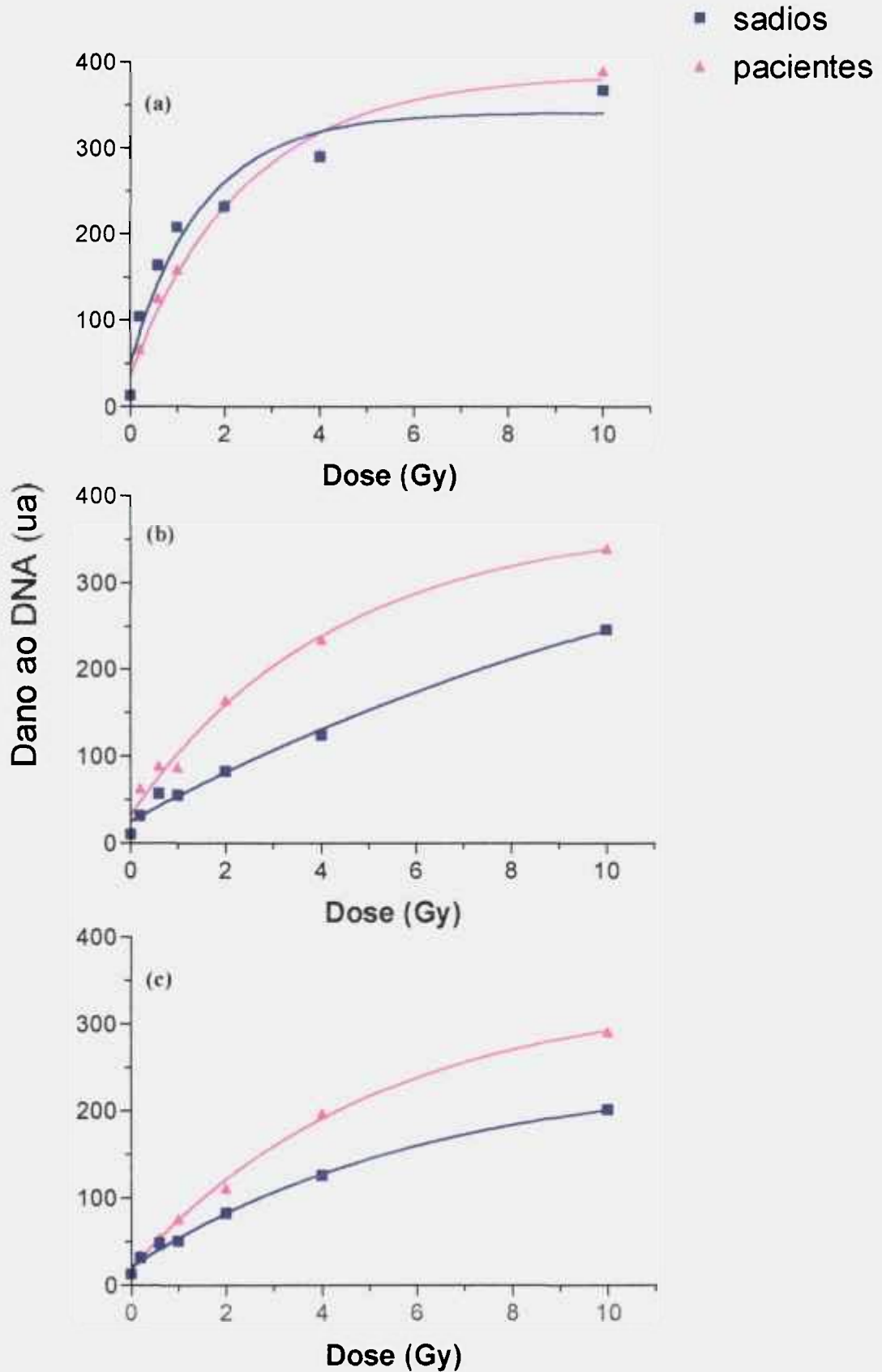


Figura 6. Dano ao DNA (DD) induzido por radiação γ em leucócitos sanguíneos de indivíduos sadios e de pacientes com câncer, processados **a**) logo após as exposições; **b**) 3 horas e **c**) 24 horas após as exposições (ua = unidade arbitrária).

Tabela XI: Estimativas do modelo dose-resposta para migração de DNA, nos diferentes tempos após as irradiações para os doadores sadios e pacientes com câncer, por meio do modelo de regressão não linear.

Grupo	Tempo	Parâmetro	Estimativa	Erro padrão	r^2
Sadios	Logo após	A	- 293,1	\pm 20,82	0,9188
		B	340,4	\pm 17,12	
		K	0,6502	\pm 0,1229	
	3 horas	A	- 452,6	\pm 265,6	0,9140
		B	476,9	\pm 270,5	
		K	0,06668	\pm 0,05500	
	24 horas	A	- 225,1	\pm 49,41	0,8615
		B	245,1	\pm 52,88	
		K	0,1611	\pm 0,07492	
Pacientes	Logo após	A	- 350,7	\pm 17,84	0,9614
		B	385,2	\pm 16,73	
		K	0,4117	\pm 0,05586	
	3 horas	A	- 339,3	\pm 40,20	0,8952
		B	370,4	\pm 42,81	
		K	0,2355	\pm 0,07003	
	24 horas	A	- 319,9	\pm 57,48	0,8492
		B	337,4	\pm 61,85	
		K	0,1948	\pm 0,08164	

Os coeficientes de ajuste indicam que o modelo se justou satisfatoriamente aos dados ($r^2 > 0,8492$) para cada uma das curvas.

4.4. ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DO DANO

As figuras 7 e 8 mostram os histogramas de distribuição de cometas obtidos de amostras sangüíneas de doadores sadios e de pacientes com câncer, respectivamente, em função da dose de radiação. O dano foi avaliado pelo comprimento total do cometa (cabeça + cauda) e a distribuição foi expressa em % de cometas com diferentes graus de migração para cada dose de radiação.

Os histogramas mostram que as amostras não irradiadas foram caracterizadas pela presença predominante de cometas medindo até 40 μm de comprimento, com a ocorrência de uma proporção muito pequena de células danificadas nos 2 grupos.

Em amostras irradiadas e processadas logo após as exposições foi possível verificar uma tendência ao deslocamento de cometas para a direita da abcissa com o aumento da dose de radiação, além do aparecimento concomitante de subpopulações de células com diferentes radios sensibilidades, tanto no grupo de doadores sadios como no de pacientes com câncer.

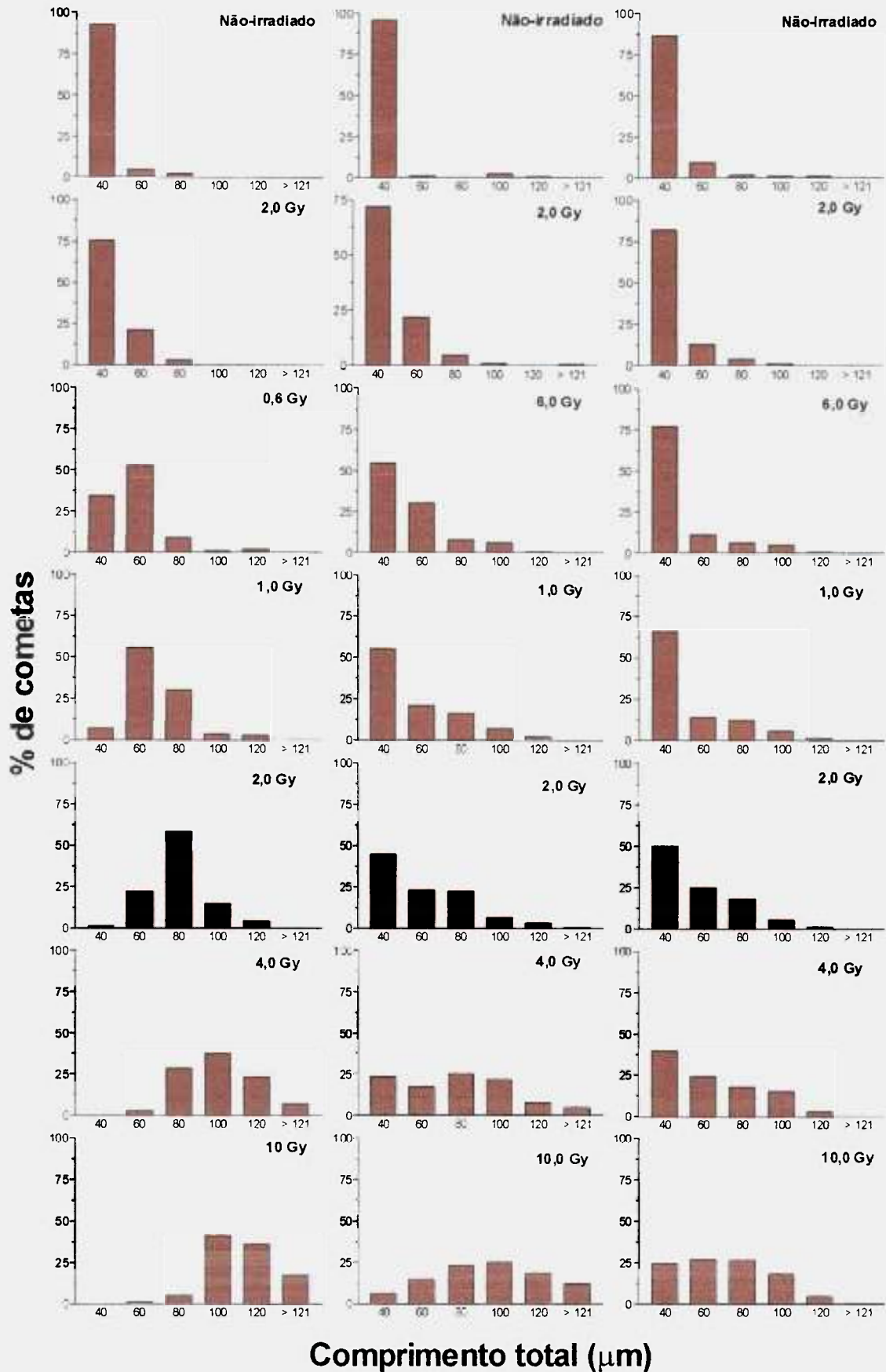


Figura 8. Histograma de distribuição de cometas em função da dose de radiação em amostras sanguíneas de pacientes com câncer de mama, processadas pelo ensaio do cometa logo após, 3 e 24 horas após as exposições.

Três horas após as exposições, foi possível observar uma redução do comprimento do cometa em todas as doses analisadas nos 2 grupos, no entanto as pacientes apresentaram subpopulações de células mais danificadas que os doadores sadios.

Vinte e quatro horas após as irradiações, o padrão de distribuição de dano foi similar com o de 3 horas nas doses mais baixas (0,2 e 0,6 Gy), persistindo, porém, subpopulações de células mais radiosensíveis nas doses mais altas (1,0 – 10,0 Gy) com proporções maiores em pacientes do que em indivíduos sadios.

4.5 AVALIAÇÃO DO REPARO CELULAR

A capacidade de reparo dos danos radioinduzidos em células sanguíneas de indivíduos sadios e de pacientes com câncer de mama foi estimada por meio da fórmula descrita por JALOSZYNSKI e col. (1997). Os valores obtidos dos doadores individualmente, 3 e 24 horas após as exposições, são ilustrados nas figuras 9 e 10, respectivamente.

Pode-se observar que houve diferenças na capacidade de reparar o dano entre os indivíduos. Essa variabilidade interindividual ocorreu em ambos os grupos, porém foi mais acentuada no grupo das pacientes.

As figuras mostram ainda que o dano radioinduzido foi menos eficientemente reparado entre as pacientes do que entre os indivíduos sadios, em todas as doses analisadas, tanto nas amostras de 3 como nas de 24 horas após as exposições. A doadora E foi a que mostrou melhor eficiência na capacidade de reparo entre as pacientes. Vinte e quatro horas após as irradiações, a sua performance foi similar a de doadores sadios, não ocorrendo o mesmo com as doadores D e F.

Cabe ressaltar que, entre os indivíduos sadios, o doador C mostrou reparo menos eficiente, praticamente em todas as doses, quando analisado 3 horas após as exposições. Porém, 24 horas após, ocorreu o processo inverso, isto é, foi o que apresentou melhor eficiência em relação aos outros doadores sadios.

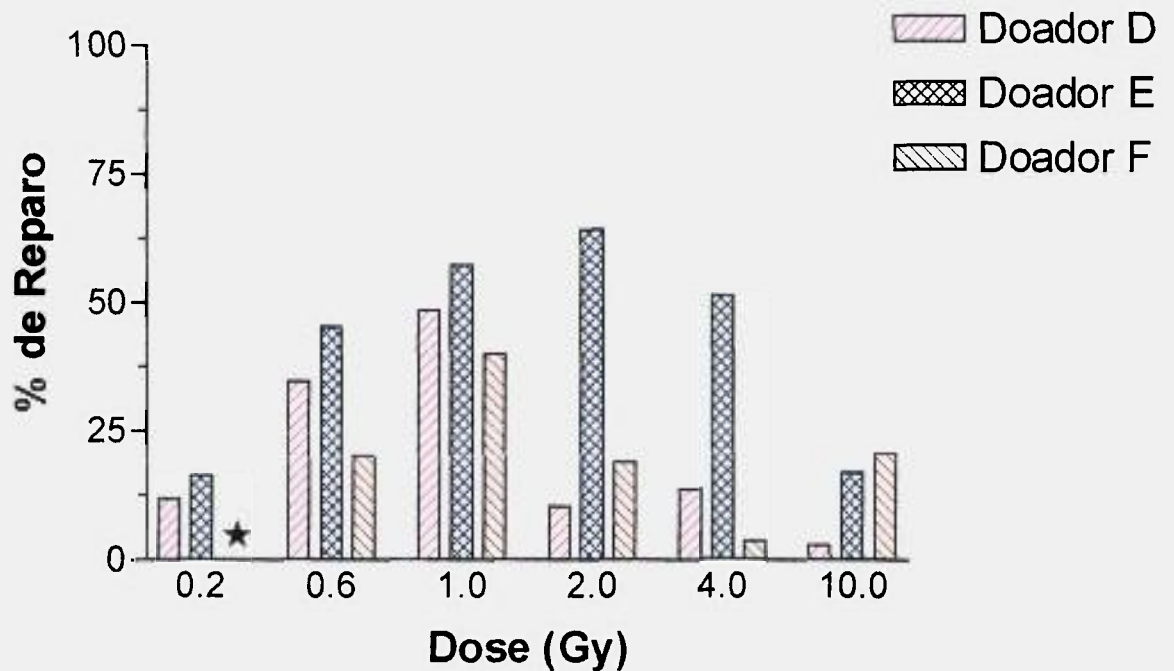
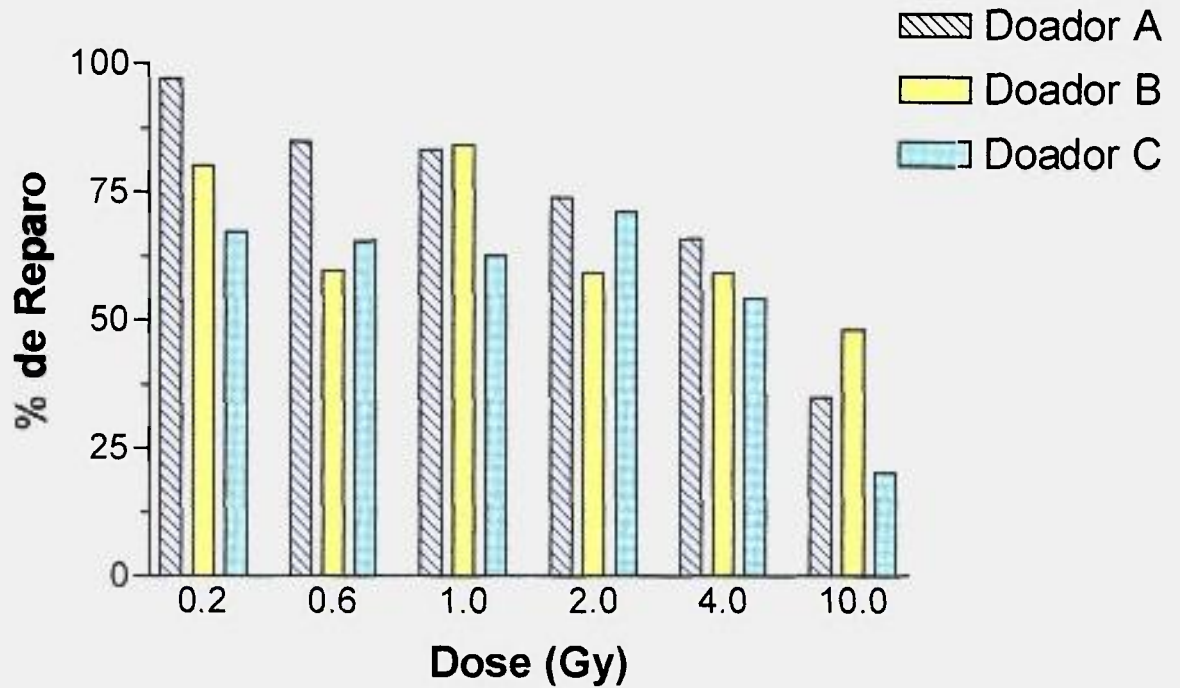


Figura 9. Capacidade de reparo observada em células sanguíneas de doadores sadios (A, B, C) e de pacientes com câncer de mama (D, E, F), 3 horas após as irradiações. * = não houve reparo

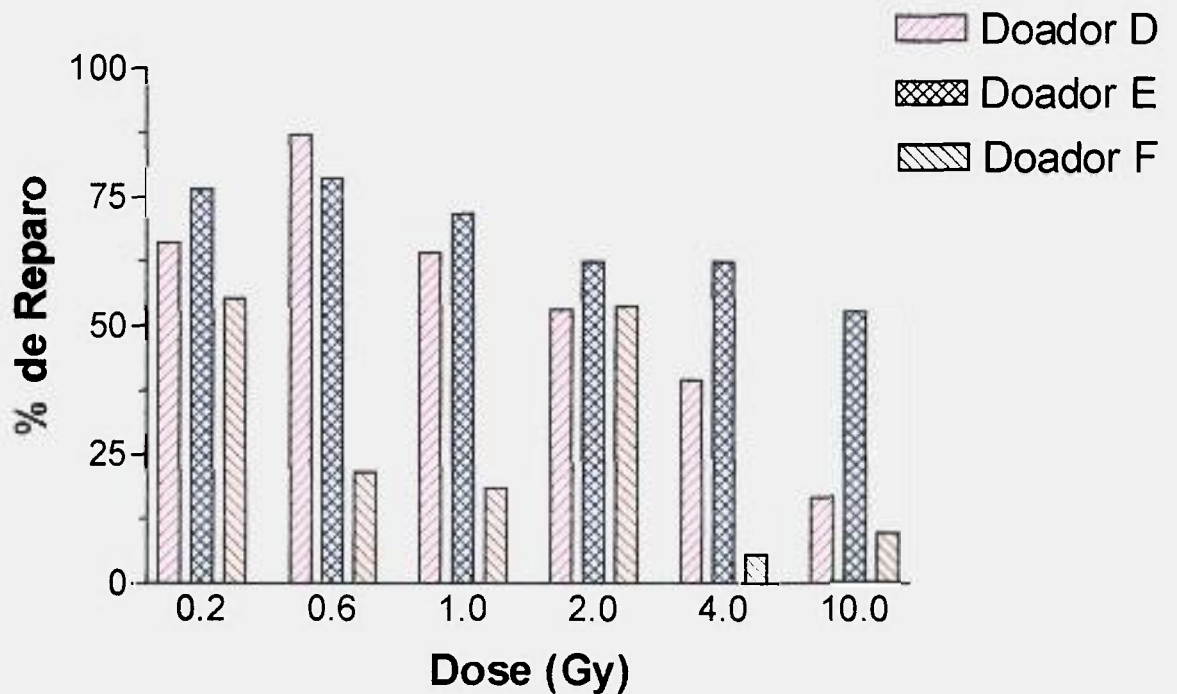
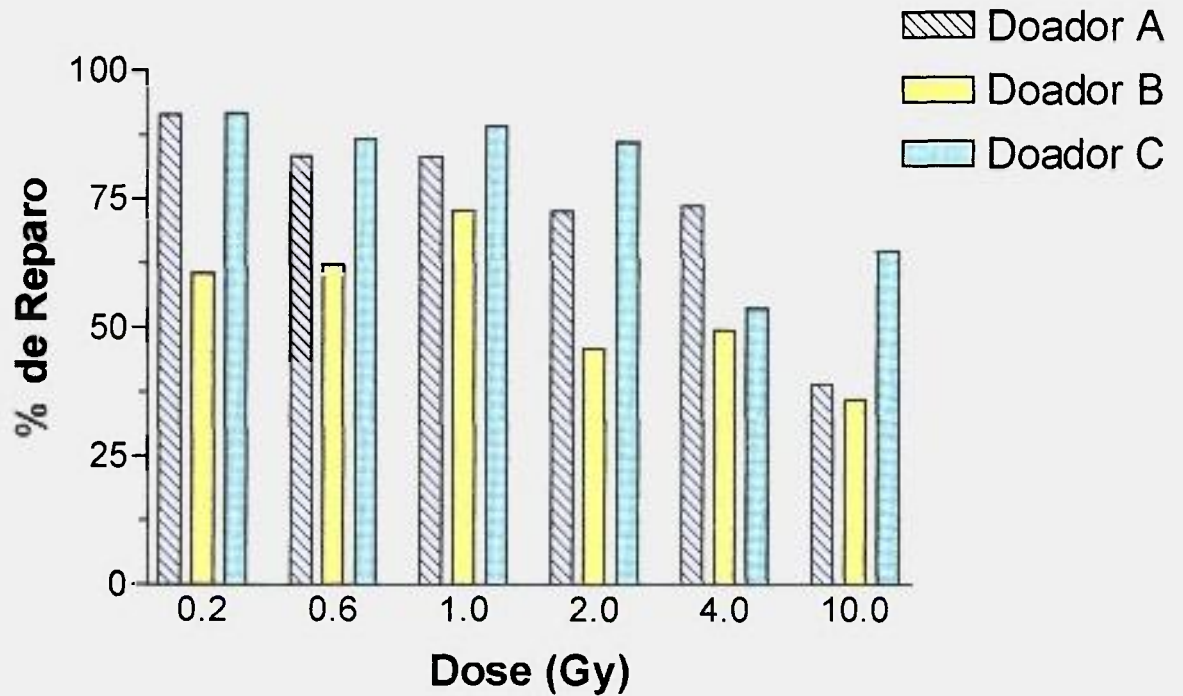


Figura 10. Capacidade de reparo observada em células sanguíneas de doadores sadios (A, B,C) e de pacientes com câncer de mama (D, E, F), 24 horas após as irradiações.

As médias dos valores obtidos de cada grupo são expressas na tabela XII e são apresentadas sob a forma de histograma na figura 11.

Uma diferença significativa na capacidade de reparo entre os 2 grupos foi observada em todas as doses de radiação aplicadas, tanto em 3 ($p < 0,0001$) como em 24 horas ($p = 0,0091$) após as exposições. Os doadores sadios foram mais eficazes no reparo do dano em relação às pacientes tanto nas amostras de 3 quanto de 24 horas: por exemplo, na dose de 1 Gy houve cerca de 78% de reparo nos doadores sadios contra cerca de 50% nas pacientes com câncer de mama, 3 horas após as irradiações. O potencial de reparo dos doadores sadios analisado 24 horas após praticamente não diferiu daquele de 3 horas; já nas pacientes com câncer, essa diferença foi pronunciada.

Tabela XII. Média da percentagem de reparo do dano ao DNA em amostras sangüíneas de doadores sadios e de pacientes com câncer de mama.

Doadores sadios		
Reparo (%)		
Dose (Gy)	3 horas	24 horas
0.2	81,61 ± 14,9	81,32 ± 17,9
0.6	70,05 ± 13,1	77,54 ± 13,2
1.0	76,77 ± 12,2	81,88 ± 8,3
2.0	68,17 ± 7,8	68,26 ± 20,4
4.0	59,85 ± 5,8	59,07 ± 12,9
10.0	34,54 ± 13,9	46,68 ± 15,7
Pacientes com câncer		
Reparo (%)		
Dose (Gy)	3 horas	24 horas
0.2	9,23 ± 8,2	65,88 ± 10,5
0.6	33,34 ± 12,5	62,44 ± 35,7
1.0	48,50 ± 8,6	51,49 ± 28,9
2.0	31,68 ± 28,9	56,50 ± 5,2
4.0	23,83 ± 25,3	35,89 ± 28,6
10.0	13,36 ± 9,3	26,33 ± 23,2

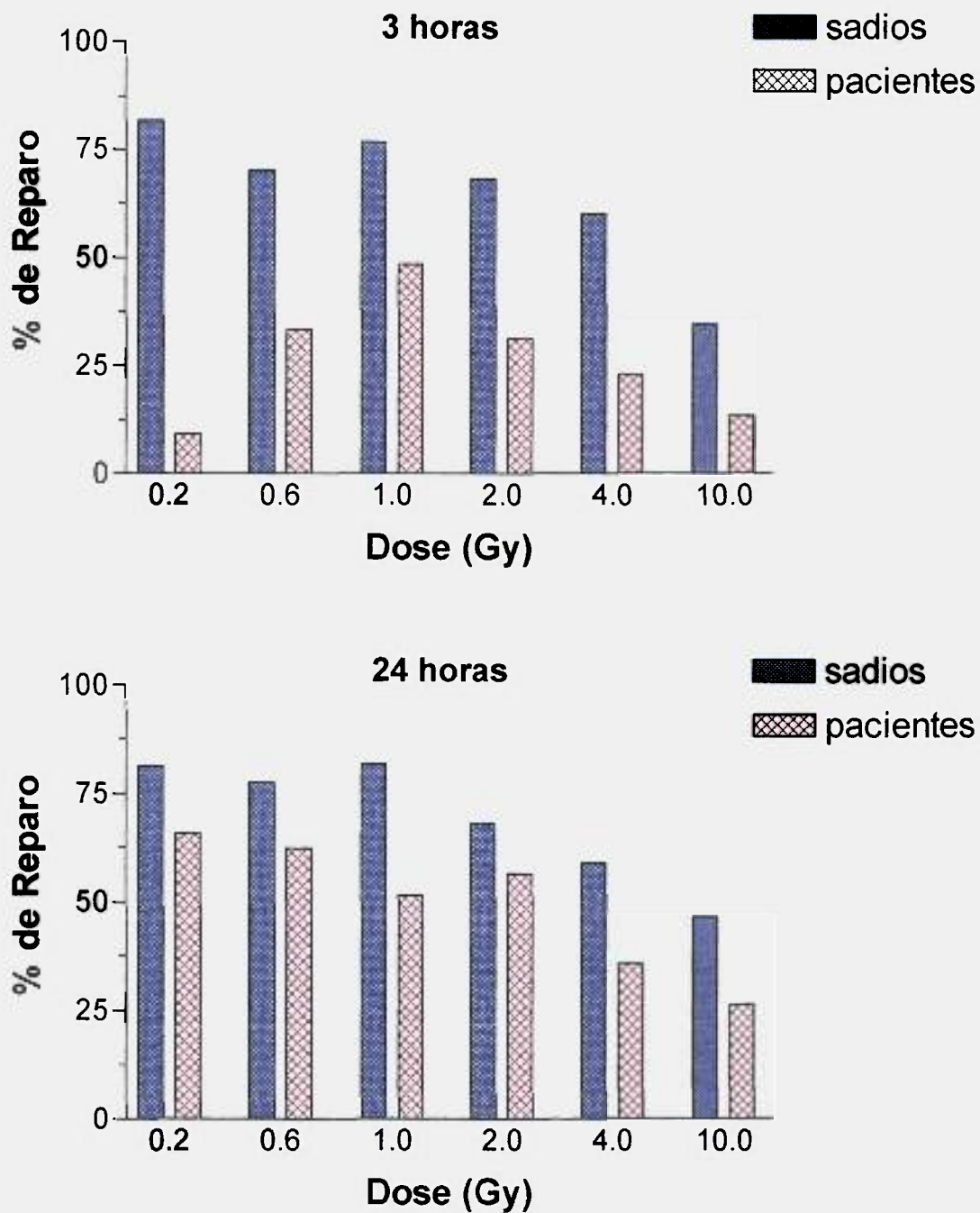


Figura 11. Capacidade de reparo do dano radioinduzido no DNA observada em células sanguíneas de doadores sadios e de pacientes com câncer de mama , 3 e 24 horas após as exposições.

5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento neoplásico envolve interações entre vários fatores endógenos e exógenos. Contudo, 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 (MENDONÇA *et al.*, 1992).

Segundo CHERRY & HSU (1983), uma variedade de tumores ocorre como resultado direto da exposição aos agentes cancerígenos ambientais ou ocupacionais como determinadas substâncias de uso industrial e agrícola, fumo, álcool, medicamentos e radiações ionizantes. Uma vez que a população humana está cada vez mais exposta a esses agentes, torna-se cada vez mais necessário identificar pessoas com alto risco de desenvolver câncer.

A suscetibilidade individual ao câncer pode resultar de vários fatores, incluindo diferenças na metabolização de carcinógenos químicos, fatores hormonais, fatores imunológicos, instabilidade genética herdada ou adquirida e capacidade de reparo do DNA.

Muitos indivíduos com predisposição ao câncer (como ataxia telangiectasia, síndrome de Gardner, polipose familiar, anemia de Fanconi, síndrome de Bloom e xeroderma pigmentosum) apresentam deficiências em alguma etapa do processo de reparo do DNA, o que propicia a ocorrência de tumores nestes indivíduos.

Em pacientes com ataxia telangiectasia (AT), uma doença genética autossômica recessiva, é observada uma sensibilidade à radiação ionizante.

Estudos em linfócitos ou fibroblastos de pacientes com AT, mostram que essas células possuem um defeito no reparo de quebras na fita dupla do DNA (THACKER, 1994; EASTON, 1994). Mulheres heterozigotas para o gene AT são cinco vezes mais sensíveis ao câncer de mama do que outras mulheres (FORAY *et al.*, 1997).

A presença de um mecanismo deficiente em reparo é encontrada não somente dentro das síndromes clássicas de fragilidade cromossômica, mas também tem sido reportado em pacientes com câncer, colorretal (PERO *et al.*, 1983), de pulmão (WEI *et al.*, 1996), de colo do útero (UDUMUDI *et al.*, 1998), de pele não-melanocítica (MOLLER *et al.*, 1998), em indivíduos com lúpus e com artrite reumatóide (McCURDY *et al.*, 1997) e em indivíduos com síndrome de Down (SANFORD *et al.*, 1993).

A radiação ionizante vem sendo amplamente utilizada na indução de quebras no DNA de linfócitos, com o intuito de identificar pessoas com deficiência no reparo de DNA (HSU, 1987; HSU *et al.*, 1989). No entanto, cabe salientar que um indivíduo pode apresentar deficiência no reparo de DNA em resposta a um determinado mutagênico com um mecanismo de ação específico e ser eficiente no reparo do dano induzido por um outro agente mutagênico com um mecanismo de ação diferente, por exemplo, apresentar sensibilidade à ação da radiação ionizante ou a um agente radiomimético, mas não à ação de um indutor de dímero de pirimidina (luz UV) ou à um agente alquilante (como mitomicina C). A deficiência em um tipo de mecanismo de

reparo de DNA, portanto, pode manifestar-se mais intensamente com um mutagênico do que com outro (HSU *et al.*, 1985).

O objetivo desse trabalho foi avaliar e comparar a sensibilidade celular e a eficiência de reparo do DNA utilizando o ensaio do cometa como metodologia, entre doadores sadios e pacientes com câncer de mama. Para tanto, amostras sangüíneas desses doadores foram expostas a várias doses de radiação ionizante e processadas logo após para a avaliação do dano inicial e, 3 e 24 horas após a irradiação para a avaliação do reparo do dano radioinduzido.

Com relação aos valores basais não foi encontrada diferença significativa entre os dois grupos estudados (doadores sadios e pacientes com câncer) quando a análise foi realizada pelo método da classificação visual do cometa (DD₀), embora houvesse uma certa tendência ao aumento do dano em amostras não irradiadas de pacientes com câncer de mama. Resultado similar foi obtido por JALOSZÝNSKI e col. (1997), que utilizando o ensaio do cometa, não encontraram diferenças nos dados basais (DD₀) entre doadores sadios e pacientes com câncer de mama.

No entanto, a análise realizada pelo método da medição utilizando o comprimento da cauda, diferiu significativamente entre os grupos; nas pacientes o comprimento da cauda foi maior. A análise visual provavelmente não permitiu detectar pequenas diferenças entre células com pouco dano e aquelas sem migração do DNA.

Índices mais altos de dano basal nas pacientes com câncer de mama em relação aos indivíduos saudáveis, podem indicar que a malignidade da doença está associada com um aumento do dano ao DNA, ou que essas pacientes possuem um DNA mais frágil que os indivíduos saudáveis, estando dessa forma mais suscetíveis aos danos endógenos e exógenos (VAGHEF *et al.*, 1997).

Em condições controle (sem exposição a radiação ionizante), a maioria das células (mais de 80%) se mostrou sem dano aparente, ou seja, com o DNA contido no nucleóide, com pouquíssimos filamentos de DNA fora dessa área. No presente trabalho o diâmetro do nucleóide nas amostras não irradiadas foi cerca de 29 μm , coincidindo com os dados de MALCOLMSON e col. (1995) e VISVARDIS e col. (1997) que encontraram nucleóides com diâmetros variando de 25 a 30 μm .

Os valores basais não diferiram entre os tempos utilizados nesse estudo, sugerindo que a manutenção das amostras sanguíneas em estufa a 37°C por 24 horas, não ocasionou lesões adicionais no DNA.

As curvas dose-respostas obtidas logo após, 3 e 24 após a irradiação γ mostraram que houve um aumento da migração de DNA em função da dose de radiação nos dois grupos estudados (figuras 4 e 6). Isto porque com o aumento da dose de radiação, ocorreu um maior número de lesões no DNA e os fragmentos migraram de maneira pronunciada em sentido ao ânodo numa corrida eletroforética, dando origem às caudas do cometa, cuja extensão está intimamente relacionada com a intensidade do dano. A distância e a quantidade

de DNA que migra da “cabeça” ao ânodo está diretamente relacionada com a magnitude do dano ocorrido. Esses resultados estão de acordo com a literatura (VIJAYALAXMI *et al.*, 1993; VISVARDIS *et al.*, 1997; SINGH & STEPHENS, 1997).

Os dois grupos estudados mostraram resultados análogos quanto ao dano inicial, estudado logo após a irradiação, sugerindo uma radiosensibilidade inicial similar.

No entanto, indivíduos sadios e pacientes com câncer de mama diferiram significativamente com relação aos dados obtidos 3 e 24 horas após as irradiações, analisados pelos dois parâmetros, medição do cometa (figura 4b e 4c) e classificação visual (figura 6b e 6c).

Ambos os métodos mostraram ser bastante eficientes na avaliação do dano induzido ao DNA, corroborando com os dados de VISVARDIS e col. (1997), que também utilizaram estes dois parâmetros para a avaliação do dano.

COLLINS e col. (1995), utilizando o ensaio do cometa, mostraram que houve uma clara correlação entre a análise por categoria de dano e a percentagem de DNA na cauda do cometa obtida por um analisador de imagem e concluíram que a análise pela classificação visual do cometa baseada na categoria de dano é um método rápido, seguro e sensível.

A capacidade de reparo do dano radioinduzido no DNA em células sangüíneas de doadores sadios e de pacientes com câncer de mama foi avaliada e os resultados obtidos mostraram que houve uma variabilidade interindividual

na habilidade de reparar o dano ao DNA induzido por raios γ analisados após 3 e 24 horas, tanto nas células dos doadores sadios como nas das pacientes com câncer de mama (figura 9 e 10).

Segundo HSU e col. (1989), na população humana existem indivíduos com diferentes graus de eficiência no reparo do dano ao DNA. Pessoas com deficiências em alguma etapa do reparo ao DNA podem ser classificadas em uma categoria de risco.

No grupo das pacientes com câncer houve uma maior variabilidade na capacidade de reparo em comparação ao grupo de doadores sadios; na maioria das doses, a paciente E reparou melhor o dano radioinduzido do que as pacientes D e F tanto em 3 quanto em 24 horas após as irradiações.

Uma das possíveis explicações poderia estar relacionada com a história familiar de câncer existente nas pacientes D e F. As pacientes D e F apresentavam parentescos do 1^o e do 2^o grau com câncer de ovário e de mama, respectivamente, além de outros tipos de cânceres na família. Parece haver, então, uma certa propensão aos cânceres nas famílias dessas doadoras, embora não se possa afastar a hipótese de exposição dos membros da família a uma causa comum. Já na família da paciente E não havia histórico de câncer.

Os cânceres de mama e ovário são tipos de cânceres que apresentam um componente familiar, mas o papel de predisposição herdada, muitas vezes, é difícil de delinear por causa de vários fatores que dificultam a análise, por exemplo, a existência de casos predominantes de cânceres esporádicos e

mutações de penetrância variável (SANKARANARAYANAN & CHAKRABORTY, 1995).

Casos de ligação familiar ao câncer de mama é observado em aproximadamente 20% dos casos (HALL *et al.*, 1990). Muitos casos de câncer de mama hereditário e em alguns casos de câncer de mama esporádico, são ligados a mutações nos genes BRCA1 e 2, que parecem ter um papel no reparo de quebras na fita dupla do DNA (MIKI *et al.*, 1994; SCOTT *et al.*, 1998).

A idade parece não ter interferido nos dados, pois a paciente E (72 anos) com idade mais avançada foi a que apresentou melhor capacidade de reparo comparada às outras pacientes. Nos doadores sadios, os três apresentavam idades relativamente próximas na faixa etária de 40 a 50 anos. Não está descartada, porém, uma possível influência da idade entre os grupos.

A relação entre idade e aumento do dano em células somáticas tem sido muito estudada, e dados obtidos por vários autores são contraditórios. FENECH & MORLEY (1986), DUFFAUD e col. (1997), SCOTT e col. (1998), observaram um aumento no número de micronúcleos com o aumento da idade do indivíduo, ao passo que SARTO e col. (1987), GANTEMBERG e col. (1991), não encontraram diferença significativa entre os doadores jovens e com idade mais avançada (acima de 45 anos), atribuindo o resultado encontrado a diferenças interindividuais.

A variabilidade interindividual pode ser decorrente de uma série de fatores como imunológico, hormonal, vascular, metabólico e nutricional, assim como de fatores relacionados com a constituição genética e estilo de vida.

Com relação a influência do sexo dos doadores (doador C) vários autores mostraram não haver uma diferença significativa na resposta biológica à ação dos genotóxicos ambientais (DUFFAUD *et al.*, 1997; SCOTT *et al.*, 1998).

A capacidade de reparo do dano radioinduzido obtida de três doadores sadios e de três pacientes, foi apresentada na figura 11. Os resultados obtidos mostraram que nos doadores sadios, as % de reparo 3 e 24 horas após as irradiações, praticamente não diferiram, sugerindo que muitas das lesões radioinduzidas foram eficientemente reparadas dentro de 3 horas, corroborando com os dados de diversos autores. Estes autores utilizando o ensaio do cometa no estudo do dano radioinduzido e reparo, mostraram que em células sangüíneas de indivíduos sadios, a maior parte do reparo ocorreu nos primeiros 15 minutos após a irradiação, com uma fase secundária mais lenta de reparo completada dentro de 2 horas (SINGH *et al.*, 1988). Segundo OLIVE (1998), existiria ainda um outro componente mais lento de reparo para lesões com uma complexidade maior que seria completado dentro de 30 a 40 horas.

Notou-se, no entanto, que a restituição da integridade do DNA foi comprometida nos indivíduos com câncer de mama aqui estudados. Apesar de ocorrer uma redução do dano após 3 horas, muitas das lesões ocorridas ao DNA ainda permaneceram, mesmo após 24 horas. Essa diferença significativa

encontrada entre os grupos pode ser decorrente de um reparo mais lento nas pacientes, necessitando de um tempo maior para reparar os danos radioinduzidos ou mesmo, um reparo deficiente aos danos induzidos pela radiação ionizante, propiciando dessa forma um maior acúmulo de danos radioinduzidos.

Vários trabalhos utilizando células sangüíneas de pacientes com câncer de mama têm mostrado que essas pacientes apresentam uma deficiência no reparo do dano ao DNA. No entanto, esses trabalhos diferem do presente, por utilizarem uma outra metodologia (técnica de aberração cromossômica) e/ou por terem utilizado diferentes tempos (< 2 horas) para análise do reparo e/ou por terem utilizado um outro agente indutor do dano.

O único trabalho publicado que utilizou o teste do cometa na avaliação da sensibilidade das pacientes com câncer de mama foi o de JALOSZYNSKI e col. (1997) que empregaram a bleomicina como mutagênico teste. Os autores observaram um reparo de DNA menos eficiente em relação às doadoras sadias, quando estudado 1 e 2 horas após o tratamento com bleomicina.

PARSHAD e col. (1996) observaram que a freqüência de quebras cromatídicas em linfócitos sangüíneos de doadores com câncer de mama esporádico e com história familiar de câncer de mama, foi cerca de 2 a 3 vezes mais alta após a irradiação, em relação às células de doadores sadios. Os autores concluíram que o reparo deficiente do DNA encontrado nas pacientes

com câncer de mama, manifestado pela frequência alta de quebras cromatídicas induzidas por raios X, pode ser um fator de predisposição ao câncer de mama.

RIGAUD e col. (1990), realizaram um estudo com 43 pacientes com câncer de mama sem exposição prévia aos tratamentos médicos e observaram que essas pacientes em comparação aos indivíduos sadios apresentaram uma eficiência reduzida de reparo do dano induzido por raios γ , avaliado pela técnica de aberração cromossômica, 1 hora após a irradiação. Essa diferença na capacidade de reparo entre doadores sadios e pacientes com câncer de mama também foi observada por KOVACS e col. (1986), onde em um estudo envolvendo 41 pacientes com câncer de mama, cerca de 50% delas mostraram uma deficiência na capacidade de reparo após irradiação dos linfócitos à luz UV.

O ensaio do cometa, utilizado no presente trabalho, permitiu avaliar dano e reparo em células individuais e identificar subpopulações de células resistentes ou sensíveis ao tratamento. É possível usar este método para avaliar se todas as células dentro de uma população apresentam quantidades similares de dano e talvez o mais importante, se todas elas dentro de uma mesma população reparam o dano com a mesma intensidade, como foram apresentadas nas figuras 7 e 8.

As figuras mostraram subpopulações “celulares” com respostas diferentes à ação da radiação ionizante, isto é, a presença de células resistentes e sensíveis à radiação ionizante.

Essa diferença pode ser em virtude de diferentes tipos celulares que compõem os leucócitos sanguíneos (monócitos, linfócitos e os granulócitos).

VAN DER SCHANS e col. (1989) conduziram um estudo comparativo quanto a sensibilidade entre granulócitos e linfócitos. Amostras sanguíneas foram irradiadas com 1, 2 e 5 Gy de raios γ , e então os linfócitos e granulócitos foram separados do sangue total. Os autores observaram um efeito dose-dependente nos dois tipos celulares, mas os linfócitos mostraram ser mais radiossensíveis.

No entanto, VIJAYALAXMI e col. (1993), utilizando a técnica do cometa para comparar a magnitude do dano ocorrido entre linfócitos e granulócitos expostos a radiação γ , não encontraram diferenças significativas entre os dois tipos celulares.

São muitas as vantagens na utilização do ensaio do cometa, no entanto, o teste do cometa não permite a detecção do tipo de dano e reparo envolvidos diretamente bem como não oferece a possibilidade de monitorar a qualidade de reparo no DNA.

Porém, sabe-se que o valor do pH das soluções de lise e de eletroforese representa um dos fatores fundamentais: sob condições neutras, as quebras nas fitas duplas do DNA constituem o componente predominantemente de dano enquanto que sob condições alcalinas, situação adotada no presente trabalho, as quebras nas fitas duplas e simples e lesões álcali-lábeis contribuem

significativamente na quantidade de DNA encontrada nas caudas dos cometas (FAIRBAIRN *et al.*, 1995).

O ensaio do cometa vem sendo amplamente utilizado em estudos de dano oxidativo, em genética toxicológica, em estudos de biomonitoramento e em estudos de dano e reparo do DNA (SINGH *et al.*, 1990; ANDERSON *et al.*, 1994; HARTMANN & SPEIT, 1995; VAGHEF *et al.*, 1997). Além disso, como foi apresentado aqui, a técnica do cometa pode ser aplicada em dosimetria biológica.

O estudo da radiosensibilidade celular é de grande importância, pois, ela representa um papel relevante não somente na determinação do risco genético, mas também na terapia de tumores (MÜLLER *et al.*, 1994; VAGHEF *et al.*, 1997). O teste do cometa revelou que, pelo menos neste caso, a radiosensibilidade celular depende, dentre outros fatores, da quantidade de dano inicial e da capacidade de reparo das células.

A resposta diferente observada nos leucócitos das pacientes com câncer de mama pode ser resultado da fisiologia afetada decorrente da doença, ou o reparo de DNA comprometido pode ser o responsável pelo desenvolvimento neoplásico.

Há vários sinais indicando uma possível correlação entre desenvolvimento de câncer de mama e proficiência na remoção do dano no DNA induzido por radiação ionizante, pelo menos em casos familiares (HELZLSOUER *et al.*, 1996).

Assim, com base nos resultados obtidos e nas informações da literatura pode-se concluir que o aumento da susceptibilidade a radiação ionizante e a deficiência na capacidade de reparo celular podem representar fatores preponderantes no desenvolvimento do câncer de mama.

Contudo, cabe salientar que os resultados obtidos referem-se a poucos indivíduos analisados; para uma melhor compreensão há necessidade de coletar dados de mais doadores, assim como uma análise molecular dos genes envolvidos na susceptibilidade ao câncer de mama como, p53, AT, BRCA-1 e BRCA-2, para uma avaliação mais acurada.

6. CONCLUSÕES

Os dados obtidos sobre a indução do dano e o reparo do DNA em células sangüíneas de 3 doadores sadios e de 3 pacientes com câncer de mama processados logo após, 3 e 24 horas após a exposições *in vitro* com doses de 0,2 a 10 Gy de radiação gama de ^{60}Co (0,722 Gy/min.) por meio do ensaio do cometa, permitiram concluir que:

- O dano radioinduzido ao DNA foi mais pronunciado logo após as irradiações. As células apresentaram um aumento na migração de DNA em função da dose de radiação tanto em doadores sadios como em pacientes com câncer de mama;
- A radiosensibilidade dos doadores dependeu não somente da quantidade de dano inicial, mas também da capacidade de reparo;
- No grupo de doadores sadios, o reparo foi completado dentro de 3 horas após as exposições;
- As pacientes com câncer de mama apresentaram uma capacidade de reparo mais lenta em relação aos doadores sadios;
- O teste do cometa empregado mostrou ser uma ferramenta extremamente valiosa que permitiu quantificar as radiolesões induzidas no DNA e a capacidade de reparo em células individuais.

ANEXO 1**AUTORIZAÇÃO**

Eu _____ autorizo a coleta de 5 mL de sangue periférico para análises laboratoriais, a serem realizadas no Departamento de Radiobiologia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP). Atesto minha participação voluntária, estando ciente de que os resultados obtidos serão utilizados no projeto de pesquisa, avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas do IPEN.

São Paulo, ____ / ____ / ____.

Assinatura

ANEXO 2

QUESTIONÁRIO

1) Nome _____

2) Data de Nascimento: ___/___/___ Idade: _____

3) Sexo: () Feminino () Masculino

4) Estado Civil: _____

5) Tem filhos?

() Sim Quantos? _____

() Não

6) Já sofreu algum aborto espontâneo?

() Sim () Não

7) Já foi exposto a produtos químicos ou radiação?

() Sim () Não

8) Fuma?

() Sim Há quanto tempo? _____
Quantos cigarros por dia? _____

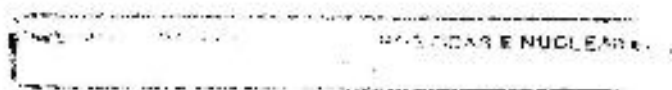
() Não

() Já fumou Há quanto tempo parou? _____
Fumou por quanto tempo? _____

9) Teve alguma medicação prescrita pôr algum médico nos últimos 2 anos,

por exemplo: - pílulas anticoncepcionais ()
- hormônios em geral ()
- antibióticos ()
- para pressão sanguínea ()
- vitaminas ()
- outros _____

10) Tem ou teve alguma dessas doenças?



Hepatite ()

Herpes ()

AIDS ()

Meningite ()

Infecção por bactéria ou vírus ()

Doenças vasculares ()

Diabete ()

Outras _____

11) Algum membro de sua família teve ou tem câncer?

() Sim Qual parentesco e o tipo de câncer? _____

() Não

12) Características do câncer da paciente: _____

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS B.; BRAY D.; LEWIS J.; RAFF M.; ROBERTS K.; WATSON J. D. *Molecular Biology of The Cell*. New York: Garland, 1994.
- AMES, B.N. Endogenous DNA damage as related to cancer and aging *Mutat. Res.*, v. 214, v. 1, p. 41-46, 1989.
- ANDERSON, D.; YU, T.-W.; PHILLIPS, B.J.; SCHMEZER, P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the Comet assay. *Mutat. Res.*, v. 307, p. 261-271, 1994.
- ANDREOLI, C.; ROSSI, S.; LEOPARDI, P.; CREBELLI, R. DNA damage by hydroquinone in human white blood cells: analysis by alkaline single-cell gel electrophoresis *Mutat. Res.*, v. 438, p. 37-45, 1999.
- ARLETT, C.F.; LOWE, J.E.; HARCOURT, S.A.; WAUGH, A.P.W.; COLE, J.; ROZA, L.; DIFFEY, B.L.; MORI, T.; NIKAIDO, O. ; GREEN, M.H.L. Hypersensitivity of human lymphocytes to UV-B and solar irradiation. *Cancer Res.*, v. 53, p. 609-614, 1993.
- BARNETT, Y.A.; KING, C.M. An investigation of antioxidant status, DNA repair capacity and mutation as a function of age in humans *Mutat. Res.*, v. 338, p. 115-128, 1995.
- BOHR, V.A.; EVANS, M.K.; FORNACE Jr., A.J. Biology of disease. DNA repair and its pathogenetic implications. *Lab. Invest.*, v.50, p.945-950, 1989.
- BOICE, J.D.Jr.; MORIN, M.M.; GLASS, A.G.; FRIEDMAN, G.D.; STOVALL, M.; HOOVER, R.N.; FRAUMENI, J.F.Jr. Diagnostic X-ray procedures and risk of leukemia, lymphoma and multiple myeloma. *JAMA*, v.265, n.10, p.1290-1294, 1991.
- BRUGAROLAS, J.; JACKS, T. Double indemnity: p53, BRCA and cancer. *Nature Medicine*, v. 3, n. 7, p.721-722, 1997.

CARDIS, E.; GILBERT, E.S.; CARPENTER, L.; HOWE, G.; KATO, I.; ARMSTRONG, B.K.; BERAL, V.; COWPER, G.; DOUGLAS, A.; FIX, J.; FRY, S.A.; KALDOR, J.; LAVÉ, C.; SALMON, L.; SMITH, P.G.; VOELZ, G.L.; WIGGS, L.D. Effects of low doses and low dose rates of external ionizing radiation: Cancer mortality among nuclear industry works in three countries. *Radiat. Res.*, v. 142, p. 117-132, 1995.

CHERRY, L.M.; HSU, T.C. Bleomycin-induced chromosome damage in lymphocytes of medullary thyroid carcinoma patients and their family members. *Anticancer Res.*, v.3, p.367-371, 1983.

COLLINS, A.; DUSINSKÁ, M.; FRANKLIN, M.; SOMOROVSKÁ, M.; PETROVSKÁ, H.; DUTHIE, S.; FILLION, L.; PANAYIOTIDIS, M.; RASLOVÁ, K.; VAUGHAN, N. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environ. and Mol. mutagenesis*, v. 30, p. 139-146, 1997.

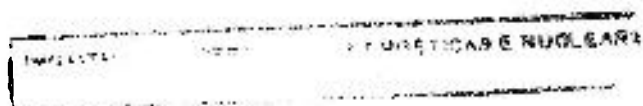
COLLINS, A.R.; AI-GHO M.; DUTHIE, S.J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat. Res.*, v. 336, , p.69-77, 1995.

DELIC, J.; MAGDELÉNAT, H.; BARBAROUX, C.; CHAILLET, M.P.; DUBRAY, B.; GLUCKMAN, E.; FOURQUET, A.; GIRINSKY, T.; COSSET, J-M. *In vivo* induction of apoptosis in human lymphocytes by therapeutic fractionated total body irradiation. *The British Journal of Radiology*, v.68, p.997-1003, 1995.

DICKSON, R.B.; LIPPMAN, M.E. Molecular basis of breast cancer In: MENDELSON J.; HOWLEY P. M.; ISRAEL M. A.; LIOTTA L. A. *The Molecular Basis of Cancer*. Philadelphia: Saunders Company, 1995. p. 358-384.

DUFFAUD, F.; ORSIÈRE, T.; VILLANI, P.; PELISSIER, ^aL.; VOLOT, F.; FAIRE, R.; BOTTA, A. Comparison between micronucleated lymphocytes rates observed in health subjects and cancer patients. *Mutagenesis*, v. 12,n. 4, p. 227-231, 1997.

- EASTON, D.F. Cancer risks in A-T heterozygotes. *Int. J. Radiat. Biol.*, v.64 (suppl), S, p.177-182, 1994.
- FAIRBAIRN, D.W.; OLIVE, P.L.; O'NEILL, K.L. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.*, v.339, p. 37-59, 1995.
- FEARON E. R. Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. *Science*, v. 278, p. 1043-1050, 1997.
- FENECH, M.; MORLEY, A.A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res.*, v.147, p. 29-36, 1985.
- FENECH, M.; MORLEY, A.A. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effects of *in vivo* ageing and low dose X-irradiation. *Mutat. Res.*, v. 161, p. 193-198, 1986.
- FORAY, N.; PRIESTLEY, A.; ALSBEIH, G.; BADIE, C.; CAPULAS, E.P. ARLETT, C.F.; MALAISE, E.P. Hypersensitivity of ataxia telangiectasia fibroblasts to ionizing radiation is associated with a repair deficiency of DNA double-strand breaks *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 72, n.3, p. 271-283, 1997.
- GARVIN, A.M.; ATTENHOFER-HANER, M.; SCOTT, R.J. BRCA1 and BRCA2 mutation analysis in 86 early onset breast /ovarian cancer patients. *J. Med. Genetic*, v. 34, p. 990-995, 1997.
- GEDIK, C.M.; EWEN, S.W.B.; COLLINS, A.R. Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, v.62, n.3, p.313-320, 1992.
- HALL E. J. Radiobiology for the radiologist. Philadelphia: Lippincott Company, 1994.
- HALL, J. M.; LEE, M. K.; NEWMAN, B.; MORROW, J.E.; ANDERSON, L.A.; HUEY, B.; KING, M.C. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21 *Science*, v. 250, p. 1684-1689, 1990.
- HARRIS, C.C. Chemical and Physical Carcinogenesis: Advances and perspectives for the 1990s¹. *J. Cancer Research Suppl*, v.51, p.5013s-5044, 1991.



- HARRIS, J.R.; LIPPMAN, M.E.; VERONESI, U.; WILLETT, W. Breast cancer. *New Engl.J.Med.*, v.327, p.319-328, 1992.
- HARTMANN, A.; FENDER, H.; SPEIT, G. Comparative biomonitoring study of workers at a waste dispositional site using cytogenetic tests and comet (Single-Cell Gel) assay. *Environ. and Mol. mutagenesis*, v. 32, p.17-24, 1998.
- HARTMANN, A.; SPEIT, G. Genotoxic effects of chemicals in the single cell gel (SCG) test with human blood cells in relation to the induction of sister-chromatid exchanges (SCE). *Mutat.Res.*, v.346, p.49-56, 1995.
- HELZLSOUER, K.J.; HARRIS, E.I.; PARSHAD, R.; PERRY, H.R.; PRICE, F.M.; SANFORD, K.K.; Familial clustering of breast cancer: Possible interaction between DNA repair proficiency and relation exposure in the development of breast cancer. *Int. J. Cancer*, v. 64 (1), p. 14-17, 1995.
- HELZLSOUER, K.J.; HARRIS, E.L.; PARSHAD, R.; PERRY, H.R.; PRICE, F.M.; SANFORD, K.K. DNA repair proficiency: potential susceptibility factor for breast cancer. *J. of the Nat. Cancer Institute*, v. 88, n. 11, p. 754-755, 1996.
- HENDERSON, I. C. Cáncer de mama. In: MURPHY, G.P.; LAWRENCE, W.Jr.; LENHARD, R.E.Jr.. *Oncología Clínica – Manual de la American cancer society*. Washington: Organización Panamericana de La Salud, 1996. p. 224-248.
- HILLEBRANDT, S.; STREFFER, C.; REINERS, C.H.R.; DEMIDCHIK, E. Mutations in the p53 tumour suppressor gene in thyroid tumours of children from areas contaminated by the Chernobyl accident. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 69, n. 1, p. 39-45, 1996.
- HOFFMAN, D.A.; LONSTEIN, J.E.; MORIN, M.M.; VISSCHER, W.; HARRIS, B.S.; BOICE, J.D.Jr.; Breast cancer in woman with scoliosis exposed to multiple diagnostic X rays. . *J.Natl. Cancer Inst.*, v.81, n.17, p.1307-1312, 1989.
- HOLLSTEIN, M., SIDRANSKY, D., VOGELSTEIN, B., HARRIS, C.C. p53 Mutation in human cancer. *Science*, v. 253, p. 49-53, 1991.

- HOWE, G.R. Lung cancer mortality between 1950 and 1987 after exposure to fractionated moderate-dose-rate ionizing radiation in the Canadian fluoroscopy cohort study and a comparison with lung cancer mortality in the atomic bomb survivors study. *Rad. Res.*, v. 142, p. 295-304, 1995.
- HSU, T.C. Genetic predisposition to cancer with special reference to mutagen sensitivity. *In vitro*, v.23, p.591-603, 1987.
- HSU, T.C. Genetic susceptibility to carcinogenesis. *Cancer Bull.*, v.38, p.125-128, 1986.
- HSU, T.C.; PATHAK, S.; SAMAAAN, N.; HICKEY, R.C. Differential mutagen susceptibility in cultured lymphocytes of normal individuals and cancer patients. *Cancer Genet. Cytogenet.*, v. 17, p. 307-313, 1985.
- HSU, T.C.; JOHNSTON, D.A.; CHERRY, L.M.; RAMKISSOON, D.; SCHANTZ, S.P.; JESSUP, J.M.; WINN, R.J.; SHIRLEY, L.; FURLONG, C. Sensitivity to genotoxic effects of bleomycin in humans: possible relationship to environmental carcinogenesis. *Int. J. Cancer*, v.43, p. 403-409, 1989.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA/PRO-ONCO) - MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 1999. Rio de Janeiro, 1999.
- INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Biological Dosimetry: chromosomal aberration analysis for dose assessment. *IAEA*, Vienna, 1986.
- JALOSZYNSKI, P.; KUJAWSKI, M.; CZUB-SWIERCZEK, M.; MARKOWSKA, J.; SZYFTER, K. Bleomycin-induced DNA damage and its removal in lymphocytes of breast cancer patients studied by comet assay. *Mutat. Res.*, v. 385, p.223-233, 1997.
- JEGGO, P.A. DNA breakage and repair. *Advances in Genetics*, v. 38, p. 185-218, 1998.
- KING, C.M.; BRISTOW-CRAIG, H.E.; GILLESPIE, E.S.; BARNETT, Y.A. In vivo antioxidant status, DNA damage, mutation and DNA repair capacity in cultured lymphocytes from healthy 75 - to 80 - year - old humans *Mutat. Res.*, v. 377, p. 137-147, 1997.

KONDO, S. Mutation and cancer in relation to the atomic-bomb radiation effects. *Jpn. J. Cancer Res.*, v. 79, p. 785-799, 1988.

KOVACS, E.; STUCKI, D.; WEBER, W.; MÜLLER, HJ. Impaired DNA-repair synthesis in lymphocytes of breast cancer patients. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, v. 22, n. 7, p. 863-869, 1986.

KREJA, L. ; SELIG, C.; NOTHDURFT, W. Assessment of DNA damage in canine peripheral blood and bone marrow after total body irradiation using the single-cell gel electrophoresis technique. *Mutat.Res.*, v.359, p.63-70, 1996b.

LANKINEN, M.H.; VILPO, L.M.; VILPO, J.A. UV-and gamma – irradiation – induced DNA single – strand breaks and their repair in human blood granulocytes and lymphocytes. *Mutat.Res.*, v.352, n. 1-2, p.31-38, 1996.

LEVINE, A.J. Tumor supressor genes In: MENDELSON J.; HOWLEY P. M.; ISRAEL M. A.; LIOTTA L. A. *The Molecular Basis of Cancer*. Philadelphia: Saunders Company, 1995. p. 86-104.

LOPES, E.R.; MENDONÇA, G.A.S.; GOLDFARB, L.M.; AGUINAGA, S.; SILVA, V.L.; MATTOS, I.E.; CURADO, M.P.; SAKAMOTO, L.H.; FONSECA, L.A.M.; TABAK, D.; SIQUEIRA, M.S.N.; RUMJANEK, V.M.; ROSEMBERG, J.; MORAES, M.S.A.; BORGES, N.F.; CARDOSO, V.M.; ETGES, V.E. Câncer e meio ambiente. Tabaco, agrotóxicos, radiações, dieta. Um documento para a Conferência Mundial de Ecologia *Rev. Bras. Cancerol.*, v. 36, n. 1, p. 35-64, 1992.

MACHADO, C.R.; MENCK, C.F.M. Human DNA repair diseases: From genome instability to cancer. *Brazilian Journal of Genetics*, v. 20, n. 4, p. 755-762, 1997.

MALCOLMSON, A. M., DAVIES, G., HANSON, J. A., DEELEY, J. O. T., GAFFNEY, C. C., Mc GREGOR, A. D.; KERBY, I. J. Determination of radiation induced damage in lymphocytes using the micronucleus and microgel electrophoresis "Comet" assay. *Eur. J. Cancer*, v. 31A, n.13 e 14, p. 2320-2323, 1995.

- McCARTHY, P.J.; SWEETMAN, S.F.; McKENNA, P.G.; McKELVEY-MARTIN, V.J. Evaluation of manual and image analysis quantification of DNA damage in the alkaline comet assay. *Mutagenesis*, v.12, n.4, p.209-214, 1997.
- McCURDY, D.; TAI, L-Q.; FRIAS, S.; WANG, Z. Delayed repair of DNA damage by ionizing radiation in cells from patients with juvenile systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Radiat. Res.*, v.147, p.48-54, 1997.
- McKAY, M.; PETERS, L. Genetic determinants of radiation response. Report on a symposium held at Peter MacCallum Cancer Institute, Melbourne, Australia, 8 August 1996. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 71, n. 2, p. 225-229, 1997.
- McKELVEY-MARTIN, V.J.; GREEN, M.H.L.; SCHMEZER, P.; POOL-ZOBEL, B.L.; DE MÉO, M.P.; COLLINS, A. The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): A European review. *Mutat. Res.*, v.288, p. 47-63, 1993.
- MENDELSON J.; HOWLEY P. M.; ISRAEL M. A.; LIOTTA L. A. *The Molecular Basis of Cancer* 1^o Ed. W. B. Saunders Company - Philadelphia, 1995.
- MENDIOLA-CRUZ, M.T., MORALES-RAMÍREZ, P. Repair kinetics of gamma-ray induced DNA damage determined by the single cell gel electrophoresis assay in murine leukocytes in vivo. *Mutat. Res.*, v. 433, p. 45-52, 1999.
- MENDONÇA, G. A. ES.; PINHEIRO, L.R.; DA SILVA, M.G.C.; GADELHA, M.I.P.; TEIXEIRA, M.T.B. O problema do câncer no Brasil. Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Câncer, Coordenação de Programa de Controle de Câncer (Pro-Onco): p.1-43, 1992.

MIKI, Y.; SWENSEN, J.; SHATTUCK-EIDENS, D.; FUTREAL, P.A.; HARSHMAN, K.; TAVTIGIAN, S.; LIU, Q.; COCHRAN, C.; BENNETT, L.M.; DING, W.; BELL, R.; ROSENTHAL, J.; HUSSEY, C.; TRAN, T.; McCLURE, M.; FRYE, C.; HATTIER, T.; PHELPS, R.; HAUGEN-STRANO, A.; KATCHER, H.; YAKUMO, K.; GHOLAMI, Z.; SHAFFER, D.; STONE, S.; BAYER, S.; WRAY, C.; BOGDEN, R.; DAYANANTH, P.; WARD, J.; TONIN, P.; NAROD, S.; BRISTOW, P.K.; NORRIS, F.H.; HELVERING, L.; MORRISON, P.; ROSTECK, P.; LAI, M.; BARRET, J.C.; LEWIS, C.; NEUHAUSEN, S.; CANNON-ALBRIGHT, L.; GOLDGAR, R.; WISEMAN, R.; KAMB, A.; SKOLNICK, M.H. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1 *Science*, v. 266, p. 66-71, 1994.

MOLLER, P.; KNUDSEN, L.E.; FRENTZ, G.; DYBDAHL, M.; WALLIN, H.; NEXO, B.A. Seasonal variation of DNA damage and repair in patients with non-melanoma skin cancer and referents with and without psoriasis. *Mutat. Res.*, v. 407, v. 1, p. 25-34, 1998.

MÜLLER, W.U.; BAUCH, T.; STREFFER, C.; NIEDEREICHHOLZ, F.; BÖCKER, W. Comet assay studies of radiation-induced DNA damage and repair in various tumour cell lines. *Int. J. Radiat. Biol.*, v.65, n.3, p. 315-319, 1994.

MURAKAMI, M.S.; STROBEL, M.C.; WOUDE, G.F. Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs In: MENDELSON J.; HOWLEY P. M.; ISRAEL M. A.; LIOTTA L. A. *The Molecular Basis of Cancer*. Philadelphia: Saunders Company, 1995. p. 3-17.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Cancer incidence public. US Department of Health and Human Services, *Public Health Service*, 1998.

OLIVE, P.L. The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation. *Rad. Res.*, v. 150, p. 42-51, 1998.

OLIVE, P.L.; BANÁTH, J.P. Detection of DNA double-strand breaks through the cell cycle after exposure to X-rays, bleomycin, etoposide and ¹²⁵IdUrd. *Int. J. Radiat. Biol.*, v.64, n.4, p. 349-358, 1993.

OLIVE, P.L.; BANÁTH, J.P.; DURAND, R.E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "Comet" assay. *Radiat. Res.*, v.122, p. 86-94, 1990.

- ÖSTLING, O.; JOHANSON, K.J. Bleomycin, in contrast to gamma irradiation, induces extreme variation of DNA strand breakage from cell to cell. *Int. J. Radiat. Biol.*, v.52, n.5, 683-691, 1987.
- ÖSTLING, O.; JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.123, p. 291-295, 1984.
- PARSHAD, R.; PRICE, F.M.; BOHR, V.A.; COWANS, K.H.; ZUJEWSKI, J.A.; SANFORD, K.K. Deficient DNA repair capacity, a predisposing factor in breast cancer. *British Journal of Cancer*, v. 74, p. 1-5, 1996.
- PARSHAD, R.; SANFORD, K.K.; JONES, G.M.; Chromatid damage after G2 phase x-irradiation of cells from cancer-prone individuals implicates deficiency in DNA repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 5612-5616 (1983).
- PERERA, F. P. Environment and cancer: Who are susceptible?. *Science*, v. 278, p. 1068-1073, 1997.
- PERO, R.W.; MILLER, D.G.; LIPKIN, M.; MARKOWITZ, M.; GUPTA, S.; WINAWER, S.J.; ENKER, W.; GOOD, R. Reduced capacity for DNA repair synthesis in patients with or genetically predisposed to colorectal cancer. *J.Natl. Cancer Inst.*, v.70, n.5, p.867-875, 1983.
- PIKE, M.C.; KRAILO, M.D.; HENDERSON, B.E.; CASAGRANDE, J.T.; HOEL, D.G. Hormonal risk factors, breast tissue age and the age-incidence of breast cancer *Nature*, v. 303, p.767-770, 1983.
- PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescent hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 583, p. 2934-2938, 1986.
- POWELL, S.; McMILLAN, T.J. DNA damage and repair following treatment with ionizing radiation. *Radiotherapy and Oncology*, v.19, p.95-108, 1990.
- PRICE, A. The repair of ionising radiation-induced damage to DNA. *Cancer Biology*, v. 4, p. 61-71, 1993.

- RIGAUD, O., GUEDENEY, G., DURANTON, I., LEROY, A., DOLOY, M.T., MAGDELENAT, H. Genotoxic effects of radiotherapy and chemotherapy on the circulating lymphocytes of breast cancer patients. II. Alteration of DNA repair and chromosome radiosensitivity. *Mutat. Res.*, v. 242, p. 25-35, 1990.
- ROSEN, N. Oncogenes In: MENDELSON J.; HOWLEY P. M.; ISRAEL M. A.; LIOTTA L. A. *The Molecular Basis of Cancer*. Philadelphia: Saunders Company, 1995. p. 105-116.
- SANFORD, K.K.; PARSHAD, R.; PRICE, F.M.; TARONE, R.E.; SCHAPIRO, M.B. X-ray-induced chromatid damage in cells from Down syndrome and Alzheimer disease patients in relation to DNA repair and cancer proneness. *Cancer Genet. Cytogenet.*, v. 70, n. 1, p. 25-30, 1993.
- SANFORD, K.K.; PARSHAD, R.; GANTT, R.; TARONE, R.E.; JONES, G.M.; PRICE, F.M. Factors affecting and significance of G₂ chromatin radiosensitivity in predisposition to cancer. *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 55, p. 963-981, 1989.
- SANKARANARAYANAN, K., CHAKRABORTY, R. Cancer predisposition, radiosensitivity and the risk of radiation-induced cancer. I. Background. *Radiat. Res.*, v. 143, p. 121-143, 1995.
- SARTO, F.; FINOTO, S.; GIACOMELLI, L.; MAZZOTTI, D.; TOMANIS, R.; LEVIS, A.G. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. *Mutagenesis*, v. 2, n. 1, p. 11-17, 1987.
- SCHANS, G.P.; van LOON, A.A.; GROENENDIJK, R.H.; BAAN, R.A. Detection of DNA damage in cells exposed to ionizing radiation by use of anti-single – stranded DNA monoclonal antibody. *Int. J. Radiat. Biol.* v. 55, n.5, p. 747-760, 1989.
- SCHANTZ, P. S.; ZHANG, Z.; MARGARET, S.S.; SUN, M.; HSU, T.C. Genetic susceptibility to head and neck cancer: Interaction between nutrition and mutagen sensitivity. *Laryngoscope*, v. 107, p. 765-781, 1997.

- SCHMUTZLER, R.K.; BIERHOFF, E.; WERKHAUSEN, T.; FIMMERS, R.; SPEISER, P.; KUBISTA, E.; KREBS, D.; ZEILLINGER, R.; WIESTLER, O.D.; DEIMLING, A.V. Genomic deletions in the BRCA1, BRCA2 and TP53 regions associate with low expression of the estrogen receptor in sporadic breast carcinoma. *Int. J. Cancer*, v. 74, p.322-326, 1997.
- SCOTT, D.; BARBER, J.B.P.; LEVINE, E.L.; BURRILL, W.; ROBERTS, S.A. Radiation-induced micronucleus induction in lymphocytes identifies a high frequency of radiosensitive cases among breast cancer patients: a test for predisposition? *British Journal of cancer*, v. 77, p. 614-620, n. 4, 1998.
- SETLOW, R.B. Repair deficient human disorders and cancer. *Nature*, v. 271, p. 713-717, 1978.
- SINGH, N.P.; DANNER, D.B.; TICE, R.R.; BRANT, L; SCHNEIDER, E.L. DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *Mutat. Res.*, v.237,p. 123-130, 1990.
- SINGH, N.P.; DANNER, D.B.; TICE, R.R.; McCOY,M.T.; COLLINS, G.D.; SCHNEIDER, E.L. Abundant alkali-sensitive sites in DNA of human and mouse sperm. *Exp. Cell Res.*, v.184, p. 461-470, 1989.
- SINGH, N.P.; McCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, v.175, p. 184-191, 1988.
- SINGH, N.P.; STEPHENS, R.E. Microgel electrophoresis: Sensitivity, mechanisms, and DNA electrostretching. *Mutat. Res.*, v. 383, p. 167-175, 1997.
- SUGIMURA, T. Multistep Carcinogenesis: a 1992 perspective. *Science*, v. 258, p. 603-607, 1992.
- SWIFT, M. Ionizing radiation, breast cancer, and ataxia-telangiectasia *Journal of the National Cancer Institute*, v. 86, n. 21, p.1571-1572, 1994.

SZYFTER, K.; WIKTOROWICZ, K.; WIELGOSZ, M.S.; ZAJACZEK, S.; KUJAWSKI, M.; JALOSZYNSKI, P.; CZUB, M.; MARKOWSKA, J. Relationship between DNA replication and DNA repair in human lymphocytes proliferating in vitro in the presence and in absence of mutagen. *J. Appl. Genet.*, v.36, n.4, p.379-388, 1995.

THACKER, J. Cellular radiosensitivity in ataxia-telangiectasia *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 66, n.6, p. S87-S96, 1994.

THOMPSON, D.E.; MABUCHI, K.; RON, E.; SODA, M.; TOKUNAGA, M.; OCHIKUBO, S.; SUGIMOTO, S.; IKEDA, T.; TERASAKI, M.; IZUMI, S.; PRESTON, D.L. Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part II: Solid tumors, 1958-1987. *Rad. Res.*, v. 137, p. 17-67, 1994.

THOMPSON, M.W.; McINNES, R.R.; WILLARD, H.F. *Genética Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1993.

UDUMUDI, A., JAISWAL, M., RAJESWARI, N., DESAI, N., JAIN, S., BALAKRISHNA, N., VISWESWARA RAO, K., AHUJA, Y.R. Risk assessment in cervical dysplasia patients by single cell gel electrophoresis assay: a study of DNA damage and repair. *Mutat. Res.*, v. 412, p. 195-205, 1998.

VAGHEF, H., NYGREN, P., EDLING, C., BERGH, J., HELLMAN, B. Alkaline single-cell gel electrophoresis and human biomonitoring for genotoxicity: a pilot study on breast cancer patients undergoing chemotherapy including cyclophosphamide. *Mutat. Res.*, v. 395, p. 127-138, 1997.

VAN BEKKUM, D.W.; BROERSE, J.J. Induction of mammary tumors by ionizing radiation *Radiat. Environ Biophys*, v. 30, p.217-220, 1991.

VENKATACHALAM, P.; SOLOMON, P.F.D.; MOHANKUMAR, M.N.; PRABHU, B. K.; GAJENDIRAN, N.; KATHIRESAN, A.; JEEVANRAM, R.K. Higher frequency of dicentrics and micronuclei in peripheral blood lymphocytes of cancer patients. *Mutat. Res.*, v. 425, p. 1-8, 1999.

VENKITARAMAN, A.R. Breast cancer genes and DNA repair. *Science*, v. 286, p. 1100-1102, 1999.

- VIJAYALAXMI; STRAUSS, G.H.S.; TICE, R.R. An analysis of γ -ray-induced DNA damage in human blood leukocytes, lymphocytes and granulocytes. *Mutat. Res.*, v.292, p. 123-128, 1993.
- VIJAYALAXMI; TICE, R.R.; STRAUSS, G.H.S. Assessment of radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single-cell gel electrophoresis technique. *Mutat. Res.*, v.271, p. 243-252, 1992.
- VISVARDIS, E.E.; TASSIOU, A.M.; PIPERAKIS, S.M. Study of DNA damage induction and repair capacity of fresh and cryopreserved lymphocytes exposed to H₂O₂ and γ -irradiation with the alkaline comet assay. *Mutat. Res.*, v.383, p.71-80, 1997.
- WEI Q., CHENG L., HONG W. K., SPITZ M. R. Reduced DNA repair capacity in lung cancer patients. *Cancer Res.*, v. 56, p. 4103-4107, 1996.
- WEISTEIN, I. B.; CAROTHERS, A.M.; SANTELLA, R.M.; PERERA, F. P. Molecular mechanisms of mutagenesis and multistage carcinogenesis In: MENDELSON J.; HOWLEY P. M.; ISRAEL M. A.; LIOTTA L. A. *The Molecular Basis of Cancer*. Philadelphia: Saunders Company, 1995. p. 59-85.
- WOOSTER, R.; NEUHAUSEN, S.L.; MANGION, J.; QUIRK, Y.; FORD, D.; COLLINS, N.; NGUYEN, K.; SEAL, S.; TRAN, T.; AVERILL, D.; FIELDS, P.; MARSHALL, G.; NAROD, S.; LENOIR, G.M.; LYNCH, H.; FEUNTEUN, J.; DEVILEE, P.; CORNELISSE, C.J.; MENKO, F.H.; DALY, P.A.; ORMISTON, W.; McMANUS, R.; PYE, C.; LEWIS, C.M.; CANNON-ALBRIGHT, L.A.; PETO, J.; PONDER, B.A.J.; SKOLNICK, M.H.; EASTON, D.F.; GOLDFAR, D.E.; STRATTON, M.R. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13 q12-13 *Journal of the National Cancer Institute*, v. 86, n. 21, p.1571-1572, 1994.