

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO MUTAGÊNICA EM PACIENTES EXPOSTOS À
RADIAÇÃO: ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DO DANO GENÉTICO E
POLIMORFISMOS DOS GENES DE REPARO.**

FERNANDA DO AMARANTE

Julho/2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO MUTAGÊNICA EM PACIENTES EXPOSTOS À
RADIAÇÃO: ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DO DANO GENÉTICO E
POLIMORFISMOS DOS GENES DE REPARO.**

FERNANDA DO AMARANTE

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Leistner Segal

Tese apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Doutor pelo
Programa de Pós-Graduação em Medicina:
Ciências Médicas, UFRGS.

Porto Alegre, Julho de 2014

CIP - Catalogação na Publicação

AMARANTE, FERNANDA DO
INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO MUTAGÊNICA EM PACIENTES
EXPOSTOS À RADIAÇÃO: ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DO DANO
GENÉTICO E POLIMORFISMOS DOS GENES DE REPARO. /
FERNANDA DO AMARANTE. -- 2014.
89 f.

Orientadora: SANDRA LEISTNER-SEGAL.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2014.

1. RADIAÇÃO IONIZANTE DE BAIXA DOSE. 2. DANO AO
DNA. 3. ENSAIO COMETA. 4. TESTE MICRONÚCLEO. 5. GENES
DE REPARO XRCC1 E XRCC3. I. LEISTNER-SEGAL, SANDRA,
orient. II. Título.

*À minha família & Ao meu grande Amor e
Companheiro Lucas!*

Agradecimentos

- ' A Profª. Drª. Sandra Leistner Segal por todas as orientações, apoio, incentivo e muita paciência.
- ' Ao Prof. Dr. Sharbel Weidner Maluf pelo apoio, orientações e incentivo à pesquisa.
- ' Às Equipes de Medicina Nuclear do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e de Hemodinâmica do Instituto de Cardiologia de Porto Alegre pela colaboração para execução deste trabalho, em especial à Dra. Ilza V. Moraes, Dr. Cristiano Cardoso e ao Físico Rogério Fachel de Medeiros.
- ' À colega Roberta Passos Palazzo pela atenção e paciência dispensada com no ensino das técnicas de danos.
- ' A colega Tamires Marostega, por todo tempo dispensado e carinho pelo projeto.
- ' A todas as pessoas que se envolveram de certa forma para que este trabalho fosse possível.
- ' Ao apoio da FAPERGS, CNPq e FIPE/HCPA.
- ' Ao programa de Pós Graduação em Ciências Médicas pela oportunidade da minha formação de doutorado.

Resumo

Introdução: As radiações ionizantes produzem efeitos na molécula do DNA e o biomonitoramento in vivo pode ser utilizado para melhor avaliar o nível de exposição interna à radiação. Os agentes genotóxicos em populações expostas geram diferentes danos ao DNA e por existir uma variabilidade genética isso acarreta sensibilidades diferentes a estes agentes. Essa variação pode ser explicada pela existência de polimorfismos genéticos envolvidos no processo de reparo, entre eles o XRCC1 e XRCC3, responsáveis por manter a integridade do genoma das células frente a danos causados pelos agentes mutagênicos, como a radiação ionizante. **Objetivo:** Avaliar os efeitos mutagênicos da exposição à radiação x e gama em pacientes que realizam cintilografia miocárdica e angioplastia miocárdica e relacionar os possíveis resultados positivos com os polimorfismos dos genes de reparo, XRCC1 e XRCC3. **Materiais e Métodos:** Foram selecionados 57 pacientes expostos à radiação gama, e 57 expostos à radiação X. A análise da instabilidade genômica foi realizada através dos testes do micronúcleo e cometa, e a genotipagem através de sonda de TaqMan, para os polimorfismos do gene de reparo XRCC1 e XRCC3. **Resultados e Conclusões:** Em nosso estudo, os dados encontrados demonstram que ocorre dano ao DNA, após a exposição à radiação gama ($p=0,026$). No entanto, não observamos ocorrer influência dos diferentes genótipos em ambos polimorfismos estudados, Arg399Gln e Thr241 Met, embora a presença do genótipo mutado Met/Met, parece ter indicado menor radiosensibilidade. Apesar desta diferença não ter alcançado os níveis de significância esperados, este resultado está de acordo com dados da literatura que indicam que este genótipo poderia estar associado à capacidade de reparação do DNA. Neste mesmo grupo, não encontramos diferenças estatisticamente significativas para aberrações cromossômicas (MN e NBUDs) após a exposição, para ambos polimorfismos, exceto para o genótipo normal Arg/Arg ($p=0,012$), que parece ter indicado maior radiosensibilidade à exposição, estando de acordo com trabalhos da literatura, os quais demonstram que, este genótipo pode ser associado com a diminuição da capacidade de reparo do DNA, apresentando níveis mais altos de quebras induzidas. As evidências de radiosensibilidade celular também podem ser

explicadas pela alteração da proteína resultante do polimorfismo que não corrige os danos ao DNA, podendo aumentar o acúmulo de lesões no material genético, possivelmente pelo efeito da dose, tempo e tipo de exposição da radiação. Já no grupo de pacientes expostos à radiação X, observamos que não ocorre aumento nos níveis de danos ao DNA após a exposição ($p=0,004$) e que não existe efeito de ambos polimorfismos estudados, exceto para o genótipo mutado Met/Met que parece determinar maior radiosensibilidade ($p=0,041$). Para este grupo, observamos que ocorre aumento nas frequências de MN ($p<0,001$) e NBUDs ($p<0,001$), mas que os diferentes genótipos não influenciaram diferenças para estes achados. Para os dados de aberrações cromossômicas, encontrados neste grupo, a superexposição radiológica pode ser a interpretação dos achados, já que os detectores planos dos equipamentos utilizados aumentam em torno de 65% a exposição aos pacientes, quando comparados aos antigos intensificadores de imagens. **Palavras-Chave:** Radiação ionizante de baixa dose, Dano do DNA, Ensaio cometa, CBMN, Genes de Reparo, XRCC1, XRCC3.

Abstract

Introduction: Ionizing radiations produce effects on the DNA molecule and biomonitoring in vivo may be used to better assess the level of internal radiation exposure. Genotoxic agents in exposed populations generate different DNA damage, and there is a genetic variation in sensitivity to these agents. This variation can be explained by the existence of genetic polymorphisms involved in the repair process, including XRCC1 and XRCC3, responsible for maintaining genome integrity of the cell by the damage caused by mutagenic agents, such as ionizing radiation. **Objective:** Assess the mutagenic effects of exposure to x and gamma radiation in patients undergoing myocardial scintigraphy and coronary angioplasty and relate the possible positive result with polymorphisms of repair genes, XRCC1 and XRCC3. **Materials and Methods:** 57 patients exposed to gamma radiation, and 57 exposed to x radiation were selected. Analysis of genomic instability was performed by the micronucleus comet assay, and genotyping using TaqMan probe for polymorphisms XRCC1 and XRCC3 repairing genes. **Results and Conclusions:** In our study the data found demonstrate that DNA damage occurs after exposure to gamma radiation ($p=0.026$). However, we did not observed influence of the different genotypes for both polymorphisms, Arg399Gln and Thr241Met, although the presence of the mutated genotype Met/Met seems to be less radiosensitive. Despite this difference did not reach statistical significance, this result is in agreement with data reported in the literature indicating that this genotype might be associated with the ability of DNA repair. In this group, we found no statistically significant differences in chromosomal aberrations (MN and NBUDs) after exposure for both polymorphisms, except for the normal genotype Arg/Arg ($p= 0.012$), that seems to have shown greater radiosensitivity exposure, which is consistent with literature studies, which demonstrate that this genotype may be associated with decreased DNA repair capacity, showing higher levels of induced breaks. Evidence of cellular radiosensitivity may also be explained by the alteration of the protein resulting from polymorphism that does not correct the DNA damage and

may increase the accumulation of lesions in the genetic material, possibly the effect of the dose, time and type of radiation exposure. In the group of patients exposed to x-radiation, we observe that no increase in the levels of DNA damage after exposure ($p=0.004$) and that there is no effect of both polymorphisms studied, except for the mutated genotype Met / Met that seems to determine higher radiosensitivity ($p=0.041$). For this group, we observed an increase in the frequency of MN ($p<0.001$) and NBUDs ($p<0.001$), but the different genotypes did not influence differences for these findings. For the data of chromosomal aberrations found in this group, radiological overexposure may be the interpretation of the findings, since the flat detectors of the equipment used increase around 65% exposure to patients, when compared to the old image intensifiers. **Keywords:** Low dose of ionizing radiation, DNA damage, comet assay, CBMN, Repair Genes, XRCC1, XRCC3.

Lista de Tabelas

Tabelas do Artigo

Tabela 1- Características da amostra estudada	62
Tabela 2- Frequência de Micronúcleos, BUDs e Dano de acordo com Teste Cometa.....	63
Tabela 3- Frequência Genotípica e Alélica dos Pacientes Expostos	64
Tabela 4- Comparação entre as médias dos Danos nos diferentes genótipos .	66
Tabela 5- Comparação entre as médias dos MN nos diferentes genótipos.....	67
Tabela 6- Comparação entre as médias dos NBUDs nos diferentes genótipos.	69

Lista de Figuras

Lista de Figuras da Revisão de Literatura

- Figura 1-** Estratégias de busca sobre as bases que fundamentam esta tese. 20
- Figura 2-** Estratégias de busca sobre as bases que fundamentam o artigo.... 22
- Figura 3** -Efeitos Diretos e Indiretos da Radiação Ionizante no DNA 27
- Figura 4-** Ilustração das Etapas da Técnica do Cometa32
- Figura 5-** Demonstração dos linfócitos processados pela Técnica do Cometa ..32
- Figura 6-** Linfócitos Processados pela Técnica do Micronúcleo35

Lista de Abreviaturas e Siglas

<i>Arg</i>	<i>Arginina</i>
<i>BER</i>	<i>Reparo por Excisão de Base</i>
<i>BUD</i>	<i>Nuclear bud</i>
<i>CBMN</i>	<i>Cytokinesis-blocked micronucleus</i>
<i>DNA</i>	<i>Ácido Desoxirribonucléico</i>
<i>Gln</i>	<i>Glutamina</i>
<i>LET</i>	<i>Transferência Linear de Energia</i>
<i>Met</i>	<i>Metionina</i>
<i>MN</i>	<i>Micronúcleo</i>
<i>NPB</i>	<i>Nucleoplasmic bridges</i>
<i>PCR- RT</i>	<i>Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real</i>
<i>RNA</i>	<i>Ácido Ribonucléico</i>
<i>SCGE</i>	<i>Single-cell gel electrophoresis</i>
<i>SNP</i>	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
<i>Thr</i>	<i>Trionina</i>
<i>XRCC1</i>	<i>X-Ray Repair Crosscomplementig Group 1</i>
<i>XRCC3</i>	<i>X-Ray Repair Crosscomplementig Group 3</i>
¥	<i>Concentração</i>
ϵ^-	<i>Elétron</i>
Γ	<i>Raios Gama</i>
h_ν	<i>Fóton</i>

Sumário

1.INTRODUÇÃO	15
1.1 Introdução Geral	15
2.REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Estratégias para Selecionar e Organizar Informações.....	19
2.2 Radiação Eletromagnética	22
2.3 Efeitos Biológicos das Radiações Ionizantes.....	23
2.3.1 Mecanismos de Interação das Radiações com o Tecido.....	24
a) Ação Direta da Radiação	26
b) Ação Indireta da Radiação.....	26
2.3.2 Produção de Elétrons Hidratados e Radicais Livres	27
2.3.3 Danos Radioinduzidos na Molécula de DNA	29
2.4 Monitoramento/Dosimetria Interna Individual.....	30
2.4.1 Linfócitos.....	30
2.4.2 Técnicas de Avaliação de Dano de DNA.....	31
a) Ensaio Cometa.....	31
b) Teste do Micronúcleo.....	34

2.5 Danos no DNA e Sistema de Reparo	36
2.5.1 Polimorfismos dos Genes de Reparo	37
a) X- Ray Repair Crosscomplementing Group 1 (XRCC1).....	37
b) X- Ray Repair Crosscomplementing Group 3 (XRCC3).....	38
2.5.2 Análise Molecular dos Polimorfismos XRCC1 e XRCC3	39
a) Reação de Polimerização em Cadeia - (PCR-RT).....	39
3. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DE LITERATURA.....	41
4. OBJETIVOS.....	53
5. ARTIGO EM INGLÊS.....	54
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
7. ANEXO- TCLE- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	88

Introdução

1.1 Introdução Geral

As radiações ionizantes, amplamente utilizadas como métodos de diagnóstico e tratamento produzem ação direta e indireta em tecidos biológicos (1,2).

As radiações de baixas doses têm sido amplamente utilizadas no meio diagnóstico, embora alguns métodos cardiológicos, principalmente intervencionistas utilizam-se de maior de tempo de exposição ao paciente, aumentando assim as doses a eles submetidos. Sabendo-se que as altas doses de exposição são claramente conhecidas por induzir efeitos indiretos na molécula do DNA, ocorrendo assim danos ao DNA, caso o reparo celular não for eficiente em tempo curto podemos ter origem a mutações e possíveis transformações neoplásicas (3,4).

As baixas frequências de índices de dano ao DNA detectadas usualmente na população podem aumentar significativamente em um grupo particularmente exposto à agentes físicos e/ou químicos, como radiações ionizantes, e à

quimioterápicos (4,5,6,7,8). Estas alterações, embora não possam ser usadas para prever se uma determinada pessoa irá sofrer uma forma particular de doença são de grande utilidade na estimativa de riscos da população como um todo (9). Alguns estudos indicam que as aberrações cromossômicas são eventos iniciais na carcinogênese e constituem sinal de alerta em relação ao desenvolvimento de um futuro câncer (10). Travis e colaboradores consideram que o desenvolvimento de câncer consiste em processo que envolve pelo menos três estágios: iniciação, promoção e progressão. O estágio de iniciação pode resultar de alterações genéticas como mutações gênicas, translocações ou outros eventos em um gene específico (11).

O biomonitoramento pode ser usado para melhorar a avaliação do nível de exposição interna à radiação ou a agentes químicos (12). Entre os métodos biológicos adotados para dosimetria a análise citogenética tem sido o mais utilizado. A análise da ocorrência de aberrações cromossômicas em linfócitos do sangue periférico é utilizada há mais de 30 anos como um indicador biológico sensível (12,13). As qualidades exigidas de um indicador biológico (especificidade, habilidade de detecção precoce das alterações induzidas, rapidez, fácil aplicação e baixo custo), para ser um bom dosímetro, é preenchida pela análise dos micronúcleos (MN). A ação de agentes que induzem quebras cromossômicas (agentes clastogênicos) e/ou interfere na divisão celular (agentes aneugênicos) pode ser detectada pelo teste do micronúcleo, e teste do cometa, realizado *in vivo* (14,15).

Populações expostas à agentes com genotoxicidade conhecida, mostram diferenças interindividuais em relação ao dano do DNA. Este fato pode ser

explicado pela existência de polimorfismos genéticos em genes envolvidos nos processos de desintoxicação e reparo de DNA, gerando estas variações (16). Por um lado, uma diminuição na capacidade de reparo gera um aumento na suscetibilidade a mutações e uma maior instabilidade genética (17). Além disto, polimorfismos nas enzimas metabolizadoras de xenobióticos podem ser uma explicação para estas diferenças interindividuais (18), uma vez que alguns químicos adquirem capacidade mutagênica somente após sua metabolização, pois podem induzir trocas gênicas por atingirem direta ou indiretamente o DNA ou por se ligarem a proteínas envolvidas na manutenção da integridade gênica (19).

O sistema de reparo de um indivíduo consiste de um grande número de proteínas codificadas por vários genes, entre eles o XRCC1 e o XRCC3. [29]. Vários polimorfismos já foram detectados no gene XRCC1, e um dos mais investigados é o Arg399Gln, para o qual o alelo raro já foi associado com diferentes tipos de câncer (16,20).

No gene XRCC3, a proteína produzida é responsável pelo reparo de quebras na fita dupla do DNA, além de promover a estabilidade cromossômica e a correta segregação de cromossomos em células (16,17,18,19). Um polimorfismo de troca de aminoácidos denominado Thr241Met do gene XRCC3 tem sido relacionado com câncer de bexiga, melanoma maligno e câncer gástrico (16).

Embora a importância de ambos polimorfismos tenha sido amplamente estudados, não encontramos trabalhos que demonstrem associação dos

polimorfismos com índices de danos causados por radiação ionizante X e gama em pacientes expostos à diagnóstico, justificando assim o nosso estudo.

Revisão de Literatura

2.1 Estratégias para Selecionar e Organizar Informações

Nesta revisão de literatura foram abordados os aspectos abaixo:

- ' Radiações Ionizantes,
- ' Efeitos Biológicos das Radiações Ionizantes,
- ' Danos Radioinduzidos e Sistema de Reparo,
- ' Dosimetrias internas,
- ' Polimorfismos dos Genes de Reparo, XRCC1 e XRCC3.

A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: MEDLINE (PubMed), LILACs, SCIELO, Portal Cochrane. As referências dos artigos identificados foram revisadas para localizar outras possíveis não contempladas na busca das palavras-chaves. Foram utilizados buscas e cruzamentos através dos termos “low dose of radiation ionizing”, “damage DNA”, “genes of repair”, “XRCC1” e “XRCC3”. Foi utilizado filtro para estudos em humanos, publicados nos últimos cinco anos e usou-se delineamentos para revisões sistemáticas, ensaios clínicos e estudos casos e controles.

Figura 1. Estratégias de busca sobre as bases que fundamentam esta tese.

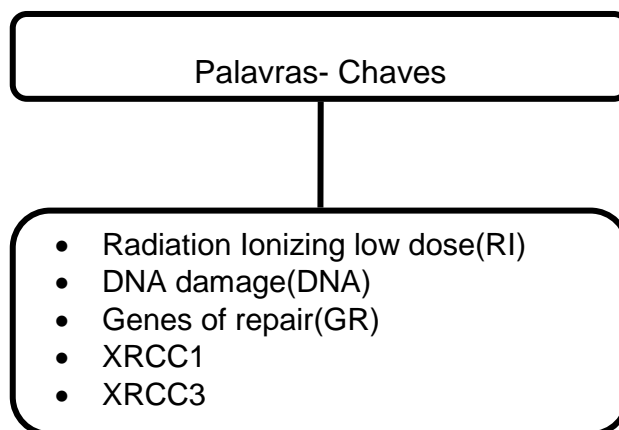
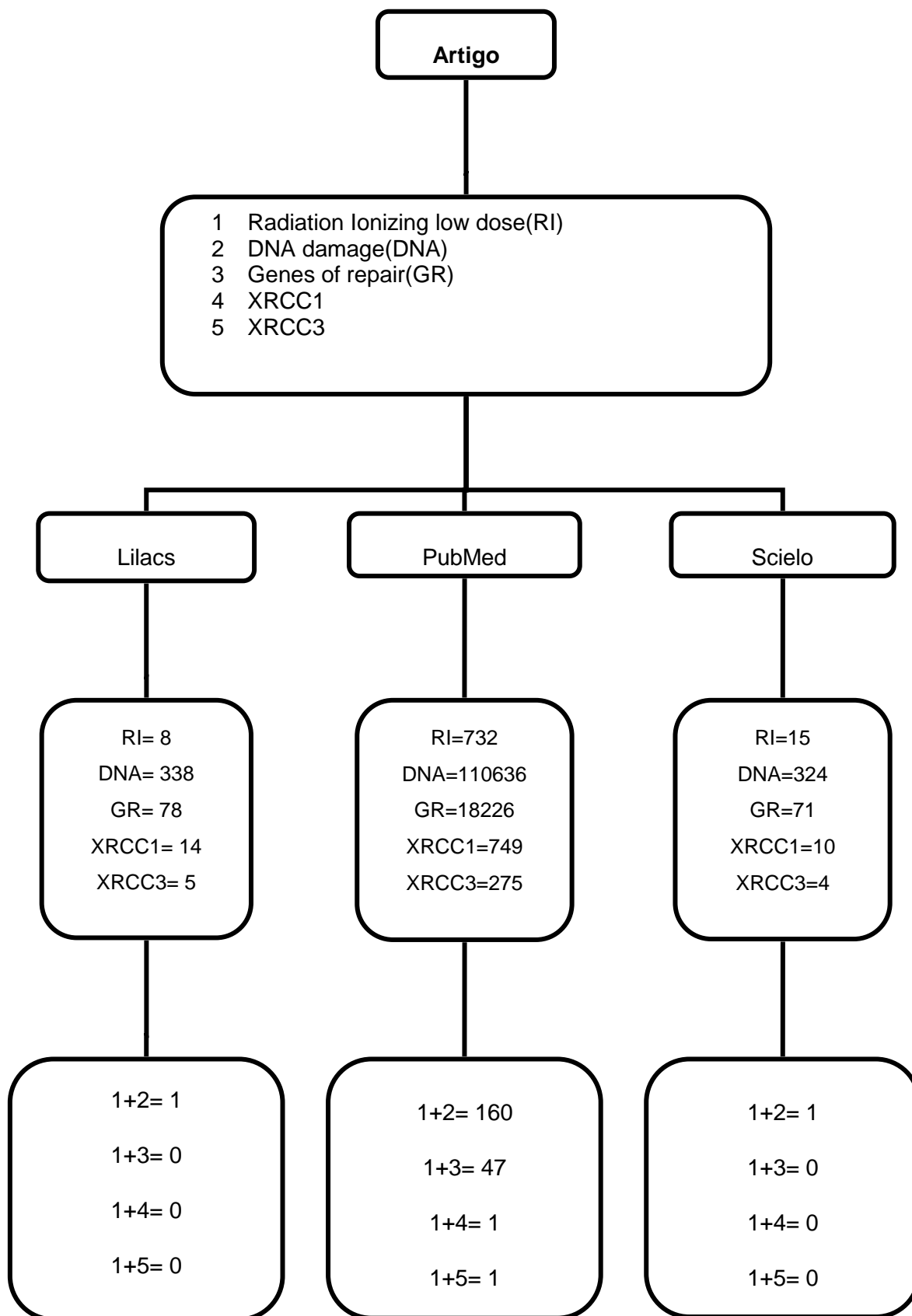


Figura 2. Estratégias de busca sobre as bases que fundamentam o artigo.



2.2 Radiação Eletromagnética

A radiação eletromagnética inclui ondas de rádio, microondas, luz visível, luz ultravioleta, Raios X e Raios gama(γ). Estas ondas são basicamente caracterizadas por sua energia que varia inversamente com o comprimento de onda, estas energias se deslocam em forma de “pacote” e são chamadas de fótons. A energia associada às ondas aumenta progressivamente a partir de ondas de rádio com menos energia, para Raios X e com maior energia para raios γ (20).

Os Raios X são produzidos por dispositivos denominados de tubos de Raios X que consistem, basicamente, em um filamento que produz elétrons por emissão termo iônica (catodo), que são acelerados fortemente por uma diferença de potencial elétrica (kilovoltagem) até um alvo metálico (ânodo), onde colidem. A maioria dos elétrons acelerados são absorvidos ou espalhados, produzindo aquecimento no alvo. Cerca de 5% dos elétrons sofrem reduções bruscas de velocidade, e a energia dissipada se converte em ondas eletromagnéticas, denominadas de Raios X (21).

Os Raios X característicos são radiações eletromagnéticas de alta energia originadas em transições eletrônicas do átomo que sofreu excitação ou ionização, após interação. Elétrons das camadas externas fazem transições para ocupar lacunas produzidas pelas radiações nas camadas internas, próximas do núcleo, emitindo o excesso de energia sob a forma de Raios X.

A radiação gama (γ), é emitida pelo núcleo atômico com excesso de energia (no estado excitado) após transição de próton ou nêutron para nível de energia com valor menor, gerando uma estrutura mais estável. Por depender da estrutura nuclear, a intensidade e a energia com que é emitida permite caracterizar o radioisótopo (20,22,23).

Os fótons X e γ têm a capacidade de ejetar um elétron de sua órbita em um átomo (são radiações ionizantes). A ionização é o processo de remoção de um ou mais elétrons entre átomos pela radiação incidente, deixando para trás as partículas eletricamente carregadas, o que pode, subsequentemente, produzir efeitos biológicos significativos no material irradiado (20,24).

As propriedades da matéria são afetadas pela radiação em função do tipo de processo associado à absorção de energia. Para compreendermos os efeitos biológicos, os Raios x e γ são diretamente ou indiretamente ionizantes, porque eles não produzem danos químicos e biológicos em si, mas produzem elétrons secundários (partículas carregadas) após a absorção de energia no material (20,25,26).

2.3 Efeitos Biológicos das Radiações Ionizantes

No nível atômico, a ionização afeta, principalmente, os elétrons das camadas mais externas que circundam o núcleo. Tendo em vista que justamente esses elétrons estão envolvidos nas ligações químicas de átomos em moléculas. A remoção de elétrons pode provocar a quebra de uma molécula e seus

fragmentos, dependendo da estabilidade química, podem se combinar, de algumas maneiras diferentes, com o material do meio circundante (26,27,28).

A irradiação de material biológico pode resultar em transformação de moléculas específicas, levando-as a alterar suas funções biológicas originais. O DNA, por ser responsável pela codificação da estrutura molecular de todas as enzimas das células, passa a ser a molécula chave no processo de estabelecimento de danos biológicos.

Os efeitos da ação dos Raios X e γ não dependem somente da dose absorvida, mas também, da taxa de absorção (aguda ou crônica) e do tecido atingido. O dano ocasionado em células quando estas estão em processo de divisão é maior, tornando os respectivos tecidos e órgãos mais radiosensíveis (29,30).

2.3.1 Mecanismos de interação das radiações com o tecido

Quando as células de uma determinada cultura são expostas à radiação ionizante, pode ser observado que, para a maioria dos efeitos a quantidade de energia absorvida pela célula é, claramente, uma variável muito importante.

Na radiobiologia, a quantidade física e a qualidade de um feixe de radiação ionizante é definida através da Transferência Linear de Energia (LET) (1).

Radiações eletromagnéticas como Raios X e gama têm uma probabilidade baixa de interagir com os átomos do meio irradiado e, portanto, liberam sua

energia ao longo de uma trajetória relativamente longa. Neste caso, a área alvo produziria muitos eventos de ionização com alta probabilidade de efeitos biológicos danosos, mesmo a baixas doses, sendo assim consideradas de baixo LET (pouco ionizantes) (31).

Os efeitos biológicos da radiação podem ser somáticos ou hereditários. O primeiro ocorre na soma do indivíduo irradiado, isso quer dizer os danos que estes indivíduos se expuseram durante a sua vida, enquanto que os hereditários se originam da introdução de danos na linhagem germinativa do sujeito e se manifestam em sua descendência.

Para fins de proteção radiológica, os efeitos biológicos da radiação são classificados em estocásticos e determinísticos (anteriormente chamados de não estocásticos). Os Efeitos Estocásticos são aqueles cuja probabilidade de ocorrência é em função da dose, não existindo limiar, como é o caso do câncer. Assim, para qualquer indivíduo irradiado há uma probabilidade de que certos efeitos atribuíveis à radiação se manifestem, mas só depois de um período de tempo longo (dezenas de anos) a partir do momento que ocorreu o evento de irradiação. Os Efeitos Determinísticos são aqueles que surgem num curto espaço de tempo (dias, horas, minutos) a partir de um valor de dose limiar e sua gravidade é função do aumento dessa dose, esses efeitos são atribuídos, principalmente, à morte celular ou perda de capacidade de reposição de células de vida biológica relativamente curta, ou seja, aquelas que devem se manter em permanente estado de reprodução como as da medula óssea e tecidos como epiteliais de revestimento (sistema excretor, sistema gastrointestinal, mama, sistema genital) (32,33,34).

Quando a radiação ionizante é absorvida diretamente em material biológico, os danos para a célula podem ocorrer em uma de duas formas, direta ou indireta.

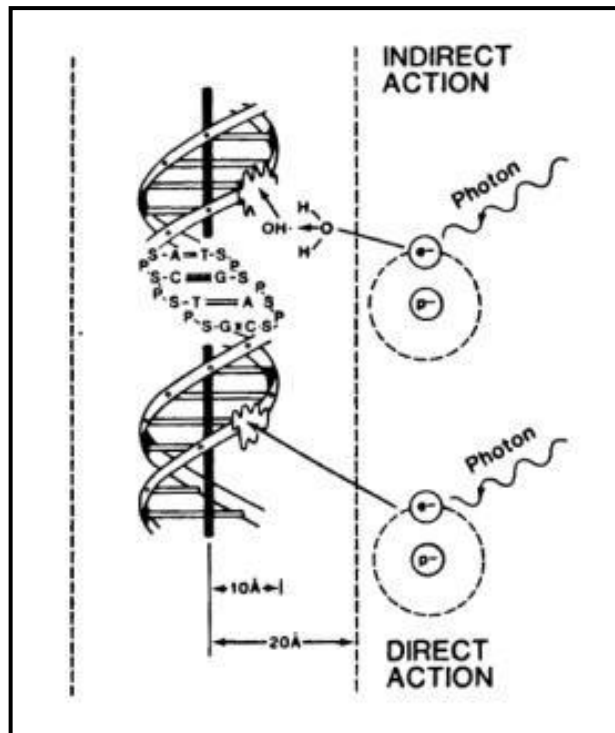
a) A ação direta da radiação

Na ação direta, a radiação interage diretamente com o alvo crítico na célula. Os átomos do próprio alvo podem ser ionizados ou excitados através Interações de Coulomb, levando a cadeia de eventos físicos e químicos que eventualmente podem produzir o dano biológico, conforme figura 3. A ação direta é o processo dominante na interação de partículas de alto LET com material biológico.

b) Ação indireta da radiação

Na ação indireta, a radiação interage com outras moléculas e átomos dentro da célula para produzir radicais livres, que podem, por meio de difusão na célula, danificá-la. Cerca de dois terços dos danos biológicos provocados pela ação indireta ocorre por efeitos da radiação de baixo LET, como por exemplo Raios X ou Raios Gama (31) Figura 3.

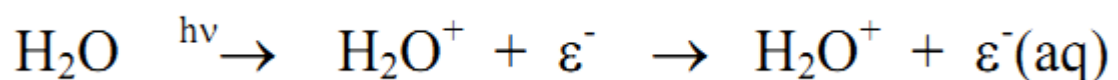
Figura 3: Efeitos diretos e indiretos da radiação ionizante no DNA



<http://biomedicaltopic.net/...1/03/interação-dna.jpg>, acesso em 20/06/2014.

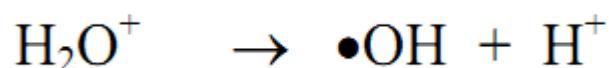
2.3.2 Produção de Elétrons Hidratados e Radicais Livres

Uma vez que a água é o principal componente das células, sendo responsável por cerca de 70% a 80% da composição celular, a maior parte da radiação incidente é por ela absorvida, dando lugar às seguintes espécies reativas:

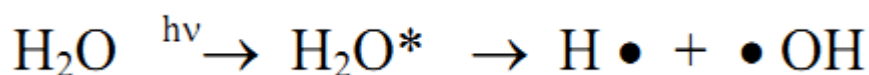


A molécula d'água, afetada pela passagem da radiação, é ionizada. O elétron que deixa a molécula é 'aprisionado' por demais moléculas d'água que, devido a

sua natureza polar, se posiciona de tal forma que os átomos de hidrogênio, carregados positivamente, ficam mais próximos ao elétron e os átomos de oxigênio, mais distantes. Esse arranjo é denominado elétron hidratado, $\epsilon^-(aq)$.

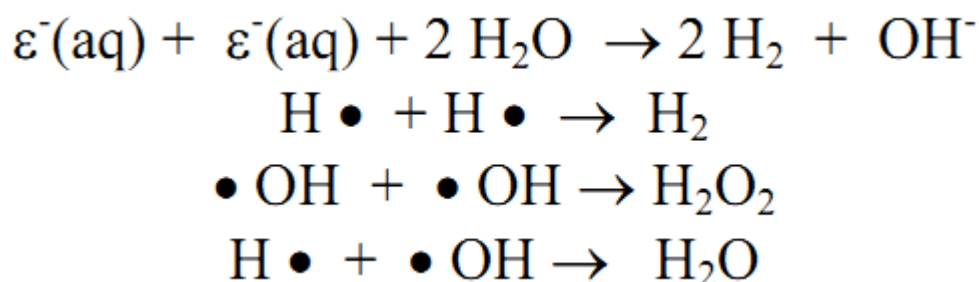


A molécula d'água ionizada, H_2O^+ pode também, se dissociar, dando formação ao íon hidrogênio e ao radical livre hidroxila, conforme ilustrado acima.



É possível, ainda, por radiólise da molécula d'água, a formação dos radicais livres hidrogênio e hidroxila que, sendo altamente reativos – em decorrência da presença, nas respectivas últimas camadas eletrônicas, de um elétron isolado ou não emparelhado – interagem quimicamente entre si ou com as moléculas do meio, modificando-as.

Os principais produtos resultantes da irradiação da água pura tendem a reagir com as bases nitrogenadas do DNA ou, na ausência destas, entre si, conforme se segue:



As reações acima irão sempre competir com as reações que levam ao dano das moléculas biológicas presentes no sistema (2,31).

2.3.3 Danos Radioinduzidos na Molécula de DNA

As espécies reativas $e^{-}(aq)$, $H \bullet$ e $\bullet OH$, resultantes da transferência de energia da radiação ionizante para a água, podem atacar, em maior ou menor grau, as bases nitrogenadas contidas no DNA (Adenina, Guanina, Citosina e Timina), alterando, conseqüentemente, seu papel biológico.

Convém observar que o DNA, responsável pela codificação da estrutura molecular de todas as enzimas das células, passa a ser a molécula chave no processo de estabelecimento de danos biológicos. Ao sofrer a ação das radiações, a molécula de DNA pode sofrer quebras e mutações gênicas.

As mutações gênicas correspondem a alterações induzidas na molécula de DNA que resultam na perda ou na transformação de informações codificadas na forma de genes. A introdução de mutações no genoma de uma célula é considerada indispensável para a indução de um câncer por ação das radiações. No entanto, mutações radioinduzidas não evoluem obrigatoriamente para câncer (35).

Quando uma lesão no DNA resultar em quebra desta molécula, a respectiva célula, caso possua taxa de divisão alta, passa a ter dificuldade em transferir integralmente seu patrimônio material genético para as células filhas que podem morrer após uma ou duas divisões subseqüentes.

Por outro lado, células diferenciadas (que não sofrem divisão) podem conviver com inúmeras quebras sem, contudo, terem suas funções prejudicadas. No entanto, caso haja rearranjo dos fragmentos resultantes das quebras de DNA, é possível que surjam cromossomos aberrantes, afetando o funcionamento das células que os contêm (2,31).

2.4 Monitoramento/Dosimetria Interna Individual

A dosimetria citogenética consiste em analisar as aberrações cromossômicas em linfócitos de uma amostra de sangue venoso e compará-las com um controle negativo(21,31,36,37,38,39,40). O nosso estudo determinou dosimetria em linfócitos periféricos comparando com controle negativo.

2.4.1 Linfócitos

O número total de linfócitos em um adulto jovem saudável foi estimado em aproximadamente 500×10^9 . Apenas cerca de 2% (10×10^9) destes estão presentes no sangue periférico, sendo os outros estão localizados geralmente ao longo de outros tecidos, com concentrações particulares no timo, gânglios linfáticos, tonsilas palatinas, tecidos linfáticos como no baço e na medula óssea. A média de tempo que um determinado linfócito se redistribui no sangue periférico é de cerca de 30 min. Isto significa que os linfócitos com aberrações

cromossômicas que tenham sido induzidos em qualquer parte do corpo, eventualmente, estão presentes no sangue periférico (41,42,43).

Assim, os testes realizados com linfócitos humanos, podem ser utilizados não apenas para aberrações que tenham sido induzidos em linfócitos do sangue periférico, mas sim em diferentes órgãos de todo o corpo (42,44,45).

2.4.2 Técnicas de Avaliação de Dano de DNA

a) Ensaio Cometa

O ensaio cometa é realizado por técnica de eletroforese em célula única (SCGE - single cell gel electrophoresis). É considerado um biomonitoramento rápido e sensível, método simples e barato para medir sítios sensíveis ao pH básico (álcali-lábeis) e quebras no DNA de células de mamíferos (46,47). Ostling e Johanson descreveram o método pela primeira vez em 1984. As células eram colocadas em agarose, expostas a um agente mutagênico e submetidas à eletroforese (48). Desta maneira, observou-se uma espécie de cauda, que se formava nas células danificadas. Essa cauda é formada pelo DNA livre do núcleo, por quebras de cadeia simples ou dupla, e seu comprimento (cauda) estaria diretamente proporcional à quantidade de DNA danificado. Singh et al. (49) introduziram condições alcalinas à técnica, produzindo quebras de cadeia simples de DNA em sítios álcali-lábeis (50). A figura 4 ilustra os passos para a realização da técnica do cometa em diferentes tipos celulares e a figura 5 mostra as diferentes classes de dano genético consideradas neste trabalho.

Figura 4: Ilustração das etapas da técnica do cometa (Palazzo, 2010)

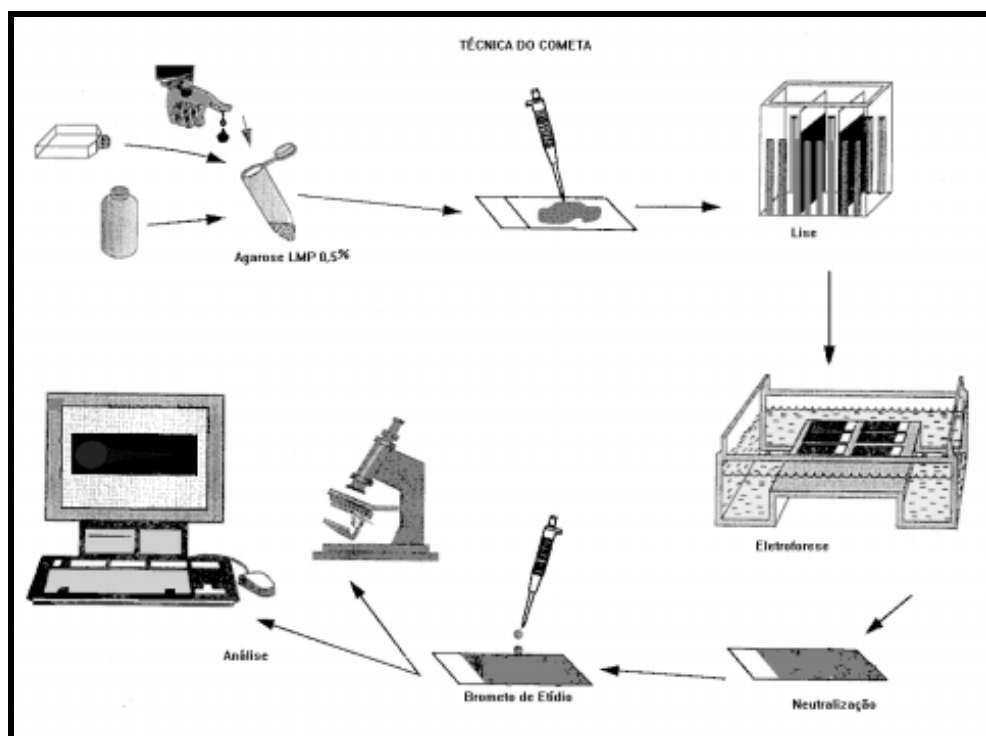
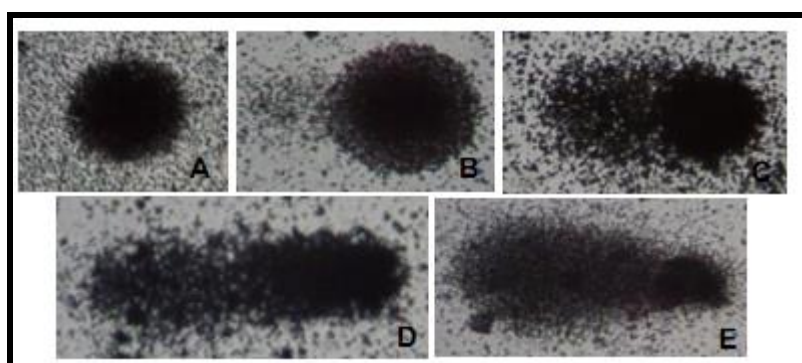


Figura 5: Demonstração dos linfócitos processados pela técnica do cometa.



(A) Classe 0, (B) Classe 1, (C) Classe 2, (D) Classe 3, (E) Classe 4 (50).

As condições alcalinas da técnica causam a separação do pareamento entre as bases, podendo assim, a descontinuidade de cadeia simples ser detectada. Em pH neutro, a continuidade da dupla hélice não é afetada por uma quebra de

cadeia simples ocasional. Porém, quebras de cadeia simples podem ter uma profunda influência no comportamento do DNA, já que a molécula de DNA, no núcleo, encontra-se super-enrolada e firmemente empacotada, e quebras de cadeia simples liberam o enrolamento e induzem ao relaxamento da estrutura do DNA (51). Segundo Betti e colaboradores (52), a técnica do cometa é uma maneira de medir lesões no DNA pela migração de fragmentos, detectando, principalmente, quebras de cadeia simples.

Danos no DNA também são comumente considerados como marcadores de risco de carcinogênese, sendo claramente relevante desde que este dano seja o evento inicial na carcinogênese, mas ainda não existe nenhuma evidência de que um alto nível de danos no DNA medido nas células brancas do sangue reflete um risco elevado de câncer. Em contraste, as aberrações cromossômicas e micronúcleos demonstrariam ter valor preditivo (48,53,54).

O teste cometa é considerado um teste de genotoxicidade, capaz de detectar danos ao DNA induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidativos, de forma quantitativa, capaz de avaliar a exposição ocupacional e/ou ambiental, sendo assim, considerado um marcador de exposição (48). No presente estudo utilizamos a versão alcalina, a qual detecta quebras de fita única e dupla, sítios álcali-lábeis, e crosslinks (55).

b) Teste do Micronúcleo

O teste do micronúcleo (MN) ou também chamado de cytokinesis-blocked micronucleus (CBMN) foi descrito pela primeira vez por Hedde em 1973 (14). É um teste capaz de detectar agentes clastogênicos ou que interferem na formação do fuso mitótico, alterando a distribuição equitativa dos cromossomos durante a divisão celular (56).

Os micronúcleos são constituídos de fragmentos cromossômicos ou cromossomos completos que são excluídos do núcleo durante a divisão celular, eles localizam-se à parte do núcleo principal da célula e, não apresentam membrana que os delimite. Os micronúcleos são corpúsculos arredondados, com diâmetro de 1/20 a 1/5 do diâmetro do eritrócito e correspondem ao que em hematologia designamos de corpúsculos de Howell-Jolly (57).

O aspecto mais importante do Teste do Micronúcleo é que ele permite identificar eventual aumento na frequência de mutações, em células expostas a uma gama variada de agentes genotóxicos. Assim, o teste do MN é, entre os testes citogênicos, o que fornece uma medida de confiança da ruptura e da perda do cromossomo (58), podendo detectar a ação de agentes clastogênicos ou aneugênicos, *in vivo* (14,15).

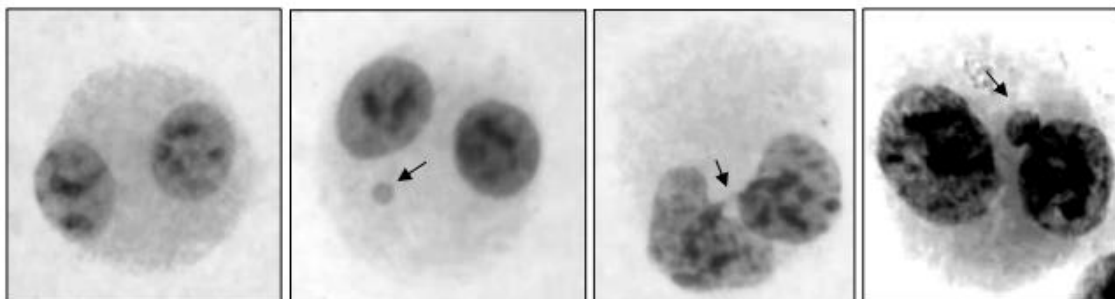
Em meados da década de 1980 uma importante inovação técnica foi introduzida. Este método bloquearia a citocinese em linfócitos em cultura através da adição de citocalasina B ao meio sem inibir a divisão nuclear. Com este protocolo, é possível fazer a distinção entre as células proliferadas (após a

primeira mitose) e células não proliferadas, e MN deve ser marcado apenas em células binucleadas com citoplasma preservado (59,60).

Desta forma, apenas as células que passam por um ciclo de divisão celular nuclear (células binucleadas) são consideradas na análise de frequência de MN.

Na análise das células binucleadas, podem ser encontradas três alterações, sendo que 1) A ocorrência de MN (fragmentos acêntricos ou cromossomos inteiros que não atingiram o fuso mitótico durante a divisão celular e acabaram expulsos do núcleo; 2) As pontes nucleoplasmáticas (NPB- nucleoplasmatic bridges), por sua vez, ocorrem quando os centrômeros de cromossomos dicêntricos são transferidos para pólos opostos da célula na anáfase. A análise de NPB pode fornecer informações sobre o tipo de mutação envolvida (clastogênese ou aneugênese); 3) BUDs nucleares, correspondem a ampliações de DNA encontrados na periferia nuclear (61,62), conforme pode ser observado na figura 6 abaixo.

Figura 6: Linfócitos processados pela técnica de micronúcleos.



A) Linfócito Binucleado Normal. B) Linfócito Binucleado com Micronúcleo. C) Linfócito Binucleado com Ponte Nucleoplasmáticas. D) Linfócito Binucleado com BUD.(50)

A frequência de micronúcleos é então determinada em cada indivíduo, em 1000 células binucleadas em lâminas feitas a partir de cultura de linfócitos, em meios de culturas RPMI mais aditivos, com bloqueio da citocinese celular (63,64,65) e nas mesmas podem ser analisadas a frequência de NPB e BUDs nucleares.

2.5 Danos no DNA e Sistema de Reparo

Os sistemas de reparo de DNA são responsáveis por manter a integridade do genoma das células frente a danos causados pelo ambiente e por erros de replicação celular.

A Radiação Ionizante induz dano no DNA por hidrólise, resultante de processos oxidativos (20) que modifica as bases nitrogenadas e a estrutura da dupla-hélice. O principal mecanismo utilizado na remoção de bases modificadas no organismo é o reparo por excisão de base (BER), considerado como a primeira defesa contra agentes endógenos e exógenos. A maioria dos reparos ocorre pela substituição de nucleotídeos(NER), chamada de via curta, onde há maior participação da proteína XRCC1 (66,67,68,69).

2.5.1 Polimorfismos dos Genes de Reparo XRCC1 e XRCC3

Os polimorfismos são variações genéticas que aparecem como consequências de mutações, podendo ter diferentes classificações dependendo do tipo de mutação. A categoria mais comum de polimorfismo é originada a partir de uma troca de um nucleotídeo por outro. Este polimorfismo é conhecido por *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) ou polimorfismo de nucleotídeo único(70)

a) X-Ray Repair Crosscomplementig Group 1(XRCC1)

O gene XRCC1 está localizado no braço longo do cromossomo 19 na posição 19q13.2 e possui um comprimento de 32kb, codifica a proteína conhecida pelo mesmo nome que participa do processo de reparo por excisão de bases do material genético (17). A proteína XRCC1 não possui atividade enzimática conhecida, parece agir como um fator fundamental no processo de reparo, pelo recrutamento simultâneo de diferentes componentes do reparo do DNA para o local da base lesada (71).

Existem mais de 60 SNPs descritos e validados para o gene XRCC1, no entanto apenas oito são variantes não sinônimas e três são as mais comuns. Dentre essas, escolhemos para este estudo o SNP no códon 399 que corresponde uma substituição de uma arginina para uma glutamina (XRCC1/Arg399Gln), pois indivíduos com este polimorfismo parecem estar

associados com maior sensibilidade às radiações ionizantes, apresentando capacidade de reparo reduzido (72,73). As alterações funcionais estariam associadas ao aumento do risco de câncer de bexiga (74), de mama (75) e de pulmões (76).

b) X-Ray Repair Crosscomplementig Group 3(XRCC3)

O gene XRCC3 encontra-se localizado no braço longo do cromossomo 14, na posição 14q32.3 e codifica uma proteína de mesmo nome que está envolvida no processo de reparo por recombinação homóloga do DNA, em que a fita complementar não danificada é utilizada como molde na substituição do fragmento lesado.

A proteína XRCC3 está relacionada em sua estrutura com o complexo RAD51, um componente importante no processo de reparo do material genético. O RAD 51 atua no reparo por meio de combinações homólogas presente na segunda cópia do gene (77). A proteína XRCC3 é requerida para a montagem do complexo e participa na manutenção da estabilidade cromossômica (78). Os polimorfismos do gene XRCC3 geram enzimas que não permitem a formação do Rad51, gerando instabilidade genética.

Existem quatro SNPs em regiões codificadoras do XRCC3 e 109 polimorfismos de base única em íntrons do mesmo gene (71). Dentre essas, escolhemos para este estudo o SNP no códon 241 que corresponde uma mudança de treonina para metionina (XRCC3/Thr241Met), pois este

polimorfismo parece estar associado ao risco aumentado de neoplasias, principalmente de pulmão, mama (78,79).

2.5.2 Análise Molecular dos Polimorfismos XRCC1 e XRCC3

a) Reação de polimerização em cadeia (PCR-RT)

A reação em cadeia de polimerase em tempo real (PCR-RT) realiza a quantificação de fragmentos de DNA e RNA de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, porque determina valores durante a fase exponencial da reação. O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é o chamado Cycle Threshold. Este ponto permite a quantificação exata e reprodutível baseada na fluorescência (80).

A emissão dos compostos fluorescentes gera um sinal que aumenta em proporção direta da quantidade de produto da PCR, os valores de fluorescência são gravados a cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado (81).

O sistema ótico acoplado ao termociclador, em uma plataforma computadorizada permite a aquisição, processamento e análises no final da reação.

Foi utilizada em nosso estudo a sonda TaqMan® (fragmento de DNA marcado usado para hibridização de outras moléculas de DNA) que é utilizada para

detectar as sequências específicas nos fragmentos de DNA amplificados na PCR. A sonda TaqMan® é um método capaz de determinar a presença ou ausência de sequências específicas. Esta sonda apresenta em uma extremidade um fluoróforo e na outra um quencher. Os produtos da reação são detectados pela fluorescência gerada após a atividade exonuclease da Taq DNA polimerase (81,82).

Durante a PCR-RT a sonda hibridiza a sequência da fita simples de DNA complementar alvo para a amplificação e no processo de amplificação a sonda é degradada devido a atividade exonuclease, separando o fluoróforo do quencher e resultando em um aumento da intensidade da fluorescência, aumentando a emissão da luz de forma exponencial. Esse aumento ocorre apenas quando a sonda hibridiza e quando a amplificação da sequência alvo é estabelecida (81).

Referências Bibliográficas da Revisão

1-HALL, E.J., Radiobiology for the Radiologist, Lippincott, Philadelphia, PA (2000).

2-IAEA - INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Generic Procedures for Assessment and Response during a Radiological Emergency. International Atomic Energy Agency, Human Health Series, Vienna, 2000.

3-ROPOLO, M. BALIA, C.; ROGGIEI, P. et al. The micronucleus assay as a biological dosimeter in hospital workers exposed to low doses of ionizing radiation. *Mutation Research*, 2012;747:7– 13.

4-SHAW, M. W. Human chromosome damage by chemical agents. *Annual Review of Medicine*. 1970;21:409-432.

5-SANTOS-MELLO, R; CAVALCANTE, B. Cytogenetic studies on gas station attendants. *Mutation Research*. 1992; 280:285-290.

6-SILVA, J. M. G. C.; SANTOS-MELLO, R Chromosomal aberrations in lymphocytes from car painters. *Mutation Research*, 1996;368:21-25.

7-MALUF, SW; PASSOS, DF, et al. Assessment of DNA Damage in Lymphocytes of Workers Exposed to X-radiation Using the Micronucleus test and comet Assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2001;38: 311-315.

8-MALUF, Sharbel Weidner. Monitoring DNA damage following radiation exposure using cytokinesis-block micronucleus method and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Clinica Chimica Acta*. 2004; 347:15-24.

9-(NSG) NORDIC STUDY GROUP. An inter-nordic prospective study on cytogenetic endpoints and cancer risk. *Cancer Genetic Cytogenetic*. 1990;45: 85-92.

10-ARMITAGE, P.; DOLL, R. A two-stage theory of carcinogenesis in relation to the age distribution of human cancer. *Br. J. Cancer*,1975;11:161-169.

11-TRAVIS, C. C.; SAULSBURY, A. W.; PACK, S. A. R. Prediction of cancer potency using a battery of mutation and toxicity data. *Mutagenesis*, [s.l.], 5, 213-219, 1990.

12-VAINIO, H. Current trends in the biological monitoring of exposure to carcinogens. *Sacand. J. Work Environ. Health*, 1985;11:1-6.

13-LOYD, D. C., COOPER, S. J.; WAL, B. F. Radiation exposure during cardiac catheterization and angiography. *Lancet*,1976;854-855.

14-HEDDLE J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutation Research*, 1973;18:187-190.

15-SCHMID W. The micronucleus test. *Mutation Research*. 1973;31:9-15.

16-IARMARCOVAI G, SARI-MINODIER I, ORSIÈRE T, DE MÉO M, GALLICE P, BIDEAU C, INIESTA D, POMPILI J, BERGÉ-LEFRANC JL, BOTTA A; A combined analysis of XRCC1, XRCC3, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and

centromere content of micronuclei in welders. *Mutagenesis*. 2006; 21(2):159–165.

17-SHEN, M. R.; JONES, I. M.; MOHRENWEISER, H.; Nonconservative amino acid substitution variants exist polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Research*, vol. 58, p. 604-608, fev. 1998.

18-TUIMALA, J.; SZEKELY, G.; GUNDY, S.; HIRVONEN, A.; NORPPA, H.; Genetic polymorphisms of DNA repair and xenobiotic-metabolizing enzymes: role in mutagen sensitivity. *Carcinogenesis*. 2002;23(6):1003-1008.

19-MATEUCA, R.; LOMBAERT, N.; AKA, P. V.; DECORDER, I.; KIRSCH-VOLDERS M.; Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*. 2006;88(11):1515-1531.

20-YIN J, VOGEL U, MA Y, QI R, SUN Z, WANG H. The DNA repair gene XRCC1 and genetic susceptibility of lung cancer in a northeastern Chinese population. *Lung Cancer*. 2007;56:153-60.

20-IAEA - INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Radiation Biology: A Handbook for Teachers and Students, Vienna, 2010.

21-IAEA - INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Recommendations for the Safe use and Regulation of Radiation Sources in Industry, Medicine, Research and Teaching International Atomic Energy Agency, SAFETY Series No 102, Vienna, 1990.

22-TURAI, I., The IAEA's Co-ordinated Research Project on Biodosimetry, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* 2000;52:1113–1116.

23-GRAY, L.H. An ionization method for the absolute measurement of gamma-ray energy, *Proc. Soc. Lond.*, 1936; 156: 578–596.

24-GOODHEAD, D.T., The initial physical damage produced by ionizing radiations. *Int. J. Radiat. Biol.* 1989;56:623–634.

25-MARSHALL, W. Nuclear Power Technology. 1983;(3), Nuclear Radiation. Oxford Science Publications.

26-XAVIER, AM; MORO JT; HEILBRON PF. Princípios Básicos de Segurança e proteção Radiológica. *UFRGS*, 2006: 3ed.

27-JOHNS, H.E. e CUNNINGHAM, J.R., The Physics of Radiology. American Lecture Series Publication, 1974,3ed(932).

28-ICRP Publication 60. Recommendation of the International Commission on Radiological Protection, *Pergamon Press*, 1991.

29-NOUAILHETAS, Y. e BONACOSSA DE A., Radiações Ionizantes e a Vida. Programa de Informação da Comissão Nacional de Energia Nuclear, 1998.

30-IAEA - INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Training Manual on Radioimmunoassay in Animal Reproduction. Technical Reports Series No 33, Vienna, 1984.

31-TAWUHATA, L.; SALATI, I.P.A; DI PRINZIO, R. e DI PRINZIO, A.R.;
Radiação e Dosimetria: Fundamentos. Instituto de Radioproteção e Dosimetria,
Comissão Nacional de Energia Nuclear, 1999.

32-CNEN-NE-3.01, Norma e Diretrizes Básicas de Radioproteção, 1989.

33-NIAS, A.H.W., An Introduction to Radiobiology, Wiley, New York (1998).

34-STEEL, G.G., Basic Clinical Radiobiology, Arnold, London (2002).

35-GONZALES, ABEL. Biological Effects os low doses of ionizing radiation: A
fuller picture. *IAEA*. 1994;35:49.

36-ABSON, W., Detection of Nuclear Radiation, in Nuclear Power Technology,
Nuclear Radiation, V3, Marshall, Clarendon Press, Oxford, 1983.

37-KNOLL, G.F., Radiation Detection and Measurement. 1989: 2 ed, John Willey
& Sons Inc.

38-RAMALIO, A. T., Dosimetria Citogenética, Instituto de Radioproteção e
Dosimetria, Comissão Nacional de Energia Nuclear, 1993.

39-DANTAS, B., Métodos 'In Vivo' para Dosimetria Interna. Instituto de
Radioproteção e Dosimetria, *Comissão Nacional de Energia Nuclear*, 1993.

40-DE MELO, D. R., Noções de Dosimetria Interna, Instituto de Radioproteção e
Dosimetria, *Comissão Nacional de Energia Nuclear*, 1993.

41-IAEA - INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Diagnosis and Treatment of Radiation Injuries, International Atomic Energy Agency, Human Health Series, Safety Report Series No. 2, Vienna, 1998.

42-IAEA - INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment: A Manual TECHNICAL REPORTS. Ed. 405, Vienna, 2001.

43-IAEA - INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Syllabus for the Training of Radiation Oncologists, (Edited by E. Rosenblatt), International Atomic Energy Agency, Human Health Series, (in press).

44-BOGEN, K.T., Reassessment of human peripheral T-lymphocyte life span deduced from cytogenetic and cytotoxic effects of radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 1993;64:195–204.

45-SCHMID, E., BAUCHINGER, M., LET dependence of dicentric yields in human lymphocytes induced by low doses of sparsely ionizing radiations and its implication for riskassessments. *Health Phys.* 1998;74:719–721.

46-SINGH NP, MCCOY MT, TICE RR e SCHNEIDER EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 1998;175:184-191.

47-O'NEIL KL, FAIRBAIRN DW e STANDING MD. Analysis of single-cell gel electrophoresis using laser-scanning microscopy. *Mutation Research.* 1993, 319:129-134.

48-DUSINSKA, M., COLLINS, AR. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis*. 2008; 23(3):191-205.

49-SINGH NP, DANNER DB, TICE RR, PEARSON JD, BRANT LJ, MORRELL CH e SCHNEIDER EL. Basal DNA damage in individual human lymphocytes with age. *Mutation Research*. 1991;256:1-6.

50-PALAZZO, RP. Dano e reparo de DNA em indivíduos com ataxia-telangiectasia e seus pais heterozigotos. 60fls. Dissertação(Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

51-MCKELVEY-MARTIN VJ, GREEN MHL, SCHMEZER P, POOL-ZOBEL BL, DE MÉO MP e COLLINS A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutation Research*. 1993;288:47-63.

52-BETTI, C., T. DAVINI, L. GIANNESI, N. LOPRIENO e BARALE R Microgel electrophoresis assay (Comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutation Research*. 1994;307:323-333.

53-HAGMAR, L., BONASSI, S., STROMBERG, U., BROGGER, A., KNUDSEN, L. E., NORPPA, H. and REUTERWALL, C. Chromosome aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European study group on cytogenetic biomarkers and health (ESCH) *Cancer Res.*, 1998;58:4117–4121.

54-BONASSI, S., ZNAOR, A., CEPPI, M., LANDO, C., CHANG, W. P., HOLLAND, N. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, 2007;28:625–631.

55-MALUF, SW; ERDTMANN, B. Biomonitorização do dano genético em humanos in: Silva D. Genética Toxicológica. 2003; 1ed. Porto Alegre. Alcance.

56-REIS, S. R. A. et al. Avaliação da presença de micronúcleos em células esfoliadas da língua de indivíduos dependentes químicos de etanol através de métodos de Feulgen e Papanicolau. *Revista Odonto Ciência*. 2004;19(46):367-371.

57-JOKSIÉ, G.; PETROVIÉ, S.; ILIÉ, Z. Age – related changes in radiation induced micronuclei among healthy adults. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2004;37:1111-1117.

58-FENECH, M. Important variables that influence base line micronucleus frequency in cytokinesis-block ed lymphocytes a biomarker for DNA damage in human populations. *Mutat Res*. 1998; 404:155-165.

59-FENECH, J., MORLEY, A.A., Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res*.1985;147:29–36.

60-FENECH, M., The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res*.2000; 455:81–95.

61-UMEGAKI, K., FENECH, M., Cytokinesis-block micronucleus assay in WIL2-NS cells: A sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils. *Mutagenesis*. 2000;15:261–269.

62-FREITAS, TAB. Avaliação dos Índices de DNA danificados em usuários de crack. *Dissertação de Mestrado, UFRGS, 2012.*

63-BREM R, HALL J. XRCC1 is required for DNA single-strand break repair in human cells. *Nucleic Acids Res.*2005;33:2512–2520.

64-LEE S. A., LEE K. M., PARK S. K., CHOI J. Y., KIM, B.; NAM, J.; YOO, K. Y.; NOH, D. Y.; AHN, S. H.; KANG, D.; Genetic polymorphism of XRCC3 Thr241Met and breast cancer risk: case-control study in Korean women and meta-analysis of 12 studies. *Breast Cancer Research and Treatment.* 2007;103(1):71-76.

65- MATEUCA, R. A.; ROELANTS, M.; IARMACOVAI, G.; AKA, P. V.; GODDERIS, L.; TREMP, A.; BONASSI, S.; FENECH, M.; BERGÉ-LEFRANC, J. L.; KIRSCH-VOLDERS M.; Hogg¹³²⁶, XRCC1³⁹⁹, and XRCC3²⁴¹ polymorphisms influence micronucleus frequencies in human lymphocytes in vivo. *Mutagenesis.* 2007;23(1):35-41.

66-VAN GENT, D.C., HOEIJMAKERS, J.H., KANAAR, R., Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat. Rev. Genet.* 2001;1:196-206.

67-SUIT, H.D., GOLDBERG, S., NIEMIENKO, A. *et al.*, Secondary carcinogenesis in patients treated with radiation: A review of data on radiation-induced cancers in human, non-human primate, canine and rodent subjects, *Radiat. Res.* (2007), 167, 12-42.

68-VAN DER KOGEL, A.J., JOINER, M.C., *Basic Clinical Radiobiology.*2009:4ed

69-WANG, Z. DNA damage-induced mutagenesis: A novel target for cancer prevention. *Mol. Interv.*2001;1:269–281.

70-KUBOTA, Y., NASH, R.A., and KLUNGLAND, A. Reconstitution of DNA base excision repair with purified human proteins: Interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. *EMBO J.*1996;15:6662–6670.

71-ABRAMENKO, Nadiia BILOUS, Anatolyi CHUMAK, Alexey KOSTIN, Zoya MARTINA and Iryna DYAGIL DNA Repair Polymorphisms in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia in Sufferers of Chernobyl Nuclear Power Plant Accident Iryna,2012;

72-STURGIS, E., CASTILLO, E.J., LI, L., ZHENG, R., EICHER, S.A., CLAYMAN, G.L., STROM, S.S., SPITZ, M.R., and WEI, Q. Polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis.* 1990;20:2125–2129.

73-VODICKA P, et al Association of DNA repair polymorphisms with DNA repair functional outcomes in healthy human subjects. *Carcinogenesis* 2012;28: 657–664.

74-STERN, M., UMBACH, D.M., VAN GILS, C.H., LUNN, R.M., and TAYLOR, J.A. DNA repair gene XRCC1 polymorphisms, smoking and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomark.* 2001;10:125–131.

75-DUELL, E.J., MILLIKAN, R.C., ILTTMAN, G.S., WINKEL, S., LUNN, R.M., TSE, C.K., EATON, A., MOHRENWISER, H.W., NEWMAN, B., and BELL, D.A.

Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and breast cancer. *Cancer Epidemiol.* 2001;10: 217–222.

76-GAO, W.M., ROMKES, M., SIEGFRIED, J.M., LUKETICH, J.D., and KEOHAVONG, P. Polymorphisms in DNA repair genes XPD and XRCC1 and p53 mutations in lung carcinomas. *Mol Carcinog.* 2006;45:828–32.

77-LIU N. LAMERDIN JE. TEBBS RS. SCHILD D., TUCKER JD. *Et al.* XRCC3, new human Rad51-family members, promote chromosome stability and protect against DNA cross-links and other damages. *Mol Cell.* 1998;1(6): 783-93.

78-MANUGUERRA, M. SALETTA F. KARAGAS MR. XRCC3 and XPD/ERCC2. Single Nucleotide Polymorphisms and the risk os câncer: A HuGE Review. *Am J. Epidemiol.* 2006;164:287-302.

79-SYNOWIEC, E. STEFANSKA J. MORAWIEC Z. *et al.* Association between DNA damage, DNA repair genes variability and clinical characteristicis in breast cancer patient. *Mutat. Res.* 2008: 648(1-2):65-72.

80-HAQQI, TM. SARKER G. DAVID CS. Specific amplification with PCR of a refractory segment of genomic DNA. *Nucleic Acids Research.* 1988; 16:11844

81-HEID CA. STEVENS J. LIVAK KJ, WILLIAMS PM. Real Time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996; 6(10) 986-94.

82-HOLLAND, PM., ABRAMSON RD. WATSON R. GELFALND DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease

activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1991; 88:7276-7280.

Objetivos

4.1. Objetivo Geral:

1. Avaliar os efeitos mutagênicos da exposição à Radiação X e Gama em pacientes que realizam cintilografia miocárdica e angioplastia miocárdica e relacionar os possíveis resultados positivos com os polimorfismos dos genes de reparo, XRCC1 e XRCC3.

4.2. Objetivos Específicos:

1. Avaliar a possível ação mutagênica dos pacientes expostos à Radiação X e Gama;
2. Determinar se existem associações entre os índices de danos do DNA e os diferentes genótipos dos genes de reparo;

Artigo em Inglês

GENOMIC INSTABILITY FOLLOWING RADIATION EXPOSURE: ASSOCIATION WITH POLYMORPHISMS IN REPAIR GENES XRCC1 AND XRCC3

Fernanda do Amarante M.D^{a,b}, Sandra Leistner Segal Ph.D^b, Ilza Vasques de Moraes M.D^c, Cristiano de Oliveira Cardoso^d, Tamires Sarita Marostega, Roberta Passos Palazzo M.D, Sharbel Weidner Maluf Ph.D^{b,e},

^aGraduate School of Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Ramiro Barcelos, 2400, Porto Alegre, RS, Brazil

^bMedical Genetics Service, HCPA, Av. Ramiro Barcelos,2350 - ZIP Code 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil.

^cNuclear Medicine Service, Clinical Hospital of Porto Alegre.

^dHemodynamics Service of the Cardiology Institute of Porto Alegre.

^eGraduate School of Pharmacy, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brazil.

*Corresponding Author:

Sharbel Weidner Maluf

Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Universidade Federal de Santa Catarina(UFSC)

Rua: Delfino Conti, s/n.

Florianópolis, SC, Brasil

ZIP Code 88040-000

E-mail: 0800swm@gmail.com

Telephone: +55 5133598011

Fax: + 55 5133598010

Previsão para Publicação: International Journal of Radiation Oncology, biology, Physics.

The authors declare no conflicts of interest.

ABSTRACT

Although Ionizing Radiation (IR) has widespread applicability in diagnostic pathology, it has been found to induce DNA damage. The aim of our study was to evaluate DNA damage and polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and XRCC3 in 57 patients who underwent myocardial scintigraphy (exposed to gamma radiation) and 57 patients who underwent myocardial angioplasty (exposed to X-radiation). Peripheral blood samples were collected before radiation exposure (at which point DNA samples were also obtained), as well as 6 and 24 hours after the procedure. In patients exposed to gamma radiation, only DNA damage indexes changed over time ($p=0.026$), while in those exposed to X-radiation, changes were observed in MN($p<0.001$) and BUD($p<0.001$) frequencies in addition to DNA damage indices ($p=0.004$). DNA damage levels did not differ between Arg399Gln polymorphisms. However, with regard to the Thr241Met polymorphism, DNA damage following gamma radiation exposure was only observed in patients with the Thr241($p=0.025$) and Thr241Met($p<0.001$) genotypes, while alterations following x-radiation exposure were only noted in those with the 241Met($p=0.041$) genotype. Significant increases in MN and BUD frequencies were observed in all genotypes following X-radiation exposure, but only in the Arg399 genotype after exposure to gamma radiation ($p=0.012$). No associations were observed between the Thr241Met polymorphism and gamma ray exposure, although changes in MN and BUD frequencies were observed in all genotypes following exposure to x-radiation.

Keywords: Ionizing radiation, DNA damage, comet assay, CBMN, repair genes, XRCC1, XRCC3.

INTRODUCTION

Low-energy ionizing radiation has widespread applicability in diagnostic pathology. Some methods, especially in cardiological diagnosis, require a longer time of exposure, increasing the amount of radiation to which patients are exposed. High doses of radiation are known to have indirect effects on DNA. If cellular repair mechanisms are not efficiently triggered, these effects may lead to mutations and neoplastic transformations (1,2). Chronic exposure to low doses of radiation has also been found to have significant genotoxic effects, leading to an increased risk of cancer (3,4).

Although the rate of DNA damage tends to be low in the general population, it can be significantly higher in individuals exposed to ionizing radiation (5,6).

Chromosomal alterations in peripheral blood lymphocytes have been used for over 30 years as a biodosimetric marker of radiation exposure (7,8). Currently, this method can also be aided by new techniques such as comet assay and micronucleus tests, which can detect a wider range of DNA damage with greater statistical power.

Micronucleus testing has several advantages over chromosomal aberration tests, such as its speed and ease, and the fact that metaphasic cells are not required for analysis (9). Several processes may be involved in micronucleus formation (10,11), such as chromosomal breaks (clastogenesis) and spindle disruption

(aneuploidogenesis). Several advantages of cytokinesis-block assays were described by Fenech (2007)(12), and include the reliable identification of micronuclei formed after a single division, as well as its sensitivity, precision and ability to detect other markers of radiation damage such as nucleoplasmic bridges.

Comet assay is a rapid and sensitive method of detecting alkali-labile sites and DNA breaks in mammalian cells (13,14). Under alkaline conditions, base pairs separate, allowing for the detection of single-strand discontinuities.

Both internal biodosimetry and the study of single nucleotide polymorphisms have been increasingly used to research individual variability in DNA repair capabilities, since these processes are responsible for maintaining genome integrity under challenging environmental conditions, and preventing replication errors and carcinogenesis (15,16). Certain variants of these polymorphisms have been found to be associated with specific diseases such as cancer, as well as to responses to environmental mutagens and carcinogens.

Polymorphisms in genes involved in DNA repair may alter protein function and impair repair mechanisms, leading to genetic instability and eventual carcinogenesis (17).

In the present study, genomic instability, as examined by comet and micronucleus assay (CBMN), and the genotypes of repair genes XRCC1(Arg399Gln) and XRCC3(Thr241Met) were examined in two groups of patients with radiation exposure due to myocardial scintigraphy (gamma radiation) or coronary angioplasty (X radiation).

MATERIALS AND METHODS

Population

The sample was divided into two groups. The 57 patients exposed to gamma radiation as a result of myocardial scintigraphy were recruited from the Department of Nuclear Medicine of the Clinical Hospital of Porto Alegre, while the 57 patients exposed to X-radiation during coronary angioplasties were recruited from the Hemodynamics Service of the Cardiology Institute of Porto Alegre. The present study was approved by the ethics committees of both hospitals, and all patients provided written consent for participation.

Peripheral blood samples were collected from both groups before the examination, as well as 6 (Time 1) and 24 hours after the procedure (Time 2). Myocardial scintigraphy was performed using intravenous [$^{99m}\text{Tc}(\text{MIBI})$]. This cation complex accumulates in myocardial tissue approximately 1 hour after administration. It is eliminated mostly by the hepatobiliary (27%) and excretory systems (33%). The maximum dose administered was 40mCi. At this dose, the body is expected to absorb 6.4mGy ^{99m}Tc -Sestamibi (18). Technetium decays by isomeric transition with a half-life of 6.02 hours. Patients undergoing myocardial angioplasty were exposed to 900mGy to 3.2Gy X-rays, calculated based on radiation doses at skin entrance (cumulative air KERMA – Kinetic Energy Released per unit Mass), for a mean of 12.7min. Procedures were performed

using a Philips fluoroscopy apparatus (Eindhoven, the Netherlands), three magnification lenses (15cm, 20cm and 25cm), a double filter (copper + aluminum) and standard programming for image acquisition at a rate of 15 frames per second.

Data were collected between 2010 and 2013. Both groups were included in the sample due to suspected coronary disease, acute myocardial ischemia or acute myocardial infarction. The following exclusion criteria were applied: history of kidney or liver failure, radiotherapy, chemotherapy, smoking, blood disease, stroke, chronic or acute infection, or scintigraphy or contrast-enhanced CT in the previous 60 days.

Comet Assay

The comet assay was performed as described by Singh (13), with modifications for in vivo use (19,20). Blood samples were mixed with low-melting point agarose and spread on slides pre-coated with agarose. Coverslips were gently placed over each slide before their storage in a cold chamber. Once the samples solidified, coverslips were removed and slides were soaked in lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10.2, with 1% Triton X-100 and 10% DMSO added prior to use) for 1-2 days under refrigeration. Excess liquid was removed from the slides, which were then transferred to an electrophoresis tank containing a fresh alkaline buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13). The slides remained in the buffer solution for 20 minutes to allow for DNA denaturation, unwinding and expression of alkali-labile sites. Samples were electrophoresed for 20 minutes (25 V; 300 mA; 0.9 V/cm). Slides were removed

from the tank and rinsed three times with neutral solution (0.4 M Tris, pH 7.5), then three times with distilled water, before being left to dry at room temperature. Sample collection and all subsequent procedures were performed in the absence of light.

Slides were then fixed and silver stained, as described by Nadin et al. (2001)(21). DNA damage was examined under an optical light microscope at 200X magnification, in 100 cells per sample. Tail intensity (size and shape) was used to classify cells into one of five categories, ranging from 0 (undamaged) to 4 (virtually all DNA in the tail). These values are then summed to provide a damage index (DI) ranging from 0 (no DNA migration) to 400 (maximum migration in all cells) (22).

Micronucleus Test

Total blood samples (0.5ml) were placed in 5 mL RPMI 1640 medium supplemented with 20% fetal bovine serum and 0.2% phytohemagglutinin. Cultures were incubated at 37°C for 44 h, after which 4.5 g/mL cytochalasin B (Cyt B, Sigma) was added to each vial, as described by Fenech and Morley 1985 (23). Cell suspensions were fixed with 3:1 methanol:acetic acid, treated with KCl, and dropped onto clean slides, which were then Giemsa stained. The frequency of micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds were also analyzed in 1000 binucleated lymphocytes per patient (24).

Genotyping

XRCC1 and XRCC3 polymorphisms were determined by real-time PCR (RT-PCR) using Taqman allele discrimination assays in a StepOne system (Applied Biosystems).

The TaqMan® Predesigned SNP Genotyping Assays includes two allele-specific TaqMan® MGB probes containing distinct fluorescent dyes (VIC® or FAM™) and a PCR primer pair to detect the specific SNP targets as described below. PCR conditions were used according to the manufacturer's instructions.

XRCC1(rs25487)GGGTTGGCGTGTGAGGCCTTACCTC[C/T]GGGAGGGCAGCCGCCGACGCATGCC
XRCC3(rs861539)GAAGGCACTGCTCAGCTCACGCAGC[A/G]TGGCCCCAGGGACTGCAGATGCCT

Statistical Analysis

Data were analyzed using SPSS 18.0.0. Mean values were compared between assessment points using GEE (Generalized Estimating Equations) with POISSON distribution and Bonferroni comparisons. Chi-squared tests were used to analyze the genotype and allele frequency of polymorphisms. Sample characteristics were examined using descriptive analysis.

RESULTS

Sample characteristics are summarized in the table below.

Table 1: Sample characteristics.

	Gamma radiation (n=57)	X radiation (n=57)
	N/%	N/%
Age	58.36 ± 11.52	58.73 ± 11.87
Gender		
Female	34 / 59.65%	19 / 33.33%
Male	23 / 40.35%	38 / 66.67%
Diabetes Mellitus		
Yes	8 / 14%	12 / 21.1%
No	49 / 86%	45 / 78.9%
ASA use		
Yes	11 / 19.3%	22 / 38.6%
No	46 / 80.7%	35 / 61.4%

N: Number of patients

The table below contains results regarding DNA damage as assessed by comet assay, and micronucleus (MN) and nuclear bud (NBUD) frequencies.

Table 2: Frequency of micronuclei, nuclear buds and DNA damage according to comet assay.

	Damage			
	Before	Time 1	Time 2	p
Exposure to Gamma Radiation				
Damage	7.70 ± 1.698	9.72 ± 1.890	9.65 ± 1.768	0.026*
MN	6.46 ± 0.498	-	7.32 ± 0.522	0.075
BUDs	2.95 ± 0.279	-	3.02 ± 0.272	0.857
Exposure to X Radiation				
Damage	6.46 ± 0.923	7.84 ± 0.854	5.47 ± 0.221	0.004*
MN	4.19 ± 0.160	7.46 ± 0.195	5.63 ± 0.190	<0.001*
BUDs	1.25 ± 0.186	3.89 ± 0.224	1.89 ± 0.198	<0.001*

Results were compared between assessment times using GEE/POISSON models

* Significant at $p < 0.05$. Values expressed as mean \pm standard deviation. N: number of patients assessed. MN: Micronuclei per 1000 cells. Buds: Nuclear buds per 1000 cells. Comet: Comets per 100 cells.

The level of DNA damage observed in patients exposed to gamma radiation differed significantly between assessment points. MN and NBUD frequencies did not change significantly over time.

Comet assay scores differed significantly between assessments for patients exposed to X radiation ($p=0.004$). MN ($p< 0.001$) and NBUD ($p< 0.001$) frequencies also differed between assessments.

Genotype and allele frequencies for each group are shown below.

Table 3: Genotype and allele frequencies in patients exposed to radiation.

	Gamma Radiation (N°/%)	X Radiation (N°/%)	p
XRCC1 ^{Arg399Gln}	(n= 42)	(n=51)	
Arg/Arg	19/ 45.2	27/ 52.9	
Arg/Gln	19/ 45.2	21/ 41.2	0.680
Gln/Gln	4/ 9.5	3/ 5.9	
Allele - C/T	(n=84)	(n=102)	
C/C	57/ 67.8	75/ 73.53	0.396
T/T	27/ 32.30	27/ 26.47	
XRCC3 ^{Thr241Met}	(n=41)	(n=49)	
Thr/Thr	23/ 56.1	21/ 42.9	
Thr/Met	14/ 34.1	22/ 44.9	0.456
Met/Met	4/ 9.8	6/ 12.2	
Allele - C/T	(n=82)	(n=98)	
C/C	60/ 73.17	64/ 65.30	0.256
T/T	22/ 26.83	34/ 34.70	

Genotype and allele frequencies analyzed by Chi-square test * Significant at $p < 0.05$.
For Arg399Gln and Thr241Met: CC=Homozygous wild-type; CT= Heterozygous;
TT=Homozygous rare;

Table 4 describes the DNA damage associated with each polymorphism. DNA damage over time changed significantly for patients with normal homozygous Arg399, heterozygous Arg399Gln and homozygous rare 399Gln genotypes exposed to both X and gamma radiation. The same analysis was performed with regard to the Thr241Met polymorphism, and statistically significant differences in DNA damage were found in normal homozygous Thr241 and heterozygous Thr241Met genotypes following exposure to both types of radiation. Changes in DNA damage over time in homozygous 241Met patients were only observed in those exposed to x radiation.

Table 4. Comparison between mean damage indices across genotypes.

	Damage							
	Gamma-Ray Exposure				X-Ray Exposure			
	(n=57)				(n=57)			
	Before	Time 1	Time 2	p	Before	Time 1	Time 2	p
Arg399Gln								
Arg/Arg	4.79±0.535	5.63±0.587	6.32±0.614	0.015*	6.81±1.543	8.81±1.725	5.33±0.310	<0.001*
Arg/Gln	3.84±0.359	6.26±2.127	7.26±1.310	<0.001*	5.24±0.251	7.14±0.531	5.90±0.293	0.001*
Gln/Gln	3.75±0.650	10.75±3.927	5.25±0.545	0.002*	14.33±9.266	8.00±1.247	5.00±0.471	<0.001*
Thr241Met								
Thr/Thr	4.35±0.420	7.74±1.906	7.39±1.110	0.025*	5.67±0.688	7.14±0.701	5.48±0.239	0.002*
Thr/Met	3.57±0.374	4.50±0.426	6.07±0.602	<0.001*	6.55±1.811	9.05±2.038	5.45±0.384	0.002*
Met/Met	6.75±0.740	6.00±1.50	4.75±1.139	0.267	5.17±0.366	7.00±1.225	6.33±0.609	0.041*

Results were compared between assessment times using GEE/POISSON models* Significant at p < 0.05. Values expressed as mean ± standard deviation. Comet damage: Comets per 100 cells.

Table 5. Comparison of MN frequencies across genotypes.

	MN							
	Gamma-Ray Exposure				X-Ray Exposure			
	(n=57)				(n=57)			
	Before	Time 1	Time 2	p	Before	Time 1	Time 2	p
Arg399Gln								
Arg/Arg	5.95±0.712	-	8.16±0.980	0.012*	4.52±0.177	7.74±0.294	5.48±0.212	<0.001*
Arg/Gln	8.11±1.104		7.58±0.888	0.510	3.76±0.277	7.05±0.256	6.00±0.337	<0.001*
Gln/Gln	6.00±0.707	-	7.50±0.901	0.096	3.67±0.272	6.67±0.272	5.33±1.089	<0.001*
Thr241Met								
Thr/Thr	6.74±0.807	-	7.43±0.829	0.242	4.05±0.238	7.05±0.297	6.24±0.293	<0.001*
Thr/Met	6.50±1.029	-	8.07±1.163	0.194	4.18±0.210	7.91±0.301	5.27±0.274	<0.001*
Met/Met	10.00±2.264	-	9.00±0.707	0.673	4.50±0.697	6.83±0.436	5.17±0.281	0.001*

Results were compared between assessment times using GEE/POISSON models * Significant at p < 0.05.

Values expressed as mean ± standard deviation. MN: number of micronuclei per 1000 cells.

As can be observed in Table 5, mean MN frequencies increased significantly over time for normal homozygous A399 patients exposed to gamma radiation. No other significant differences were found within this patient group. Among patients exposed to X-rays, statistically significant differences were observed across all Arg399Gln and Thr241Met genotypes.

The frequency of nuclear buds in patients with different genotypes is displayed in Table 6. No statistically significant differences were observed on this variable in patients exposed to gamma radiation. However, exposure to X radiation was associated with significant differences on this variable across all genotypes.

Table 6. NBUD frequencies across genotypes.

	NBUDs							
	Gamma-Ray Exposure				X-Ray Exposure			
	(n=57)				(n=57)			
	Before	Time 1	Time 2	ρ	Before	Time 1	Time 2	ρ
Arg399Gln								
Arg/Arg	2.58±0.436	-	3.32±0.605	0.334	1.56±0.284	4.11±0.345	1.78±0.274	<0.001*
Arg/Gln	2.95±0.485	-	2.84±0.381	0.833	1.05±0.305	3.52±0.327	2.00±0.356	<0.001*
Gln/Gln	2.50±1.146	-	2.75±0.415	0.865	1.33±0.720	4.33±0.720	1.33±0.720	0.001*
Thr241Met								
Thr/Thr	2.65±0.411	-	2.91±0.363	0.557	1.14±0.318	3.81±0.347	1.86±0.316	<0.001*
Thr/Met	2.57±0.612	-	3.50±0.747	0.359	1.14±0.290	4.05±0.399	1.73±0.289	<0.001*
Met/Met	3.75±0.740	-	2.25±0.545	0.146	2.50±0.514	4.00±0.333	2.67±0.805	0.011*

Results were compared between assessment times using GEE/POISSON models * Significant at $p < 0.05$.

Values expressed as mean \pm standard deviation. Buds: Nuclear buds per 1000 cells.

DISCUSSION

Ionizing radiation (IR) can lead to several types of DNA damage (25). The acute and chronic effects of exposure to high doses of IR are well-documented, while the risks associated with low-level exposure are thought to be primarily due to stochastic effects (1,26). The impact of these changes on the chemical structure of cells are thus indirectly responsible for the genotoxic effects of radiation exposure (27). The production of free radicals induces double-strand breaks, and the repair system is then recruited to prevent chromosomal fragmentation, translocations and deletions. Carcinogenesis results from persistent genomic instability or ineffective DNA repair, which lead to the activation of oncogenes, and the inactivation of tumor suppressor genes or loss of heterozygosity (4,28,29).

The greatest incidence of DNA damage as a result of low-level radiation exposure is found among patients or workers exposed to imaging procedures (30,31,32).

The DNA damage associated with chronic low-level exposure to IR has been demonstrated by several studies (25,32,33). In our investigation, the radiation involved in myocardial scintigraphy and angioplasty was found to induce significant increases in comet and MN frequencies. However, changes in gene amplification (nuclear buds) were only identified in patients exposed to X radiation.

Biodosimetry is essential for estimating absorbed radiation doses and developing radioprotective strategies to reduce the risks associated with radiation exposure (1). MN assays in peripheral lymphocytes have proven to be a valuable method for the indirect assessment of chromosomal aberrations (1,33,34). MN are the most popular lymphocyte marker of DNA damage and cytotoxicity both in vivo and in vitro (12,35,36), and provide important information regarding chromosomal breaks, reorganization, gene amplification and cell death (1,36), in addition to contributing as predictors of radiosensitivity (12,37,38).

The comet assay has been used as a biomonitoring tool in several studies of DNA damage following radiation exposure (39,40,41). It is a quick, sensitive and low-cost method for the quantification of DNA damage in individual cells (42). Its main advantage is its ability to evaluate initial responses to radiation and radiation-induced damage repair in heterogeneous populations (41,43).

Our analysis of polymorphisms in DNA repair genes (XRCC1/MspI, XRCC3/NcoI) revealed that the genotype frequencies of both markers were consistent with Hardy-Weinberg equilibrium, suggesting that no other selective factor were operative in the sample. The frequency of XRCC1-399Gln ranged from 0.32 to 0.26, and was similar to the values of 0.34 and 0.25 reported by Lun et al. and Shen et al, respectively. The frequency of XRCC3- 241Met ranged from 0.26 to 0.34, and was also similar to the values of reported in the literature for the general population (0.31 and 0.38) (44,45). Comparative analyses of

genotype and allele frequencies did not show statistically significant differences between groups.

The analysis of XRCC1 polymorphisms showed that DNA damage increased over time in patients with the Arg/Arg, Arg/Gln and Gln/Gln genotypes exposed to gamma ray radiation (which involves continued exposure over time), as indicated by an increase in comets. The frequency of MN and BUDs only increased in patients with the Arg/Arg genotype. Among patients exposed to x-radiation, changes in comet frequencies were only observed in the Arg/Gln genotype. The frequency of MN and BUDs increased significantly in all three genotypes following radiation exposure (Arg/Arg, Arg/Gln, Gln/Gln).

Modified bases are usually repaired in excision repair pathways (BER), considered the first line of defense against exogenous and endogenous agents. BER begins with a DNA glycosylase and follows one of the following pathways: short-patch BER (one-nucleotide repair) or long-patch BER (repair tract of 2-14 nucleotides) (44,46,47,48,49).

Most repairs have been said to occur by short-patch BER, which relies more heavily on the XRCC1 protein. This protein induces gene repair by its interaction with DNA polymerase beta, DNA ligase III, APE-1 (apurinic endonuclease-1), PNK (polynucleotide kinase) and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP). The activity of the XRCC1 protein has not been entirely established, but there is evidence to suggest that it coordinates enzymatic

activity in different stages of gene repair. Mutations in the gene which encodes this protein may impair or inhibit BER (47,50).

Studies of the relationship between polymorphisms and repair genes have found that the former, especially Arg/Gln, may have an impact on repair mechanisms [38]. Although most studies have reported associations between the Arg/Gln and Gln/Gln genotypes and lung (51,52), bladder (53,54), and breast cancer (55,56), some studies have also found the Arg/Arg genotype in XRCC1 codon 399 to be associated with reduced DNA repair capacity (57,58,59). These polymorphisms lead to amino acid changes which can reduce the efficiency of DNA repair. Wang et al. (60) found that individuals with the Arg/Arg genotype have significantly higher levels of induced DNA breaks than individuals with other genotypes (Arg/Gln and Gln/Gln),.

A meta-analysis of the Arg399Gln polymorphism found that the presence of the Gln/Gln genotype led to a significant decrease in the risk of bladder cancer in smokers, suggesting that the XRCC1 R399Q polymorphism may contribute to protection against cancer in this population. The protective effects of the rare allele have been discussed in several studies (47,55,61), some of which have found that homozygosity for the rare allele offers protection against tumors such as melanoma (62,63,64).

The present study also evaluated polymorphisms in the XRCC3/Ncol(Thr241Met) repair gene. The XRCC3 enzyme interacts directly with the RAD51 complex to promote homologous DNA recombination,

preventing chromosomal fragmentation, translocations and deletions, all of which are associated with carcinogenesis (64,65). Cells with mutations or deficiencies in the XRCC3 gene fail to produce RAD51 and are therefore genetically unstable and more sensitive to DNA-damaging agents (66).

In the present study, the Thr/Thr and Thr/Met genotypes were associated with significantly increased comet formation following exposure to gamma radiation. Exposure to X-radiation also led to an increase in comet values, as well as an increased frequency of MN and BUD in all three genotypes studied.

Heterozygosity for the Thr241Met polymorphism has also been associated with increased DNA damage(51,61). The presence of the T allele has been found to have different effects on malignant tumors and other conditions, although it does not appear to be associated with the risk of lung cancer (67), or breast cancer in postmenopausal women (68,69). Other studies have also reported associations between the XRCC3(Thr241Met) polymorphism and DNA repair mechanisms (70).

The present results may be explained by the fact that the protein alterations caused by the polymorphism impair DNA repair processes. The continued exposure to IR in the case of gamma-radiation, and the high doses of radiation involved in X-ray imaging may contribute to the accumulation of DNA damage.

CONCLUSION

Although our results were difficult to interpret, our ability to detect an increased frequency of DNA damage following exposure to both imaging exams suggests that our findings may be used as biomarkers in routine clinical practice. Further research into the DNA repair polymorphisms and genotoxicity associated with IR exposure should be encouraged, since the identification of genetic susceptibility markers may allow for a more precise identification of radiosensitive populations.

FINANCIAL SUPPORT

This study received financial support from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the Research Incentive Fund (FIPE) of the Clinical Hospital of Porto Alegre.

REFERENCES

1-ROPOLO, M. BALIA, C.; ROGGIEI, P. et al. The micronucleus assay as a biological dosimeter in hospital workers exposed to low doses of ionizing radiation. *Mutation Research*, 2012;747:7– 13.

2-SHAW, M. W. Human chromosome damage by chemical agents. *Annual Review of Medicine*. 1970;21:409-432.

3-FEINENDEGEN, L.E., BROOKS, A.L., MORGAN, W.F., Biological consequences and health risks of low-level exposure to ionizing radiation: commentary on the workshop. *Health Physics*. 2011;100: 47–259.

4-BALACHANDAR, V. SURESHKUMAR S., MOHAMA D. et al. Cytogenetic endpoints and Xenobiotic gene polymorphism in lymphocytes of hospital workers chronically exposed to ionizing radiation in Cardiology, Radiology and Orthopedic Laboratories. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2014;100:266–274.

5-MALUF, SW; ERDTMANN, B. Evaluation of occupational genotoxic risk in a Brazilian hospital. *Genetics and Molecular Biology*. 2000;23: 485-488.

6-MALUF, SW. Monitoring DNA damage following radiation exposure using cytokinesis-block micronucleus method and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Clinica Chimica Acta*. 2004; 347:15-24.

7-VAINIO, H. Current trends in the biological monitoring of exposure to carcinogens. *Scand. J. Work Environ. Health*, 1985;11:1-6.

8-LOYD, D. C., COOPER, S. J.; WAL, B. F. Radiation exposure during cardiac catheterization and angiography. *Lancet*, 1976;854-855.

9-TUCKER, J.D. & R.J. PRESTON Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutat. Res.* 1996; 365: 147-159.

10-HEDDLE, J. A., HITE, M., KIRKHART, B., MAVOURNIN, K., MACGREGOR, J. T., et al. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* 1983 123(1):61-118.

11- EVANS HH, HORNG MF. The repair of potentially lethal damage and sublethal damage in strains of mouse L5178Y lymphoma cells differing in radiation sensitivity. *Radiat. Res.* 1988; 113(1): 183-190.

12-FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nat. Protoc.* 2; 2007: 1084-1104.

13- SINGH, NP., MCCOY MT, TICE RR, SCHNEIDER EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 1988; 175(1): 184-191.

14- O'NEIL KL, FAIRBAIRN DW e STANDING MD. Analysis of single-cell gel electrophoresis using laser-scanning microscopy. *Mutation Research.* 1993, 319:129-134.

15-SOBTI, RC. MAHDI S.A, et al. The influence of variations in the DNA repair (XRCC1) gene on HIV-1/AIDS among Indian population. *Folia Biol(Praha)*. 2009;55(5): 183-6.

16- MEZA-ESPINOZA, JP. PERALTA-LEAL et al. XRCC1 polymorphisms and haplotypes in Mexican patients with acute lymphoblastic leukemia. *Genet Mol Res*. 2009;8(4):1451-8.

17- BATAR. BM. GUVEN et al. DNA repair gene XPD and XRCC1 polymorphisms and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*. 2009;33(6): 759-63.

18-Radiation International Dose Information Center, OAK Ridge Institute for Science and Education, Box 17 865-577-3448;

19- TICE, RR, AGURELL E. ANDERSON D, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol. Mutagen*. 2000; 35(30): 206-221.

20- HARTMANN, A. AGURELL E. BEEVERS C., BRENDLER-SCHWAAB.S. et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. *Mutagenesis*. 2003; 18(1):45-51

21- NADIN SB, VARGAS-ROIG LM, CIOCCA DR. A silver staining method for single-cell gel assay. *J Histochem Cytochem*. 2001; 49(9): 1183-1186.

22- BAGATINI, PB, PALAZZO RBP, TRESSOLDI M. COSTA C, MALUF SW. Induction and removal of DNA damage in blood leukocytes of patients with type 2 diabetes mellitus undergoing hemodialysis. *Mutat.Res.* 2008; 657:111-115.

23-FENECH, J., MORLEY, A.A., Measurement of micronuclei in lymphocytes.*Mutat. Res.*1985;147:29–36.

24-MALUF SW, PRA D, FRIEDRISCH JR, BITTAR C, DA SILVA, MAL, Length of treatment and dose as determinants of mutagenicity in sickle cell disease patients treated with hydroxyurea. *Environ. Toxicol Pharmacol.*2009;26–29.

25-WARD, J.F.,DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells identities, mechanism of formation and reparability. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology.* 1998;35:95-125.

26-FEINENDEGER, L.E, BROOKS, AL, MORGAN WF. Biologic consequences and health risks of low-level exposure to ionizing radiation: commentary on the workshop. *Health Phys.*2001; 100:247-259.

27-GONZALES, ABEL. Biological Effects os low doses of ionizing radiation: A fuller picture. IAEA. 1994;35:49.

28-PICHIERRI, A. FRANCHITTO A. PALITTI. Mini-Review Predisposition to cancer and radiosensitivity.*Radiosensitivity and cancer Genetics and Molecular Biology.*2000;23(4):1101-1105.

29-KANNAR, R., HOEIJMAKERS JH, VAN GENT DC. Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *Trends Cell. Biol.* 1998;8:483-489.

30-JHA, A .N., SHARMA T. Enhanced frequency chromosome aberration in workers occupationally exposed to diagnostic X-rays. *Mutation Research.* 1991;260:143–148

31-ZAKERI, F., HIROBE, T., AKBARI, K., NOGHABI, T., Biological effects of low-dose ionizing radiation exposure on interventional cardiologists. *Occupational Medicine.* 2010;60:464-469.

32- MONICA C. CRISTINA B. et al. The micronucleus assay as a biological dosimeter in hospital workers exposed to low doses of ionizing radiation. *Mutation Research.* 2012;747:7– 13 .

33-SABERI, A ., SALARI, E., LAFI , S.M., Cytogenetic analysis in lymphocytes from radiation workers exposed to low level of ionizing radiation in radiotherapy, CT-scan and angiocardigraphy units. *Mutation Research.* 2013;750:92–95 .

34-SAKLY, A ., AYED, Y., CHAARI, N., AKROUT, M., BACHA, H., CHEIKH, H.B. Assessment of chromosomal aberrations and micronuclei in peripheral lymphocytes from Tunisian Hospital workers exposed to ionizing radiation. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers.* 2013;17(9):650 – 655 .

35-FENECH, M. The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry. *Health Physics.* 2010;98:234– 243.

36-PEREIRA CS. MOLZ P. PALAZZO RP. FREITAS TA. MALUF SW. et al. PNA damage and cytotoxicity in adult subjects with prediabetes. Mutation Research. 2013;753:76– 81.

37-ANDREASSI, MG, AIT ALI, L. BOTTO N. MANFREDI S. Cardiac catheterization and long-term chromosomal damage in children with congenital heart disease. European Heart Journal. 2006; 27: 2703 –2708.

38-NESSLANY F. MARZIN D. A micromethod for the I vivo micronucleus assay. Mutagenesis. 1999;14(4):403-410.

39-MALUF, SW; PASSOS, DF, et al. Assessment of DNA Damage in Lymphocytes of Workers Exposed to X-radiation Using the Micronucleus test and comet Assay. Environmental and Molecular Mutagenesis. 2001;38: 311-315.

40- GARAJ-VRHPVAC, V., KOPJAR, N., RAZEM, D., et al. Application of the alkaline Comet assay in biodosimetry: assessment of in vivo DNA damage in human peripheral leukocytes after gamma radiation incident. Radiation Protection Dosimetry. 2002;98:407– 416.

41-CARBONARI, K, GONÇALVES, L. et al. Increased micronucleated cell frequency related to exposure to radiation emitted by computer cathode ray tube video display monitors. Genetics and molecular Biology. 2005;28(3):469-474.

42-SINGH NP, DANNER DB, TICE RR, PEARSON JD, BRANT LJ, MORRELL CH e SCHNEIDER EL. Basal DNA damage in individual human lymphocytes with age. Mutation Research.1991;256:1-6.

43- OKUNO, Emico. Efeitos biológicos das radiações ionizantes. São Paulo: oficina de textos, 2010.

44-MONTEIRO, M.S, VILAS BOAS DB. GLIOTTI CB..Association among XRCC1, XRCC3, and BLHX gene polymorphisms and chromosome instability in lymphocytes from patients with endometriosis and ovarian cancer. Genetics and Molecular Research. 2014;13(1):636-648.

45- SHEN, M. R.; JONES, I. M.; MOHRENWEISER, H.; Nonconservative amino acid substitution variants exist polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans.Cancer Research. 1998.58:604-608.

46- ALMEIDA, KH, SOBOL, RW.A unified view of base excisionrepair: lesion-dependent protein complexes regulated by posttranslational modification. DNA Repair (Amst), 2012;6(6):695-711.

47- SHAN LI, QILIU PENG, YONGBIN CHEN, et al.DNA Repair Gene XRCC1 Polymorphisms, Smoking, andBladder Cancer Risk: A Meta-Analysis. Plosone. 2013;8(9): e73448

48- DA SILVA, AL, ROSA H, KARNOPP TE. Evaluation of DNA damage in COPD patients and its correlation with polymorphisms in repair genes. BMC Medical Genetics. 2013;14:93.

49- WHITEHOUSE CJ, THISTLEWAITE A, et al. XRCC1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair. Cell. 2001;104(1):107-17.

50- CALDECOTT KW, AOUFOUCHI S, JOHNSON P, SHALL. XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly(ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro. Nucleic Acids Res. 1996; 24: 4387-4394.

51- GANG DING, XU WEIGUO, HUA H. et al. Comprehensive assessment of the association between DNA repair gene XRCC3 rs861539 C/T polymorphism and lung cancer risk. Tumor Biol. (2013) 34:2521– 2527

52- SUPARNA S. PACHOURI, RANBIR CHANDER SOBTI, PUSHPINDER KAUR, and JAGMOHAN SINGH. Contrasting Impact of DNA Repair Gene XRCC1 Polymorphisms Arg399Gln and Arg194Trp on the Risk of Lung Cancer in North-Indian Population. DNA and Cell Biology. 2007, 26,3.

53- WANG LEILI, GIN C. SHU J., et al. Genetic Variants of XRCC1, APE1, and ADPRT Genes and Risk of Bladder Cancer. DNA and Cell Biology 2010, 29: 6,

54- MATULLO, G., GUARRERA, S., SACERDOTE, C., POLIDORO, S., DAVICO, L., et al. Polymorphisms=haplotypes in DNA repair genes and smoking: a bladder cancer case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14:2569-2578.

55- DUELL, E.J., MILLIKAN, R.C., ILTTMAN, G.S., WINKEL, S., LUNN, R.M., TSE, C.K., EATON, A., MOHRENWISER, H.W., NEWMAN, B., and BELL, D.A. Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and breast cancer. *Cancer Epidemiol.* 2001;10: 217–222.

56- CHACKO P. RAJAN B. JOSEPH T. MATHEW B. Polymorphisms in DNA repair gene XRCC1 and increased genetic susceptibility to breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment.*2005; 89:15-21.

57-CUI Z, YIN Z. LI X. WU W. et al. Association between polymorphisms in XRCC1 gene and clinical outcomes of patients with lung cancer: a meta-analysis. *BMC Cancer* 2012;12:71.

58- ABDEL-RAHMAN SZ, EL-ZEIN RA: The 399Gln polymorphism in the DNA repair gene XRCC1 modulates the genotoxic response induced in human lymphocytes by the tobacco-specific nitrosamine NNK. *CancerLett* 2000, 159:63-71.

59-MATULLO G, PALLI D, PELUSO M, GUARRERA S, CARTURAN S, CELENTANO et al. XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and

(32)P-DNA adducts in a sample of healthy subjects. *Carcinogenesis* 2001; 22:1437-1445.

60-WANG, Z. DNA damage-induced mutagenesis: A novel target for cancer prevention. *Mol. Interv.*2001;1:269–281.

61-MATEUCA, R. A.; ROELANTS, M.; IARMACOVAI, G.; AKA, P. V.; GODDERIS, L.; TREMP, A.; BONASSI, S.; FENECH, M.; BERGÉ-LEFRANC, J. L.; KIRSCH-VOLDERS M.; Hogg¹³²⁶, XRCC1³⁹⁹, and XRCC3²⁴¹ polymorphisms influence micronucleus frequencies in human lymphocytes in vivo. *Mutagenesis*. 2007;23(1):35-41.

62- FIGL, A. SCHERER D. NAGORE E, BERMEJO JL, DICKES E. et al. Single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes XRCC1 and APEX1 in progression and survival of primary cutaneous melanoma patients. *Mutat Res*. 2009;661:78-84.

63- NELSON, HH, KELSEY KT, MOTT LA, KARAGAS MR. The XRCC1 Arg399Gln polymorphism, sunburn, and non-melanoma skin cancer: evidence of gene-environment interaction. *Cancer Res*. 2002; 62:910:152-5.

64-HAN J, HANKINSON SE, COLDITZ GA, HUNTER DJ. Genetic variation in XRCC1 sun exposure, and risk of skin cancer. *Br J Cancer*. 2004; 91(8):1604-9.

65-

HAN S, ZHANG HT, WANG Z, XIE Y, TANG.R, MAO Y, Li Y. DNA repair geneXRCC3 polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis of 48 case-controlstudies. Eur J Hum Genet. 2006;14(10):1136-44.

66- WINSEY SL. HALDAR NA, MARCS HP. Et al. A variant within the DNA repair gene XRCC3 is associated with the development of melanoma skin cancer. Cancer Res2000;60(20):5612-6.

67-ZHAN P, WANG Q, QIAN Q, Yu LK. XRCC3 Thr241Met gene polymorphisms and lung cancer risk: a meta -analysis .J ExpClinCancer Res. 2013;32:1.

68- DUAN C. ZHANG W. et al. DNA repair gene XRCC3 Thr241M et polymorphism and hepatocellular carcinoma risk.Tumor Biol. 2013; 34:2827–2834

69-SILVA SN, TOMAR M, PAULO C, GOMES BCet al. Breast cancer risk and common single nucleotide polymorphisms in homologous recombination DNA repair pathway genes XRCC2, XRCC3, NBS1 and RAD51.Cancer Epidemiol.2010;34:85– 92.

70-MATULLO, G. PALLI et al. XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and 32P-DNA adducts in a sample of healthy subjects. Carcinogenesis,2001;22(9):1437-1445.

6.Considerações Finais

Conforme resultados apresentados em nosso trabalho, sugerimos:

- A padronização de protocolos de dose e tempo de exposição, em exames cintilografia miocárdica e angioplastia miocárdica, principalmente quando da utilização de equipamentos de nova geração, afim de diminuir os efeitos biológicos da radiação.
- A realização de dosimetria citogenética e genotipagens para os polimorfismos de reparo XRCC1 e XRCC3, como parte da rotina, nos grupos de pacientes expostos à baixas doses de radiação de rotina, quando pré-dispostos à carcinogênese.
- A realização rotineira da avaliação citogenética e genotipagens para os polimorfismos de reparo XRCC1 e XRCC3 para grupos de profissionais (expostos ocupacionais), como forma de dosimetria interna(radiossensibilidade), como forma de prevenir o impacto da ação do tempo, na exposição nestes profissionais.

7.Anexos - TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

***Investigação da ação mutagênica em pacientes expostos à radiação:
análise da associação do dano genético e polimorfismos dos genes de
reparo.***

(Nome completo do PACIENTE – Preencher em letra de forma) RG/Estado

Você está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa. Este estudo tem por objetivo avaliar a possível ação da exposição à radiação x e gama em pacientes submetidos à angioplastias e cintilografias miocárdicas. A pesquisa será feita durante a própria realização do seu procedimento, sendo que não será necessária a vinda exclusiva para participação. Será coletada uma amostra de 5 mL de sangue antes do início dos procedimentos, uma segunda amostra após 6 horas, e uma terceira amostra após 24 horas do término do exame. Durante a coleta das amostras de sangue, o paciente pode sentir um desconforto pela “picada”, introdução da agulha, mas passageiro em poucos minutos, mas este não acarreta risco à sua saúde.

Foi dada a liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isso me traga prejuízo. A participação neste projeto não acarreta nenhum custo, e também não haverá nenhuma remuneração associada à pesquisa.

As informações serão utilizadas somente para fins de pesquisa, sendo extremamente confidenciais e sempre preservando sua privacidade. Os dados obtidos poderão ser utilizados quando se fizer necessário, incluindo a divulgação dos mesmos.

Você que assina este documento declara ter recebido uma explicação clara e completa sobre a pesquisa acima mencionada a que se submete de livre e espontânea vontade.

Os pesquisadores responsáveis pelo estudo são Profa. Sandra Segal, e Fernanda do Amarante e posso contatá-los pelo telefone 3359-8011 e (51) 9315-2645 ou na Rua: Ramiro Barcellos, 2350/ 3º Andar – Setor de Genética, para esclarecimento de qualquer dúvida.

Declaro que estou ciente do acima exposto e concordo em participar do estudo.

Assinatura da Paciente

Pesquisadora Sandra Segal/Pesquisadora Fernanda do Amarante

Telefone de contato do Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA: 3359-7640