

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS EM GENES DE REPARAÇÃO DO
DNA NA FREQUÊNCIA DE ANOMALIAS CROMOSSÓMICAS
RADIOINDUZIDAS**

Fátima do Rosário Nunes Gil

MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR E GENÉTICA

2007/2008

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS EM GENES DE REPARAÇÃO DO
DNA NA FREQUÊNCIA DE ANOMALIAS CROMOSSÓMICAS
RADIOINDUZIDAS**

Fátima do Rosário Nunes Gil

MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR E GENÉTICA

Dissertação de Mestrado orientado pelo Professor Auxiliar Dr. Júlio Duarte (FCUL) e
pela Investigadora Auxiliar Dr.^a Maria João Silva (INSA)

2007/2008

AGRADECIMENTOS

À Dr.^a Maria João Silva, pela oportunidade que me deu ao aceitar-me para fazer o estágio de Mestrado no Laboratório de Toxicologia Genética, pela supervisão científica, pela disponibilidade e dedicação na orientação, pelo conhecimento transmitido e amizade.

À Dr.^a Henriqueta Louro, pelo auxílio prestado na técnica de extracção automática de DNA e nos primeiros PCRs, assim como pela disponibilidade e amizade.

A todos os colegas do Laboratório de Toxicologia Genética, pelo bom ambiente de trabalho, amizade e simpatia.

Ao Dr. Paulo Nogueira, pelo auxílio prestado na análise estatística dos dados obtidos.

Ao Professor Júlio Duarte, pela orientação interna do estágio de Mestrado e pela disponibilidade sempre que precisei.

À minha família, pais e irmãos, por todo o apoio e carinho, e por estarem sempre presentes.

RESUMO

Os polimorfismos em genes que codificam proteínas envolvidas na reparação do DNA têm sido considerados como potencialmente modificadores do risco de cancro, particularmente em indivíduos expostos a agentes genotóxicos, tal como a radiação ionizante.

Num estudo anterior, avaliou-se o nível de alterações citogenéticas e a competência de reparação das lesões no DNA, num grupo de residentes na vizinhança de minas de urânio e seus resíduos, comparativamente a dois grupos não expostos. As frequências de aberrações cromossómicas (ACs) estáveis e instáveis, quer espontâneas quer radioinduzidas *in vitro* em linfócitos, foram determinadas por hibridação *in situ* fluorescente.

O presente estudo visou investigar a influência dos polimorfismos em genes de reparação do DNA envolvidos na reparação de danos radioinduzidos - *hOGG1*, *XRCC1*, *XPD*, *XRCC3*, *RAD51* e *NBS1* - nas frequências de ACs nos grupos referidos. A genotipagem foi efectuada pelo método de PCR-RFLP.

Os resultados mostraram que não existe uma associação estatisticamente significativa entre qualquer dos polimorfismos genéticos estudados e a frequência espontânea de ACs, excepto para o alelo variante 751Gln de *XPD*. Contudo, detectaram-se algumas associações estatisticamente significativas entre determinados genótipos e a frequência de ACs radioinduzidas. Assim, verificou-se que tanto o alelo variante 194Trp de *XRCC1* como o alelo 751Gln de *XPD* estão associados a uma redução significativa de ACs radioinduzidas. Ao invés, os alelos variantes 280His de *XRCC1* e 135C de *RAD51* estão, em geral, associados a um aumento significativo de ACs.

Em conclusão, os resultados obtidos vêm confirmar a hipótese de que polimorfismos em genes de reparação do DNA afectam os níveis de aberrações cromossómicas radioinduzidas tendo, possivelmente, um efeito modulador do risco individual para o desenvolvimento de cancro.

Palavras-chave: Radiação ionizante, aberrações cromossómicas, reparação do DNA, polimorfismos

ABSTRACT

Polymorphisms in DNA repair genes coding DNA repair proteins have been considered as potential modifiers of cancer risk, particularly in individuals exposed to genotoxic agents, such as ionizing radiation.

In a previous study the level of cytogenetic damage and the DNA repair competence were evaluated in a group of individuals living in the vicinity of uranium mines and its residues (GE), in comparison with two non-exposed groups (GNE and GR). Data on the frequencies of spontaneous and gamma-rays induced stable and unstable chromosome aberrations (CA) in vitro in lymphocytes, were determined by fluorescent in situ hybridization.

The aim of the present study was to investigate the influence of polymorphisms in DNA repair genes involved in the repair of ionizing radiation-induced DNA damage - *hOGG1*, *XRCC1*, *XPD*, *XRCC3*, *RAD51* and *NBS1* - on the frequencies of CA in referred groups. Genotyping was performed by PCR-RFLP method.

We found is no statistically significant association between any genetics polymorphisms and the frequencies of spontaneous CA, except for *XPD* 751Gln variant allele. However, some statistically significant associations were observed between certain genotypes and the frequency of radiation-induced CA. In fact, it was observed that both *XRCC1* 194His and *XPD* 751Gln variant alleles are associated with a significant reduction of radio-induced CA. In contrast, *XRCC1* 280His and *RAD51* 135C variant alleles are, in general, associated with an significant increase of CA.

In conclusion, our results support the hypothesis that polymorphisms in DNA repair genes affect radiation-induced chromosome aberration levels and possibly modulate individual cancer risk.

Key words: Ionizing radiation, chromosome aberrations, DNA repair, polymorphisms

ABREVIATURAS E CONVENÇÕES

5'-UTR	Região 5' não transcrita
5'-dRP	Extremidade 5' desoxirribose fosfato
⁶⁰Co	Cobalto-60
8-Oxo-dG	8-oxoguanina
A	Adenina
ACs	Aberrações cromossômicas
ANOVA	Análise de variância
Arg	Aminoácido arginina
ATM	Do inglês " <i>Ataxia-telangiectasia mutated gene</i> "
B[a]PDE	Do inglês "Benzo[alpha]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide"
BER	Reparação por excisão de bases
BRCA1	Proteína 1 de susceptibilidade ao cancro da mama
BRCA2	Proteína 2 de susceptibilidade ao cancro da mama
BRCT	Extremidade C de BRCA
C	Citosina
Cys	Aminoácido cisteína
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNA-PK	Proteína cinase dependente de DNA
dNTPs	Desoxirribonucleótidos fosfatados
DSBs	Quebras de cadeia dupla
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Endonuclease AP	Endonuclease apurínica/apirimidínica
ERCC1	Complexo1 "excision repair cross complementing"
FEN1	Flap endonuclease 1
FISH	Hibridação do DNA <i>in situ</i> com fluorescência
G	Guanina
GE	Grupo exposto
Gln	Aminoácido glutamina
Glu	Aminoácido glutamato
GNE	Grupo não exposto
GR	Grupo de referência
H₂O₂	Peróxido de hidrogénio
His	Aminoácido histidina
hOGG1	Do inglês " <i>human 8-oxo-guanine DNA glycosylase 1</i> "

HR	Recombinação homóloga
Local AP	Local apurínico/apirimidínico
Lys	Aminoácido lisina
Met	Aminoácido metionina
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
mM	milimol
MN	Micronúcleos
MRE11	Do inglês “meiotic recombination 11”
mSv	miliSievert
NBN	Proteína nibrina
NBS	Do inglês “ <i>Nimegen Breakage Syndrome</i> ”
NBS1	Do inglês “ <i>Nimegen Breakage Syndrome 1</i> ” (nibrina)
NER	Reparação por excisão de nucleótidos
ng	nanograma
NHEJ	Reparação por junção de extremidades não homólogas
OH[·]	Radical hidroxilo
p53	Gene supressor de tumores
PARP	Poli(ADP-ribose) polimerase
pb	par de bases
PCNA	Antigénio nuclear de proliferação celular
PCR	Do inglês “ <i>polymerase chain reaction</i> ”
pmol	picomol
RAD(50-52, 54)	Do inglês “RAD51 homolog (RecA homolog, E. coli) (<i>S. cerevisiae</i>)”
RFLP	Do inglês “ <i>restriction fragment length polymorphism</i> ”
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reactivas de oxigénio
RPA	Proteína de replicação A
SCE	Troca de cromatídios irmãos
Ser	Aminoácido serina
SNPs	Do inglês “ <i>single nucleotide polymorphisms</i> ”
SSBs	Quebras de cadeia simples
T	Timina
TFIIH	Factor de transcrição IIH
Thr	Aminoácido treonina
Trp	Aminoácido triptofano
U	unidades
UV	Ultra Violeta

XP(A-G)	Do inglês “ <i>xeroderma pigmentosum group A-D complementing protein</i> ”
XRCC(1-4)	Do inglês “ <i>X-ray cross complementing group 1-4</i> ”
µL	microlitro

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1- Radiação Ionizante	1
1.1.1- Fontes de exposição humana	1
1.1.2- Mecanismos de acção e efeitos biológicos	2
1.1.3- Efeitos na saúde humana	4
1.2- Biomarcadores de efeito biológico: aberrações cromossómicas	4
1.3- Reparação do DNA, vias de reparação e polimorfismos genéticos	6
1.3.1- Reparação por excisão de bases	6
1.3.2- Reparação por excisão de nucleótidos	7
1.3.3- Reparação de quebras de cadeia dupla	8
1.4- Genes de reparação do DNA e polimorfismos	9
2. OBJECTIVO	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1- Grupos de estudo	12
3.2- Análise de aberrações cromossómicas	12
3.3- Análise de polimorfismos em genes de reparação do DNA	13
3.1.1- Extração de DNA	13
3.1.2- Genotipagem por PCR-RFLP	13
3.4- Análise Estatística	15
4. RESULTADOS	16
5. DISCUSSÃO e CONCLUSÕES	23
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
7. ANEXOS	31

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1.1:	Mecanismos de acção da radiação ionizante a nível da molécula de DNA e proteínas	3
Figura 1.2:	Esquema descritivo da formação de ACs devido à exposição a radiação ionizante	5
Figura 1.3:	Mecanismo de reparação de lesões no DNA pela via BER: sub via <i>short patch</i> (A) sub via <i>long patch</i> (B)	7
Figura 1.4:	Mecanismo de reparação de lesões no DNA pela via NER	8
Figura 1.5:	Mecanismo de reparação de DSBs na molécula de DNA por recombinação homóloga (A) e por junção de extremidades não homólogas (B)	9
Tabela 1.1:	Polimorfismos em genes de reparação do DNA avaliados	10
Tabela 3.1:	Constituintes das misturas de reacção para PCR e restrição enzimática	14
Tabela 3.2:	Descrição do tamanho do produto de PCR, do padrão de restrição e respectiva enzima para cada polimorfismo analisado	15
Figura 4.1:	Fotografia de um gel de agarose <i>NuSieve</i> 3% (p/v) após digestão dos produtos de PCR referentes ao polimorfismo <i>hOGG1</i> ³²⁶	16
Tabela 4.1:	Distribuição dos genótipos referentes aos polimorfismos analisados na população total e nos grupos GE, GNE e GR	17
Figura 4.2:	Frequência espontânea média de cromossomas dicêntricos na população total	19
Figura 4.3:	Frequência espontânea média de cromossomas dicêntricos em GR	19
Figura 4.4:	Frequência média de ACs totais radioinduzidas na população total	20
Figura 4.5:	Frequência média de ACs totais radioinduzidas em GE	21
Figura 4.6:	Frequência média de ACs estáveis radioinduzidas na população total	21
Figura 4.7:	Frequência média de ACs estáveis radioinduzidas em GE	21
Figura 4.8:	Frequência média de ACs instáveis radioinduzidas na população total	22
Figura 4.9:	Frequência média de ACs instáveis radioinduzidas em GE	22
Figura 4.10:	Frequência média de ACs instáveis radioinduzidas em GNE	22

Tabela 7.1 anexos:	Sequências dos primers utilizados para a análise de cada polimorfismo	31
Tabela 7.2 anexos:	Programas das reacções de PCR utilizadas para os vários polimorfismos analisados	31
Tabela 7.3 anexos:	Frequência (média \pm desvio padrão) de ACs totais, estáveis e instáveis espontâneas, para <i>hOGG1</i> ³²⁶	32
Tabela 7.4 anexos:	Frequência (média \pm desvio padrão) de ACs totais, estáveis e instáveis radioinduzidas, para <i>hOGG1</i> ³²⁶	32
Tabela 7.5 anexos:	Frequência (média \pm desvio padrão) de ACs totais, estáveis e instáveis espontâneas para <i>XRCC1</i> ¹⁹⁴	32
Tabela 7.6 anexos:	Frequência (média \pm desvio padrão) de ACs totais, estáveis e instáveis radioinduzidas para <i>XRCC1</i> ¹⁹⁴	33
Tabela 7.7 anexos:	Frequência (média \pm desvio padrão) de ACs totais, estáveis e instáveis espontâneas para <i>XRCC1</i> ²⁸⁰	33
Tabela 7.8 anexos:	Frequência (média \pm desvio padrão) de ACs totais, estáveis e instáveis radioinduzidas para <i>XRCC1</i> ²⁸⁰	33
Tabela 7.9 anexos:	Frequência (média \pm desvio padrão) de ACs totais, estáveis e instáveis espontâneas para <i>XRCC1</i> ³⁹⁹	34
Tabela 7.10 anexos:	Frequência (média \pm desvio padrão) de ACs totais, estáveis e instáveis radioinduzidas para <i>XRCC1</i> ³⁹⁹	34
Tabela 7.11 anexos:	Frequência (média \pm desvio padrão) de ACs totais, estáveis e instáveis espontâneas para <i>XPB</i> ⁷⁵¹	34
Tabela 7.12 anexos:	Frequência (média \pm desvio padrão) de ACs totais, estáveis e instáveis radioinduzidas para <i>XPB</i> ⁷⁵¹	35
Tabela 7.13 anexos:	Frequência (média \pm desvio padrão) de ACs totais, estáveis e instáveis espontâneas para <i>RAD51</i> ^{135C}	35
Tabela 7.14 anexos:	Frequência (média \pm desvio padrão) de ACs totais, estáveis e instáveis radioinduzidas para <i>RAD51</i> ^{135C}	35
Tabela 7.15 anexos:	Frequência (média \pm desvio padrão) de ACs totais, estáveis e instáveis espontâneas para <i>NBS1</i> ¹⁸⁵	36
Tabela 7.16 anexos:	Frequência (média \pm desvio padrão) de ACs totais, estáveis e instáveis radioinduzidas para <i>NBS1</i> ¹⁸⁵	36
Figura 7.17 anexos:	Frequência (média \pm desvio padrão) de ACs totais, estáveis e instáveis, espontâneas e radioinduzidas para <i>XRCC3</i> ²⁴¹	36

1. INTRODUÇÃO

No âmbito do projecto MinUrar (1), analisaram-se os efeitos da exposição prolongada a urânio e produtos do seu decaimento na frequência de aberrações cromossómicas (ACs) estáveis e instáveis pela técnica de hibridação do DNA *in situ* com fluorescência (*FISH*), num grupo de indivíduos com exposição ambiental a urânio (GE), comparativamente a dois grupos de indivíduos não expostos (GNE e GR). Neste estudo avaliou-se ainda a existência de modificações na competência de reparação do DNA através do ensaio *challenge*.

Os resultados mostraram um aumento da frequência de ACs estáveis e instáveis basais, em particular de translocações, nos indivíduos do grupo exposto, comparativamente aos grupos não expostos, embora sem significado estatístico. Relativamente às frequências de ACs estáveis e instáveis radioinduzidas *in vitro* (ensaio *challenge*), o grupo exposto revelou frequências de ACs significativamente mais baixas do que os grupos não expostos.

Neste estudo pretende-se avaliar a potencial influência dos polimorfismos em genes de reparação do DNA na frequência de ACs, estáveis e instáveis, espontâneas e induzidas pela radiação ionizante, nos três grupos referidos.

1.1- Radiação Ionizante

1.1.1- Fontes de exposição humana

A exposição dos seres humanos a radiação ionizante proveniente de fontes naturais é uma consequência inevitável da vida na Terra. Existem dois contribuintes principais para a exposição natural: incidência de partículas de raios cósmicos de elevada energia na atmosfera terrestre e radionuclídeos que têm origem na crosta terrestre (solo, água e vegetação) e, inclusive, estão presentes no corpo humano desde o nascimento, como o carbono catorze. O ser humano está também exposto a fontes de radiação artificiais, resultantes da actividade humana, como acidentes nucleares (Chernobyl), fumo de tabaco e exposição médica (raio-X). A exposição ocupacional constitui igualmente uma importante fonte de exposição: mineiros, por exemplo minas de urânio, trabalhadores envolvidos no processamento do minério, trabalhadores de centrais nucleares e tripulações de voo, são alguns exemplos.

Uma fonte importante de radiação ionizante é o urânio. Este é um metal pesado que ocorre naturalmente em várias formas químicas em solos, rochas, oceanos, água potável e alimentos. Em consequência do seu processo de decaimento, emite radiação alfa e alguma radiação gama, possuindo assim, manifesta toxicidade química e radiobiológica (2).

1.1.2- Mecanismos de acção e efeitos biológicos

A radiação ionizante tem a capacidade de atingir qualquer tipo de célula no organismo. Contudo, nem todos os tipos de células são igualmente sensíveis à radiação, o que depende da influência de factores físicos, químicos e biológicos, tais como, dose de radiação, o seu débito e fraccionamento, presença/ausência de antioxidantes, estado proliferativo e constituição genética das células.

As moléculas biológicas podem ser alteradas pela radiação ionizante, existindo dois mecanismos pelos quais esta afecta as células (Figura 1.1):

- Mecanismo directo (deposição directa de energia no DNA): ocorre quando a radiação interage com os átomos da molécula de DNA ou com outros componentes celulares críticos para a sobrevivência da célula, provocando uma alteração química da molécula através da sua ionização;
- Mecanismo indirecto (reacções com radicais de água difusíveis): as moléculas de água, que constituem a maior parte do volume celular, são ionizadas, processo chamado radiólise, dando origem a espécies reactivas de oxigénio (ROS), que podem ser espécies moleculares como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e radicais livres, como o radical hidroxilo (OH^\bullet).

A radiação ionizante induz lesões na molécula de DNA, cujas consequências biológicas correspondem a um aumento da ocorrência das mutações genómicas e cromossómicas implicadas na tumorigénese. Estas lesões incluem modificações de bases e quebras de cadeia do DNA, em particular quebras de cadeia dupla (DSBs), as quais são consideradas como sendo a forma de dano mais crítica pois se não forem correctamente reparadas podem ser citotóxicas ou induzir a formação de aberrações cromossómicas (3).

As DSBs induzidas pela radiação ionizante definem-se como sendo a ocorrência de duas quebras de cadeia simples (SSBs) espaçadas por, aproximadamente, seis a dez pares de bases. A importância das DSBs induzidas em células de mamíferos é justificada pela hipótese de que a eficiência da sua reparação é reduzida comparativamente a SSBs e, como consequência, contribuem de forma crítica para os efeitos biológicos decorrentes da exposição a radiação ionizante (3).

No que diz respeito aos mecanismos indirectos, estudos que utilizaram soluções aquosas contendo DNA indicam que o OH^\bullet é o principal radical que induz SSBs e DSBs na cadeia de DNA, enquanto que os electrões hidratados, átomos de hidrogénio, e também os radicais hidroxilo, induzem lesões em bases (4 e 5). Um dos produtos que resulta da oxidação do DNA é a 8-oxo-desoxiguanina (8-Oxo-dG), que resulta da oxidação da guanina

pelo radical hidroxilo, podendo induzir a formação de SSBs e DSBs, as quais podem levar a ACs.

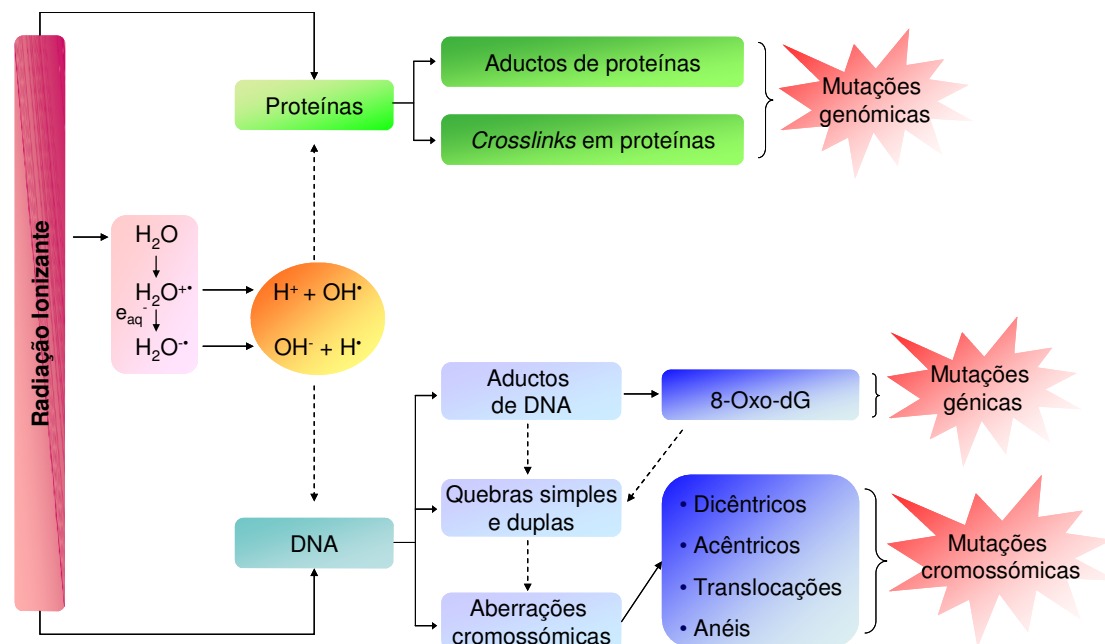


Figura 1.1: Mecanismos de acção da radiação ionizante e suas consequências a nível da molécula de DNA e proteínas (adaptado de 43).

Os efeitos biológicos da radiação ionizante dividem-se, de um modo geral, em duas categorias (6), de acordo com a dose e o tempo de duração da exposição. A primeira inclui os efeitos agudos ou de curto termo na sequência da exposição a elevadas doses de radiação durante curtos períodos de tempo. A segunda categoria representa efeitos crónicos ou de longo termo associados a exposição a doses baixas de radiação durante um período de tempo prolongado. Tendo em conta que o ser humano está maioritariamente exposto a baixos níveis de radiação ionizante (viagem de avião, raios-x, exposição ao fundo radioactivo natural, etc.), é de esperar que este tipo de dose tenha um papel de maior relevância na indução de doenças crónico-degenerativas, como é o caso do cancro. No caso de exposições agudas existem evidências claras de efeitos adversos na saúde, desde a morte até um risco aumentado de cancro (leucemia e tumores sólidos).

Relativamente à exposição a doses baixas de radiação ionizante, definidas como doses inferiores a 100mSv, observa-se um risco aumentado de certas formas de cancro para doses superiores a 50mSv e um risco moderado para doses de 5mSv. Para exposições prolongadas existe um aumento do risco de cancro em doses superiores a 100mSv, e evidências moderadas para doses acima de 50mSv (7).

A radiação ionizante determina ainda um conjunto de respostas celulares, nomeadamente alteração da síntese de um conjunto de proteínas onde se incluem as enzimas de reparação do DNA. Quando as células são expostas inicialmente a baixas doses de radiação e subsequentemente são expostas a uma dose elevada podem-se observar

alterações que se traduzem por um de dois tipos de efeitos, ambos reflectindo alterações na capacidade celular de reparação de lesões na molécula de DNA: hipersensibilidade, que consiste num aumento das lesões cromossómicas face às esperadas (8); e adaptação, que se traduz por uma redução dos danos cromossómicos esperados, face à dose de radiação aplicada, fenómeno denominado de resposta adaptativa.

A radiação pode, ainda, induzir danos em células que não são atingidas directamente pela radiação, o que se denomina efeito *bystander*. Este parece ocorrer em resposta a factores que são produzidos por células atingidas pela radiação de forma directa (9).

1.1.3- Efeitos na saúde humana

A exposição a radiação ionizante tem sido associada a vários tipos de cancro como é o caso da tiróide, mama e pulmão, assim como a leucemia (10).

Em particular, os efeitos da exposição crónica ao urânio e seus radionuclidos na saúde humana incluem alterações da função renal e reprodutora (11), e ainda um aumento da incidência de cancro, particularmente dos ossos, pulmão e do sistema linfo/hematopoiético (leucemias e linfomas) (12, 13 e 14). As consequências na saúde da exposição ao urânio prendem-se com as suas propriedades de metal pesado e material radioactivo natural sendo capaz de induzir SSBs e DSBs no DNA que poderão dar origem a ACs. Por sua vez, estas poderão estar implicadas em processos de desregulação e transformação celular conducentes ao desenvolvimento de malignidades.

1.2- Biomarcadores de efeito biológico: aberrações cromossómicas

Os biomarcadores consistem em determinações quantificáveis de eventos biológicos responsáveis pela transformação de condições biológicas normais em anormais, como por exemplo, metabolitos químicos *in vivo* e alterações genéticas. Em geral, os biomarcadores classificam-se em três categorias: biomarcadores de exposição (ex. metabolitos químicos, aductos de DNA e de proteínas), biomarcadores de efeito biológico precoce (ACs, SCE, (troca de cromatídios irmãos) micronúcleos (MN)) e biomarcadores de susceptibilidade (ACs, mutações em genes predisponentes do cancro) (15).

As alterações citogenéticas em linfócitos de sangue periférico, como ACs, SCE e MN têm sido aplicados como biomarcadores da exposição a agentes genotóxicos e de efeitos biológicos precoces de carcinogéneos genotóxicos (16 e 17). A utilização destes biomarcadores baseia-se no facto da maioria dos carcinogéneos humanos serem genotóxicos em testes de curto termo (18). O objectivo principal consiste em usar os dados

obtidos para detecção precoce de alterações biológicas antes do desenvolvimento de consequências na saúde a longo prazo, como é o caso do cancro. Para estudos cromossômicos é necessário obter células em divisão tais como os linfócitos de sangue periférico uma vez que são células primárias fáceis de manter em cultura com o cariótipo estável e possuem baixas taxas de danos cromossômicos espontâneos.

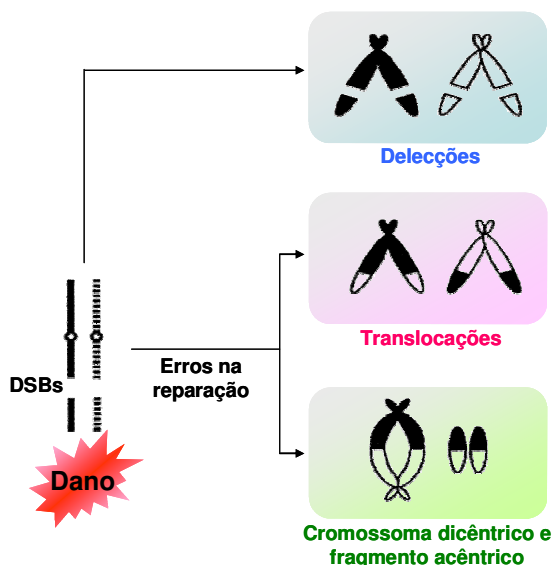


Figura 1.2: Esquema descritivo da formação de ACs devido à exposição a radiação ionizante (adaptado de 67).

As ACs são alterações na estrutura ou número normal de cromossomas de uma célula diplóide que podem ocorrer de forma espontânea ou como resultado da exposição a um químico ou radiação (19). De acordo com critérios morfológicos, as ACs estruturais podem-se dividir em dois grupos: aberrações de tipo cromatídico que envolvem apenas um dos dois cromatídios de um ou mais cromossomas, e aberrações de tipo cromossômico que envolvem ambos os cromatídios de um ou vários cromossomas (16 e 20). Iremos apenas dar atenção às ACs tipo cromossômicas (Figura 1.2), uma vez que a radiação ionizante provoca essencialmente este tipo de ACs (16).

A formação de AC estruturais depende da existência de uma ou mais DSBs na cadeia de DNA, mas os mecanismos de formação dos dois grupos de ACs estruturais diferem de acordo com o tipo de mutagêneo. No caso particular da radiação ionizante, as aberrações cromossômicas resultam de DSBs da molécula de DNA mal reparadas ou não reparadas que são predominantemente produzidas *in vivo* em linfócitos na fase G_0 - G_1 .

A relevância das ACs, não partilhada pelas SCE, como um biomarcador de excelência deve-se a dados de estudos epidemiológicos que mostram que uma elevada frequência de ACs está associada a um elevado risco de cancro (18 e 21). Deste modo, a análise de ACs em linfócitos de sangue periférico constitui um dos biomarcadores mais sensíveis para avaliação do risco de neoplasia maligna, reflectindo quer efeitos biológicos precoces decorrentes da exposição a agentes genotóxicos com actividade carcinogénica quer a susceptibilidade individual para o cancro (22, 23 e 24). Determinados estudos (22, 23

e 25) indicam que a preditividade do risco de cancro não depende do tempo que medeia a análise cromossómica e o diagnóstico de cancro e que não é restrito a fumadores ou a indivíduos ocupacionalmente expostos (21), sugerindo um significado geral das ACs como biomarcadores de um risco acrescido de desenvolvimento de cancro.

Vários estudos indicam que os factores que contribuem para a susceptibilidade podem ser classificados em factores de susceptibilidade adquirida e de susceptibilidade genética, que conjuntamente podem afectar a expressão dos biomarcadores (26, 27 e 28).

1.3- Reparação do DNA, vias de reparação e polimorfismos genéticos

A integridade do genoma humano é continuamente ameaçada por agentes endógenos resultantes do metabolismo celular ou da replicação e recombinação do DNA, e também por exposições exógenas. As lesões no DNA daí resultantes, se não forem correctamente reparadas, podem conduzir à acumulação de mutações em genes cruciais para o metabolismo e crescimento celular normal e que, quando desregulados, poderão contribuir para o aparecimento de doença. A integridade do material genético é tão importante para a viabilidade das células que existem mecanismos de reparação de lesões no DNA, sendo capazes de efectuar a reparação de quase todos os tipos de danos.

Os mecanismos de reparação do DNA são geralmente divididos em cinco, com subdivisões em muitos deles: reversão directa, reparação de erros de emparelhamento de bases do DNA, reparação por excisão de bases (BER), reparação por excisão de nucleótidos (NER) e reparação de quebras duplas no DNA (DSBR) por recombinação homóloga (HR) e por junção de extremidades não homólogas (NHEJ) (29). Como as lesões infligidas pela radiação ionizante a nível da molécula de DNA (bases oxidadas, SSBs e DSBs no DNA) são essencialmente reparadas pelas vias BER, NER e DSBR, apenas estes mecanismos vão ser alvo de maior detalhe.

1.3.1- Reparação por excisão de bases

Esta via de reparação actua quando se formam bases oxidadas ou reduzidas e aductos não volumosos (30). Está ainda envolvida na reparação de quebras simples da molécula de DNA que podem surgir como intermediários normais da via BER ou de danos directos à molécula de DNA (31). Esta via inclui as sub vias *short patch*, para reparação de fragmentos curtos, e *long patch*, para reparação de fragmentos longos. Os primeiros passos de ambas são comuns, enquanto que nos passos seguintes as proteínas intervenientes diferem dependendo da sub via, de acordo com a figura 1.3.

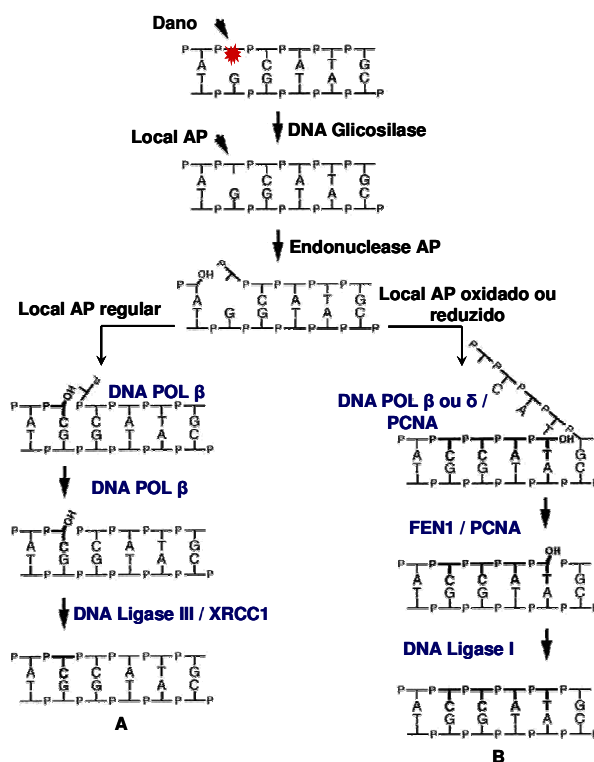


Figura 1.3: Mecanismo de reparação de lesões no DNA pela via BER:

A- Sub via *short patch*, onde uma glicosilase de DNA reconhece e remove a base danificada; o local abásico resultante é clivado por uma endonuclease apurínica/apirimidínica, resultando numa SSB; no caso do local abásico ser regular a polimerase β de DNA sintetiza o DNA e o complexo DNA ligase III/XRCC1 sela a quebra. XRCC1 recruta a polimerase β de DNA e a DNA ligase III conjuntamente para o local de reparação.

B- Sub via *long patch*, onde há o envolvimento de proteínas diferentes quando a extremidade 5'-dRP é resistente à eliminação pela polimerase β de DNA por se encontrar reduzida ou oxidada. Neste caso é necessário processar 5'-dRP como parte de uma saliência, a qual é removida por FEN1. Nesta sub via intervêm as polimerases δ/ϵ de DNA, dependentes de PCNA. (adaptado de 93)

1.3.2- Reparação por excisão de nucleótidos

Esta via está envolvida principalmente na reparação de lesões no DNA volumosas que provocam a distorção da molécula de DNA. É também o principal mecanismo responsável pela remoção de lesões induzidas pela radiação ultra violeta (UV) (32) e ainda está envolvida na reparação de pequenas lesões causadas por ROS (33). Em humanos envolve, pelo menos, quatro passos, de acordo com a figura 1.4 (30). A via de reparação NER possui ainda uma sub via que consiste na reparação acoplada à transcrição. Este mecanismo repara principalmente lesões de DNA que se localizam na cadeia transcrita.

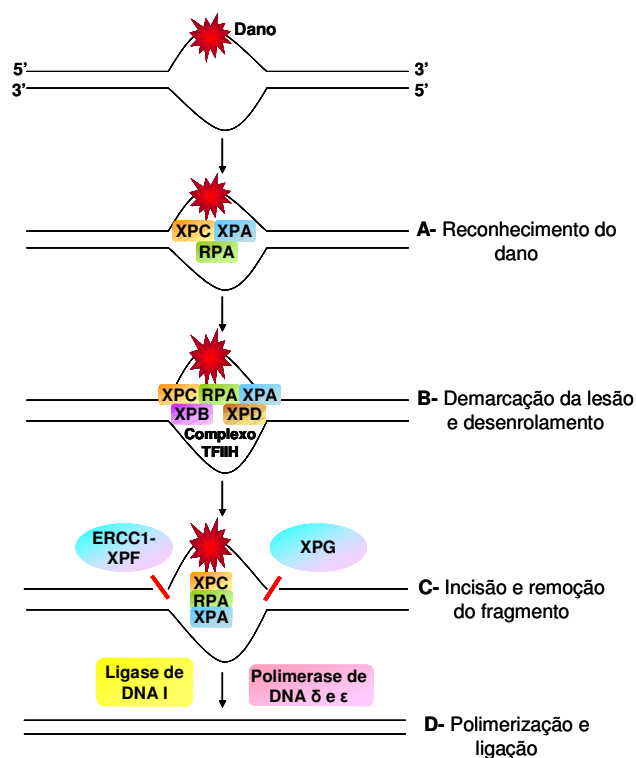


Figura 1.4: Mecanismo de reparação de lesões no DNA pela via NER:

- A-** reconhecimento da lesão por um complexo de proteínas, que inclui XPC;
 - B-** desenrolamento do DNA pelo complexo TFIIH, que inclui XPD;
 - C-** remoção do fragmento de cadeia simples danificado por moléculas que incluem o complexo ERCC1/XPF;
 - D-** polimerização e ligação;
- (adaptado de 30).

1.3.3- Reparação de quebras de cadeia dupla

Em células de mamíferos as DSBs na cadeia de DNA são principalmente reparadas por HR (nas fases S e G₂ do ciclo celular) e NHEJ (em todas as fases) (34).

Na via HR (Figura 1.5A) uma sequência num dos cromatídios do cromossoma homólogo constitui um molde para uma troca genética, que, deste modo, faz da HR uma via muito precisa e pouco sujeita a erros. As extremidades 3' da DSBs são processadas de modo a ficarem expostas, invadindo, depois, a dupla hélice intacta do cromatídio irmão do cromossoma homólogo (30). Proteínas como RAD51 e XRCC3 actuam em conjunto para promoverem a troca de cadeia e o emparelhamento da cadeia simples de DNA com a cadeia dupla do cromossoma homólogo (29). Por fim, as cadeias de DNA são sintetizadas pela polimerase de DNA.

A via NHEJ (Figura 1.5B) utiliza uma curta extensão de homologia como guia de ligação das duas extremidades clivadas. Uma ligação cega é também possível, embora seja pouco eficiente. No primeiro passo a DSB na cadeia de DNA é reconhecida pelas proteínas Ku70 e Ku80, enquanto que a sinalização é mediada pela proteína cinase dependente de DNA (DNA-PK), para o início do processo de reparação. No passo seguinte, MRE11 e NBS1 são recrutadas para o local da lesão e no último passo a DNA Ligase IV, estimulada por XRCC4, faz a junção das duas extremidades (35). Esta via, ao invés da HR, é algo sujeita a erros, resultando em alterações genéticas.

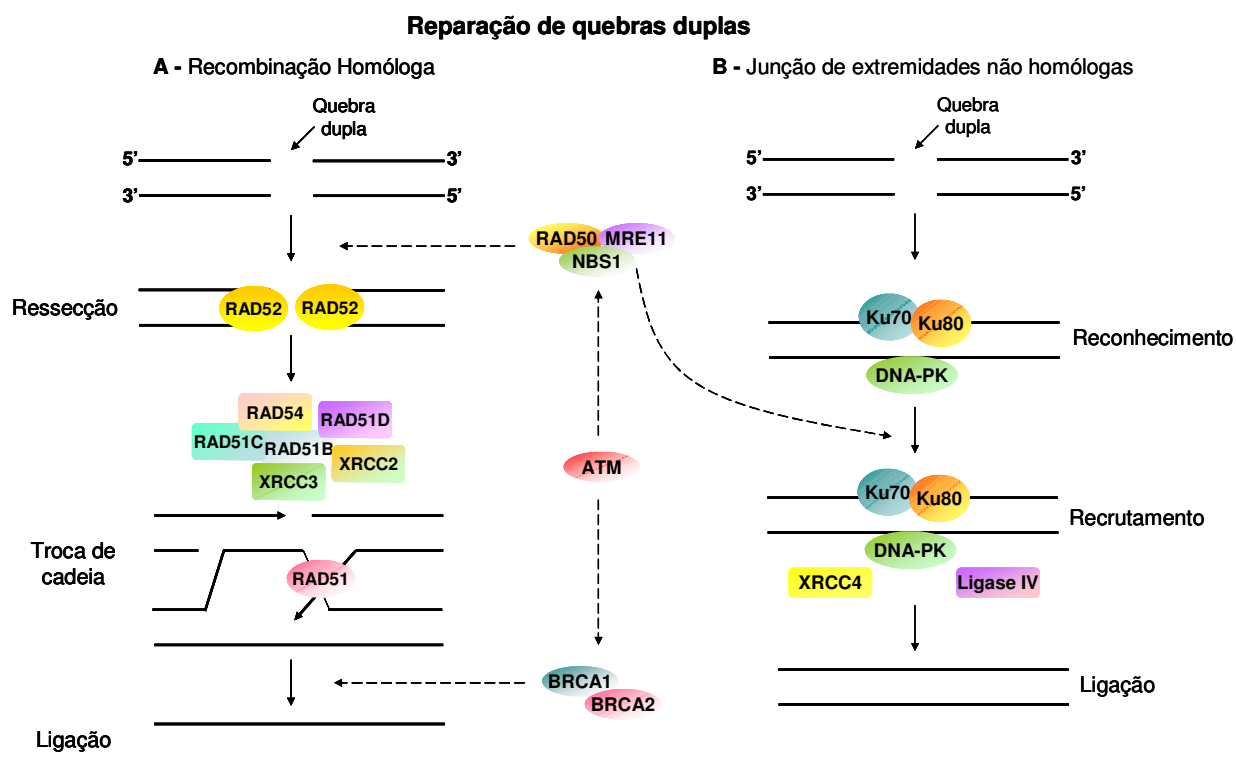


Figura 1.5: Mecanismo de reparação de DSBs na molécula de DNA, por recombinação homóloga (A) e por junção de extremidades não homólogas (B). (Adaptado de 30)

1.4- Genes de reparação do DNA e polimorfismos

Muitos genes envolvidos na reparação do DNA apresentam variação de um só nucleótido na sua sequência de DNA (*single nucleotide polymorphism*, SNP), sendo que a frequência de algumas variantes atingem o nível de polimorfismo na população (36). Para além disto, alguns dos polimorfismos provocam alterações de aminoácidos no seu produto génico presumindo-se, portanto, que causem alterações na sua função de reparação do DNA (36 e 37). O interesse da investigação nesta área tem sido focado maioritariamente no estudo dos polimorfismos dos genes de reparação do DNA como um componente importante da susceptibilidade individual para cancro, considerando a reparação do DNA como um processo muito importante para a protecção do genoma e para a prevenção do cancro (38).

Vários estudos têm examinado a relação entre polimorfismos de genes de reparação do DNA e a frequência de ACs instáveis (39, 40 e 41), frequência de MN (42) e quebras de cadeia de DNA (43) em vários grupos populacionais. Existem ainda diversos estudos que visam a determinação de possíveis associações entre o genótipo de genes de reparação de DNA e a frequência de ACs estáveis analisadas por *FISH* (44 e 45). Diversos estudos têm demonstrado que indivíduos com o mesmo tipo de exposição ambiental ou ocupacional

apresentam grande variabilidade na frequência de translocações (46 e 47). Esta diferença inter-individual sugere uma predisposição genética que possa influenciar a frequência de translocações.

Uma das vias de reparação do DNA mais relevantes na reparação de lesões induzidas pela radiação ionizante é a via BER. Nesta via, o gene *XRCC1* (*X-ray cross complementing group 1*) actua no recrutamento de outras proteínas de reparação tais como a polimerase β de DNA e DNA ligase III (31). O gene *hOGG1* (*human 8-oxo-guanine DNA glycosylase 1*) codifica para uma glicosilase, também envolvida em BER.

Por outro lado, as DSBs são predominantemente reparadas pelas vias HR e NHEJ (48). Os genes *XRCC3* (*X-ray cross complementing group 3*) e *RAD51* intervêm em HR, enquanto que *NBS1* (*Nimegen Breakage Syndrome 1*) actua em ambas.

Por sua vez, o gene *XPB* (*xeroderma pigmentosum group D complementing protein*) participa na via NER e, embora não esteja directamente envolvido na reparação das lesões induzidas pela radiação ionizante, algumas variantes alélicas têm sido associadas a um elevado risco de cancro do pulmão (49).

Nestes genes foram identificados vários polimorfismos, entre os quais, estão *XRCC1*¹⁹⁴, *XRCC1*²⁸⁰, *XRCC1*³⁹⁹, *hOGG1*³²⁶, *XRCC3*²⁴¹, *RAD51*^{135C}, *NBS1*¹⁸⁵, e *XPB*⁷⁵¹ (tabela 1.1). Estes polimorfismos têm sido associados a níveis elevados de ACs, SCE, MN, aductos de DNA e também a diversos tipos de cancro, existindo, contudo, estudos de associações negativas. Deste modo, torna-se bastante pertinente o estudo do potencial impacto destes polimorfismos na competência de reparação de lesões no DNA induzidas pela radiação ionizante.

Tabela 1.1: Polimorfismos em genes de reparação do DNA avaliados. É indicado o polimorfismo e respectivos exão/região, codão, posição genómica, alteração no DNA e alteração de aminoácido.

Polimorfismo	Exão/Região	Codão	Posição genómica	Alteração no DNA	Alteração de aminoácido
<i>hOGG1</i> ³²⁶	7	326	1245	C → G	Ser → Cys
<i>XRCC1</i> ¹⁹⁴	6	194	26304	C → T	Arg → Trp
<i>XRCC1</i> ²⁸⁰	9	280	27466	G → A	Arg → His
<i>XRCC1</i> ³⁹⁹	10	399	28152	G → A	Arg → Gln
<i>XPB</i> ⁷⁵¹	23	751	35931	A → C	Lys → Gln
<i>NBS1</i> ¹⁸⁵	5	185	553	G → C	Glu → Gln
<i>RAD51</i> ^{135C}	5'-UTR		135	G → C	
<i>XRCC3</i> ²⁴¹	7	241	18067	C → T	Thr → Met

2. OBJECTIVO

Os polimorfismos em genes de reparação do DNA tem sido considerados como potenciais modificadores do risco de cancro, particularmente em indivíduos expostos a agentes genotóxicos como é o caso da radiação ionizante.

No âmbito do projecto MinUrar (1), analisaram-se os efeitos da exposição prolongada a urânio e produtos do seu decaimento na frequência de ACs estáveis e instáveis pela técnica de *FISH*, num grupo de indivíduos com exposição ambiental a urânio, comparativamente a dois grupos de indivíduos não expostos. Neste estudo avaliou-se ainda a existência de modificações na competência de reparação do DNA através do ensaio *challenge*.

No presente estudo, pretende-se avaliar a influência de vários polimorfismos em genes de reparação do DNA na frequência de aberrações cromossómicas (estáveis e instáveis) espontâneas e induzidas pela radiação gama nos referidos grupos.

Uma vez que os danos infligidos pela radiação ionizante a nível da molécula de DNA correspondem a bases oxidadas e quebras simples e duplas na sua cadeia, seleccionaram-se genes envolvidos na reparação dos referidos danos, nomeadamente em BER, NER e na reparação de quebras duplas na cadeia de DNA.

Deste modo, com o objectivo de se avaliar o potencial impacto de polimorfismos em genes de reparação do DNA na frequência de aberrações cromossómicas espontâneas e radioinduzidas, pretende-se caracterizar o genótipo dos genes envolvidos na reparação do DNA - *hOGG1*, *XRCC1*, *XRCC3*, *XPB*, *RAD51* e *NBS1* - através da técnica de PCR-RFLP.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Grupos de estudo

A população de estudo consistiu em 94 indivíduos, divididos por três grupos de acordo com a sua exposição à radiação ionizante: grupo exposto (GE), grupo não exposto (GNE) e grupo de referência (GR).

O grupo GE (n=32) integrava residentes da freguesia de Canas de Senhorim, onde se localiza o núcleo industrial da mina da Urgeiriça e o conjunto das escombreyras resultantes da exploração e tratamento químico dos minérios radioactivos.

O grupo GNE (n=33) era constituído por residentes de um conjunto de quatro freguesias (Celorico da Beira, Sátão, Viseu e Seia) da mesma região em que não se conhece qualquer ocorrência de mineralização de urânio e onde não existiu qualquer actividade industrial desses minérios, mas com um nível médio de radiação natural considerado elevado (50).

O grupo GR (n=29) era composto por indivíduos residentes em Serpa e Ourique, distrito de Beja, na zona Sul do país, uma área onde o nível médio de radiação natural é muito baixo.

Todos os grupos foram constituídos por selecção dos indivíduos a partir dos cadernos eleitorais, sendo constituídos por indivíduos do sexo masculino, não fumadores e com idades entre os 45 e os 64 anos. A idade média dos indivíduos dos grupos GE, GNE e GR é de 54.3 ± 5.5 , 55.8 ± 4.4 e 54.4 ± 5.5 anos, respectivamente.

Constituíram critérios de exclusão: neoplasia actual ou anterior, cirurgia ou transfusão sanguínea recente (menor que seis meses), exposição presente ou prévia a agentes potencialmente genotóxicos e exposição médica (ex. quimioterapia).

Todos os indivíduos responderam a um questionário sobre aspectos profissionais, médicos e comportamentais e, devidamente informados, deram autorização por escrito para participarem no estudo.

3.2- Análise de aberrações cromossómicas

No âmbito do projecto MinUrar (1), os três grupos foram analisados no que respeita à frequência de ACs, estáveis e instáveis, nos linfócitos de sangue periférico dos indivíduos em estudo.

Os métodos incluíram a colheita de sangue e a cultura de linfócitos a partir de sangue total não irradiado (frequência espontânea) e irradiado (ensaio *challenge*), na fase

G₀ do ciclo celular, com 2Gy de radiação gama (fonte de ⁶⁰Co, 0.217-0.245Gy/min; LMRI, Instituto Tecnológico Nuclear), durante 44h (não irradiado) e 48h (irradiado).

Seguiu-se a realização da técnica de *FISH* com sondas-biblioteca marcadas com o fluorocromo *Texas Red* para os cromossomas 1, 2 e 4 (*MetaSystems, GmbH, Germany*) de acordo com o protocolo do fabricante com algumas modificações.

As metafases foram pesquisadas e localizadas automaticamente com recurso ao sistema de análise de imagem *Metafer 4* (*MetaSystems, GmbH, Germany*) acoplado a um microscópio *Zeiss Axioplan 2* equipado com câmara *CCD*. Para a determinação da frequência de ACs espontâneas e radioinduzidas analisaram-se 2000 e 700 metafases por indivíduo, respectivamente. As ACs estáveis (translocações) e instáveis (cromossomas dicêntricos, fragmentos acêntricos e anéis), envolvendo os três pares de cromossomas pintados (os cromossomas 1, 2 e 4 correspondem a 22,7% do genoma), foram contabilizadas e classificadas através do sistema *PAINT* (51, 52 e 53). As frequências genómicas de ACs foram calculadas de acordo com *Lucas e Deng* (54).

3.3- Análise de polimorfismos em genes de reparação do DNA

3.1.1- Extração de DNA

As amostras de sangue foram colhidas por punção venosa para tubos com EDTA e encontram-se preservadas a -20°C. O DNA genómico foi extraído através de um processo automático a partir de uma amostra de sangue total de cada indivíduo, usando o *MagNA Pure LC-DNA Isolation Kit-Large Volume* (Roche).

3.1.2- Genotipagem por PCR-RFLP

O DNA extraído foi usado para a caracterização dos polimorfismos de um único nucleótido nos genes de reparação de DNA *XRCC1* (codões 194, 280 e 399), *hOGG1* (codão 326), *XRCC3* (codão 241), *NBS1* (codão 185), *XPD* (codão 751) e *RAD51* (região 5'-UTR 135C) por meio de técnicas baseadas na amplificação enzimática de um fragmento de DNA seguida de restrição do fragmento amplificado com endonucleases de restrição (PCR-RFLP) nos quais o polimorfismo cria ou abole o local de restrição enzimática. Para cada um dos polimorfismos analisados foi efectuada uma prévia optimização das condições de PCR e de análise de restrição.

As reacções de PCR foram efectuadas num volume de reacção de 50µL, em que as misturas de PCR para os diferentes polimorfismos continham em comum o tampão de PCR

(excepto para o polimorfismo *XRCC1*²⁸⁰, em que foi usado um tampão de fabrico caseiro), 0,25mM de dNTPs, e 0,5U de Polimerase Taq de DNA, variando apenas a quantidade de Cloreto de Magnésio (MgCl₂), de *primers* e de DNA, de acordo com a tabela 3.1. As sequências dos *primers* são indicadas na tabela 7.1 (anexos), enquanto que as reacções de amplificação foram efectuadas nas condições referidas na tabela 7.2 (anexos).

Uma alíquota do produto de PCR foi digerida com a enzima de restrição apropriada (tabela 3.2), num volume de reacção de 25µL, onde se adicionou em comum o tampão de restrição, variando a quantidade de enzima e de produto de PCR de acordo com a tabela 3.1, a 37°C durante 18 horas. Os fragmentos de DNA amplificados e resultantes da restrição enzimática (tabela 3.2) foram visualizados por electroforese (≈2h, 80V) em gel de agarose 1,5% (p/v) e 3% (p/v), respectivamente, corado com Brometo de Etídeo (0,2µg/mL). Nestes géis foram aplicados 10µL de cada amostra misturados com 5µL de Azul de Bromofenol juntamente com dois marcadores de massa molecular. As imagens resultantes foram visualizadas e fotografadas sob luz UV, sendo a interpretação dos resultados do genótipo efectuada por análise do tamanho dos fragmentos de restrição (tabela 3.2) em comparação com dois marcadores de massa molecular.

Tabela 3.1: Constituintes das misturas de reacção para PCR e restrição enzimática. Para além dos constituintes indicados foi comum a todas as reacções de PCR a adição de tampão 1x concentrado, 0,25mM de dNTPs e 0,5U de polimerase Taq de DNA. Do mesmo modo, adicionou-se também tampão de restrição 1x concentrado a todas as reacções de restrição.

Polimorfismo	Mistura de PCR			Mistura de Restrição	
	MgCl ₂ (mM)	Primers (pmol)	DNA (ng)	Produto de PCR (µL)	Enzima (U)
<i>hOGG1</i> ³²⁶	2,0	12,5	100	15	1,5
<i>XRCC1</i> ¹⁹⁴	1,5	12,5	50	20	10
<i>XRCC1</i> ²⁸⁰	1,67	10,0	100	10	10
<i>XRCC1</i> ³⁹⁹	1,5	12,5	50	20	10
<i>XPB</i> ⁷⁵¹	1,5	50,0	50	5	15
<i>NBS1</i> ¹⁸⁵	1,5	12,5	50	15	10
<i>RAD51</i> ^{135C}	1,5	50,0	100	10	10
<i>XRCC3</i> ²⁴¹	1,5	12,5	100	10	10

3.4- Análise estatística

A comparação das frequências médias de aberrações cromossômicas estáveis, instáveis e totais (expressas como média \pm desvio padrão) nos grupos definidos pelo tipo de exposição, genótipo e idade, foi efectuada por uma análise de variância (ANOVA) multifactorial após se ter verificado que os dados seguem uma distribuição normal. As frequências médias de cada categoria de ACs espontâneas e radioinduzidas dos indivíduos portadores do alelo comum foram comparadas com as observadas nos indivíduos portadores do alelo variante, através do teste *t* de *student*. Foram também comparadas as diferenças de ACs entre os três grupos de exposição, por um lado só indivíduos homocigóticos para o alelo comum e, por outro, só indivíduos possuidores do alelo variante, por uma ANOVA *one-way*. Nos casos em que não se verificou homogeneidade de variâncias foi utilizado o teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*. No que diz respeito ao genótipo, os indivíduos homocigóticos e heterocigóticos portadores do alelo variante foram combinados devido ao baixo número de indivíduos homocigóticos para o referido alelo. O nível de significância estatística utilizado foi $p < 0,05$ e todas as análises foram efectuadas com recurso ao software *SPSS* para *Windows* (versão 15.0).

Tabela 3.2: Descrição do tamanho do produto de PCR, do padrão de restrição e respectiva enzima para cada polimorfismo analisado (indicação do respectivo gene, codão/região e via de reparação). São também indicadas as respectivas referências. Wt- homocigótico para o alelo comum; H- heterocigótico; HV- homocigótico para o alelo variante.

Gene	Via de Reparação	Codão/Região	Produto de PCR (pb)	Enzima de Restrição	Padrão de Restrição (pb)			Referência
					Wt	H	HV	
<i>hOGG1</i>	BER	326	234	Fnu4HI	213	213	164	43
							49	
		194	485	PvuII	485	485	396	55
							89	
<i>XRCC1</i>	BER	280	280	RsaI	140	280	280	56
					140	140	140	
		399	871	NciI	461	593	593	55
					278	461	278	
					132	132	132	
<i>XPD</i>	NER	751	324	PstI	224	224	158	57
					100	100	66	
					170	290	158	58
					120	120	120	
<i>NBS1</i>	HR e NHEJ	185	290	Hinfl	170	290	290	58
					120	120	120	
<i>RAD51</i>	HR		157	MvaI	86	157	157	59
					71	86	71	
<i>XRCC3</i>	HR	241	136	NcoI	136	136	97	60
							39	

4. RESULTADOS

Neste trabalho avaliou-se a influência dos polimorfismos *hOGG1*³²⁶, *XRCC1*¹⁹⁴, *XRCC1*²⁸⁰, *XRCC1*³⁹⁹, *XRCC3*²⁴¹, *NBS1*¹⁸⁵, *XPB*⁷⁵¹ e *RAD51*^{135C} na frequência de ACs espontâneas e induzidas pela radiação gama (radioinduzidas) nos grupos GE, GNE e GR. As ACs analisadas foram agrupadas em três categorias: ACs totais (que incluem ACs estáveis e instáveis), estáveis (translocações) e instáveis (cromossomas dicêntricos e fragmentos acêntricos). As frequências de fragmentos acêntricos (que incluem os anéis) e de cromossomas dicêntricos foram também analisadas separadamente. Uma vez que, na maior parte dos casos, os resultados se mantiveram inalterados após a subdivisão das ACs instáveis em cromossomas dicêntricos e fragmentos acêntricos, apenas se apresentam graficamente os resultados respeitantes ao total das ACs instáveis.

Adicionalmente foi também avaliado o potencial efeito da idade (dois grupos: 45-54 e 55-64 anos) e da exposição a radiação ionizante na frequência das ACs referidas.

Para a determinação do genótipo efectuou-se a genotipagem dos indivíduos pertencentes aos três grupos de estudo pela técnica de PCR-RFLP. Na figura 4.1 está representado um exemplo de uma fotografia de um gel de agarose obtido durante este procedimento. Neste caso pode-se observar a migração do produto de PCR e o padrão de restrição referente ao polimorfismo *hOGG1*³²⁶.

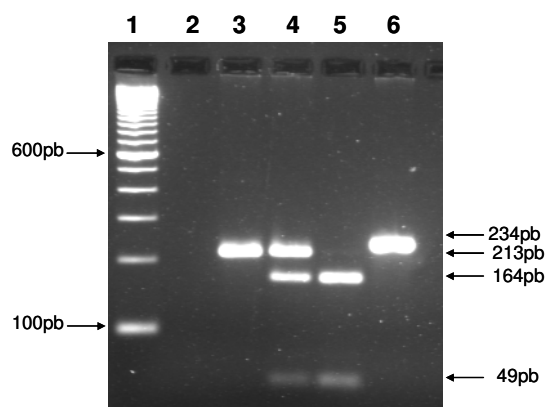


Figura 4.1: Fotografia de um gel de agarose *NuSieve* 3% (p/v) após digestão do produto de PCR referentes ao polimorfismo *hOGG1*³²⁶, com *Fnu4HI*. Linha 1: marcador de massa molecular – fragmentos de 100pb; linha 2: controlo negativo; linha 3: Ser/Ser (Homozigótico para o alelo comum); linha 4: Ser/Cys (Heterozigótico); linha 5: Cys/Cys (Homozigótico para o alelo variante); linha 6: produto de PCR não digerido.

Na tabela 4.1 indica-se a distribuição dos genótipos referentes a cada polimorfismo, na população total e nos três grupos estudados. As respectivas frequências do alelo variante, embora se tratem de populações pequenas, foram também calculadas. De um modo geral observa-se que a maior parte dos indivíduos analisados são homozigóticos para o alelo comum, enquanto que o número de indivíduos homozigóticos para o alelo variante é muito baixo. No caso particular do polimorfismo *XRCC1*³⁹⁹ e *XPB*⁷⁵¹, a maioria dos indivíduos são heterozigóticos e o número de indivíduos homozigóticos para o alelo variante é também muito baixo. No caso dos polimorfismos *RAD51*^{135C} e *XRCC3*²⁴¹ não se

observaram indivíduos homocigóticos para o alelo variante. Neste último caso todos os indivíduos analisados eram homocigóticos para o alelo comum, facto que foi confirmado através da realização de várias repetições da restrição utilizando diversas condições, após se ter testado a actividade da enzima de restrição.

Tabela 4.1: Distribuição dos genótipos referentes aos polimorfismos analisados na população total e nos grupos GE, GNE e GR. É também indicada a frequência do alelo variante para cada polimorfismo, na população total e nos três grupos estudados. A frequência do alelo variante foi detectada com base nos indivíduos heterocigóticos mais os indivíduos homocigóticos para o alelo variante.

Polimorfismo	Genótipo	Número de indivíduos (%)			
		GE	GNE	GR	Total
<i>hOGG1</i> ³²⁶	Ser/Ser	23 (71.9)	22 (66.7)	16 (55.2)	61 (64.9)
	Ser/Cys	8 (25)	11 (33.3)	11 (37.9)	30 (31.9)
	Cys/Cys	1 (3.1)	0 (0)	2 (6.9)	3 (3.2)
	Frequência do alelo variante	0,16	0,17	0,26	0,19
<i>XRCC1</i> ¹⁹⁴	Arg/Arg	27 (84.4)	32 (97.0)	26 (89.7)	85 (90.4)
	Arg/Trp	2 (6.3)	1 (3.0)	3 (10.3)	6 (6.4)
	Trp/Trp	3 (9.4)	0 (0)	0 (0)	3 (3.2)
	Frequência do alelo variante	0,13	0,02	0,05	0,06
<i>XRCC1</i> ²⁸⁰	Arg/Arg	29 (90.6)	25 (75.8)	27 (93.1)	81 (86.2)
	Arg/His	3 (9.4)	6 (18.2)	2 (6.9)	11 (11.7)
	His/His	0 (0)	2 (6.1)	0 (0)	2 (2.1)
	Frequência do alelo variante	0,05	0,15	0,03	0,08
<i>XRCC1</i> ³⁹⁹	Arg/Arg	15 (46.9)	11 (33.3)	6 (20.7)	32 (34.0)
	Arg/Gln	13 (40.6)	18 (54.5)	23 (79.3)	54 (57.4)
	Gln/Gln	4 (12.5)	4 (12.1)	0 (0)	8 (8.5)
	Frequência do alelo variante	0,33	0,39	0,40	0,37
<i>XPD</i> ⁷⁵¹	Lys/Lys	11 (34,4)	15 (45,5)	8 (27,6)	34 (36,2)
	Lys/Gln	18 (56,3)	16 (48,5)	21 (72,4)	55 (58,5)
	Gln/Gln	3 (9,4)	2 (6,1)	0 (0)	5 (5,3)
	Frequência do alelo variante	0,38	0,30	0,36	0,35
<i>NBS1</i> ¹⁸⁵	Glu/Glu	18 (56.3)	13 (39.4)	14 (48.3)	45 (47.9)
	Glu/Gln	12 (37.5)	15 (45.5)	8 (27.6)	35 (37.2)
	Gln/Gln	2 (6.3)	5 (15.2)	7 (24.1)	14 (14.9)
	Frequência do alelo variante	0,25	0,38	0,38	0,34
<i>RAD51</i> ^{135C}	135G/135G	29 (90.6)	23 (69.7)	20 (69.0)	72 (76.6)
	135G/135C	3 (9.4)	10 (30.3)	9 (31.0)	22 (23.4)
	135C/135C	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Frequência do alelo variante	0,05	0,15	0,16	0,12
<i>XRCC3</i> ²⁴¹	Thr/Thr	32 (100)	33 (100)	29 (100)	94 (100)
	Thr/Met	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Met/Met	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Frequência do alelo variante	0	0	0	0

As frequências alélicas do alelo variante de cada polimorfismo estão, em geral, de acordo com *Good et al.* (30), que apresenta uma revisão de estudos epidemiológicos (indicando a frequência do alelo variante em controlos), excepto para o polimorfismo *XRCC1*¹⁹⁴ (GNE e GR) e *hOGG1*³²⁶ (GNE e GE), onde a frequência dos respectivos alelos variantes é mais baixa e ainda para o polimorfismo *XRCC1*³⁹⁹ (GR) e *XRCC1*²⁸⁰ (GNE), onde a frequência do alelo 399Gln e 280His é mais elevada. No que diz respeito aos polimorfismos *NBS1*¹⁸⁵ e *RAD51*^{135C}, as frequências do alelo variante estão de acordo com frequências publicadas no *web site* da *Weizmann Institute of Science* (61), excepto para o último, em que a frequência do alelo 135C é um pouco mais alta.

Para avaliação da influência dos polimorfismos na frequência dos vários tipos de ACs referidas, os indivíduos homocigóticos para o alelo variante foram agrupados com os indivíduos heterocigóticos devido ao baixo número dos primeiros. As frequências médias de cada categoria de ACs espontâneas e radioinduzidas dos indivíduos portadores do alelo comum foram comparadas com as observadas nos indivíduos portadores do alelo variante; e estão indicadas nas tabelas 7.3 a 7.17 (anexos). Para uma melhor visualização dos resultados, os dados referidos foram colocados em gráficos de barras, dos quais apenas são apresentados aqueles em que se observam diferenças estatisticamente significativas entre os alelos mencionados.

Para cada polimorfismo, os dados obtidos foram tratados por uma ANOVA multifactorial, através da qual se avaliou o efeito da idade (45-54 *versus* 55-64 anos), exposição (GE *versus* GNE *versus* GR) e genótipo (alelo comum *versus* alelo variante) na frequência de ACs espontâneas e radioinduzidas, após se ajustar cada variável para as outras duas. Os resultados obtidos demonstraram que a idade não tem influência na frequência de ACs espontâneas e radioinduzidas, enquanto que a exposição tem apenas no caso das ACs radioinduzidas ($p=0,000$). Por outro lado, mostraram também que o genótipo referente ao polimorfismo *XRCC1*¹⁹⁴ tem influência na frequência de ACs totais ($p=0,034$) radioinduzidas; e que *XPB*⁷⁵¹ tem influência na frequência espontânea de cromossomas dicêntricos ($p=0,018$).

De modo a tentar compreender-se de que modo o genótipo influenciaria a frequência de ACs, compararam-se os indivíduos portadores do alelo comum com os portadores do alelo variante quer na população total, quer em GE, GNE e GR, através de um teste *t* de *Student*. As comparações cujos resultados apresentaram diferenças significativas são apresentadas nas figuras 4.2 a 4.10.

Não se observaram diferenças significativas entre os dois alelos de cada um dos polimorfismos genéticos em estudo no que diz respeito à frequência de ACs totais, estáveis e instáveis espontâneas, excepto para *XPB*⁷⁵¹, em que o alelo variante 751Gln está

significativamente associado a uma reduzida frequência de cromossomas dicêntricos na população total (figura 4.2) ($p=0,010$) e em GR (figura 4.3) ($p=0,026$).

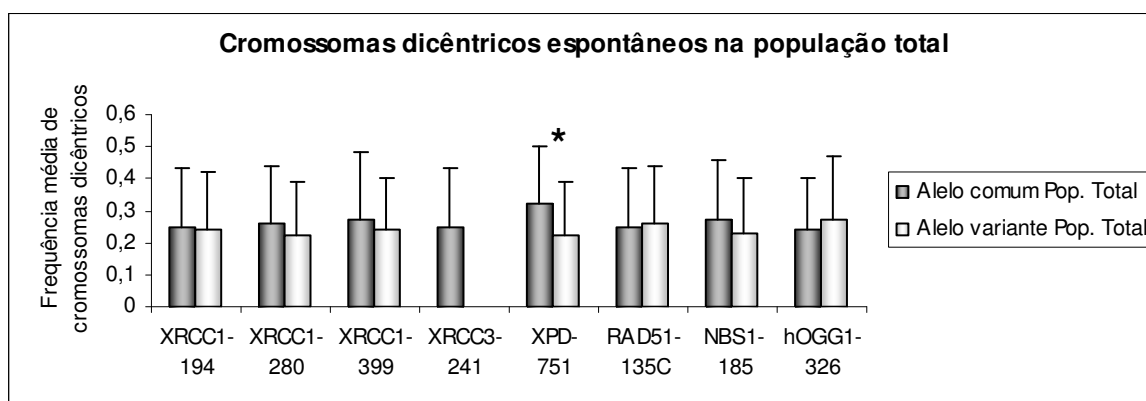


Figura 4.2: Frequência espontânea média de cromossomas dicêntricos na população total.

* indica uma diferença estatisticamente significativa entre os alelos variante e comum ($p<0,05$).

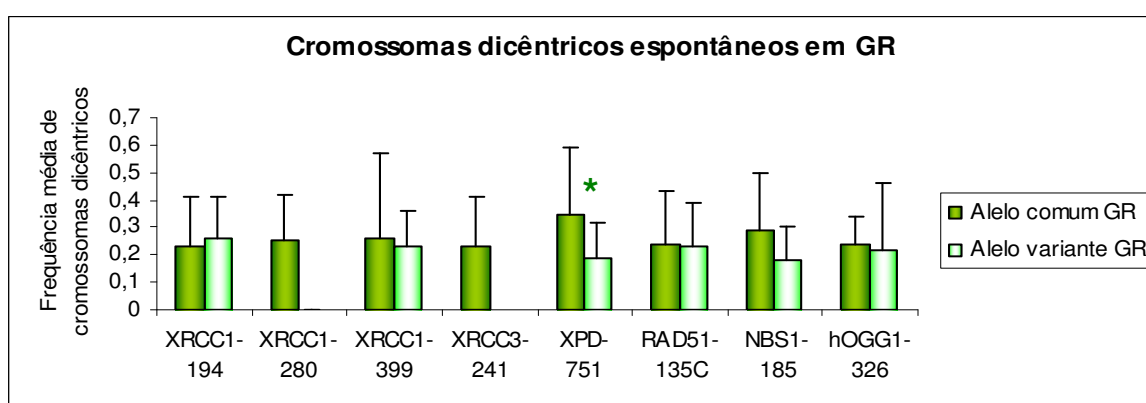


Figura 4.3: Frequência espontânea média de cromossomas dicêntricos em GR.

* indica uma diferença estatisticamente significativa entre os alelos variante e comum ($p<0,05$).

No que diz respeito ao efeito do genótipo na frequência de ACs radioinduzidas, o alelo variante do gene *XRCC1*¹⁹⁴ está associado, de forma significativa, a uma menor frequência de ACs totais radioinduzidas na população total (figura 4.4) ($p=0,033$) e em GE (figura 4.5) ($p=0,029$). Este alelo está também associado a uma menor frequência de ACs estáveis, com significado estatístico, na população total (figura 4.6) ($p=0,027$) e em GE (figura 4.7), embora sem significado estatístico. Relativamente às ACs instáveis, considerando o total de indivíduos, os portadores do alelo variante apresentam, também, uma frequência mais baixa (figura 4.8) ($p=0,043$), assim como em GE (figura 4.9) ($p=0,035$). Quando subdivididas, a associação mantém-se em GE para os cromossomas dicêntricos ($p=0,027$) e fragmentos acêntricos ($p=0,049$), e na população total para fragmentos acêntricos ($p=0,034$) (tabela 7.6). Nos grupos não expostos, GNE e GR (excepto para ACs estáveis em GR), o alelo variante está também associado com frequências de ACs totais, estáveis e instáveis mais baixas, embora as diferenças não sejam estatisticamente significativas (tabela 7.6).

O alelo variante do gene *XRCC1*²⁸⁰ está associado a uma elevada frequência de ACs totais, estáveis e instáveis radioinduzidas em GE, só de forma estatisticamente significativa ($p=0,010$) no caso das ACs estáveis (figura 4.7). Por outro lado, o referido alelo variante, está associado a uma menor frequência de ACs nos grupos de controlo, sendo que apenas existe significância estatística no caso das ACs instáveis (figura 4.10) em GNE ($p=0,041$).

Relativamente ao polimorfismo *RAD51*^{135C}, o alelo variante está significativamente associado com uma elevada frequência de ACs totais ($p=0,022$) (figura 4.4) e de fragmentos acêntricos ($p=0,031$) (tabela 7.14) na população total. O mesmo acontece para as ACs estáveis e instáveis, mas de forma não significativa (tabela 7.14).

Os alelos variantes para dos genes *hOGG1*³²⁶, (tabela 7.4), *NBS1*¹⁸⁵ (tabela 7.16) e *XRCC1*³⁹⁹ 399Gln (tabela 7.10) e *RAD51*^{135C} (tabela 7.14) estão associados com uma elevada frequência de ACs totais, estáveis e instáveis radioinduzidas em GE, embora sem significado estatístico. No grupo GR, existe uma associação não significativa entre os alelos variantes dos genes *XRCC1*²⁸⁰ (tabela 7.8), *XPB*⁷⁵¹ (tabela 7.12), *RAD51*^{135C} (tabela 7.14) e *XRCC1*³⁹⁹ (tabela 7.10), e uma frequência de ACs totais, estáveis e instáveis mais baixas.

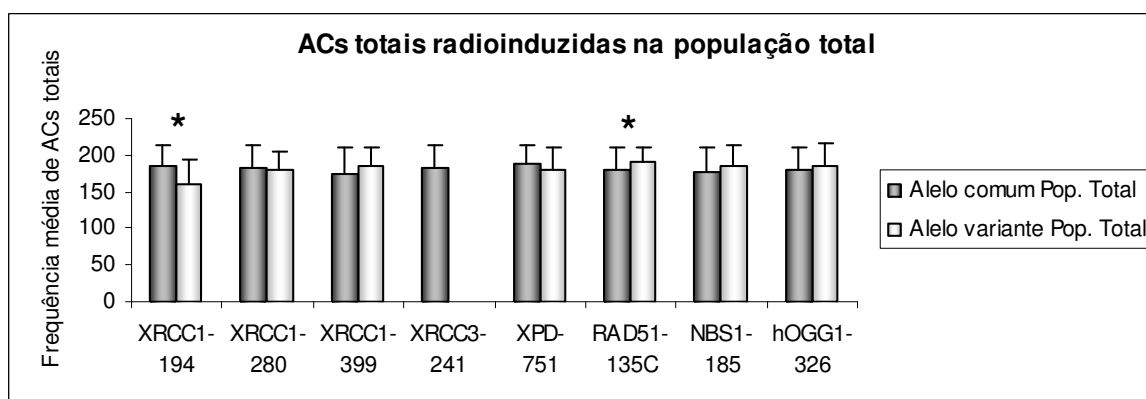


Figura 4.4: Frequência média de ACs totais radioinduzidas na população total.

* indica uma diferença estatisticamente significativa entre os alelos variante e comum ($p<0,05$).

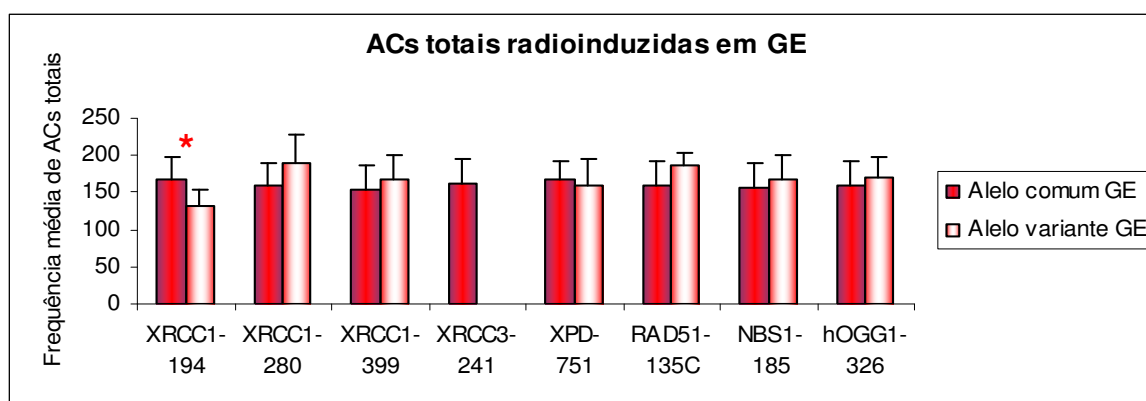


Figura 4.5: Frequência média de ACs totais radioinduzidas em GE.

* indica uma diferença estatisticamente significativa entre os alelos variante e comum ($p<0,05$).

No que diz respeito ao grupo GNE, os alelos variantes dos genes *XRCC1*³⁹⁹ (tabela 7.10) e *RAD51*^{135C} (tabela 7.14) estão associados, embora não significativamente, a uma elevada frequência de ACs totais, estáveis e instáveis. Por outro lado, há uma associação com uma baixa frequência de ACs totais, estáveis e instáveis para os alelos variantes dos genes *XRCC1*¹⁹⁴ (tabela 7.6), *XPB*⁷⁵¹ (tabela 7.12) e *XRCC1*²⁸⁰ (tabela 7.8) (onde a associação é significativa no caso das ACs instáveis, $p=0,041$).

Em particular, o alelo variante *XPB*⁷⁵¹ está associado a baixas frequências de ACs totais, estáveis e instáveis radioinduzidas tanto em GE como nos grupos de controlo (tabela 7.12).

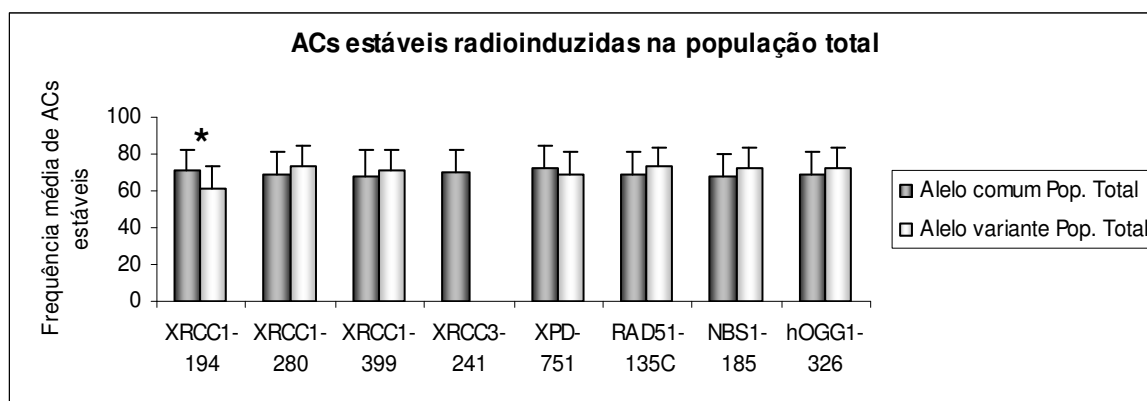


Figura 4.6: Frequência média de ACs estáveis radioinduzidas na população total.

* indica uma diferença estatisticamente significativa entre os alelos variante e comum ($p<0,05$).

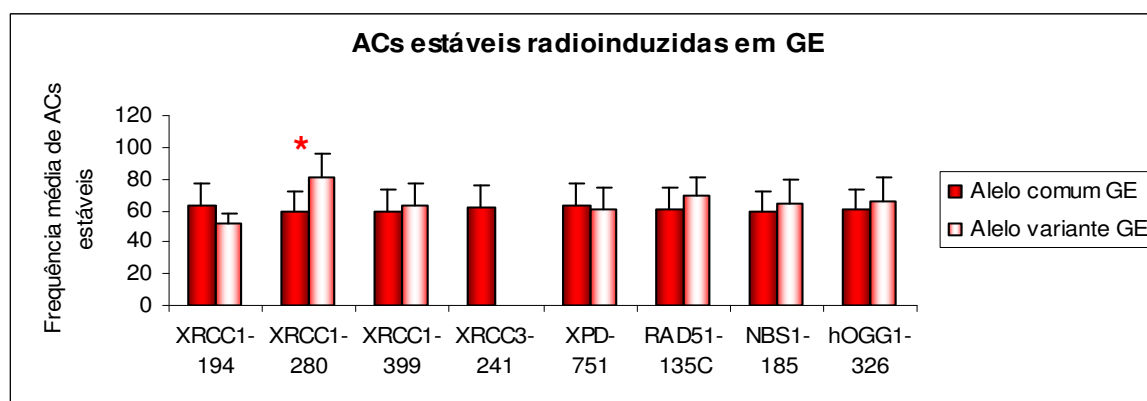


Figura 4.7: Frequência média de ACs estáveis radioinduzidas em GE.

* indica uma diferença estatisticamente significativa entre os alelos variante e comum ($p<0,05$).

Verificou-se ainda que existem diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$) entre os três grupos de exposição, quando se comparam as diferenças entre as frequências de ACs radioinduzidas totais, estáveis e instáveis entre os três grupos, considerando os indivíduos homocigóticos para o alelo comum. Quando se comparam apenas os indivíduos possuidores do alelo variante, obteve-se o mesmo resultado, excepto para os genes *XRCC1*²⁸⁰ e *RAD51*^{135C}. No que diz respeito às frequências de ACs espontâneas, não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de exposição, tanto

para os indivíduos homocigóticos para o alelo comum, como para os indivíduos portadores do alelo variante.

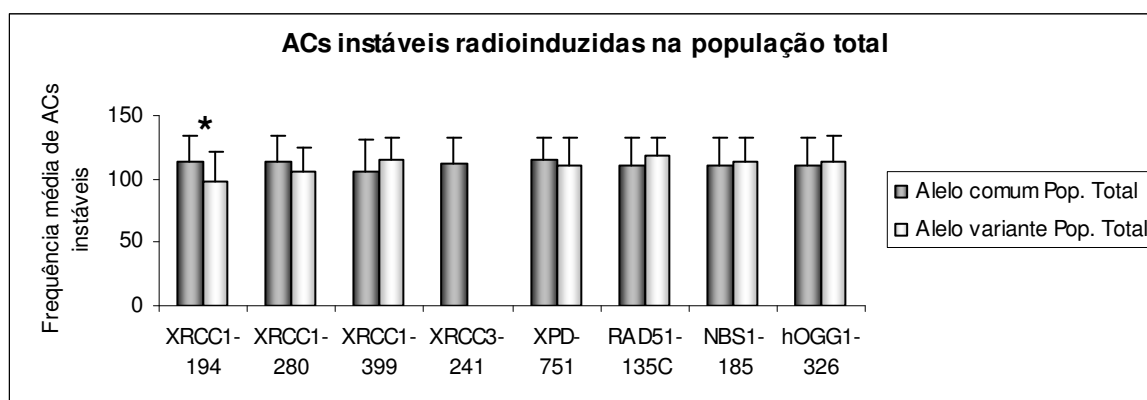


Figura 4.8: Frequência média de ACs instáveis radioinduzidas na população total.

* indica uma diferença estatisticamente significativa entre os alelos variante e comum ($p < 0,05$).

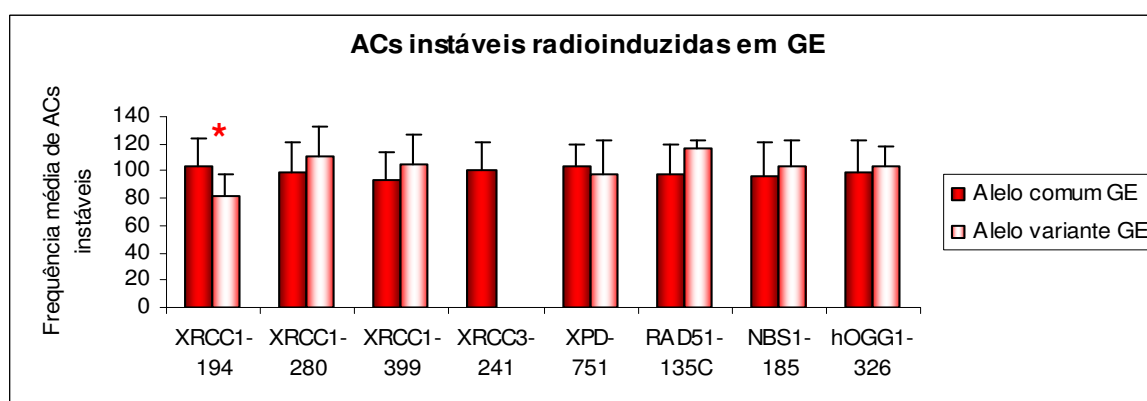


Figura 4.9 Frequência média de ACs instáveis radioinduzidas em GE.

* indica uma diferença estatisticamente significativa entre os alelos variante e comum ($p < 0,05$).

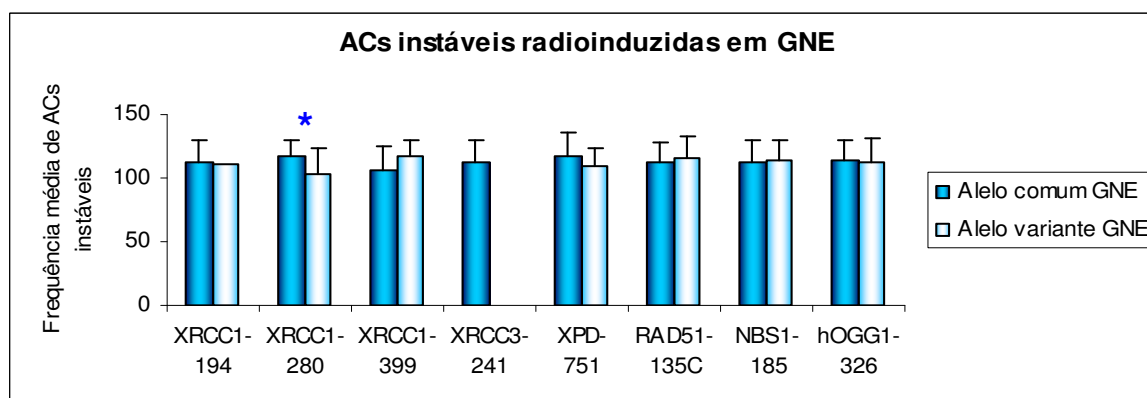


Figura 4.10 Frequência média de ACs instáveis radioinduzidas em GNE.

* indica uma diferença estatisticamente significativa entre os alelos variante e comum ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO e CONCLUSÕES

No âmbito do projecto MinUrar (1) foram analisados os efeitos da exposição prolongada a urânio e produtos do seu decaimento na frequência de ACs estáveis e instáveis. Os resultados mostraram que em linfótos, em resposta à exposição *in vitro* a uma dose de radiação gama, os indivíduos do grupo GE apresentaram uma menor frequência de translocações radioinduzidas relativamente aos dos grupos controlo, o que sugere uma resposta adaptativa induzida pelas condições específicas da exposição ambiental em GE. Este tipo de resposta parece reflectir um mecanismo de “protecção” da célula relativamente à exposição a uma dose de radiação elevada, após exposição a doses mais baixas. Pensa-se que nesta resposta está envolvido um aumento da competência de reparação das lesões de DNA, estimulado pelos baixos níveis de exposição prévia (62), embora outros mecanismos possam também estar envolvidos, como por exemplo a modulação de sistemas de regulação do ciclo celular. A variação da resposta observada não pode ser justificada por factores de confundimento como sexo, idade ou hábitos de tabagismo, uma vez que se seleccionaram exclusivamente indivíduos do sexo masculino, não fumadores e com idades muito próximas. Deste modo, poderá haver factores genéticos envolvidos nesta variação de resposta genotóxica, como é o caso dos polimorfismos em genes de reparação do DNA. O polimorfismo *XRCC1*¹⁹⁴ poderá ser parte responsável desta resposta adaptativa, uma vez que se verificou que o alelo variante 194His está significativamente associado a uma reduzida frequência de ACs radioinduzidas em GE.

A exposição a agentes genotóxicos, como a radiação ionizante, induz a formação de lesões na molécula de DNA, as quais podem conduzir à formação de aberrações cromossómicas (ACs). A análise de cromossomas dicêntricos é o método mais usado em dosimetria radiobiológica, principalmente em casos de exposição recente a radiação ionizante. No entanto, os cromossomas dicêntricos, assim como os fragmentos acêntricos e os anéis constituem ACs instáveis, uma vez que são eliminadas da célula aquando da divisão celular. Quando se pretende avaliar os efeitos cumulativos de uma exposição prolongada, a análise de ACs estáveis, como as translocações, constitui uma metodologia mais adequada (63) pois estas não são eliminadas da célula pelas divisões celulares, acumulando-se no organismo.

Qualquer polimorfismo que afecte o metabolismo de xenobióticos ou a reparação de danos no DNA pode alterar a sensibilidade individual a agentes genotóxicos. O papel dos polimorfismos genéticos na susceptibilidade à exposição a genotóxicos específicos pode ser mais facilmente elucidada através da análise do seu impacto em biomarcadores de um efeito biológico, como alterações citogenéticas, em indivíduos expostos e não expostos.

Neste tipo de estudo os níveis de biomarcadores nos diferentes grupos são comparados segundo os genótipos, avaliando-se, deste modo, a susceptibilidade à exposição (64). Muitos estudos referem que os polimorfismos podem também afectar o nível basal de alterações citogenéticas, e, nesse sentido, as ACs podem ter também um grande valor preditivo do cancro em populações não expostas (17). Contudo, no que diz respeito à susceptibilidade genética, muitos estudos têm também reportado resultados inconsistentes e inconclusivos (30, 60 e 65).

No presente estudo não foi observada nenhuma relação entre a frequência de ACs e a idade, apesar de haver estudos que descrevem um aumento da frequência de aberrações em idades mais avançadas (66 67 68). O resultado obtido deve-se, provavelmente, ao facto dos dois grupos etários comparados (45-54 e 55-64 anos) serem muito próximos, não sendo, deste modo, detectável qualquer diferença entre eles no que diz respeito à frequência de ACs espontâneas e radioinduzidas.

Relativamente à influência dos polimorfismos em genes de reparação do DNA, não se encontrou qualquer associação estatisticamente significativa entre a frequência de ACs espontâneas e os polimorfismos estudados. Contudo, existem estudos que encontraram associações significativas entre polimorfismos em alguns destes genes e a frequência de ACs (69). No presente estudo e no que se refere às ACs espontâneas, observou-se uma grande variabilidade na sua frequência, à excepção do gene XPD, em que se encontrou uma associação estatisticamente significativa entre o alelo variante 751Gln e uma redução da frequência de cromossomas dicêntricos na população total e em GR. O gene XPD codifica uma helicase envolvida em NER e a referida variação na sequência do DNA localiza-se a cerca de 50pb a montante do sinal de poliadenilação. Deste modo, o polimorfismo poderá afectar a função da proteína, estando mesmo associado com um elevado risco de cancro do pulmão (49). No caso das ACs radioinduzidas, o mesmo alelo está também associado a baixas frequências das referidas ACs no grupo exposto e também nos controlos, embora sem significado estatístico. Um resultado semelhante foi também obtido por *Au et al.* (60), sendo que o alelo variante estava associado com uma redução na frequência de ACs induzidas por raios-x. Estes resultados indicam que este gene, envolvido em NER, poderá estar associado com uma resposta deficiente na reparação de danos oxidativos. Para além disso, este gene poderá estar envolvido na reparação de danos induzidas pelo urânio na sua qualidade de metal pesado, o que seria mais pertinente em GE. No entanto, neste grupo também não se verificou alteração na reparação das lesões no DNA.

O gene *XRCC1* codifica uma proteína envolvida na reparação de quebras de cadeia simples de DNA e em BER. A proteína possui múltiplos domínios que interagem com as enzimas PARP, DNA Ligase III e Polimerase β de DNA (70). *XRCC1* não tem actividade

enzimática por si só (71), mas dirige a montagem da maquinaria celular necessária para uma via BER operacional. Foi reportado que *XRCC1* é responsável pela reparação de danos no DNA provocados por espécies reactivas de oxigénio, agentes alquilantes e radiação ionizante (31 e 36), sendo que células mutantes em *XRCC1* possuem uma elevada sensibilidade a radiação UV, ionizante, H₂O₂ e mitomicina C (71). Foram identificados três polimorfismos (*Arg*¹⁹⁴*Trp*, *Arg*²⁸⁰*His*, *Arg*³⁹⁹*Gln*) (36) em sequências conservadas do gene *XRCC1* que resultam numa substituição de aminoácidos.

Neste estudo, verificou-se que o alelo variante do gene *XRCC1*¹⁹⁴ está associado, de forma significativa, a baixas frequências de ACs radioinduzidas totais, estáveis e instáveis na população total e em GE (neste grupo para as ACs instáveis não há significado estatístico). O mesmo se passa nos dois grupos de controlo (excepto para as ACs estáveis em GR), embora sem significado estatístico. De facto, alelo variante tem sido associado a uma maior eficiência de reparação de danos no DNA (20) e com um reduzido risco de cancro do fígado, pulmão, mama, estômago e de carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço (30). Todos estes resultados indicam que o alelo variante 194Trp poderá ter um efeito protector.

Os indivíduos do grupo GE portadores do alelo variante *XRCC1* 280His apresentaram uma maior frequência de ACs totais, estáveis e instáveis radioinduzidas, embora só de forma significativa no caso das ACs estáveis. Pelo contrário, em GNE e GR, este alelo está associado a baixas frequências de ACs totais, estáveis e instáveis, só com significado estatístico no caso das instáveis e no grupo GNE. Deste modo, podemos dizer que o alelo variante 280His, envolvido em BER, está associado a uma reparação deficiente dos danos induzidos pela exposição a radiação gama, nos indivíduos do grupo GE. Este resultado está de acordo com outros estudos que demonstraram que este alelo variante está associado com uma reduzida capacidade de reparação de danos no DNA, através de BER (72 e 73), sendo que se encontra associado a um elevado risco de cancro do pulmão (74).

Relativamente ao alelo variante *XRCC1* 399Gln também se verificou um aumento, embora não significativo, da frequência de ACs totais, estáveis e instáveis em GE e GNE, mas não em GR. Estes resultados também estão de acordo com a literatura, uma vez que o alelo variante 399Gln tem sido associado com um aumento de ACs, nomeadamente em trabalhadores expostos a citostáticos (75). Para além disto, este alelo tem sido associado a elevados níveis de SCE (76) e de aductos de DNA induzidos pela aflotoxina B1 (77).

Os alelos variantes dos genes *XRCC1*²⁸⁰ e *XRCC1*³⁹⁹ envolvidos em BER, estão associados com um aumento da frequência de ACs em GE e, em GE e GNE, respectivamente, o que está de acordo com *Au et al.* (60), sugerindo que indivíduos que possuem estas variantes alélicas têm capacidade mais reduzida de reparação de danos no DNA induzidos pela radiação gama.

O gene *hOGG1* codifica uma DNA glicosilase envolvida em BER, sendo responsável pela eliminação da 8-Oxo-dG da molécula de DNA. Os resultados obtidos para o alelo variante do gene *hOGG1*³²⁶ mostram que está associado a uma elevada frequência de ACs totais, estáveis e instáveis em GE, embora não significativamente, indicando uma redução na capacidade de reparação de danos no DNA radioinduzidos. É de salientar que o grupo de indivíduos com o alelo variante mostra uma duplicação da frequência de ACs estáveis comparativamente aos possuidores do alelo comum. O alelo variante 326Cys está associado com uma reduzida capacidade de reparação de danos no DNA (78) e também se relaciona com um elevado risco de vários tipos de cancro, incluindo pulmão, próstata e esófago (30), assim como com uma elevada frequência de MN devido à exposição a poeira contendo cobalto (43).

O gene *NBS1* codifica a proteína nibrina, que intervém no reconhecimento, sinalização e reparação de DSBs pelas vias HR e NHEJ, formando um complexo com as proteínas MRE11 e RAD50. Fibroblastos primários deficientes em *NBS1* possuem níveis elevados de ACs induzidas pela radiação ionizante, comparativamente aos fibroblastos normais, principalmente de translocações (79). Outro gene envolvido na reparação de quebras de cadeia dupla por recombinação homóloga é *RAD51*. Em particular, o alelo variante do gene *RAD51*^{135C} está associado de forma significativa com uma elevada frequência de ACs totais e de fragmentos acêntricos na população total. Globalmente, os alelos variantes dos genes *NBS1*¹⁸⁵ e *RAD51*^{135C} estão associados com um elevado nível de ACs totais, estáveis e instáveis na população total, em GE e GNE, o que sugere que os portadores destes alelos apresentam uma possível hipersensibilidade à radiação ionizante.

Dados experimentais demonstraram que blastócitos de ratinhos *knockout* são altamente sensíveis à radiação ionizante (80) e que a sobre-expressão de *RAD51* em células de mamíferos provoca um aumento da recombinação homóloga após tratamento com radiação ionizante (81). Está descrito um único polimorfismo na região 5'-UTR de *RAD51*, cujo efeito biológico não é totalmente claro. No entanto, pensa-se que poderá afectar a estabilidade e/ou a eficiente tradução do RNA mensageiro, levando a níveis de proteína *RAD51* alterados (82). Este polimorfismo está associado com um elevado risco de cancro da mama em portadores de mutações em *BRCA1* e *BRCA2* (82 e 83) e em mulheres com história familiar de cancro da mama numa população portuguesa (84).

Não existem muitos dados sobre a relevância funcional do polimorfismo *NBS1*¹⁸⁵, apesar de se localizar no domínio BRCT da proteína, podendo estar, deste modo, relacionado com algum efeito na sua função (85). Sabe-se, contudo, que o alelo variante 185Gln está significativamente associado com um aumento da prevalência de mutações no gene *p53* em tumores do pulmão (86), assim como a um elevado risco de cancro do pulmão,

no caso de indivíduos heterozigóticos (87). Sabe-se ainda que pacientes NBS estão sujeitos a danos cromossômicos em linfócitos (88).

O gene *XRCC3* apresenta homologia com o gene *RAD51* e codifica uma proteína envolvida na reparação de DSBs por recombinação homóloga (89), onde interage e estabiliza de forma directa *RAD51* (90). *Shen et al.* (35) identificou o polimorfismo *XRCC3*²⁴¹ na região codificante do gene *XRCC3*, cujo alelo variante tem sido associado a níveis relativamente altos de aductos no DNA em linfócitos, o que indica que este polimorfismo estará associado com uma capacidade de reparação do DNA relativamente baixa (91). Existem também evidências que o alelo variante 241Met está significativamente associado com um aumento de ACs após exposição a radiação ionizante (raios-x) (60) e com cancro da mama e do pulmão (78). No entanto, também existem evidências que ambos os alelos têm a mesma competência na reparação de DSBs (92). Não foi possível, neste estudo, retirar qualquer conclusão sobre o efeito do polimorfismo *XRCC3*²⁴¹ uma vez que todos os indivíduos genotipados eram homozigóticos para o alelo comum 241Thr. O facto da população analisada ser de relativamente de pequena dimensão (n=94) para este tipo de estudos, poderá explicar este resultado.

Os alelos variantes para os polimorfismos *XRCC1*³⁹⁹, *hOGG1*³²⁶ (só no caso das ACs estáveis em GNE), *NBS1*¹⁸⁵ e *RAD51*^{135C} estão associados com uma elevada frequência de ACs radioinduzidas em GE e GNE, embora não de forma significativa. Estes resultados sugerem que indivíduos expostos a urânio (GE) bem como indivíduos expostos a um nível de radiação natural considerado elevado (GNE), portadores dos alelos variantes destes genes, podem ser mais susceptíveis à radiação ionizante devido a uma menor competência no que diz respeito à eficiência dos seus processos de reparação das lesões de DNA radioinduzidas. Observou-se ainda uma associação dos alelos variantes para os genes *XRCC1*¹⁹⁴, *hOGG1*³²⁶ (excepto para as ACs estáveis), *XPB*⁷⁵¹ e *XRCC1*²⁸⁰ (significativa no caso das ACs instáveis) com uma baixa frequência de ACs radioinduzidas nos indivíduos provenientes de uma região de elevado fundo radioactivo (GNE).

De entre os indivíduos residentes numa região com um nível de radiação natural considerado baixo (GR), aqueles que possuem alelos variantes dos genes estudados, excepto *XRCC3*²⁴¹ (que não foi possível estudar) apresentam uma frequência mais baixa de ACs radioinduzidas, embora não de forma significativa, do que os possuidores do alelo comum. Assim, nesta população em particular, os alelos variantes parecem conferir protecção relativamente à exposição *in vitro* a uma dose elevada de radiação ionizante. Os casos das ACs estáveis para *XRCC1*¹⁹⁴ e das ACs totais e estáveis para *NBS1*¹⁸⁵ constituem uma excepção, onde o alelo variante dos referidos polimorfismos está associado a uma elevada frequência das ACs.

Para cada polimorfismo genético, quando se comparam as diferenças entre as frequências de ACs radioinduzidas totais, estáveis e instáveis entre os três grupos, considerando os indivíduos homocigóticos para o alelo comum, verificou-se que existem diferenças estatisticamente significativas entre eles. Neste caso, a exposição assim como o genótipo parecem ter influência na frequência de ACs radioinduzidas em indivíduos homocigóticos para o alelo comum. Quando se comparam apenas os indivíduos possuidores do alelo variante, obteve-se o mesmo resultado, exceto para os genes *XRCC1*²⁸⁰ e *RAD51*^{135C}, para os quais não parece haver qualquer nível de impacto. O mesmo se passa relativamente às frequências de ACs espontâneas, onde não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de exposição, tanto para os indivíduos homocigóticos para o alelo comum, como para os indivíduos portadores do alelo variante.

Globalmente, os resultados obtidos neste estudo revelaram que existem associações entre variantes alélicas de certos genes envolvidos na reparação do DNA e as frequências de ACs induzidas pela radiação gama, que são influenciadas também pelo tipo de exposição ambiental. Considerando, por sua vez, que a frequência de ACs se relaciona com o risco de desenvolvimento de doenças malignas, os achados deste estudo vêm corroborar a importância de se incluir o estudo da susceptibilidade genética na avaliação de efeitos genotóxicos e em populações expostas a agentes potencialmente carcinogênicos. No entanto, seria interessante levar a cabo estudos adicionais com amostras de maior dimensão para colocar em evidência os pequenos efeitos observados. Do mesmo modo, seria interessante o estudo de interações entre variantes alélicas, uma vez que está bem documentado na literatura que elas ocorrem.

Em conclusão, os resultados obtidos vêm confirmar a hipótese de que polimorfismos em genes de reparação do DNA afectam os níveis de aberrações cromossômicas radioinduzidas tendo, possivelmente, um efeito modulador do risco individual para o desenvolvimento de cancro.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Falcão M, Carvalho FP, Machado Leite M, Cordeiro E, Ribeiro J (2005) *MinUrar, Relatório Científico* 1
- 2- Harley NH, Cohen BS, Robbins ES (1996) *Environmental International*, 22: S959-S964
- 3- Dobbs TA, Palmer F, Maniou Z, Lomax ME, O'Neill P (2008) *DNA Repair*, 7: 1372-1383
- 4- von Sonntag C (1987) *The Chemical basis of radiation biology*. Taylor & Francis, London
- 5- O'Neill P (2001) *Radiation Chemistry*. Elsevier Science, pp. 585-622
- 6- *Biological effects of radiation "Nuclear Reactor Concepts" Workshop manual*, U.S. NRC
- 7- Brenner DJ, Doll R, Goodhead DT, Hall EJ, Land CE, Little JBM, Lubin JH, Preston DL, Preston RJ, Puskin JS, Ron E, Sachs K, Samet JM, Setlow RB, Zaider M (2003) *PNAS*, 100: 13761-13766
- 8- Au WW, Lana RG, Legator MV, Whorton EB, Wilkinson GS, Gabehart GJ (1995) *Environ. Health Persp.*, 103: 466-470
- 9- Tucker JD (2008) *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 656: 211-220
- 10- Ron.E. (1998) *Radiat.Res.*, 150, 530-541
- 11- Brugge D, de Lems JL, Oldmixon B (2005) *Rev. Environ. Health*, 20:117-193
- 12- Kathren RL, Moore RH (1986) *Health Phys.*, 51: 17-21
- 13- Kathren RL, McInray JF, Dietert SE (1989) *Health Phys.*, 57: 17-21
- 14- Kusiak RA, Ritchie AC, Muller J, Springer J (1993) *Brit. J. Ind. Med.*, 50: 920-928
- 15- Au WW,(2007) *Int. J. Hyg. Environ.-Health*, 210:239-246
- 16- Albertini RJ, Andersen D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, Natarajan AT, Norppa H, Shuker DE, Tice R, Waters MD, Aitio A (2000) *Mutat. Res.*, 436: 111-172
- 17- Norppa H, (2004) *IARC Science Publication*, 157: in press
- 18- Hagmar L, Strömberg U, Tinnerberg H, Mikoczy (2004) *IARC Scientific Publications*. 157: 207-213
- 19- Russel PJ (2002) in B. Cummings (Ed), *Genetics*, Pearson Education Inc, San Francisco: 595-621
- 20- Hagmar L, Stromberg U, Bonassi S, Hansteen IL, Knudsen LE, Lindholm C, Norppa H (2004) *Cancer Res*. 64: 2258–2263
- 21- Bonassi S, Hagmar L, Strömberg U, Huici Montagud A, Tinnerberg H, Forni A, Heikkilä P, Wanders S, Wilhardt P, Hansteen IL, Knudsen L, Norppa H, (2000) *Cancer Res*. 60: 1619-1625
- 22- Hagmar L, Bonassi S, Strömberg U, Brogger A, Knudsen L, Norppa H, Reuterwall C, Forni A, Hansteen IL, Högststedt B, Huici Montagud A, Lambert B, Mitelman F, Nordenson I, Salomaa S, Skerfving S (1998) *Cancer Res*. 58: 4117-4121
- 23- Bonassi S, Abbondandolo A, Camurri L, Dal Prá A, De Ferrari M, Degrassi F, Forni A, Lamberti L, Lando C, Padovani P, Sbrana I, Vecchio D, Puntoni R (1995) *Cancer Genet. Cytogenet.*, 79: 133–135.
- 24- Bonassi S (1999) *Mutation Res.*, 428: 177-185
- 25- Hagmar L, Brogger A, Hansteen IL, Heim S, Högststedt B, Knudsen L, Lambert B, Linnainmaa K, Mitelman F, Nordenson I, Reuterwall C, Salomaa S, Skerfving S, Sorsa, M (1994) *Cancer Res.*, 54: 2919-2922
- 26- Norppa H (2003) *Mutat. Res.*, 544: 339-349
- 27- Au WW (2004) *Toxicology*, 198: 117-120
- 28- Sabbioni G, Jones CR, Sepai O, Hirvonen A, Norppa H, Jarventaus H, Glatt H, Pomplum D, Yan H, Brooks LR, Warren SH, Demarini DM, Liu YY (2006) *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 15: 559-566
- 29- Mohrenweiser HW, Wilson III DM, Jones IM (2003) *Mut. Res.*, 526:93-125
- 30- Goode EL, Ulrich CM, Potter JD (2002) *Cancr Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 11: 1513-15-30
- 31- Caldecott KW, (2003) *DNA repair* 2: 955-969
- 32- Wood R D (1999) *Biochimie*, 81: 39–44
- 33- Reardon J T, Bessho T, Kung H C, Bolton P H, Sancar A (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94: 9463–9468
- 34- Natarajan AT, Berni A, Marimuthu KM, Palitti F (2008) *Mut. Res.*, 642:80-85
- 35- Tuimala J, (2004) in *People and work research reports* 63
- 36- Shen MR, Jones IM, Mohrenweiser H (1998) *Cancer Res*, 58: 604-608
- 37- Mohrenweiser HW, Jones IM (1998) *Mutat. Res.*, 400: 15-24
- 38- Harms C, Salama SA, Sierra-Torres C, Cajas-Salazar N, Au WW (2004) *Environ. Mol. Mutagen.*, 44: 74-82
- 39- Affatato AA, Wolfe KJ, Lopez MS, Hallberg C, Ammenheuser MM, Abdel-Rahman SZ (2004) *Environ. Mol. Mutag.*,44: 65-73
- 40- Tuimala J, Szekely G, Wikman H, Jarventaus H, Hirvonen A, Gundy S, Norppa H (2004) *Mutat. Res.*, 554: 319-333
- 41- Vodicka P, Kumar R, Stetina R, Musak L, Soucek P, Hufroid V et al. (2004) *Environ. Mol. Mutag.*, 44: 283-292
- 42- Angelini S, Kumar R, Carbone F, Maffei F, Forti GC, Violante FS, Lodi V, Curti S, Hemminki K, HreliaP (2005) *Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 570: 105-117
- 43- Mateuca R, Aka PV, Boeck M, Hauspie R, Kirsch-Volders M, Lison D (2005) *Toxicology Letters*, 156: 277-288
- 44- Kiuru A, Lindholm C, Heilimo I, Ceppi M, Koivistoinen A, Ilus T, Hirvonen A, Norppa H, Salomaa S (2005) *Environ. Mol. Mutag.*, 46:198-205
- 45- Wilding CS, Relton CL, Rees GS, Tarone R, Whitehouse CA, Tawn EJ (2005) *Mutat. Res.*, 570:137-145
- 46- Lindholm C, Makelainen I, Paile W, Koivistoinen A, Salomaa S (1999) *Int. J. radiat. Biol.*, 75: 921-928
- 47- Sorokine-Durm I, Whitehouse C, Edwards A (2000) *Rad. Prot. Dosim.*, 88: 93-99
- 48- Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B (2003) *Toxicology*, 193: 3-34

- 49- Liang G, Xing D, Miao X, Tan W, Yu C, Lu W, Lin D (2003). *Int. J. Cancer*, 105: 669-673
- 50- Vaz CJ, Mateus do Amaral E, Severo A (1998) *Radiat Prot Dosimetry*, 24: 375-377
- 51- Tucker JD, Morgan WF, Awa AA, Bauchinger M, Blakey D, Cornforth MN, Littlefield LG, Natarajan AT, Shasserre C (1995) *Cytogenet. Cell Genet.*, 68:211-221
- 52- Tucker JD, Cofield J, Matsumoto K, Ramsey MJ, Freeman DC (2005) *Environ. Mol. Mutag.*, 45: 249-257
- 53- Tucker JD, Cofield J, Matsumoto K, Ramsey MJ, Freeman DC (2005) *Environ. Mol. Mutag.*, 45: 229-248
- 54- Lucas JN, Deng W (2000) *Radiat. Protect. Dosimet.*, 88: 77-86
- 55- Sturgis EM, Castillo EJ, Li L, Zheng R, Eicher SA, Clayman GL, Strom SS, Spitz MR, Wei Q (1999) *Carcinogenesis*, 20: 2125-2129
- 56- Tuimala J, Szekeley G, Gundy S, Hirvonen A, Norppa H (2002) *Carcinogenesis*, 23: 1003-1008
- 57- Dybdahl M, Vogel U, Frentz G, Wallin H, Nexø BA (1999) *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 8: 77-81
- 58- Medina PP, Ahrendt SA, Pollan M, Fernandez P, Sidransky D, Sanches-Cespedes M(2003)*Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*,12:699-704
- 59- Schlade-Bartusiak K, Rozik K, Laczmanska I, Ramsey D, Sasiadek M (2004) *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 558: 121-130
- 60- Au WW, Salama SA, Sierre-Torres CH (2003) *Environmental Health Perspectives* 111: 1843-1850
- 61- GeneCards®, an academic web site of the Weizmann Institute of Science in association with Xenex (<http://www.genecard.org>)
- 62- Oliveira NR, Rodrigues AS, Chaveca T, Rueff J (1998) *Brotéria Genética*, XIX: 133-181
- 63- Edwards AA, Lindholm C, Darroudi F et al. (2005) *Radiat. Prot. Dosim.*, 113: 396-402
- 64- Mateuca R, Lombaert N, Aka PV, Decordier I, Kirsch-Volders M (2006) *Biochimie*, 88: 1515-1531
- 65- Hu JJ, Mohrenweiser HW, Bell DA, Leason SA, Miller MS (2002) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 185:64-73
- 66- Tawn EJ, Whitehouse CA (2001) *Mutation Research*, 354: 77-80
- 67- Ramsey MJ, Moore II DH, Briner JF, Lee DA, Olsen LA, Senft JR, Tucker JD (1995) *Mutation Research*, 338: 95-106
- 68- Fenech M (1998) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 854: 23-26
- 69- Kiuru A, Lindholm C, Heilimo I, Ceppi M, Koivistoinen A, Ilus T, Hirvonen A, Norppa H, Salomaa S (2005) *Environ. Mol. Mutag.*, 46: 198-205
- 70- Hu JJ, Smith TR, Miller MT, Mohrenweiser W, Golden A, Case LD (2001) *Carcinogenesis*, 22: 917-922
- 71- Thompson, L. H., and West, M. G. (2000) *Mutat. Res.*, 459: 1-18
- 72- Pachkowski BF, Winkel S, Kubota Y, Swenberg JA, Millikan RC, Nakamura J (2006) *Cancer Res.*, 66: 2860-2868
- 73- Takanami T, Nakamura J, Kubota Y, Horiuchi S (2005) *Mutat. Res.*, 582: 135-145
- 74- Ratnasinghe D, Yao SX, Tangrea JA, Qiao YL, Andersen MR, Barret MJ, Giffen CA, Erozan Y, Tockman MS, Taylor PR (2001) *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 10: 119-123
- 75- Musák L, Vodicka P, Klimentová G, Soucek P, Hánová M, Mikulková R, Buchancová J, Vodicková L, Poláková V, Péc M (2006) *Neuro. Endocrinol. Lett. Suppl.* 2:57-60
- 76- Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA (2000) *Cancer Lett.*, 159: 63-71
- 77- Lunn RM, Langlois RG, Hsieh LL, Bell DA (1999) *Cancer Res.*, 59: 2557-2561
- 78- Hirvonen A (2008) State of the art of genotype vs. phenotype studies in WP7 ECNIS Report 1
- 79- Pluth JM, Yamasaki V, Cooper BA, Rydberg BE, Kirchgessner CU, Cooper PK (2008) *DNA Repair*, 7:108-118
- 80- Tsuzuki T, Fujii Y, Sakumi K, Tominaga Y, Nakao K, Sekiguchi M, Matsushiro A, Yoshimura Y and Morita T(1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 6236–6240
- 81- Lambert S, Lopez BS. (2000). *EMBO J.*, 19: 3090–3099
- 82- Levy-Lahad E, Lahad A, Eisenberg S, Dagan E, Paperna T, Kasinetz L, Catane R, Kaufman B (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 3232-3236
- 83- Wang WW, Spurdle AB, Kolachana P, Bove B, Modan B, Ebbers SM, Suthers G, Tucker MA, Kaufman DJ, Doody MM, Tarone RE, Daly M, Levavi H, Pierce H, Chetrit A, Yechezkel GH, Chenevix-Trench G, Offit K, Godwin AK, Struwing JP (2001) *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 10: 955-960
- 84- Costa S, Pinto D, Pereira D, Rodrigues H, Cameselle-Teijeiro J, Medeiros R, Schmitt F(2007), *Breast Cancer Res Treat*, 103: 209-217
- 85- Mosor M, Ziolkowska, Janusszkiewicz-Lewandowska D, Nowak J (2008) *Eur. J. Cancer*, doi: 10.1016/j.ejca.2008.06.026
- 86- Ryk C, Kumar R, Thirumaran RK, Hou SM (2006) *Lung cancer*, 54:285–292
- 87- Lan Q, Shen M, Berndt SI, et al. (2005) *Lung Cancer*, 49:317–23
- 88- Tauchi H, Matsuura S, Kobayashi J, Sakamoto S, Komatsu K, (2002) *Oncogene*, 21: 8967–8980
- 89- Liu N, Lamerdin JE, Tebbs RS, Schild D, Tucker JD, Shen MR, Brookman KW, Siciliano MJ, Walter CA, Fan W, Narayana LS, Zhou ZQ, Adamson A W, Sorensen KJ, Chen DJ, Jones NJ, Thompson LH (1998) *Mol. Cell.*, 1:783–793.
- 90- Bishop DK, Ear U, Bhattacharya A, Calderone C, Beckett M, Weichselbaum RR, et al. (1998) *J. Biol. Chem.*, 273: 21482-21488
- 91- Matullo G, Palli D, Peluso M, Guarrera S, Carturan S, Celentano E, Krogh V, Munnia V, Tumino R, Polidoro S, Piazza A, Viennis P (2001) *Carcinogenesis*, 22: 1437-1445
- 92- Araujo FD, Pierce AJ, Stark JM, Jasin M (2002) *Oncogene*, 21:4176–80
- 93- Klungland A, Lindahl T (1997) *EMBO J.*, 16: 3341.3348

7. ANEXOS

Tabela 7.1: Sequências dos *primers* utilizados para a análise de cada polimorfismo.

Polimorfismos	Primers
<i>hOGG1</i> ³²⁶	F- 5' CCC AAC CCC AGT GGA TTC TCA TTG C 3' R- 5' GGT GCC CCA TCT AGC CTT GCG GCC CTT 3'
<i>XRCC1</i> ¹⁹⁴	F- 5' GCC AGG GCC CCT CCT TCA A 3' R- 5' TAC CCT CAG ACC CAC GAG T 3'
<i>XRCC1</i> ²⁸⁰	F- 5' TGG GGC CTG GTA TGC TGG GTC TG 3' R- 5' CAG CAC CAC TAC CAC ACC CTG AAG G 3'
<i>XRCC1</i> ³⁹⁹	F- 5' CAG TGG TGC TAA CCT AAT C 3' R- 5' AGT AGT CTG CTG GCT CTG G 3'
<i>XPB</i> ⁷⁵¹	F- 5' ATC CTG TCC CTA CTG GCC ATT C 3' R- 5' TGT GGA CGT GAC AGT GAG AAA T 3'
<i>NBS1</i> ¹⁸⁵	F- 5' GGA TGT AAA CAG CCT CTT TG 3' R- 5' CAC AGC AAC TAT TAC ATC TC 3'
<i>RAD51</i> ^{135C}	F- 5' TGG GAA CTG CAA CTC ATC TGG 3' R- 5' GCG CTC CTC TCT CCA GCA G 3'
<i>XRCC3</i> ²⁴¹	F- 5' GCC TGG TGG TCA TCG ACT C 3' R- 5' ACA GGG CTC TGG AAG GCA CTG 3'

Tabela 7.2: Programas das reacções de PCR utilizadas para os vários polimorfismos analisados.

<i>XRCC1</i> ¹⁹⁴	<i>XRCC1</i> ²⁸⁰	<i>XRCC1</i> ³⁹⁹	<i>hOGG1</i> ³²⁶
1x 95°C, 5min	1x 94°C, 5min	1x 95°C, 5min	1x 94°C, 4min
95°C, 30s	94°C, 1min	95°C, 45s	94°C, 30s
35x 61°C, 35s	30x 72°C, 1min	35x 58°C, 45s	35x 60°C, 30s
72°C, 45s	72°C, 1min	72°C, 1,2min	72°C, 1,5min
1x 72°C, 10min	1x 72°C, 7min	1x 72°C, 10min	1x 72°C, 5min
<i>XRCC3</i> ²⁴¹	<i>RAD51</i> ^{135C}	<i>NBS1</i> ¹⁸⁵	<i>XPB</i> ⁷⁵¹
1x 94°C, 3min	1x 95°C, 3min	1x 94°C, 3min	1x 96°C, 1min
95°C, 1min	94°C, 1min	94°C, 45s	94°C, 30s
35x 60°C, 1min	35x 60°C, 1min	35x 58°C, 45s	35x 54°C, 45s
72°C, 1min	72°C, 1min	72°C, 45s	72°C, 1min
1x 72°C, 5min	1x 72°C, 10min	1x 72°C, 5min	1x 72°C, 2min

Tabela 7.3: Frequência (média \pm desvio padrão) de ACs totais, estáveis e instáveis espontâneas, para *hOGG1*³²⁶.

Genótipo <i>hOGG1</i> ³²⁶	N	ACs totais	Estáveis	Dicêntricos	Acêntricos	Instáveis
Total	94					
Ser/Ser	61	4.12 \pm 1.51	2.94 \pm 1.32	0.24 \pm 0.16	0.95 \pm 0.45	1.19 \pm 0.54
Ser/Cys + Cys/Cys	33	4.22 \pm 1.58	3.02 \pm 1.37	0.27 \pm 0.20	0.93 \pm 0.48	1.20 \pm 0.59
GE	32					
Ser/Ser	23	4.46 \pm 1.50	3.20 \pm 1.39	0.23 \pm 0.18	1.25 \pm 0.49	1.03 \pm 0.41
Ser/Cys + Cys/Cys	9	4.64 \pm 2.14	3.39 \pm 1.90	0.25 \pm 0.12	1.24 \pm 0.60	1.00 \pm 0.58
GNE	33					
Ser/Ser	22	3.91 \pm 1.45	2.75 \pm 1.25	0.26 \pm 0.19	0.92 \pm 0.46	1.18 \pm 0.58
Ser/Cys + Cys/Cys	11	4.23 \pm 1.17	2.84 \pm 1.14	0.36 \pm 0.19	1.03 \pm 0.44	1.39 \pm 0.57
GR	29					
Ser/Ser	16	3.92 \pm 1.60	2.81 \pm 1.32	0.24 \pm 0.10	0.86 \pm 0.52	1.11 \pm 0.58
Ser/Cys + Cys/Cys	13	3.93 \pm 1.51	2.92 \pm 1.18	0.22 \pm 0.24	0.79 \pm 0.43	1.01 \pm 0.59

Tabela 7.4: Frequência (média \pm desvio padrão) de ACs totais, estáveis e instáveis radioinduzidas, para *hOGG1*³²⁶.

Genótipo <i>hOGG1</i> ³²⁶	N	ACs totais	Estáveis	Dicêntricos	Acêntricos	Instáveis
Total	94					
Ser/Ser	61	179.82 \pm 30.96	68.78 \pm 12.39	34.69 \pm 7.47	76.35 \pm 14.64	111.04 \pm 21.38
Ser/Cys + Cys/Cys	33	186.07 \pm 28.95	71.69 \pm 12.05	35.99 \pm 6.46	78.39 \pm 13.29	114.38 \pm 19.28
GE	32					
Ser/Ser	23	158.46 \pm 34.19	30.02 \pm 13.07	31.01 \pm 8.14	67.43 \pm 16.30	98.44 \pm 23.88
Ser/Cys + Cys/Cys	9	169.26 \pm 28.49	65.55 \pm 15.02	31.68 \pm 3.81	72.04 \pm 11.65	103.72 \pm 17.78
GNE	33					
Ser/Ser	22	187.36 \pm 20.05	73.68 \pm 9.03	34.66 \pm 5.87	79.02 \pm 10.72	113.68 \pm 15.24
Ser/Cys + Cys/Cys	11	186.03 \pm 24.08	73.75 \pm 8.69	35.55 \pm 5.57	76.33 \pm 13.33	112.28 \pm 18.61
GR	29					
Ser/Ser	16	200.16 \pm 18.28	74.64 \pm 7.71	40.03 \pm 5.14	85.48 \pm 9.26	125.51 \pm 13.79
Ser/Cys + Cys/Cys	13	197.73 \pm 29.19	74.19 \pm 11.62	39.35 \pm 7.04	84.19 \pm 12.78	123.54 \pm 19.42

Tabela 7.5: Frequência (média \pm desvio padrão) de ACs totais, estáveis e instáveis espontâneas para *XRCC1*¹⁹⁴.

Genótipo <i>XRCC1</i> ¹⁹⁴	N	ACs totais	Estáveis	Dicêntricos	Acêntricos	Instáveis
Total	94					
Arg/Arg	85	4.15 \pm 1.51	2.97 \pm 1.32	0.25 \pm 0.18	0.93 \pm 0.47	1.19 \pm 0.57
Arg/Trp + Trp/Trp	9	4.18 \pm 1.77	2.93 \pm 1.52	0.24 \pm 0.18	1.01 \pm 0.34	1.25 \pm 0.48
GE	32					
Arg/Arg	27	4.53 \pm 1.61	3.30 \pm 1.48	0.23 \pm 0.16	1.01 \pm 0.49	1.24 \pm 0.54
Arg/Trp + Trp/Trp	5	4.37 \pm 2.13	3.03 \pm 1.92	0.24 \pm 0.22	1.09 \pm 0.24	1.33 \pm 0.42
GNE	33					
Arg/Arg	32	4.06 \pm 1.35	2.80 \pm 1.21	0.30 \pm 0.20	0.97 \pm 0.44	1.27 \pm 0.57
Arg/Trp + Trp/Trp	1	2.50	1.95	0.14	0.42	0.56
GR	29					
Arg/Arg	26	3.87 \pm 1.57	2.83 \pm 1.27	0.23 \pm 0.18	0.80 \pm 0.48	1.03 \pm 0.58
Arg/Trp + Trp/Trp	3	4.44 \pm 1.34	3.10 \pm 1.16	0.26 \pm 0.15	1.08 \pm 0.40	1.34 \pm 0.55

Tabela 7.6: Frequência (média \pm desvio padrão) de ACs totais, estáveis e instáveis radioinduzidas para $XRCC1^{194}$.

Genótipo $XRCC1^{194}$	N	ACs totais	Estáveis	Dicêntricos	Acêntricos	Instáveis
Total	94					
Arg/Arg	85	184.47 \pm 28.80	70.77 \pm 11.85	35.59 \pm 6.83	78.11 \pm 17.71	113.70 \pm 19.89
Arg/Trp + Trp/Trp	9	158.80 \pm 35.60	60.64 \pm 13.19	30.95 \pm 8.81	67.22 \pm 15.18	98.16 \pm 23.37
GE	32					
Arg/Arg	27	166.83 \pm 31.74	63.48 \pm 13.81	32.38 \pm 6.75	70.97 \pm 17.78	103.35 \pm 20.90
Arg/Trp + Trp/Trp	5	132.69 \pm 21.57	51.26 \pm 6.42	24.82 \pm 6.12	56.61 \pm 11.34	81.43 \pm 16.49
GNE	33					
Arg/Arg	32	187.42 \pm 21.23	74.15 \pm 8.54	35.02 \pm 5.78	78.25 \pm 11.68	113.28 \pm 16.41
Arg/Trp + Trp/Trp	1	170.68	59.55	32.72	78.41	111.13
GR	29					
Arg/Arg	26	199.15 \pm 24.69	74.19 \pm 9.96	39.63 \pm 6.29	85.34 \pm 11.23	124.96 \pm 17.12
Arg/Trp + Trp/Trp	3	198.36 \pm 1.03	76.64 \pm 2.97	40.57 \pm 1.01	81.15 \pm 5.45	121.72 \pm 4.99

Tabela 7.7: Frequência (média \pm desvio padrão) de ACs totais, estáveis e instáveis espontâneas para $XRCC1^{280}$.

Genótipo $XRCC1^{280}$	N	ACs totais	Estáveis	Dicêntricos	Acêntricos	Instáveis
Total	94					
Arg/Arg	81	4.18 \pm 1.45	2.96 \pm 1.28	0.26 \pm 0.18	0.97 \pm 0.44	1.23 \pm 0.53
Arg/His + His/His	13	3.98 \pm 2.00	3.00 \pm 1.67	0.22 \pm 0.17	0.77 \pm 0.56	0.98 \pm 0.68
GE	32					
Arg/Arg	29	4.55 \pm 1.56	3.26 \pm 1.46	0.23 \pm 0.17	1.05 \pm 0.44	1.28 \pm 0.50
Arg/His + His/His	3	4.15 \pm 2.92	3.22 \pm 2.47	0.22 \pm 0.08	0.71 \pm 0.55	0.93 \pm 0.63
GNE	33					
Arg/Arg	25	3.93 \pm 1.21	2.66 \pm 1.06	0.30 \pm 0.20	0.98 \pm 0.39	1.28 \pm 0.53
Arg/His + His/His	8	4.29 \pm 2.92	3.14 \pm 1.60	0.27 \pm 0.18	0.89 \pm 0.61	1.15 \pm 0.73
GR	29					
Arg/Arg	27	4.03 \pm 1.50	2.92 \pm 1.24	0.25 \pm 0.17	0.87 \pm 0.47	1.12 \pm 0.56
Arg/His + His/His	2	2.51 \pm 1.65	2.12 \pm 1.27	0.00 \pm 0.00	0.39 \pm 0.38	0.39 \pm 0.38

Tabela 7.8: Frequência (média \pm desvio padrão) de ACs totais, estáveis e instáveis radioinduzidas para $XRCC1^{280}$.

Genótipo $XRCC1^{280}$	N	ACs totais	Estáveis	Dicêntricos	Acêntricos	Instáveis
Total	94					
Arg/Arg	81	182.44 \pm 30.98	69.25 \pm 12.41	35.51 \pm 7.31	77.69 \pm 14.16	113.19 \pm 20.80
Arg/His + His/His	13	179.33 \pm 26.29	73.24 \pm 11.27	32.91 \pm 5.59	73.17 \pm 13.96	106.08 \pm 19.16
GE	32					
Arg/Arg	29	158.48 \pm 31.21	59.63 \pm 12.05	30.99 \pm 7.30	67.86 \pm 15.00	98.85 \pm 21.68
Arg/His + His/His	3	190.69 \pm 37.88	80.32 \pm 16.20	33.21 \pm 5.94	77.15 \pm 16.27	110.36 \pm 21.89
GNE	33					
Arg/Arg	25	190.90 \pm 19.41	74.47 \pm 8.94	35.80 \pm 5.44	80.64 \pm 9.33	116.44 \pm 13.45
Arg/His + His/His	8	174.46 \pm 22.57	71.32 \pm 8.36	32.32 \pm 6.04	70.82 \pm 14.90	103.13 \pm 20.50
GR	29					
Arg/Arg	27	200.35 \pm 22.67	74.75 \pm 9.13	40.09 \pm 5.90	85.52 \pm 10.69	125.60 \pm 16.06
Arg/His + His/His	2	181.78 \pm 35.63	70.32 \pm 17.63	34.85 \pm 6.17	76.61 \pm 11.82	111.46 \pm 18.00

Tabela 7.9: Frequência (média \pm desvio padrão) de ACs totais, estáveis e instáveis espontâneas para $XRCC1^{399}$.

Genótipo $XRCC1^{399}$	N	ACs totais	Estáveis	Dicêntricos	Acêntricos	Instáveis
Total	94					
Arg/Arg	32	4.37 \pm 1.50	3.12 \pm 1.26	0.27 \pm 0.21	0.98 \pm 0.52	1.25 \pm 0.63
Arg/Gln + Gln/Gln	62	4.05 \pm 1.54	2.89 \pm 1.37	0.24 \pm 0.16	0.92 \pm 0.43	1.16 \pm 0.51
GE	32					
Arg/Arg	15	4.61 \pm 1.66	3.33 \pm 1.48	0.25 \pm 0.18	1.03 \pm 0.50	1.28 \pm 0.58
Arg/Gln + Gln/Gln	17	4.42 \pm 1.71	3.19 \pm 1.59	0.22 \pm 0.15	1.01 \pm 0.43	1.23 \pm 0.47
GNE	33					
Arg/Arg	11	4.04 \pm 1.36	2.71 \pm 1.17	0.31 \pm 0.20	1.02 \pm 0.53	1.33 \pm 0.65
Arg/Gln + Gln/Gln	22	4.00 \pm 1.38	2.81 \pm 1.24	0.28 \pm 0.20	0.93 \pm 0.41	1.21 \pm 0.55
GR	29					
Arg/Arg	6	4.38 \pm 1.45	3.32 \pm 0.65	0.26 \pm 0.31	0.80 \pm 0.59	1.06 \pm 0.82
Arg/Gln + Gln/Gln	23	3.81 \pm 1.56	2.74 \pm 1.34	0.23 \pm 0.13	0.84 \pm 0.46	1.07 \pm 0.52

Tabela 7.10: Frequência (média \pm desvio padrão) de ACs totais, estáveis e instáveis radioinduzidas para $XRCC1^{399}$.

Genótipo $XRCC1^{399}$	N	ACs totais	Estáveis	Dicêntricos	Acêntricos	Instáveis
Total	94					
Arg/Arg	32	173.58 \pm 37.73	67.64 \pm 14.09	33.19 \pm 8.88	72.76 \pm 17.47	105.95 \pm 24.71
Arg/Gln + Gln/Gln	62	186.36 \pm 24.83	70.92 \pm 11.20	36.16 \pm 5.85	79.29 \pm 11.63	115.44 \pm 16.78
GE	32					
Arg/Arg	15	153.58 \pm 33.02	59.76 \pm 13.86	29.45 \pm 7.18	64.37 \pm 14.10	93.82 \pm 20.56
Arg/Gln + Gln/Gln	17	168.48 \pm 31.55	63.17 \pm 13.63	32.73 \pm 6.93	72.58 \pm 15.30	105.31 \pm 21.66
GNE	33					
Arg/Arg	11	179.09 \pm 25.43	72.99 \pm 8.91	32.52 \pm 6.95	73.58 \pm 13.91	106.10 \pm 19.57
Arg/Gln + Gln/Gln	22	190.83 \pm 17.96	74.06 \pm 8.90	36.17 \pm 4.68	80.60 \pm 5.59	116.77 \pm 13.26
GR	29					
Arg/Arg	6	213.49 \pm 36.09	77.51 \pm 12.95	43.76 \pm 8.44	92.22 \pm 16.78	135.98 \pm 24.96
Arg/Gln + Gln/Gln	23	195.31 \pm 18.08	73.64 \pm 8.54	38.67 \pm 4.48	82.99 \pm 8.11	121.67 \pm 12.28

Tabela 7.11: Frequência (média \pm desvio padrão) de ACs totais, estáveis e instáveis espontâneas para XPB^{751} .

Genótipo XPB^{751}	N	ACs totais	Estáveis	Dicêntricos	Acêntricos	Instáveis
Total	94					
Lys/Lys	34	4,21 \pm 1,48	3,03 \pm 1,26	0,32 \pm 0,18	0,88 \pm 0,40	1,19 \pm 0,54
Lys/Gln + Gln/Gln	60	4,12 \pm 1,56	2,93 \pm 1,38	0,22 \pm 0,17	0,98 \pm 0,49	1,20 \pm 0,57
GE	32					
Lys/Lys	11	4,30 \pm 1,72	3,21 \pm 1,44	0,27 \pm 0,11	0,81 \pm 0,43	1,09 \pm 0,51
Lys/Gln + Gln/Gln	21	4,62 \pm 1,67	3,28 \pm 1,60	0,21 \pm 0,18	1,13 \pm 0,44	1,34 \pm 0,51
GNE	33					
Lys/Lys	15	4,09 \pm 1,32	2,89 \pm 1,19	0,33 \pm 0,20	0,89 \pm 0,39	1,22 \pm 0,55
Lys/Gln + Gln/Gln	18	3,96 \pm 1,42	3,08 \pm 2,74	0,26 \pm 0,19	1,01 \pm 0,49	1,27 \pm 0,61
GR	29					
Lys/Lys	8	4,33 \pm 1,60	3,05 \pm 1,26	0,35 \pm 0,24	0,93 \pm 0,42	1,28 \pm 0,60
Lys/Gln + Gln/Gln	21	3,77 \pm 1,52	2,79 \pm 1,26	0,19 \pm 0,13	0,80 \pm 0,50	0,98 \pm 0,56

Tabela 7.12: Frequência (média \pm desvio padrão) de ACs totais, estáveis e instáveis radioinduzidas para XPD^{751} .

Genótipo XPD^{751}	N	ACs totais	Estáveis	Dicêntricos	Acêntricos	Instáveis
Total	94					
Lys/Lys	34	186,90 \pm 27,66	72,06 \pm 12,16	35,78 \pm 6,25	79,06 \pm 13,12	114,84 \pm 18,45
Lys/Gln + Gln/Gln	60	179,24 \pm 31,53	68,52 \pm 12,27	34,79 \pm 7,60	75,93 \pm 14,68	110,72 \pm 21,78
GE	32					
Lys/Lys	11	166,66 \pm 26,96	63,18 \pm 13,90	31,57 \pm 4,19	71,91 \pm 12,49	103,49 \pm 15,84
Lys/Gln + Gln/Gln	21	158,79 \pm 35,3	60,73 \pm 13,75	31,00 \pm 8,36	67,06 \pm 16,34	96,08 \pm 24,24
GNE	33					
Lys/Lys	15	193,32 \pm 24,24	76,31 \pm 8,96	36,61 \pm 7,05	80,39 \pm 13,24	117,01 \pm 19,08
Lys/Gln + Gln/Gln	18	181,58 \pm 16,98	71,53 \pm 8,25	33,57 \pm 3,98	76,48 \pm 9,86	110,05 \pm 12,98
GR	29					
Lys/Lys	8	202,70 \pm 19,43	76,32 \pm 8,75	39,99 \pm 3,18	86,39 \pm 9,65	126,38 \pm 12,38
Lys/Gln + Gln/Gln	21	197,69 \pm 24,99	73,72 \pm 9,85	39,63 \pm 6,79	84,34 \pm 11,37	123,96 \pm 17,75

Tabela 7.13: Frequência (média \pm desvio padrão) de ACs totais, estáveis e instáveis espontâneas para $RAD51^{135C}$.

Genótipo $RAD51^{135C}$	N	ACs totais	Estáveis	Dicêntricos	Acêntricos	Instáveis
Total	94					
135G/135G	72	4.06 \pm 1.50	2.89 \pm 1.31	0.25 \pm 0.18	0.92 \pm 0.46	1.17 \pm 0.56
135G/135C + 135C/135C	22	4.48 \pm 1.60	3.22 \pm 1.41	0.26 \pm 0.18	0.99 \pm 0.45	1.25 \pm 0.54
GE	32					
135G/135G	29	4.42 \pm 1.71	3.18 \pm 1.57	0.23 \pm 0.17	1.01 \pm 0.47	1.24 \pm 0.52
135G/135C + 135C/135C	3	5.34 \pm 0.96	3.97 \pm 0.65	0.26 \pm 0.12	1.11 \pm 0.37	1.37 \pm 0.47
GNE	33					
135G/135G	23	3.78 \pm 1.02	2.59 \pm 0.93	0.29 \pm 0.19	0.92 \pm 0.39	1.20 \pm 0.53
135G/135C + 135C/135C	10	4.57 \pm 1.87	3.22 \pm 1.65	0.30 \pm 0.22	1.05 \pm 0.56	1.35 \pm 0.68
GR	29					
135G/135G	20	3.85 \pm 1.60	2.81 \pm 1.22	0.24 \pm 0.19	0.81 \pm 0.53	1.05 \pm 0.65
135G/135C + 135C/135C	9	4.09 \pm 1.46	2.98 \pm 1.35	0.23 \pm 0.16	0.89 \pm 0.35	1.11 \pm 0.39

Tabela 7.14: Frequência (média \pm desvio padrão) de ACs totais, estáveis e instáveis radioinduzidas para $RAD51^{135C}$.

Genótipo $RAD51^{135C}$	N	ACs totais	Estáveis	Dicêntricos	Acêntricos	Instáveis
Total	94					
135G/135G	72	178.94 \pm 32.41	68.64 \pm 12.87	34.63 \pm 7.45	75.67 \pm 15.06	110.30 \pm 21.94
135G/135C + 135C/135C	22	192.08 \pm 19.13	73.62 \pm 9.37	36.83 \pm 5.79	81.63 \pm 9.50	118.46 \pm 14.24
GE	32					
135G/135G	29	158.92 \pm 32.95	60.73 \pm 13.72	30.82 \pm 7.39	67.38 \pm 15.19	98.19 \pm 21.95
135G/135C + 135C/135C	3	186.41 \pm 15.83	69.73 \pm 11.63	34.87 \pm 1.11	81.80 \pm 4.58	116.67 \pm 5.35
GNE	33					
135G/135G	23	184.46 \pm 21.18	72.50 \pm 8.55	34.46 \pm 5.32	75.51 \pm 11.58	111.96 \pm 16.06
135G/135C + 135C/135C	10	192.56 \pm 20.89	76.48 \pm 9.11	36.10 \pm 6.65	79.99 \pm 11.72	116.09 \pm 18.86
GR	29					
135G/135G	20	201.60 \pm 24.84	75.66 \pm 9.60	40.37 \pm 6.07	85.58 \pm 11.85	125.95 \pm 17.49
135G/135C + 135C/135C	9	193.44 \pm 19.82	71.74 \pm 9.14	38.30 \pm 5.77	83.40 \pm 8.38	121.70 \pm 13.62

Tabela 7.15: Frequência (média \pm desvio padrão) de ACs totais, estáveis e instáveis espontâneas para $NBS1^{185}$.

Genótipo $NBS1^{185}$	N	ACs totais	Estáveis	Dicêntricos	Acêntricos	Instáveis
Total	94					
Glu/Glu	45	4.22 \pm 1.34	2.97 \pm 1.28	0.27 \pm 0.19	0.99 \pm 0.35	1.27 \pm 0.46
Glu/Gln + Gln/Gln	49	4.09 \pm 1.69	2.97 \pm 1.39	0.23 \pm 0.17	0.89 \pm 0.54	1.13 \pm 0.63
GE	32					
Glu/Glu	18	4.51 \pm 1.39	3.31 \pm 1.40	0.21 \pm 0.16	0.99 \pm 0.28	1.20 \pm 0.39
Glu/Gln + Gln/Gln	14	4.51 \pm 2.02	3.20 \pm 1.72	0.26 \pm 0.16	1.06 \pm 0.62	1.32 \pm 0.65
GNE	33					
Glu/Glu	13	3.82 \pm 1.15	2.46 \pm 1.08	0.33 \pm 0.18	1.05 \pm 0.44	1.38 \pm 0.55
Glu/Gln + Gln/Gln	20	4.15 \pm 1.49	2.98 \pm 1.25	0.26 \pm 0.20	0.90 \pm 0.46	1.16 \pm 0.59
GR	29					
Glu/Glu	14	4.24 \pm 1.43	3.00 \pm 1.23	0.29 \pm 0.21	0.95 \pm 0.36	1.24 \pm 0.47
Glu/Gln + Gln/Gln	15	3.63 \pm 1.62	2.73 \pm 1.28	0.18 \pm 0.12	0.72 \pm 0.55	0.90 \pm 0.62

Tabela 7.16: Frequência (média \pm desvio padrão) de ACs totais, estáveis e instáveis radioinduzidas para $NBS1^{185}$.

Genótipo $NBS1^{185}$	N	ACs totais	Estáveis	Dicêntricos	Acêntricos	Instáveis
Total	94					
Glu/Glu	45	177.84 \pm 32.39	67.56 \pm 12.75	31.21 \pm 7.33	76.07 \pm 16.83	110.28 \pm 22.58
Glu/Gln + Gln/Gln	49	185.85 \pm 27.96	71.86 \pm 11.59	36.00 \pm 6.90	77.98 \pm 12.50	113.99 \pm 18.72
GE	32					
Glu/Glu	18	156.01 \pm 32.90	59.16 \pm 12.60	30.01 \pm 7.22	66.84 \pm 16.81	96.85 \pm 23.56
Glu/Gln + Gln/Gln	14	168.55 \pm 32.01	64.67 \pm 14.73	32.72 \pm 6.97	71.15 \pm 12.75	103.88 \pm 18.92
GNE	33					
Glu/Glu	13	185.50 \pm 22.89	73.38 \pm 9.60	33.87 \pm 4.86	78.25 \pm 13.27	112.12 \pm 17.18
Glu/Gln + Gln/Gln	20	187.83 \pm 20.42	73.91 \pm 8.45	36.66 \pm 6.21	78.27 \pm 10.55	113.92 \pm 15.88
GR	29					
Glu/Glu	14	198.78 \pm 21.48	72.94 \pm 9.72	39.93 \pm 5.64	85.90 \pm 9.43	125.84 \pm 14.62
Glu/Gln + Gln/Gln	15	199.34 \pm 25.74	75.84 \pm 9.35	39.53 \pm 6.43	83.97 \pm 12.18	123.50 \pm 18.10

Tabela 7.17: Frequência (média \pm desvio padrão) de ACs totais, estáveis e instáveis, espontâneas e radioinduzidas para $XRCC3^{241}$. Os indivíduos são todos portadores do alelo comum (241Thr).

Genótipo $XRCC3^{241}$	N	ACs totais	Estáveis	Dicêntricos	Acêntricos	Instáveis
Total	94					
Espontâneas	94	4.16 \pm 1.53	2.97 \pm 1.33	0.25 \pm 0.18	0.94 \pm 0.46	1.19 \pm 0.56
Radioinduzidas	94	182.01 \pm 30.27	69.80 \pm 12.28	35.15 \pm 7.12	77.06 \pm 14.14	112.21 \pm 20.63
GE	32					
Espontâneas	32	4.15 \pm 1.67	3.26 \pm 1.52	0.23 \pm 0.16	1.02 \pm 0.45	1.25 \pm 0.51
Radioinduzidas	32	161.50 \pm 32.61	61.27 \pm 13.63	31.20 \pm 7.13	68.73 \pm 15.10	99.92 \pm 21.61
GNE	33					
Espontâneas	33	4.02 \pm 1.36	2.78 \pm 1.20	0.29 \pm 0.19	0.96 \pm 0.45	1.25 \pm 0.58
Radioinduzidas	33	186.92 \pm 21.10	73.70 \pm 8.78	34.95 \pm 5.70	78.26 \pm 11.50	113.21 \pm 16.16
GR	29					
Espontâneas	29	3.93 \pm 1.53	2.86 \pm 1.24	0.23 \pm 0.18	0.83 \pm 0.48	1.07 \pm 0.57
Radioinduzidas	29	199.07 \pm 23.36	74.44 \pm 9.47	39.73 \pm 5.96	84.90 \pm 10.79	124.63 \pm 16.26