

## OS EFEITOS EM *ALLIUM CEPA* DA IRRADIAÇÃO COM RAIOS X

### THE EFFECTS ON *ALLIUM CEPA* OF X-RAY IRRADIATION

Mithitaka SOMA<sup>1</sup>  
Angela Cristina ITO<sup>2</sup>  
Sérgio Carlos Barros STEVES<sup>3</sup>  
Luciana Mari TSUTSUI<sup>2</sup>  
Lillian Stranghetti JORGE<sup>2</sup>  
Maria Carolina AOKI<sup>2</sup>  
Milena Belotti AMORIM<sup>2</sup>

#### RESUMO

*Foram descritos os efeitos das radiações X em várias dosagens em *Allium cepa*, irradiados de 6 - 12 Gy. As análises foram feitas em 2000 células do ciclo celular e mostramos as principais anomalias visualizadas em microscopia óptica. Os efeitos da radiação X são muito drásticos, principalmente quando as dosagens de radiação vão aumentando, podendo-se visualizar micronúcleos, pontes de cromossomas e deleções.*

#### ABSTRACT

*The effects of several doses of x - rays on *Allium cepa*, irradiated by 6 - 12 Gy, are described. The analyses were carried out on 2,000 cells of the cell cycle and the main abnormalities seen in na optic microscope are shown. X - rays are very drastic mainly when its doses are increased and we are able to see micronucleii, chromossomo bridges and deletion.*

#### INTRODUÇÃO

As radiações em material biológico, atualmente, são mais deletérias, já que todos os seres vivos existentes são os acúmulos das melhores mutações selecionadas pela força da seleção

natural. Portanto a probabilidade de uma nova mutação para melhorar o material genético da espécie é extremamente pequena. Assim sendo, por menor que seja a dose de radiação, por ser cumulativa, podemos considerá-la como nociva, pois, essas dosagens vão acumulando conse-

<sup>(1)</sup> Docente do ICBQ - PUC-Campinas e Herpetologia - I. Butantan.

<sup>(2)</sup> Bolsista Pibic e CEAP- PUC-Campinas.

<sup>(3)</sup> Caism - UNICAMP.

qüências, resultando em grandes modificações no material genético da espécie. As pequenas e grandes modificações no material genético podem hoje ser detectadas por processos moleculares, embora nas mutações médias e grandes há um processo mais simples de encontrá-las através da citogenética.

As radiações, ao atingirem as células podem, dependendo da dose, causar pequenas alterações que levam à inibição temporária no ciclo celular ou à inibição permanente, levando à morte celular. Este é princípio da radioterapia. Não resta nenhuma dúvida que a radioterapia tem trazido grande benefício, pelo menos a curto prazo, nos tratamentos tumorais. Contudo, a longo prazo, 'as vezes, podem acarretar novas frentes de células tumorais por aquelas células que não foram inativadas ou mortas pelos feixes indiretos da radiação ou seja, os raios periféricos do feixe, cujo ângulo de incidência do feixe radiativo não tenha tanta eficiência, mas certamente causarão mutações e que no futuro podem ser uma nova frente de células tumorais. Mas de qualquer forma ela traz um benefício na sobrevida do paciente.

Portanto, as células que sobreviveram ao tratamento da radioterapia não estão livres de alterações no seu material genético, e as que sofreram mutações poderão ser novas fontes tumorais.

Experimentos em ratos da linhagem AKR mostraram que eles apresentam uma alta incidência de linfomas, cerca de 70 - 80 % em machos e de 80 - 90 % nas fêmeas (Ishii *et al.* 1996). Esses pesquisadores incidiram altas doses de radiação ionizante e notaram que havia um prejuízo no sistema imune e induziram o câncer. Notaram ainda que uma dosagem baixa no corpo inteiro, aumentava a resposta imune e no efeito carcinoestático, reduzindo às vezes a incidência de algumas espécies de câncer sob certas condições. Maisin *et al.* (1996), utilizando ratos C 57 / Cnb machos adultos, revelaram que dosagens altas de radiação X, podem diminuir significamente o tempo de sobrevida, ao passo que dosagens baixas podem aumentar a sobrevida desses animais.

Outros estudos feitos por Di Majo *et al.* (1996), em ratos CBA / Cne machos e fêmeas, investigaram a influência do sexo no prazo de sobrevivência e indução de tumor depois de

exposição a altas e baixas doses de radiação. Os resultados obtidos demonstraram que de modo geral, os machos apresentaram-se mais suscetíveis a tumores do que as fêmeas, entretanto, tumores benignos e malignos de muitos tipos são observados em ambos os sexos.

Segundo Jikko *et al.* (1996), a radiação x pode causar alterações no metabolismo das proteoglicanas, com diferentes efeitos conforme a diferenciação celular e o tipo de condrócitos.

As  $\beta$  glicanas são extremamente importantes no combate às células tumorais (Mizuno, 1995).

Mill *et al.* (1996), definiram micronúcleos como partículas pequenas e arredondadas, presentes no citoplasma e fora do núcleo principal e muito semelhantes na sua forma e estrutura.

Os micronúcleos podem ter surgido por vários mecanismos, tais como de um ou mais fragmentos acêntricos de cromossomos inteiros que foram deletados durante a mitose ou então resultar de complexas configurações cromossômicas que acarretam problemas na anáfase e telófase. Portanto, um micro-núcleo pode ser o resultado de um ou a somatória de vários fragmentos ou de cromossomos inteiros deletados. Tal deleção pode ter surgido por defeito no fuso e na ligação centrômero fuso, centrômero anormal ou ainda no decréscimo na produção de tubulina, que é a grande responsável pela formação do fuso mitótico.

Manti *et al.* (1997), investigaram os efeitos das partículas  $\alpha$  de diferentes LET para observar a frequência no atraso de micronúcleos em células V 769 de Hamster Chinês, depois de bloquear a divisão celular com citocalasina B. Micronúcleos são produzidos imediatamente após a irradiação e após sete dias, o aumento é dez vezes maior.

Há uma forte correlação entre LET e a distribuição da radiação, influenciando no efeito biológico. O fator mais importante que afeta a eficiência biológica relativa (RBE) de um tipo de radiação é a quantidade de ionizações e a distribuição destas ionizações na matéria por unidade de comprimento do trajeto (LET) e é expressa em Kev /mm ou seja, a energia média liberada em Kev / mm de tecido atravessado.

Uma característica da radiação ionizante é o fato de que ela pode causar dano em células

proligerativas independente da fase do ciclo celular, contrastando com a ação de agentes químicos que necessitam que a célula passe por uma fase de síntese de DNA para que os danos sejam evidenciados (Natarajan, 1984; Natarajan et al. 1986).

As mutações no DNA podem ser provocadas por radiações principalmente pelas ionizantes, mas há outros agentes mutagênicos químicos e físicos que quebram a fita do DNA além de formar ligações inespecíficas, devido a formação de grandes quantidades de radicais iônicos, que são extremamente reativos, daí a formação das mutações por ligações inespecíficas.

As lesões primárias induzidas pelos mutagênicos são transformadas em lesões secundárias e as aberrações são os resultados de erros que escaparam do mecanismo de reparo pela polimerase I da célula.

Há ainda uma proteína extremamente importante denominada p53 que mantém o controle do ciclo celular para preservar a integridade do DNA (guardião do Genoma). Uma outra função desse p53, não menos importante é no controle da apoptose, que é a autodestruição programada de células danificadas, a fim de evitar a propagação de células alteradas, evitando-se assim um processo tumoral (guardião de tecido) Kamb, (1994). Portanto, a apoptose faz parte dos mecanismos de proteção do organismo contra os efeitos nocivos do insulto genotóxico (Lane, 1993).

Os resultados do descamamento da nossa pele é a consequência da apoptose, onde as células epidérmicas são afetadas e mortas e desta maneira o risco de câncer de pele é bastante minimizado.

O bronzeamento da pele também está envolvido no processo de proteção contra o risco de câncer. Neste caso, parece estar envolvido uma enzima de reparo do DNA. Há uma hipótese de que após a exposição à luz solar, o acúmulo de danos nas células da pele pode propiciar a ativação desta enzima de reparo do DNA, juntamente com a produção aumentada de melanina para a proteção das células epidérmicas (Eller *et al.* 1994).

Portanto, qualquer alteração levando a uma mutação, por exemplo do gene p53, pode acarretar consequências biológicas como a desregulação da

proliferação celular e da apoptose. As células apoptóticas alteradas apresentam a vantagem competitiva na expansão do clone em relação às células não mutadas. Assim, as células apoptóticas alteradas e aquela que contém a mutação no p53, são favorecidas invadindo o tecido sadio, tornando-se um tumor.

Mas, há o lado bom e importante da irradiação que é a de conseguir espécies mutantes favoráveis e até a formação de novas ligações químicas muito mais resistentes, surgindo assim novas espécies.

A pesquisa envolvendo doses crescentes de radiação e a alteração no ângulo de incidência é de extrema importância na aplicação da radioterapia, pois dependendo do ângulo, a eficiência será maior ou menor na morte de células tumorais.

Evans et al. (1959) utilizou pela primeira vez o teste do micronúcleo (MN) na ponta da raiz de *Vicia faba*, em estudo com neutrons rápidos e raios gama de  $CO^{60}$ . Em 1965, Russel denominou de Mn ao observá-los em preparações histológicas de embrião de camundongos irradiados no estágio de pré-implantação. Apesar de ter observado uma correlação positiva entre dose e efeito, os primeiros resultados mostrando uma relação quantitativa entre a dose absorvida de radiação e a frequência de MN foram relatados por Corintryman e Heddle (1976) em linfócitos periféricos humanos.

Streffer, 1993, observou que fragmentos cromossômicos acêntricos são os principais geradores de MN enquanto que (Kramer et al. 1990) sugere que ocorre a partir de cromossomos inteiros que não foram incluídos nos núcleos filhos durante a divisão celular.

Foi demonstrado imunoquimicamente que alguns MN contém o anticorpo anticinetocoro reativo, o que indica a presença de centrômeros e portanto, cromossomos inteiros ou até de fragmentos cêntricos. Quando há lesões no centrômero podem também propiciar a formação do MN (Molls *et al.*, 1986; Fuhrmann *et al.*, 1992).

A microscopia eletrônica mostrou que os MN possuem duas unidades de membranas com poros nucleares e que podem sintetizar RNA se o fragmento cromossômico com a região organizadora do nucléolo estiver incluída (Steffe, 1993). Também foi provado que sintetiza DNA

através de análise com timidina radioativa (Nusse et al. 1992; Streffer, 1993).

As radiações ionizantes causam mutações do tipo clastogênico e aneugênico. Os do tipo clastogênico são os que causam a quebra nos cromossomos, causando aberrações do tipo estrutural. Já os aneugênicos são os fatores que afetam o fuso celular, deixando de ligar no centrômero dos cromossomos.

## MATERIAL E MÉTODOS

O material utilizado foi *Allium cepa* irradiado com dosímetro de raios-X do centro de radioterapia do CAISM (Unicamp). A irradiação com este aparelho é de extrema necessidade devido a sua precisão nas dosagens, ao contrário de um aparelho de raio x comum.

O ângulo de incidência do feixe de raio x foi de 90° em relação ao eixo apical do bulbo do *Allium cepa* e a 20 cm de distância da fonte emissora de irradiação com a intensidade de 1 Gy por minuto.

As dosagens foram de 6 - 12 Gys. Esse material foi levado ao laboratório de Biologia Celular da PUC de Campinas, no campus II, onde foram colocados em Beckers com água até o bulbo, para o crescimento das raízes. Quando estas atingiram entre 0,5 - 1,0 cm de comprimento foram cortados e colocados em fixador de ácido acético glacial e álcool absoluto na proporção de 1:1, durante 24 horas. Decorrido esse tempo, as raízes foram conservadas em álcool 70° até o dia em que foram utilizadas para preparação em lâminas. Todas as raízes que foram cortadas dentro da mesma semana foram conservadas como sendo da primeira geração, as da segunda como as de segunda geração, etc.

Para a confecção das lâminas as raízes foram hidrolisadas em ácido clorídrico (HCl) 1 N durante 7 minutos em banho-maria, no total de três a quatro raízes. A seguir, com o auxílio de um pincel, mergulhamos as raízes em água gelada para cessar o processo de hidrólise. Secamos muito bem as raízes e as colocamos no Reativo de Schiff, em recipiente fechado e no escuro por 20 minutos.

Decorrido o tempo de coloração, as raízes de *Allium cepa* foram colocadas individualmente

em uma lâmina com uma gota de água e coberta com lamínula e com auxílio de um palito de dente, realizamos o squash batendo delicadamente sobre a lamínula, liberando assim os cromossomos das células.

Para destacar as lamínulas utilizamos gelo seco e álcool absoluto, mergulhando as lâminas por aproximadamente 2 - 3 minutos e com o auxílio de gilete as destacamos com um só golpe. As lâminas foram secas ao ar livre e montadas com Permout e lamínula nova, pressionando a mesma para retirar o excesso de Permout, para se obter uma focalização perfeita. Após 2 dias, as lâminas foram limpas com xilol, retirando-se o excesso de Permout.

As análises das lâminas foram feitas no microscópio óptico e as melhores metáfases, anáfases, telófases e micronúcleos foram fotografadas em fotomicroscópio Zeiss no Instituto Butantan.

Não foram utilizadas solução de colchicina, que inibe a formação do fuso mitótico, a fim de que as células se dividissem normalmente e com isso poderemos analisar em que dose de raios x ocorrem as anomalias no material genético de *Allium cepa*.

Foram analisadas 1000 células de cada geração, perfazendo um total de 2000 células para cada dosagem de radiação x, já que a análise baseou-se nos efeitos de duas gerações

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

O material analisado de *Allium cepa* de 6 - 12 Gy com incidência do raio x 90° em relação ao eixo do ponto apical à base do bulbo é apresentado na tabela 1 com os respectivos tipos de anomalias encontrados.

A comunidade científica está preocupada com os efeitos da radiatividade, não só das naturais, mas principalmente das artificiais. Se por um lado ela traz benefícios para a humanidade, quando bem manipulada e controlada, como a energia nuclear para uso pacífico, na produção de eletricidade, propulsão de foguetes, radiodiagnóstico, radioterapia, etc., pode também trazer alguns problemas, tais como lixo atômico, consequências a medio e longo prazo dos efeitos da radioterapia,

que pode causar mutações em células normais gerando novas fontes de carcinomas.

Por esta razão que resolvemos verificar em diversas dosagens controladas, as consequências que as mesmas acarretam no portador.

As radiações ionizantes produzem uma série de mutações. Nossas enzimas de reparos das moléculas de DNA não são suficientes para repará-las, e portanto, a mutação persiste sem a devida correção, principalmente pela polimerase I.

Segundo Fenech e Morley, 1986; Hsu *et al.* 1989. Essas enzimas de reparos do DNA, são pelo menos em boa parte a responsável pela integridade do material hereditário após os danos espontâneos ou induzidos no DNA.

Esse tipo de radiação pode induzir aneuploidias, devido a anomalias no fuso mitótico ou na ligação centrômero com fuso, centrômero

anormal ou ainda uma diminuição de tubulina, já que esta é a grande responsável pela formação do fuso ou aumento de quebras cromossômicas (French e Morley, 1986 ; Hando *et al.* 1994).

Mas não só as aneuploidias como também algumas anomalias estruturais levam a formação de micronúcleos. Os fragmentos e pontes de cromossomos pelo menos temporariamente até o seu rompimento, causam deleções gênicas para uma célula e duplicações gênicas em outras.

A tabela 1, mostra as frequências de anomalias em porcentagem, nas diversas dosagens analisadas em *Allium cepa* irradiados à 90°n em relação ao eixo principal do bulbo. O ângulo de incidência da radiação é extremamente importante, principalmente em radioterapia onde o LET é fundamental na eficiência desse processo no tratamento tumoral.

**Tabela 1.** Frequência de anomalias em % das várias dosagens de irradiação X em *Allium cepa*

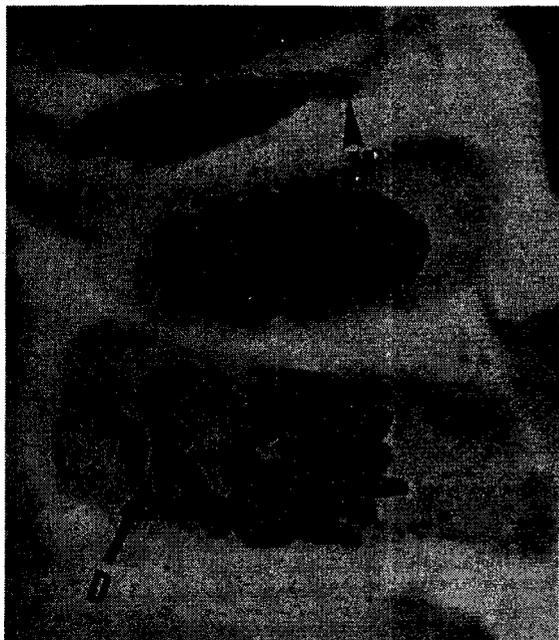
Dose (Gy)	Frequências de Anomalias em %			
	MN	Pontes	Deleções	Fragmentos
0	1	0	0	0
6	14	12	7	12
7	16	12	9	12
8	18	14	11	14
9	17	15	10	12
10	20	14	10	15
11	24	17	12	15
12	24	16	12	16

Podemos observar que as frequências de MN são elevadas, pois quanto maior a dosagem de radiação, podemos encontrar células com dois a quatro MN (fig. 2). Havia até mais, mas não consideramos pois a partir de 4 MN as células já estavam em um processo de desintegração.

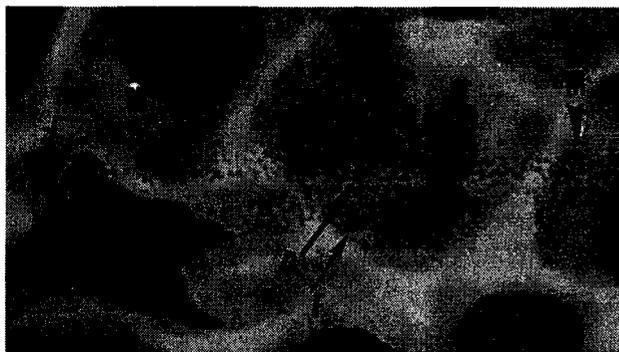
As pontes de cromossomos e os fragmentos também foram bastante significativos, em dosagens acima de 7 Gy (fig. 3). Ocorreram duas ou mais anomalias na mesma célula. Desta forma pudemos verificar que o aumento na dosagem de radiação, leva a indução de mais erros no DNA além dos MN.

As radiações ionizantes levam a mutações do tipo clastogênicos, isto é, que quebram a molécula de DNA, como também do tipo aneugênicos, isto é, que interferem no fuso mitótico ou no centrômero deixando de ligar-se ao cromossomo (Fig. 1).

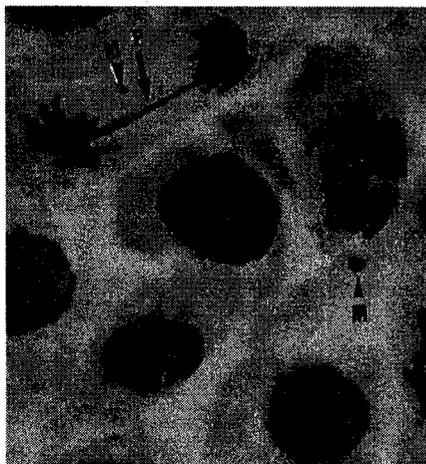
Com o aumento na dosagem de radiação, houve um acréscimo de aberrações, porém notamos uma pequena diminuição no índice mitótico, isto provavelmente porque as células em divisão celular são mais vulneráveis à radiação.



**Figura 1.** A fotomicrografia apresenta metáfase com D-deleções e M-micronúcleos, dose de 11Gy.



**Figura 2.** A fotomicrografia apresenta M-micronúcleos, D-deleções e F-fragmentos, dose de 12Gy.



**Figura 3.** P-Pontes cromossômicas e m-micronúcleos em fotomicrografia de 8Gy

Há uma relação direta entre o atraso do ciclo celular em virtude da dosagem mais alta de radiação e a expressão de MN induzido em eritrócitos policromáticas de camundongos, irradiados com doses de 1 a 8 Gy de raios x (58 Gy / min) McFer *et al.* (1994).

A grande maioria dos micronúcleos só aparecem na interfase porque os fragmentos e deleções que são vistos em interfase, concluindo que estes tornaram-se MN. Às vezes, encontramos MN em metáfases, mas isto provavelmente seja MN da divisão anterior. Mas há também cromossomos deletados nesta fase que não migram para o equador da célula, principalmente a partir de 7 Gy.

Segundo Luomahaara *et al.* (1999), as quebras nos cromossomos 1, 2 e 4 humanos não são ao acaso, pois há pontos de maior fragilidade, principalmente no meio dos braços p e q dos cromossomos.

Recentemente, tem-se demonstrado que células L 929, irradiadas com 20 Gy, não sofrem apoptose, mas formam uma alta frequência de micronúcleo (Abend *et al.* 1995, 1996 a). Nenhum fragmento típico de apoptose foi detectado por gel de eletroforese.

Surpreendentemente, fragmentos na série de 50, 700 e 1000 Kbp, que são usualmente detectados durante os primeiros estágios de apoptose, foram encontrados em MN (Abend *et al.* 1999).

Em nossos experimentos observamos uma frequência razoável de pontes, deleções e fragmentos (tabela 1, Fig. 4), além dos MN.

O tamanho dos fragmentos eram maiores quanto maior a dose, pelo menos na primeira geração de raízes que brotaram após o bulbo ser irradiado à 90°. Além do tamanho, o número de fragmentos tornam-se maiores com o aumento da dosagem irradiada.

Ager and Dewey 1990, Iliakis *et al.* (1991), mostraram que a extensão da quebra nos cromossomos é proporcional a dose de radiação.

Gantemberf *et al.* (1991) verificaram que havia um decréscimo no número de células em divisão com o aumento da dose de raio x (1 Gy/min) na faixa de dose de 5 a 10 Gy. Os autores atribuíram o fato a um mecanismo de seleções e eliminação de

linfócitos que estavam severamente danificados pelo aumento da dose.

Portanto, embora a radiação X tenha causado uma grande quantidade de anomalias, a proporção de anomalia foi muito menor nas doses mais elevada, talvez pelos mesmos motivos atribuídos

por Gantemberg *et.al.* (1991) ou as enzimas de correção do DNA sejam mais eficientes ou presentes em maior quantidade devido a diminuição do índice mitótico, assim a quantidade de polimerase I é suficiente para fazer uma correção com grande eficiência.

Frequências de Anomalias em %

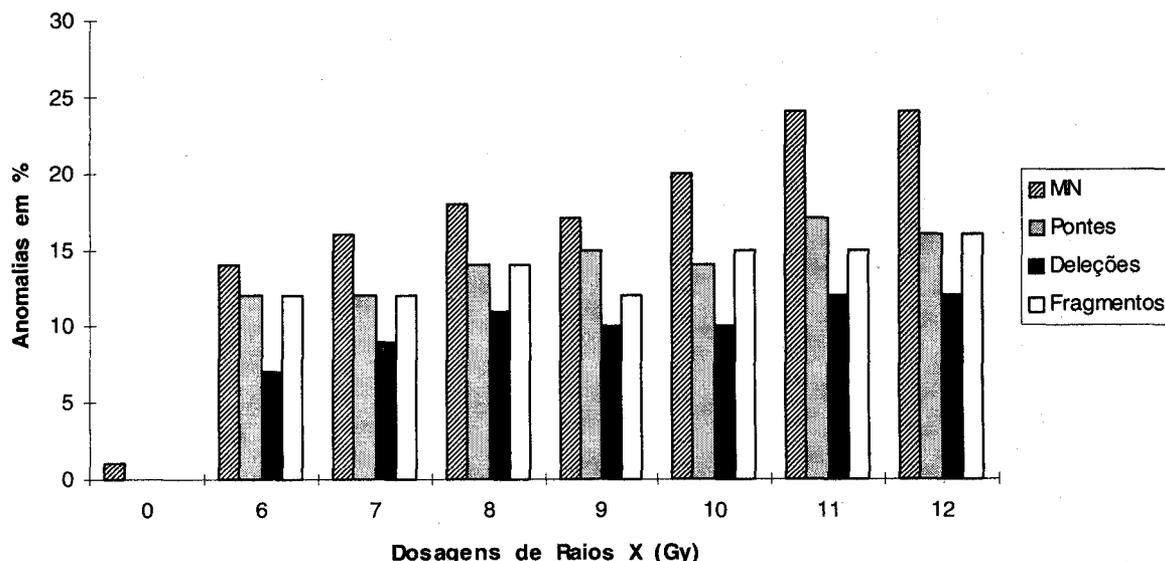


Figura 4. Frequência de anomalias em % das diferentes dosagens de irradiação X em *Allium cepa*

## CONCLUSÃO

Devido a diminuição na taxa de divisão celular em doses mais elevadas de radiação X, provavelmente restarão mais enzimas de correção e portanto a eficiência torna-se maior. Por esta razão não há tanta aberração quanto esperado.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Maria N. Pujol André do Centro de radioterapia do CAISM - UNICAMP, Elizabeth M. da Silva, Myrtha L. G. Martinez, Dirce C. Snatos do Laboratório de Citologia da PUC-Campinas, Mauricio S. Rodrigues da Silva Laboratório de Zoo/Bot/Eco da PUC-Campinas pelo suporte técnico. Agradecemos também ao CNPq e a PUC-Campinas para que pudessemos desenvolver o trabalho.

## BIBLIOGRAFIA

- ABEND, M.; Frombeck, S. and Van Beuningen, D., 1999 Indications for a active process underlying spontaneous and radiation-induced micronucleation in L929 cells. *Int. J. Radiat. Biol.* Vol.75; N° 12 - 1567-78.
- ABEND, M.; Rhein, A.; Gilbertz, K. P.; Blakely, W. F. and Van Beuningen, D., 1995 - Correlation of micronucleus and apoptosis assays with reproductive cell death. *Int. J. of Radiation Biol.*, 67, 315 - 26.
- ABEND, M.; Rhein, A.; Gilbertz, K. P. and Van Beuningen, D., 1996<sup>a</sup> - Evaluation of a modified micronucleus assay. *Int. J. of Radiation Biol.*, 69, 717 - 27.
- AGER, D. D. and Dewey, W. C., 1990 - Calibration of pulsed field gel electrophoresis for measurement of DNA double strand breaks. *Int. J. of Radiation Biol.*, 58, 242-259.
- CORINTRYMAN, P. J. & Heddle, J. A., 1976 The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat. Res.* 41: 321 - 32.

- DI MAJO, V.; Coppola, M.; Rebessi, S.; Saran, A.; Pazzaglia, S.; Pariset, L. and Covelly, V., 1996 - The influence of sex on life shortening and tumor induction in CBA / Cne mice exposed to x - rays or fission neutrons. *Radiation Research*. Virginia: **Carden Jennings Publishing**. n. 146. p. 81 - 87.
- ELLER, M. S.; Yaar, M. and Gilchrest, B. A., 1994 - DNA damage and melanogenesis. *Nature*. 372: 413 - 4.
- EVANS, H. J.; Neary, G. J. and Willianson, F. S., 1959 - The relative biological efficiency of single doses of the fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxigen. Part II. Chromosome damage: the production of micronuclei. *Int. J. Radit. Biol.* 3: 216 - 29.
- FENECH, M. & Morley, A. A. 1986 - Cytokinesis - block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo agling and low dose x-irradiation. *Mutat. Res.* . 161: 193 - 8.
- FUHRMANN, C.; Streffer, C.; Muller, W. U. and Bender, U., 1992 - Micronucleus assay prediction and optimized by cytochalasin-B, induced benucleated tumor cells. *Strahlenther onkol.* 168: 6036 - 09.
- GANTEMBERG, H. W.; Wuttke, K.; Streffer, C. and Muller, W. U., 1991 - Micronuclei in human lymphocytes irradiated in vitro or in vivo. *Radiat. Res.*. 128: 276 - 81.
- HANDO, J. C.; Nath, J. and Tricker, J. D., 1994 . Sex chromosomes, micronuclei and aging in women. *Chromosoma*. 103: 186 - 92.
- HSU, T. C.; Johnston, D. A.; Cherry, L. M.; Ramkisson, D.; Schantz, P.; Jessup, J. M.; Winn, R. J.; Shirley, L. and Furlong, C., 1989 - Sensitivity to genotoseic effects of bleomycim in humans: possible relationship to environmental carcinogenesis. *Int. J. cancer*. 43: 403 - 09.
- ILIAKIS, G., 1991 . The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation induced killing of eucaryotic cells. *Bioessays*, 13, 641 - 48.
- ISHII, K.; Hosoi, Y.; Yamada, S.; Ono, T. and Sakamoto, K., 1996 Decreased incidence of Thymic Lymphoma in AKR mice as a result of chronic, fractioneted low-dose total-body x-irradiation. *Radiation Research*. Virginia: **carden Jennings Publishing** 146. p. 582 - 585.
- JIKKO, A.; Hiranuma, H.; Iwamoto, M.; Kato, Y.; Okada, Y. and Fuchihata, H., 1996 Effects of x- irradiation on metabolism of proteoglycans. *Radiation Research*, Virginia: **carden Jennings Publishing**. n. 146. p. 93 - 99.
- KRAMER, J.; Schaich-Walch, G. & Nusse, M., 1990. DNA synthesis in radiation induced micronucleus studie by bromodeoxyridine (BrdUrd) labelling and anti BrdUrd antibodies. *Mutagenesis*. 5 (5) : 491 - 95.
- KUMB, A., 1994 . Sun protection factor p. 53. *Nature*. 372 : 730 - 1.
- LANE, D. P., 1993 - A death in the life in the of p.53. *Nature*, 362: 786 - 7
- LUOMAHAARA, S.; Lindholm, C.; Mustonen, R. and Salomaa, S., 1999. Distribution of radiation-induced exchange aberrations in human chromosomes 1, 2 and 4. *Int. J. Radiat. Biol.* Vol. 75, n° 12, 1551 - 56.
- MAISIN, J. R.; Gerber, G. B.; Vanderkom, J. and Wambersie, A., 1996 - Survival and diseases in C57Bl mice exposed to x-rays or 3-1 Mev neutrons at na age of 7 or 21 days. *Radiation Research*. Virginia: **carden Jennings Publishing**, n. 146 p. 453 - 460.
- MANTI, L.; Jamali, M.; Prise, M.; Michael, B. D. and Trott, K. R., 1997 - Genomic instability in Chinese Hamster cells after exposure to x-rays or alpha particles of different mean linear energy transfer. *Radiation Research*. Virginia: **Carden Jennings Publishing**. 147 . p. 22 - 28.
- MCFEE, A. F.; Cook, S. B. & Abbott, M. G., 1994. Negative dose-response relationship for radiation induced micronuclei in polychromatic reythrocytes of mice. *Environ. Mol. Mutat.* 23: 128 - 31.
- MILL, A. J.; Wells, J.; Hall, S. C. and Buther, A., 1996 - Micronucleus induction in human lymphocytes. Comparative effects of x-rays, alpha particles, beta particles and neutrons and implications for biological dosimetry. *Radiation Research*. Virginia: **Carden Jennings Publishing**. n. 145 p. 575 - 585.
- MIZUNO, T., 1997 - In: **A solução para o câncer através da alimentação**. Editor - Teruki Matsumoto, Editoração - Paulo's Comunicaçõe Artes Gráficas Ltda.
- MOLLS, M.; Beuningen, D. Van & Streffer, C., 1986 - The micronuclei assay in biological dosimetry. *Bga - Schriffen*, 2: 248 - 52.
- NATARAJAN, A. T., 1984 - **Origin and significance of chromosome alterations**. In: Ed. Obe, G. *Mutation in man*, Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg

- NATARAJAN, A . T.; Darroudi, F.; Mullenders, L. H. F. and Meyers, M., 1986 - The nature and repair of DNA lesions that lead to chromosome meal aberrations induced by ionizing radiationm. **Mutation Research** 160: 231 - 236.
- NURSE, M.; Kramer, J. & Miller, B. M., 1992 - Factors influencing the DNA content of radiation-induced micronuclei. Int. I. J. **Radiat. Biol.**62: 587 - 602.
- RUSSEL, L. B., 1965 - **Death and chromosome damage from irradiation of preimplantation stages.** In: Wolstenhome GEW, O'Connor, (Eds): *Preimplantation stages of Pregnancy* London: J & A Churchil Ltda. Pp. 217.
- STREFFER, C., 1993 - Is the micronucleus assay predictive for cellular radiosensitivity. **Br. J. Radiol.** 66 (Suppl. 24): 70 - 3.