

doi: <http://dx.doi.org/10.11606/issn.1679-9836.v.94i1p46-56>

Marcadores radiométricos de dano ao DNA: possíveis alvos e estado atual

Radiometric markers of DNA damage: possible targets and current status

Matheus Acquesta Gaubeur¹, Elaine Imaeda de Moura², Roger Chammas³

Gauber MA, Moura EI, Chammar R. Marcadores radiométricos de dano ao DNA: possíveis alvos e estado atual / *Radiometric markers of DNA damage: possible targets and current status*. Rev Med (São Paulo). 2015 jan.-mar.;94(1):46-56.

RESUMO: Seja por fontes endógenas ou exógenas, terapêuticas ou espontâneas, o dano ao DNA celular está presente a todo o momento, demanda uma resposta de reparo com enzimas específicas e, eventualmente, gera processos neoplásicos. No tratamento do câncer, os benefícios da radioterapia e terapia radiomimética precisam ser balanceados com os riscos de indução de outras mutações. Estima-se que o risco de um indivíduo desenvolver neoplasias secundárias chega a 5% em indivíduos submetidos à radioterapia. Nesse estudo, foi realizada uma revisão na base de dados bibliográficos Pubmed, SciELO, e Lilacs utilizando-se três descritores de assunto: *dano ao DNA*, *radiação ionizante*, e *reparo do DNA* entre 2002 e 2014 e foram selecionados 22 artigos. Resultados: com base nas cascatas de reparo ao dano ao DNA, foi analisado o comportamento cinético das proteínas de reparo estudadas *in vitro* ATM, BRCA1, p53, histona H2AX, MDC1 e 53BP1. As proteínas ATM e MDC1 foram descritas com período breve de platô em relação às demais e, no caso de ATM, há dois períodos de variação da concentração. Conclusão: com um período prolongado de platô, mostra-se promissor o estudo *in vivo* das proteínas p53, 53BP1, BRCA1 e H2AX para a dosagem indireta dos danos causados pela radioterapia.

DESCRIPTORIOS: Dano ao DNA; Radiação ionizante; Reparo do DNA

ABSTRACT: Either by endogenous or exogenous, therapeutic or spontaneous sources, the damage to cellular DNA occurs every time, requires repair with specific enzymes and eventually produces neoplastic processes. In cancer treatment, the benefits of radiotherapy and radiomimetic therapy must be compared with the risks of mutations *de novo*. It is estimated that individuals submitted to radiotherapy present 5% risk of developing secondary tumors. In the present review, 22 articles were selected from bibliographic database PubMed, SciELO, and LILACS using three subject descriptors: DNA damage, ionizing radiation and DNA repair, between 2002 and 2014. Results: based on cascades of repair of DNA damage, we analyzed the kinetic properties of repair proteins detected *in vitro* ATM, BRCA1, p53, histone H2AX, MDC1 and 53BP1. The ATM and MDC1 proteins evidenced a brief plateau, and ATM demonstrated two periods of concentration changes. Conclusion: p53, 53BP1, BRCA1 and H2AX represent a potential novel for indirect detection of damage after radiotherapy, as they showed a longstanding plateau.

KEYWORDS: DNA damage; Radiation, ionizing; DNA repair

2º lugar Prêmio Monografias no 33º COMU - Congresso Médico Universitário da FMUSP, SP, 31 de out. a 02 de nov. de 2014. Trabalho desenvolvido na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

1. Acadêmico de Medicina da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

2. Acadêmica de Medicina da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. E-mail: elaineimaeda@gmail.com.

3. Professor titular do Departamento de Radiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Endereço para correspondência: Matheus Acquesta Gaubeur. Av. Dr. Arnaldo, 455. São Paulo, SP. CEP: 01246-904. E-mail: matheus.gaubeur@gmail.com.

INTRODUÇÃO

Dano ao DNA ocorre com grande frequência no organismo humano, e por diferentes motivos. A molécula de DNA pode sofrer lesões espontâneas, devido à instabilidade de suas ligações, em um processo que ocorre normalmente no organismo. Ela também pode sofrer dano como resultado de reações metabólicas endógenas e estresse replicativo (por exemplo, devido à produção de espécies reativas de oxigênio). Ou ainda fontes exógenas como radiação UV, radiações ionizantes e compostos químicos podem ter interação com o DNA, causando lesões.

As radiações ionizantes têm uma ampla utilidade na área médica, para uso terapêutico, principalmente em doenças oncológicas e proliferativas. A radioterapia é utilizada para provocar lesão celular nas doenças malignas, e ela age de duas maneiras. Em sua forma direta, que constitui 30% do efeito biológico das radiações, a radiação é absorvida pelo tecido, e provoca lesão através da ejeção de elétrons. De forma indireta, ela interage com a água presente no local onde as células estão suspensas, causando o aparecimento de radicais livres, dentre os quais o principal é a hidroxila. A hidroxila reage com moléculas orgânicas, e forma radicais orgânicos, os quais, quando interagem com o oxigênio, formam radicais peroxidantes, que não permitem o retorno para a molécula original¹.

Doses altas de radiação provocam morte clonogênica, e doses baixas causam apoptose. Na morte clonogênica, as células não conseguem ter divisão celular, ficando estéreis. Isso ocorre pois não há reparo das quebras cromossômicas causadas pela radiação, que são transmitidas para as células filhas. Como consequência, as células filhas perdem a capacidade de realizar mitose. A apoptose, por sua vez, consiste em morte programada das células, a qual ocorre devido a mecanismos intrínsecos da célula¹. No caso do tratamento por radioterapia, os dois mecanismos de morte celular são importantes. Acredita-se que a apoptose esteja relacionada à capacidade de as células responderem de forma rápida à radiação, e a morte clonogênica é importante para que as células tumorais percam a capacidade de reprodução e de crescimento².

A exposição à radiação provoca um dano nas estruturas celulares, especialmente no conteúdo nuclear, desencadeando um mecanismo de reparo que envolve uma complexa reação intracelular em cascata. Os benefícios da radioterapia nas células neoplásicas precisam ser balanceados com os riscos de indução de outras mutações. O risco de um indivíduo desenvolver neoplasias secundárias é de 5% após radioterapia, e entre as neoplasias mais frequentes pós-irradiação tem-se leucemia, câncer de tireóide, mama, pulmão, pele e osso.

A partir da dosagem de intermediários da cascata de reparo, e potenciais biomarcadores, em linfócitos sanguíneos, seria possível obter evidências indiretas do dano ao DNA provocado pela radioterapia? Como isso permitiria detectar a toxicidade do tratamento, sua efetividade e a doses ideais para cada indivíduo? Com a tecnologia empregada até o momento na radioterapia, por mais que se estime a intensidade de radiação pré-

radioterapia, visando atingir ao máximo o tumor e irradiar pouco os tecidos vizinhos, a radiação provoca danos aos tecidos ao seu redor e não se sabe quanto efetivamente atingiu o tumor.

Com base no exposto, foi realizada uma revisão bibliográfica de bancos de dados nacionais e internacionais. Foram utilizados os bancos de dados bibliográficos Pubmed, SciELO (Scientific Electronic Library Online), e Lilacs (Literatura Latino-americana e do Caribe em Ciências da Saúde) utilizando-se três descritores de assunto: *dano ao DNA*, *radiação ionizante*, e *reparo do DNA* e os seus equivalentes no idioma inglês, procurando-se inicialmente artigos publicados entre 2002 e 2014. No início da pesquisa, todos os artigos com os descritores *dano ao DNA* e *radiação ionizante* no título ou no resumo foram utilizados, resultando em 51 artigos, e destacamos 22 artigos. Os artigos utilizados abordam o mecanismo de dano ao DNA, provocado por radiação ionizante e outros métodos que mimetizam a radiação ionizante, gerando quebra da dupla fita de DNA.

Nessa revisão serão abordados os (i) danos e mecanismos de reparo ao DNA; bem como, (ii) uma potencial forma de se estimar a dose efetiva recebida de irradiação, por medidas dos efeitos biológicos da irradiação em linfócitos sanguíneos. Assim, seria possível estimar-se o tempo, após a exposição à radiação não-ionizante, em que é possível detectar a quantidade máxima de complexos protéicos de reparo ao DNA e o tempo em que permanecem alterados até se tornarem indetectáveis. Com essas informações, espera-se que futuramente seja possível estabelecer doses individualizadas do tratamento radioterápico, tornando-o mais efetivo e menos tóxico.

Resposta ao Dano ao DNA

A radiação ionizante provoca danos significativos ao DNA, como a quebra da dupla-fita (Double-strand break - DSB) e a quebra de apenas uma fita de DNA (Single-strand break - SSB). Estima-se que as células submetidas a 1 Gray de radiação ionizante apresentem 1000 quebras simples e 40 quebras duplas³. A radiação ionizante produz principalmente DSB, gerada quando as duas fitas complementares do DNA são quebradas simultaneamente em regiões próximas o suficiente para separar as fitas justapostas. Isso permite a separação dos fragmentos de DNA formados e a recombinação em sítios inapropriados do genoma. Por sua vez, a quebra da dupla fita do DNA desencadeia uma cascata de reação que pode seguir duas principais vias, dependendo da fase do ciclo celular. A recombinação homóloga (RH) atua nas fases S e G2, em que a cópia do DNA da cromátide-irmã unida pelo centrômero cromossomal serve de molde para o reparo da cromátide-irmã danificada; e a junção de extremidades não-homólogas (JENH) ocorre na fase G1 e em fases pós-mitose⁴. Casos esses mecanismos de reparo sejam inadequados ou insuficientes para a dose recebida, pode surgir uma nova neoplasia ou ativação do mecanismo de morte celular.

Já a quebra de apenas uma fita do DNA pode ser resolvida com mais facilidade, tendo em vista que a fita

complementar serve de molde para o reparo do DNA e não há separação completa de fragmentos de DNA. Nesse caso, há remoção dos nucleotídeos alterados no

mecanismo de reparo por excisão de base e inserção dos nucleotídeos complementares à fita molde^{5,6}.

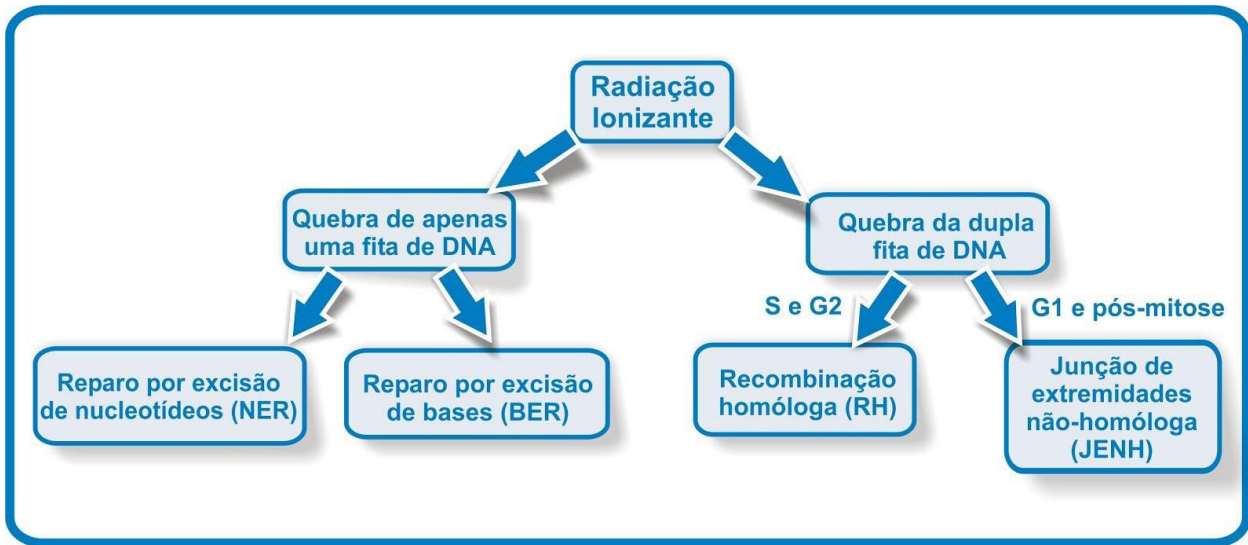


Figura 1. Resposta à radiação ionizante ocorre com o dano a uma fita ou à dupla-fita do DNA. De acordo com o dano e fase do ciclo celular, desencadeia-se um mecanismo de reparo específico por excisão de bases, recombinação homóloga ou junção de extremidades não-homólogas

Quebra de apenas uma fita de DNA

Os danos a apenas uma fita do DNA são menores e envolvem desde alterações pequenas que não influenciam na dupla-hélice até aquelas que desestabilizam mais a estrutura helicoidal.

No caso das pequenas alterações químicas na fita da DNA, o mecanismo de reparo por remoção de bases pode ser suficiente para o restauro completo no mecanismo de Excisão de Bases (BER, do inglês

Base Excision Repair). Os danos são reconhecidos por glicosilases específicas para dano ao DNA e o segmento do DNA acometido tem sua base nitrogenada removida do esqueleto de fosfato-pentose. O local sem a base nitrogenada sofre a ação da DNA polimerase beta para preencher o local a partir do pareamento de bases com a fita molde íntegra e da endonuclease que cliva o fragmento danificado anteriormente. Por fim, o complexo ligase III sela a fita de DNA restaurada^{5,6}.

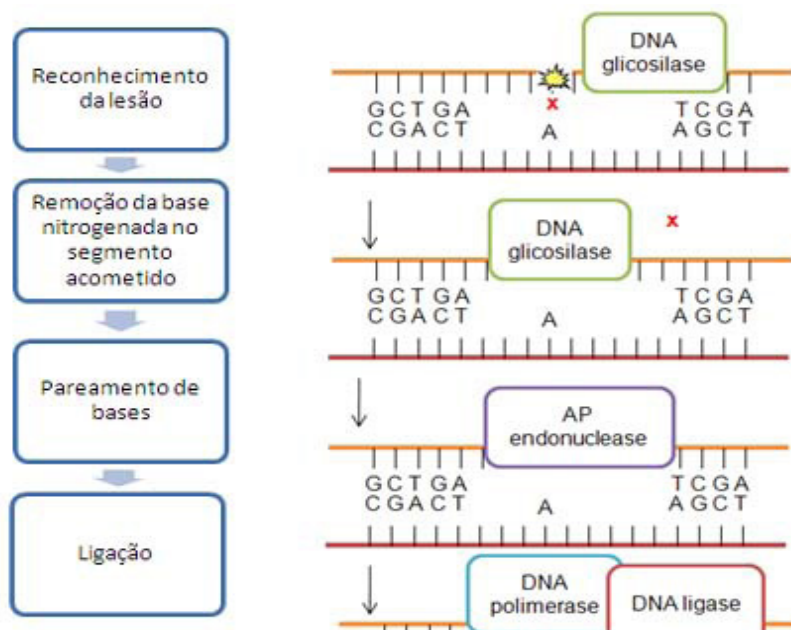


Figura 2. De acordo com o tamanho do dano a uma fita do DNA e com vias diferentes, ocorre remoção das áreas danificadas, pareamento de bases a partir da fita molde preservada e selamento do DNA restaurado. O reparo por excisão de bases restaura lesões e pequenas alterações químicas na fita de DNA. (Adaptado de Almeida e Sobol⁵)

Já a lesão mais grave a apenas uma fita de DNA, com amplas regiões de perda de nucleotídeos e que chega a desestabilizar a dupla-hélice, desencadeia um mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos (NER, do inglês nucleotide excision repair), mais elaborado. Nesse mecanismo, podem-se destacar duas subvias: (i) reparo acoplado à transcrição⁷ e, (ii) o reparo de genoma global. Ambas as formas de reparo convergem para a ação de helicases e abertura da dupla-fita na região alterada em até 30 nucleotídeos. Os nucleotídeos são removidos

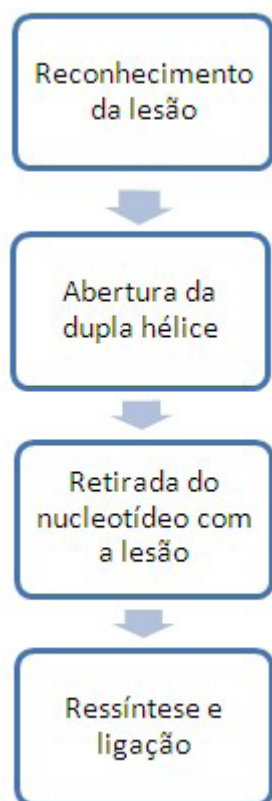


Figura 3. O reparo por excisão de nucleotídeos é o principal mecanismo para a remoção de fotoprodutos do genoma humano. Seu reconhecimento ocorre relacionado ao genoma global (GGR) e acoplado a transcrição (TCR). No TCR, a parada da RNA polimerase II durante a transcrição devido ao encontro com a lesão é o sinal de reconhecimento do dano ao DNA, e nesse estágio, os fatores específicos CSA e CSB são requeridos para o deslocamento da polimerase bloqueada, permitindo, assim, o acesso da maquinaria de reparo ao sítio da lesão. Já o GGR reconhece da lesão e o recruta as demais proteínas envolvidas no reparo é realizado pelos complexos protéicos XPC e XPE. A proteína de replicação A (RPA) estabiliza a dupla fita enquanto XPD e XPS separam as fitas complementares. XPG e XPF removem a região danificada. DNA polimerases (DNA pol) ressintetizam a fita danificada (Adaptado de Yokoi et al.⁸)

e substituídos por nucleotídeos íntegros pela ação de endonucleases e DNA polimerases δ , ϵ ou κ . Por fim, são completamente unidos por ligases I ou III⁸.

Por mais que esses tipos de dano ao DNA ocorram, a restauração é completa e dificilmente associada à indução de morte celular. Por isso, não se buscam marcadores para essas formas de reparo, uma vez que indicariam apenas os danos com reparo completo e não um dano mais intenso a ponto de atingir o objetivo de morte celular induzido por radiação ionizante ou outra forma de tratamento.

Danos causados pela radiação: quebra da dupla-fita de DNA

A quebra da dupla-fita de DNA é o principal tipo de lesão causada pela radiação ionizante e ocorre quando as fitas complementares da dupla hélice de DNA são lesionadas simultaneamente, em locais próximos. Como consequência dessa lesão, as duas fitas de DNA geradas podem se tornar fisicamente dissociadas uma da outra, fazendo com que reparos subsequentes sejam difíceis de ocorrer. Além disso, a quebra da dupla-fita de DNA permite que recombinações inapropriadas possam acontecer, originando mutações cromossômicas⁹. Essas lesões são extremamente citotóxicas, uma vez que são mais difíceis de terem reparo, devido ao fato de a célula não poder usar a fita complementar como molde, por ambas estarem danificadas¹⁰.

Por causa dos malefícios causados pela quebra da dupla fita de DNA, as células eucarióticas desenvolveram sistemas complexos para rapidamente detectar essas lesões, retardar a progressão do ciclo celular, sinalizar e efetuar o reparo. O retardo da progressão do ciclo celular pode demorar até 10 horas e se baseia na fosforilação de fosfatases CD25A e CD25B (do inglês, *cell division cycle 25*), enquanto o reparo das lesões leva cerca de 4 horas¹¹.

Há duas vias principais para o reparo da dupla-fita de DNA: recombinação homóloga (RH) e recombinação por junção de extremidades não homólogas (JENH)¹², sendo a ocorrência desses modos de reparo determinada pela fase do ciclo celular. A recombinação homóloga (RH) atua nas fases S e G2, e a recombinação por junção de extremidades não homólogas (JENH), na fase G1 e em fases pós-mitose⁴.

Quebra da dupla-fita de DNA: Reparo por Recombinação Homóloga (RH)

A recombinação homóloga ocorre nas fases S e G2 do ciclo celular, pois nessas fases as células têm um molde homólogo. A recombinação homóloga é iniciada através da ligação do complexo de proteínas MRE11-RAD51- NBS1 (MRN) aos locais de quebra da dupla-

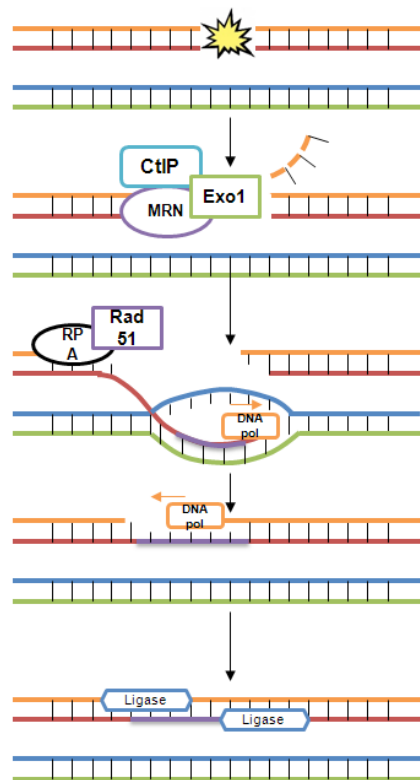
fitas, o qual funciona para manter as partes que sofreram lesão agrupadas e próximas uma da outra¹³. Essa situação fornece base estruturada para a nucleasa CtIP (do inglês, *carboxy-terminal binding protein (CtBP) - interacting protein*), constituindo o complexo MRN-CtIP. Esse complexo catalisa a ressecção dos finais das lesões, juntamente com a exonuclease I (EXO1)^{14,15}.

Em seguida, a Proteína de Replicação A (RPA) se liga à nova região de fita única criada, estabiliza a extremidade 3', e sequencialmente é trocada por um filamento da recombinase RAD51^{10,16}. A RAD51 une as extremidades 3' das fitas únicas de DNA, em um

processo do qual participam várias proteínas, incluindo RPA, Rad52p e Rad54p⁹. A RAD51 interage com uma molécula de DNA que não sofreu dano, e, quando localiza uma região homóloga, a RAD51 catalisa a troca de fitas. Assim, a molécula que sofreu dano invade a outra fita de DNA, em um D-loop¹⁷.

O término 3' da molécula de DNA lesionada é estendido por uma DNA polimerase, que copia informação da fita sem dano, e os finais das fitas são ligados por uma DNA ligase I. Depois de finalizado o processo, os crossovers de DNA são dissociados através de quebra¹⁸.

Recombinação homóloga



Adaptado de Takeda S et al, 2007

Figura 4. Reparo por Recombinação Homóloga: o complexo MRN se liga à dupla-fita de DNA lesionada, formando o complexo MRN-CtIP, que catalisa a ressecção dos finais das lesões associado a exonuclease 1 (exo 1). A proteína de replicação A (RPA) estabiliza a fita simples, enquanto a RAD 51 une as extremidades 3' das fitas, catalisa a troca de fitas. Uma das fitas simples aproxima-se da fita complementar da cromátide-irmã e, com auxílio da DNA polimerase, é sintetizada a região danificada. Com base nessa fita recém-sintetizada, é feita a dita complementar. Por fim, DNA ligases unem as extremidades (Adaptado de Takeda et al.¹⁴)

Quebra da dupla-fita de DNA: Reparo por Junção de Extremidades Não-Homóloga (JENH)

Nessa forma de reparo, a lesão ao DNA é detectada pela proteína Ku70 que se liga às extremidades rompidas da molécula de DNA, formando um anel permitindo a

ligação de outras enzimas catalíticas. A seguir, a enzima quinase catalítica dependente de DNA (DNA-PKcs, do inglês *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*) se une e permite a ligação de proteínas quinases ao sítio DNA-PKcs¹⁹, que ativa por fosforilação proteínas do complexo MRE11- RAD50- NBS1(MRN), com a função

de exonuclease, endonuclease e helicase¹³. A função de exonuclease permite a remoção de nucleotídeo de áreas terminais do DNA, enquanto a de endonuclease permite a remoção de áreas dentro do DNA. Para acessar essa região, a função de helicase do complexo MRN permite a separação da dupla fita ao redor da área de reparo.

DNA polimerases produzem áreas de DNA com alta probabilidade de erros, uma vez que não há cromátide-irmã ou fita complementar para servir de modelo. Por fim, a ligase 4 agrega-se a região e une completamente os nucleotídeos²⁰.

Reparo por junção de extremidades não-homologas

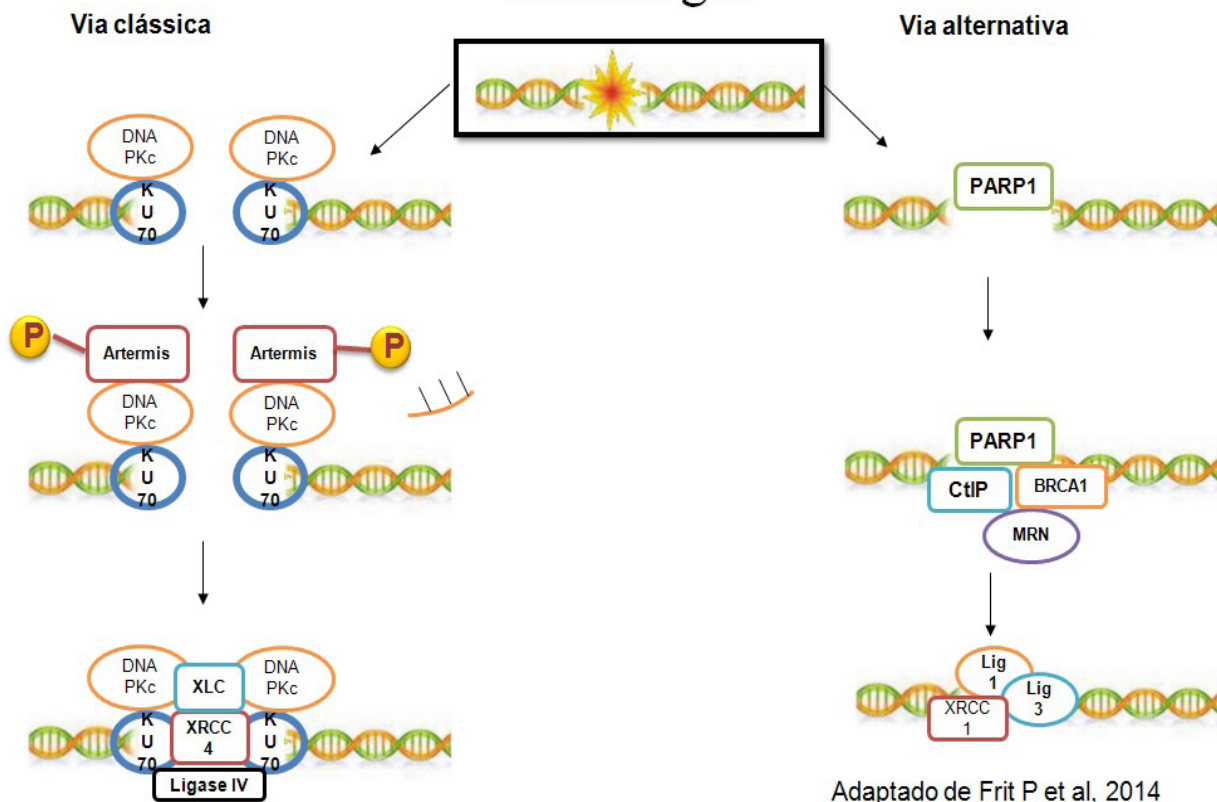


Figura 5. Nas fases G1 e pós-mitose, os cromossomos encontram-se com apenas uma cromátide. Nesses casos, o dano à dupla-fita do DNA é reconhecido pela proteína Ku70. A área danificada é removida com auxílio do fator Artemis, DNA-PKc, XRCC4 e XLC na via clássica ou com PARP1, CtIP, MRN e BRCA1 na via alternativa (Adaptado de Hammarsten et al.¹⁹)

Efetores de reparo do dano ao DNA e sua cinética

O reparo ao dano de DNA ocorre de uma forma coordenada de complexos eventos. A falha desses mecanismos gera instabilidades genômicas e cromossômicas. Dentre as instabilidades genômicas, a instabilidade de microssatélites gera pequenas alterações repetidas de DNA, enquanto que as instabilidades cromossômicas podem causar alterações mais graves de ploidia.

Mutações nos genes *BRCA 1* e *BRCA 2*, relacionados ao reparo de duplas quebras do DNA por recombinação homóloga, causam câncer de ovário e

de mama^{21,22}. Modulações de expressão do gene *TP53* com *up-regulation* e *down-regulation* da proteína p53 participam da carcinogênese de diversos tipos de tumor²³ e mutações no gene *TP53* geram a síndrome de Li Fraumeni que predispõe a múltiplas neoplasias no mesmo indivíduo²⁴. O MDC1, por ativar o checkpoint da fase intraS e G2/M, tem a sua deficiência relacionada com o aumento da suscetibilidade para a carcinogênese. Mutação no gene que codifica a proteína NBS1 causa a Síndrome de Quebra de Nijmegen, caracterizada por microcefalia ao nascer associada a imunodeficiência primária celular e humoral, retardo no crescimento e predisposição a malignidades^{25,26}.

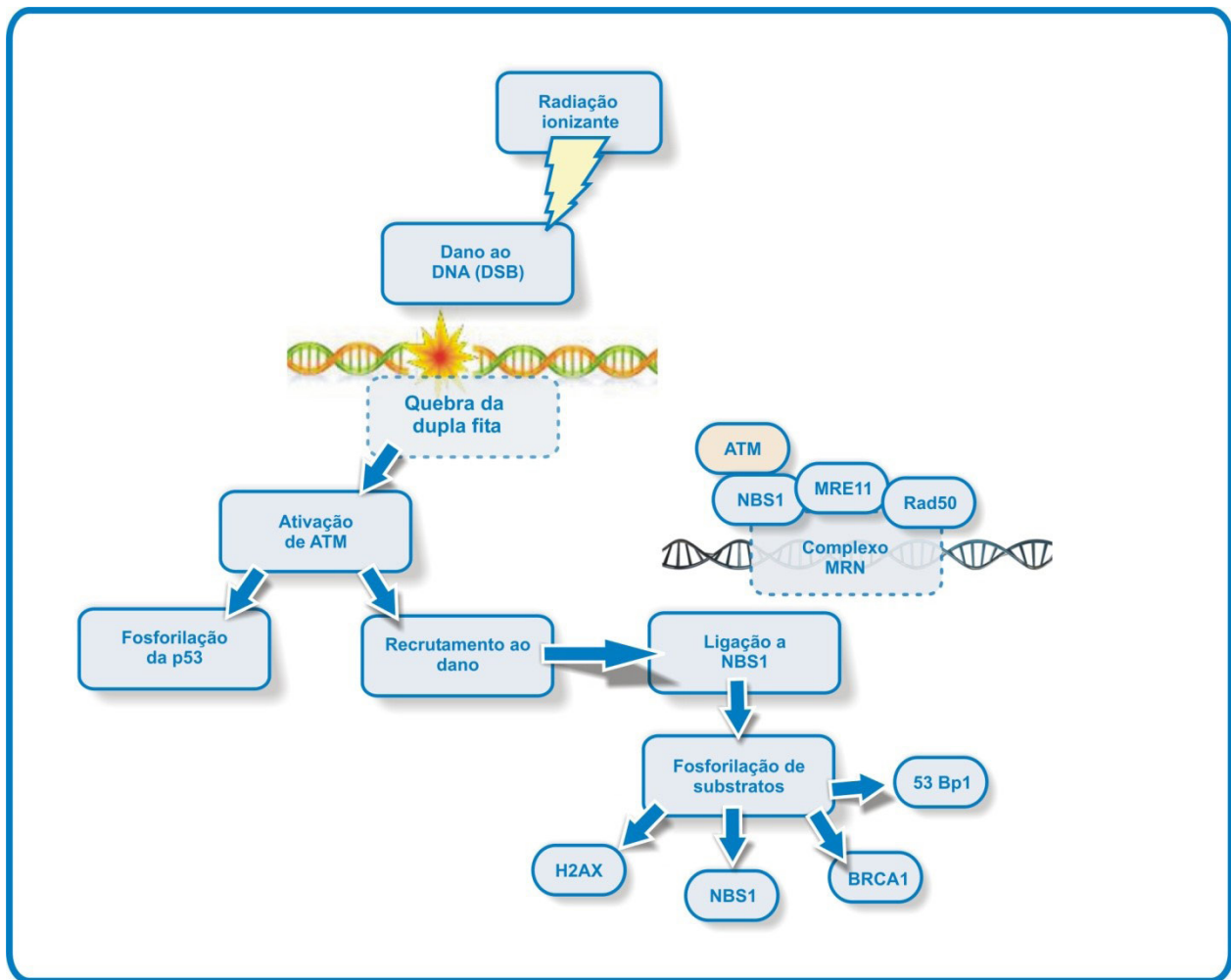


Figura 6. Cascata de reparo do dano ao DNA, em consequência de radiação ionizante. A quebra da dupla fita (DSB) leva à ativação de ATM, que se relaciona ao aumento dos níveis de p53. A ATM é recrutada ao local da lesão pelo complexo MRN (NBS1 - MRE11 - RAD50) e, depois de ativada fosforila a histona H2AX, BRCA1, 53BP1 e NBS1, que se irão participar do acesso à região lesionada, sinalização e reparo do DNA

Após a quebra da dupla fita de DNA, provocada pela radiação ionizante, ocorre ativação de ATM, que pertence à família das proteínas quinases relacionadas à fosfatidilinositol 3 -quinase²⁷ e é uma proteína fundamental para a via de reparo. O ATM é recrutado pelo complexo MRN ao local da lesão²⁸. A deficiência da proteína ATM caracteriza a ataxia-telangiectasia, a qual é uma imunodeficiência primária associada a telangiectasias oculocutâneas e ataxia cerebelar progressiva, e em que há aumento da predisposição à câncer e da sensibilidade à radiação ionizante^{29,30}. Após a lesão, em indivíduos sem essas mutações na proteína, a ATM é ativada dentro de minutos, e possui expressão máxima após 120 minutos³¹.

Como resposta à ativação da ATM, há aumento dos níveis de p53. A proteína efetora p53 é fosforilada pelo ATM no sítio 15 de serina (¹⁵Ser), tornando-se ativa. Essa fosforilação se correlaciona tanto com o acúmulo de proteína p53, quanto com a eficácia de a proteína p53

recrutar e ativar outros genes da cascata³¹. Ocorre também fosforilação da serina 20 da p53 (²⁰Ser), realizada pela quinase CHK2, a qual tem sua ativação controlada por ATM. A fosforilação da p53 atinge pico de intensidade máxima entre 3-6 horas após a exposição a radiação e permanece com níveis pouco aumentados em até 6 dias *in vitro*³².

O complexo MRN, o BRCA1, e 53 BP1 são recrutados para o sítio de lesão do DNA (DSB) independentemente de ATM. Assim, as vias dependentes e independentes de ATM ocorrem de forma concomitante após o dano, e a ATM se junta à quebra da dupla fita (DSB), ao se ligar à NBS1, que faz parte do complexo MRN. A ATM ativada que se liga à NBS1 fosforila diversos substratos, como a histona H2AX, BRCA1, 53BP1 e NBS1, que se relacionam ao acesso a região danificada, sinalização e reparo efetivamente do DNA³³.

A fosforilação da histona H2AX ocorre no

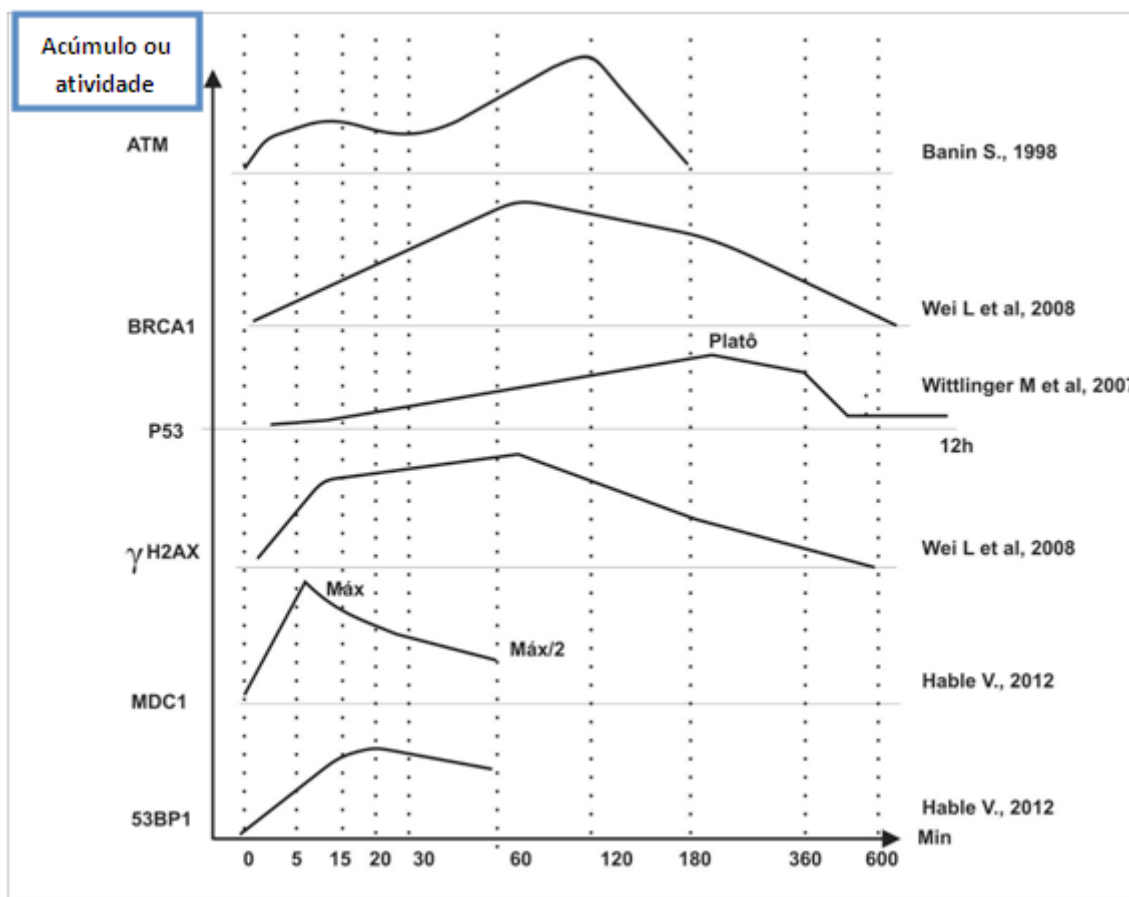
resíduo 139 de serina (¹³⁹Ser). Logo após a fosforilação da histona H2AX, ocorre ligação da proteína MDC1 e recrutamento de outras proteínas de reparo como ubiquitinas³⁴. A fosforilação da histona H2AX, de acordo com a teoria “Access, Repair, and Restore”³⁵, induz modificações estruturais ao DNA e permite o acesso do mecanismo de reparo ao DNA e mostrou-se essencial no acúmulo das proteínas de reparo para a retenção e amplificação do sinal³⁶. Após o reparo ser concluído, fosfatases desfosforilam a histona H2AX fazendo a cromatina restaurar sua conformação inicial³⁷. No estudo *in vitro*, células derivadas de tumor humano foram submetidas a radiação a laser e atingiram uma elevação de H2AX próximo do pico máximo já em 10 minutos e permaneceram aumentados de forma menos intensa até 60 minutos. Depois, houve redução da quantidade acumulada de H2AX fosforilada em 300 minutos e voltou a níveis próximos dos basais em 600 minutos³⁸.

A proteína efetora BRCA1 pode ser detectada

a partir de 5 minutos após a radiação em estudo com imunofluorescência e atinge intensidade máxima em 60 min, permanecendo detectável após 600 min, diferentemente da histona gama-H2AX que não é mais detectada nessa fase³⁸, por isso a associação da proteína BRCA1 com a cromatina é considerado um evento de intermediário a tardio no reparo do DNA. A BRCA1 participa do reparo de DNA por recombinação homóloga e junção de extremidades não homóloga³⁹ e ela forma um complexo proteico nuclear, o qual se acredita ser importante na sinalização posterior para outras proteínas da via de reparo⁴⁰.

A proteína 53BP1 é detectada em alguns minutos após a radiação e possui intensidade máxima em 20 minutos⁴¹. A 53BP1 age no reparo ao DNA através de junção final não-homóloga, participando também do *switching* de classes de imunoglobulina, e interagindo com RIF1 e PTIP⁴².

Gráfico 1: Síntese de cinética a partir de dados da literatura. Expressão relativa de proteínas da via de reparo, de acordo com o tempo. Os dados foram obtidos de estudos realizados *in vitro*, em que se determinou a cinética das proteínas após exposição ao dano ao DNA



Para potencializar o efeito citotóxico no tecido neoplásico e limitar a lesão no tecido normal adjacente, a radioterapia aplica fundamentos da radiobiologia. A dose da radioterapia é aplicada de forma fracionada e determinada de acordo com o tecido tumoral e a tolerância do tecido normal adjacente. Esse fracionamento da dose permite o reparo do tecido normal de resposta lenta e a repopulação de células do tecido normal de resposta rápida, associado à ocorrência de lesões nas células tumorais. O esquema radioterápico mais utilizado consiste em doses de 1,8 a 2,0 Gy por fração, diariamente, 5 dias por semana em 5 semanas. Há variações com hiper ou hipofracionamento de dose de acordo com a resposta tumoral e potencial de reparo a lesão radioinduzida⁴³.

O planejamento para radioterapia, por sua vez, é elaborado com exames de imagem em três dimensões e tem como alvo a concentração máxima da radiação no interior do tumor e a menor concentração possível nos tecidos adjacentes. Por isso, empregam-se múltiplas fontes emissoras de radiação de pontos distintos.

A resposta de efetividade do tratamento é observada pela redução local do tamanho do tumor ou não-progressão do crescimento, por meio de marcadores tumorais disponíveis na clínica médica de acordo com o tumor e por exames de imagem. Já os efeitos colaterais, com o acometimento de tecidos adjacentes e acúmulo de mutações potencialmente neoplásicas, não são de fácil observação por imagem. Para tanto, é proposto o uso dos biomarcadores descritos nesse artigo em células de fácil aquisição, como leucócitos periféricos. Considerando os tempos necessários para alterar os marcadores, pico máximo, platô e tempo de depuração, pode-se explorar a quantidade de radiação que atingiu sítios fora do tumor e remanejar, dessa forma, o tipo de radioterapia, a dose ou estratégia empregada.

CONCLUSÃO

Biomarcadores consistem em substâncias detectáveis ou achados radiológicos a partir dos quais torna-se possível diagnosticar ou acompanhar a evolução clínica de uma doença e seu tratamento. Muitos biomarcadores já são largamente empregados no acompanhamento e diagnóstico de diversos tipos de tumores sólidos, mas ainda existem poucos biomarcadores específicos para radioterapia e terapias que envolvem a quebra da dupla-fita de DNA.

Com base nos efeitos celulares provocados pela radioterapia detectados em estudos *in vitro*, verificou-se a expressão aumentada ou a ativação de proteínas relacionadas ao reparo do dano ao DNA. A partir disso, é possível inferir que essas proteínas são hiperexpressas ou ativas tanto nas células tumorais que sofreram a lesão

quanto nas células sanguíneas circulantes próximo ao tumor irradiado, configurando potenciais biomarcadores que já se conhece a cinética de reparo do dano ao DNA.

Associado a isso, a radioterapia revela um desafio no controle aos tumores sólidos, uma vez que a irradiação de um foco eventualmente não atinge a intensidade ideal no alvo ou ainda leva ao acúmulo de mutações nas áreas próximas ao alvo. Ainda, a dose estimada para atingir o tumor, tendo como base as imagens no planejamento da radiação, pode eventualmente não ter o efeito completo no alvo. Por isso, a medida dos biomarcadores após a radioterapia forneceria uma estimativa mais precisa dos efeitos do tratamento.

Uma forma de viabilizar a medição dos biomarcadores seria a análise de leucócitos do sangue periférico, por ser uma amostra pouco invasiva para o paciente. A análise dessas células nucleadas fornece as informações dos efeitos sistêmicos de uma terapia direcionada para um foco no caso da radioterapia, ou da terapia sistêmica com quimioterápicos radiomiméticos, como a bleomicina. As substâncias radiomiméticas são capazes de se interpor no DNA e induzir danos na dupla-fita de DNA. A ação sistêmica dos radiomiméticos tem ação mais ampla em leucócitos se comparado a radioterapia, o que deve ser considerado na análise final. Da mesma forma, que essa medida revela o efeito desejado de agressão ao tumor, também se evidencia os efeitos deletérios da terapia nas demais células do organismo.

Considerando a cinética dos estudos *in vitro*, verificam-se biomarcadores mais viáveis para uma estimativa fidedigna do efeito do tratamento. De maneira geral, a maioria dos marcadores oferece uma medida confiável por não sofrer muitas oscilações na quantidade acumulada de proteína. A única exceção observada *in vitro* foi a proteína ATM com decréscimo seguido pelo aumento dos níveis protéico em nível celular. Já as outras proteínas analisadas, BRCA1, p53, histona H2AX, MDC1 e 53BP1, apresentam uma elevação seguida de decréscimo com cinéticas passíveis de modelagem matemática. Ainda, um período prolongado de platô da substância permite um intervalo de tempo maior para coleta e análise, sendo vantajoso o uso de p53, 53BP1, BRC1 e H2AX.

É importante ressaltar que os estudos *in vitro* foram produzidos com linhagem celulares sob o efeito da quebra da dupla-fita de DNA e representam o efeito do tratamento sob condições extremamente controladas. Dessa forma, é fundamental a comprovação dos eventos biológicos *in vivo* e em seres humanos quanto a cinética e a influência de fatores de confusão. Os biomarcadores representam um futuro promissor na dosagem indireta dos efeitos biológicos da radioterapia e na detecção dos efeitos desejados e colaterais no controle do câncer.

REFERÊNCIAS

1. Segreto HRC, Segreto RA. Radiobiologia: Fundamentos para a radioterapia. In: Hoff PMG, Chammas R, Katz A, Filho VO, Novis YS, editors. Tratado de oncologia. Rio de Janeiro: Atheneu; 2012.
2. Segreto RA. Radioterapia. In: Lopes AC, editor. Diagnóstico e tratamento: oncologia. São Paulo: Manole; 2006. v.1
3. Von Sonntag C. DNA lesion induced by ionizing radiation. In: Obe G, Vijayalaxmi, editors. Chromosomal alterations - methods, results and importance in human health. Berlin: Springer; 2007.
4. Wyman C, Kanaar R. DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu Rev Genet.* 2006;40:363-83. doi: 10.1146/annurev.genet.40.110405.090451.
5. Almeida KH, Sobol RW. A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. *DNA Repair.* 2007;6:695-711. doi: 10.1016/j.dnarep.2007.01.009
6. Hegde ML, Hazra TK, Mitra S. Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Res.* 2008;18:27-47. doi: 10.1038/cr.2008.8.
7. Bohr VA, Okumoto DS, Hanawalt PC. Survival of UV-irradiated mammalian cells correlates with efficient DNA repair in an essential gene. *Proc Natl Acad Sci.* 1986;83:3830-3. Available from: <http://www.pnas.org/content/83/11/3830.long>.
8. Yokoi M, Masutani C, Maekawa T, Sugawara K, Ohkuma Y, Hanaoka F. The xeroderma pigmentosum group C protein complex XPC-HR23B plays an important role in the recruitment of transcription factor IIH to damaged DNA. *J Biol Chem.* 2000;275:9870-5. doi: 10.1074/jbc.275.13.9870.
9. Jackson SP. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis.* 2002;23(5):687-96. doi: 10.1093/carcin/23.5.687.
10. Giglia-Mari G, Zotter A, Vermeulen W. DNA Damage response. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;3(1):a000745. doi: 10.1101/cshperspect.a000745.
11. Hall EJ. Radiobiology for the radiologist. 6th ed. Philadelphia: JB Lippincott; 2006.
12. Van Gent DC, Hoeijmakers JHJ, Kanaar R. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nature Rev Genet.* 2001;2:196-206. doi: 10.1038/35056049.
13. De Jager M, van Noort J, van Gent DC, Dekker C, Kanaar R, Wyman C. Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Mol Cell.* 2001;8:1129-35. doi: 10.1016/S1097-2765(01)00381-1.
14. Takeda S, Nakamura K, Taniguchi Y, Paull TT. Ctp1/CtIP and the MRN complex collaborate in the initial steps of homologous recombination. *Mol Cell.* 2007;28:351-2. doi: 10.1016/j.molcel.2007.10.016.
15. Limbo O, Chahwan C, Yamada Y, de Bruin RA, Wittenberg C, Russell P. Ctp1 is a cell-cycle-regulated protein that functions with Mre11 complex to control double-strand break repair by homologous recombination. *Mol Cell.* 2007;28(1):134-46. doi: 10.1016/j.molcel.2007.09.009.
16. de Laat WL, Appeldoorn E, Sugawara K, Weterings E, Jaspers NG, Hoeijmakers JH. DNA-binding polarity of human replication protein A positions nucleases in nucleotide excision repair. *Genes Dev.* 1998;12:2598-609. doi: 10.1101/gad.12.16.2598.
17. Petukhova G, Stratton S, Sung P. Catalysis of homologous DNA pairing by yeast Rad51 and Rad54 proteins. *Nature.* 1998;393:91-9. doi: 10.1038/30037.
18. Haber JE. Partners and pathways-repairing a double-strand break. *Trends Genet.* 2000;16:259-64. doi: 10.1016/S0168-9525(00)02022-9.
19. Hammarsten O, DeFazio LG, Chu G. Activation of DNA-dependent protein kinase by single-stranded DNA ends. *J Biol. Chem.* 2000;275:1541-50. doi: 10.1074/jbc.275.3.1541.
20. Nick McElhinny SA, Snowden CM, McCarville J, Ramsden DA. Ku recruits the XRCC4-ligase IV complex to DNA ends. *Mol Cell Biol.* 2000;20:2996-3003. doi: 10.1128/MCB.20.9.2996-3003.2000.
21. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science.* 1994;266(5182):66-71. Available from: http://www.jstor.org/stable/2884716?seq=1#page_scan_tab_contents.
22. Foulkes WD, Shuen AY. In brief: BRCA1 and BRCA2. *J Pathol.* 2013;230(4):347-9. doi: 10.1002/path.4205.
23. Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(1):a00100. doi: 10.1101/cshperspect.a001008.
24. Li FP, Fraumeni JF, Jr., Mulvihill JJ, Blattner WA, Dreyfus MG, Tucker MA, Miller RW. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res.* 1988;48:5358-62. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/48/18/5358.long>.
25. Weemaes CM, Hustinx TW, Scheres JM, van Munster PJ, Bakkeren JA, Taalman RD. A new chromosomal instability disorder: the Nijmegen breakage syndrome. *Acta Paediatr Scand.* 1981;70:557-64. doi: 10.1111/j.1651-2227.1981.tb05740.x.
26. Chrzanowska KH, Gregorek H, Dembowska-Baginska B, Kalina MA, Digweed M. Nijmegen breakage syndrome (NBS). *Orphanet J Rare Dis.* 2012;7:13. doi: 10.1186/1750-1172-7-13.
27. Shiloh, Y. ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev.* 2001;11(1):71-7. doi: 10.1016/S0959-437X(00)00159-3.
28. Lee JH, Paull TT. ATM activation by DNA double-strand

- breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science*. 2005;308:551-4. doi: 10.1126/science.1108297.
29. Sedgwick RP, Boder E. Ataxia-telangiectasia. In: Vinken P, Bruyn G, Klawans H, editors. *Handbook of clinical neurology*, v.60. New York: Elsevier; 1991. p.347-423.
 30. Gatti RA, Becker-Catania S, Chun HH, Sun X, Mitui M, Lai CH, et al. The pathogenesis of ataxia-telangiectasia. Learning from a Rosetta stone. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2001;20:87-108. doi: 10.1385/CRIAI:20:1:87
 31. Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, Smorodinsky NI, Prives C, Reiss Y, Shiloh Y, Ziv Y. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*. 1998;281(5383):1674-7. doi: 10.1126/science.281.5383.1674.
 32. Wittlinger M, Grabenbauer GG, Sprung CN, Sauer R, Distel LV. Time and dose-dependent activation of p53 serine 15 phosphorylation among cell lines with different radiation sensitivity. *Int J Radiat Biol*. 2007;83(4):245-57. doi: 10.1080/095553000701275432.
 33. Kastan MB. DNA damage responses: mechanisms and roles in human disease. *Mol Cancer Res*. 2007;6:517-24. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-08-0020.
 34. Mailand N, Bekker-Jensen S, Fastrup H, Melander F, Bartek J, Lukas C, Lukas J. RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell*. 2007;131:887-900. doi:10.1016/j.cell.2007.09.040.
 35. Smerdon MJ. DNA repair and the role of chromatin structure. *Curr Opin Cell Biol*. 1991;3:422-8. doi: 10.1016/0955-0674(91)90069-B.
 36. Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Sedelnikova OA, et al. Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science*. 2002;296:922-7. doi: 10.1126/science.1069398.
 37. Chowdhury D, Keogh MC, Ishii H, Peterson CL, Buratowski S, Lieberman J. γ -H2AX dephosphorylation by protein phosphatase facilitates DNA double-strand break repair. *Mol Cell*. 2005;20:801-9. doi: 10.1016/j.molcel.2005.10.003.
 38. Wei L, Lan L, Hong Z, Yasui A, Ishioka C, Chiba N. Rapid recruitment of BRCA1 to DNA double-strand breaks is dependent on its association with Ku80. *Mol Cell Biol*. 2008;28(24):7380-93. doi: 10.1128/MCB.01075-08.
 39. Rothfuss A, Grompe M. Repair kinetics of genomic interstrand DNA cross-links: evidence for DNA double-strand break-dependent activation of the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Mol Cell Biol*. 2004;24(1):123-34. doi: 10.1128/MCB.24.1.123-134.2004.
 40. Zhang J, Powell SN. The Role of the BRCA1 Tumor suppressor in DNA double-strand break repair. *Mol Cancer Res*. 2005;3:531-9. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-05-0192.
 41. Hable V, Drexler GA, Brüning T, Burgdorf C, Greubel C, Derer A, et al. Recruitment kinetics of DNA repair proteins Mdc1 and Rad52 but Not 53BP1 depend on damage complexity. *PLoS One*. 2012;7(7):e41943. doi: 10.1371/journal.pone.0041943
 42. Fradet-Turcotte A, Canny MD, Díaz CE, Orthwein A, Leung CCY, Huang H, et al. 53BP1 is a reader of the DNA-damage-induced H2A Lys 15 ubiquitin mark. *Nature*. 2013;499:50-4. doi: 10.1038/nature12318.
 43. Withers HR, Mc Bride WH. Biologic basis of radiation therapy. In: Perez CA, Brady LW, editors. *Principles and practice of radiation oncology*. 4th ed. Philadelphia: PB Lippincott; 2004. p.96-136.