

MEMÓRIAS  
DA  
ACADEMIA DAS CIÊNCIAS  
DE  
LISBOA

CLASSE DE CIÊNCIAS

TOMO XLVI

---

**Efeitos genéticos das radiações  
ionizantes**

JOSÉ RUEFF

---



ACADEMIA DAS CIÊNCIAS  
DE LISBOA

LISBOA • 2019

# Efeitos genéticos das radiações ionizantes

José Rueff

Os efeitos biológicos das radiações ionizantes são, genericamente, classificados em determinísticos e probabilísticos. Os primeiros referem-se nomeadamente à morte celular e estão directamente relacionados com a dose recebida. Estão entre estes, para doses correntes, também o eritema dérmico e as queimaduras, que frequentemente são observados em doentes tratados com radioterapia.

Já os efeitos não directamente relacionados com a dose de radiação e de aparição tipicamente tardia após a irradiação, são efeitos probabilísticos, estando entre estes as lesões de ADN conduzindo a mutações e a indução de cancro. Ou seja, num como no outro caso, efeitos sobre o genoma; ressaltando-se, porém, que a cancerigénese não é sempre resultado de agentes que lesam o genoma, embora de entre os agentes classificados pela 'International Agency for Research on Cancer' da OMS, como pertencendo aos grupos 1, 2A ou 2B; isto é, cancerígenos para o homem (grupo 1), ou provavelmente cancerígenos para o homem (grupo 2A), ou possivelmente cancerígenos para homem (grupo 2B), cerca de 88% são lesivos do genoma. (1)

Os efeitos directos das radiações são mais rigorosamente definíveis como não-estocásticos e os segundos como efeitos estocásticos. Importante é que estes segundos não são dependentes de dose e não apresentam limiar de acção de dose. De acordo com o "Committee on the Biological Effects of Ionizing Radiation" do National Research Council of the USA, ou simplesmente BEIR Committee's, o risco de cancro decorre de modo linear a baixas doses de radiação e sem limiar de dose; ou seja, qualquer dose de radiação, mesmo que baixa, tem o potencial de conduzir a um aumento de risco de cancro (2, 3): é o que muitas vezes referimos como 'excesso de incidência' que é definível como proporcional ao efeito conjugado da taxa base de mutações pela taxa das que são induzidas pela exposição.

Frequentemente também referidos como efeitos irreversíveis, as lesões genéticas revestem-se de importância não apenas por poderem ocorrer em células germinativas e originarem efeitos hereditários potencialmente deletérios, mas igualmente por estarem na base do fenómeno de iniciação de neoplasias.

Tal não significa, porém, que as lesões genéticas no cancro sejam o único fenómeno que condiciona o comportamento clínico de um tumor, sua evolução e seu prognóstico. Embora se admita que são mutações os principais factores de proliferação celular no cancro – as "driver mutations" – outras mutações que coexistem no tumor como as passivas "passenger mutations" podem eventualmente reverter no seu papel a "driver mutations" e presidirem a resistência tumoral ao tratamento, por exemplo. Mas a estas haverá que juntar fenómenos como o micro-ambiente tumoral e o modo como condiciona a evolução do tumor. Certo é, porém, que o inicial carácter monoclonal do tumor, progride com geração de oligoclonalidade e, portanto, micro-heterogeneidade tumoral, com genótipos diversos entre si e relativamente ao clone inicial; o que se pode revestir de papel crucial na resistência terapêutica tumoral; aspectos estes que já mais exaustivamente analisámos anteriormente (ver 4).

As fontes de exposição humana a radiações são diversas, incluindo fontes terrestres como a inalação de radão, fonte de radiação de alta LET ('linear energy transfer') que representa cerca de 52% da contribuição da irradiação, para além dos cerca de 4% dos neutrões (alta LET) de origem cósmica e ainda cerca de 20% de radiação de baixa LET de origem terrestre, entre outras. De entre as fontes de origem deliberada humana, só a exposição diagnóstica a raios X representa cerca 79% da exposição de origem deliberada humana, face a cerca de 5% do ciclo de utilização de energia nuclear (5). No seu todo, estima-se que a dose efectiva acumulada para uma duração de vida de 80 anos possa situar-se entre 80 mSv e 800 mSv.

Apartamos aqui as altas doses e a altas taxas como as que ocorreram em Hiroshima e Nagasaki, ou mesmo nos acidentes nucleares.

### EFEITOS NÃO-ESTOCÁSTICOS

Os efeitos não-estocásticos ocorrem em curto intervalo de tempo após a irradiação, que pode ser de horas ou menos. Compreendem, como já acima mencionado, eritema cutâneo e mais severamente depressão medular. Como fontes correntes de uso médico de efeitos não-estocásticos de radiações, encontram-se os exames radiológicos de diagnóstico, designadamente a radiografia convencional e a tomografia axial computadorizada (TAC ou CT). É importante referir que o uso diagnóstico crescente da TAC se traduz num aumento de dose acumulada significativa. Enquanto os métodos tradicionais de radiologia diagnóstica podem representar uma dose efectiva de cerca de 0.01–10 mSv, uma TAC para a mesma região anatómica pode representar cerca de 2–20 mSv, o que corresponderá a uma dose absorvida de aproximadamente 20mGy. Um exemplo paradigmático é o de comparar uma radiografia simples convencional do tórax com uma TAC torácica, representando esta uma dose para o doente cerca de 100 vezes superior ao exame convencional. Estas diferenças, embora tidas em conta as maiores potencialidades diagnósticas da TAC, levam, porém, a comunidade médica a seguir o princípio ALARA (*As Low As Reasonably Achievable*), procurando reduzir o número de exames com maior dose por doente, sempre que possível.

Os efeitos seguem uma relação linear em função da dose e sempre com limiar de efeitos, o que, desde já, distingue os efeitos não-estocásticos dos estocásticos. Ou seja, os efeitos não-estocásticos não têm lugar abaixo de um limiar de dose.

### EFEITOS ESTOCÁSTICOS

Os efeitos estocásticos, como as lesões de ADN e subsequentes efeitos genéticos e os cancros daí potencialmente resultantes, podem ser o resultado de ionização directa de átomos de ADN ou de radiólise da água intra-celular com produção designadamente de radicais OH, iões H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> e moléculas como o peróxido de hidrogénio H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, reactivas face ao ADN.

A radiação ionizante afecta directamente a estrutura do ADN, cindindo ligações covalentes dos polinucleótidos e induzindo quebras de ADN, particularmente as quebras de cadeia dupla (DSB). Os efeitos das espécies resultantes da radiólise da água (espécies reativas de oxigénio ou ROS) compreendem proteínas e lípidios, além de induzirem lesões no ADN, como a geração de sítios abásicos e quebras de cadeia simples (SSB).

Na compreensão dos efeitos estocásticos, como cancro (tumores sólidos e leucemias), os dados dos sobreviventes das bombas em Hiroshima e Nagasaki desempenharam um papel fundamental na quantificação dos riscos da exposição à radiação externa. Todavia, como os sobreviventes dos bombardeamentos foram expostos a altas taxas de dose, a inferência de risco de radiação em doses baixas e a baixas taxas de dose ainda é uma questão a merecer toda a atenção.

Todavia, as informações obtidas podem ser usadas para prever o risco de efeitos irreversíveis em populações humanas que forem expostas a baixos níveis de radiação ionizante, designadamente por terem desencadeado um melhor conhecimento de que a relação dos efeitos (E) em função da dose (D) se pode calcular por uma equação linear-quadrática, que estabelece a relação entre a dose recebida e os efeitos biológicos observados. A curva é linear ou não-linear e representa uma dose limite ou uma dose não inicial, segundo a equação:

$$E = aD + \beta D^2$$

em que em que D é a dose em Gy,  $a$  é o efeito por Gy do componente inicial linear da função e  $\beta$  o efeito por Gy<sup>2</sup> da porção quadrática.

A BEIR Committee's recomenda o uso da porção linear e sem limiar da curva para a maioria dos cancros como efeito de irradiação, o que implica que o efeito biológico é directamente proporcional à dose (com possível excepção de algumas leucemias radio-induzidas) (2, 3).

A utilização do componente linear da curva pode exacerbar os efeitos para baixas doses de radiação de baixa LET, mas reflecte com precisão os efeitos de radiação de alta LET (neutrões e partículas  $\alpha$ ) e a doses mais elevadas. Este procedimento de utilizar a formalização dos efeitos a partir da zona linear é comumente adoptado por agências e comissões de segurança nuclear, na base de um princípio cautelar. De facto, o risco de excesso de incidência de cancro pode revelar-se com doses efectivas não superiores a 50-100mSv.

Para baixas doses, prevalecem os efeitos estocásticos, isto é, a probabilidade de ocorrência de efeitos biológicos adversos (v.g. cancro) aumenta na razão directa da dose. Todavia, a severidade dos efeitos não é correlacionável com a dose: doses baixas podem representar risco de efeitos biológicos severos, como cancro, ou apenas ocorrência de lesões genéticas somáticas em células de sobrevida limitada.

A ocorrência de eficaz reparação de ADN durante exposição a baixas doses de radiação e com baixa taxa de dose, reduz o componente quadrático da equação ( $\beta D^2$ ), o que constitui um mecanismo explicativo para que o comportamento dos efeitos em função da dose seja razoavelmente descritível como linear. De facto, está demonstrado que mesmo polimorfismos em genes codificantes para sistemas de reparação de ADN podem constituir risco adicional para neoplasias, tenha ou não sido a radiação ionizante o mecanismo causal 'princeps', como já o verificámos em vários estudos por nós levados a cabo (6, 7, 8, 9, 10, 11).

O ADN está no cerne dos alvos celulares susceptíveis de lesão por radiação ionizante e as quebras de cadeia dupla (DSB) induzidas pela radiação ionizante são porventura a mais eficaz lesão conduzindo a cancro. As DSB induzidas por radiação se não reparadas ou reparadas com erros (o que pode ocorrer com a "non homologous end-joining", NHEJ) constituem uma lesão de risco.

A formação de DSB por acção da radiação é seguida, como mecanismo sinalizador de resposta celular, pela fosforilação da histona H2AX no resíduo amino-acídico Ser 139. A histona H2AX é uma variante da família de histonas H2A que constituem o nucleossoma compactando o ADN. Estas histonas são fosforiláveis por cinases como a ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), ou a ATR (*ATM and Rad3-related*), ou a proteína-cinase ADN-dependente (DNA-PK)

Esta histona quando fosforilada, histona  $\gamma$ -H2AX, constituirá um primeiro sinal de recrutamento e localização de sistemas de reparação de ADN. A percentagem de  $\gamma$ -H2AX formada por DSB é sempre aproximadamente constante: como exemplo, para uma dose de raios X de 1Gy, haverá cerca 1-2% de H2AX que é fosforilada em  $\gamma$ -H2AX. É claro, que quebras de ADN, conduzindo à identificação de  $\gamma$ -H2AX, não são exclusivas de lesão radio-induzida. Por exemplo, fármacos anti-tumorais inibidores das topoisomerases podem levar a quebras e logo a focos de  $\gamma$ -H2AX, como os inibidores da topoisomerase I (camptotecina e topotecan) e da topoisomerase II (etoposido, doxorubicina, mitoxantrona). A existência de  $\gamma$ -H2AX em células em interfase pode ser posta em evidência por imunofluorescência ou citometria de fluxo. A Figura 1 mostra células em interfase com detecção  $\gamma$ -H2AX por imunofluorescência.

O estudo das lesões genéticas radio-induzidas tem assentado, porém, primordialmente na análise de anomalias cromossómicos estruturais (cromossomas dicêntricos, anéis, tetra-radiais), analisados em células em metáfase.

Interessante é notar, que a frequência de anomalias cromossómicas estruturais (v.g. dicêntricos) não se reconduz numericamente à percentagem de quebras de ADN, como já antes demonstrámos (12); isto é, podem ocorrer quebras de ADN que não resultam em anomalias cromossómicas estruturais, p. ex. por ter havido eficaz reparação de ADN, ou porque as mesmas ocorreram dispersamente nos dois polinucleótidos não gerando DSB que se venham a traduzir em clastogenia observável citogeneticamente.

A paragem da citocinese gerando células binucleadas, nas quais se podem identificar micronúcleos (Figura 2), contendo fragmentos cromossómicos formados por quebras não reparadas eficazmente e que não segregam

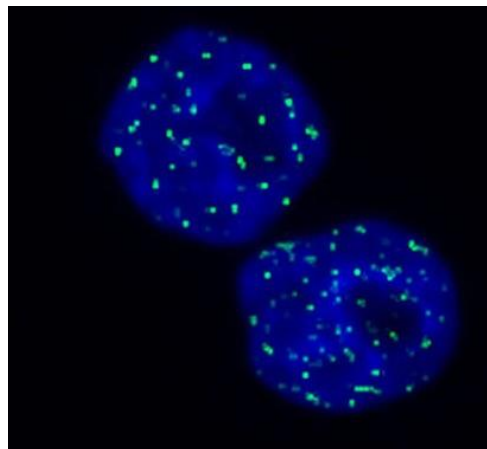


Figura 1  
Células em interfase marcadas por imunofluorescência para a detecção de  $\gamma$ -H2AX fosforilada que indica a presença de quebras de DNA.

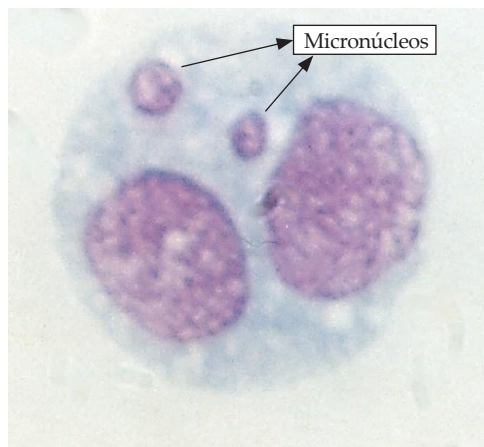


Figura 2  
Célula binucleada bloqueada em citocinese com dois micronúcleos

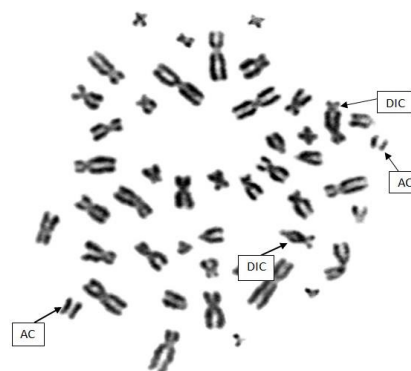


Figura 3  
Metáfase de célula após irradiação com 2Gy, apresentando cromossomas dicêntricos (DIC) e fragmentos acêntricos (AC).

adequadamente em anáfase, constitui igualmente um método fiável e muito menos demorado na análise do que a contagem de frequências de cromossomas dicêntricos (Figura 3).

### BIOMONITORIZAÇÃO DE EFEITOS DE EXPOSIÇÃO A RADIAÇÕES

As lesões genéticas decorrentes da exposição ocupacional ou acidental à radiação ionizante são frequentemente avaliadas pela monitorização das anomalias cromossómicas estruturais (v.g. os cromossomas dicêntricos como indicador padrão fidedigno) nos linfócitos do sangue periférico, e esses procedimentos têm, em vários casos, auxiliado os médicos na avaliação de pessoas irradiadas. Os linfócitos circulantes, que estão no estado  $G_0$  do ciclo celular, são estimulados com um agente mitogénico, geralmente fito-hemaglutinina, para replicar o ADN *in vitro* e entrar em divisão celular, sendo então observados, após paragem em metáfase usualmente com colchicina, para a detecção de anomalias estruturais. A comparação com as relações dose-resposta obtidas *in vitro* permite uma estimativa da exposição baseada na determinação das constantes de efeito  $\alpha$  e  $\beta$  da equação linear-quadrática (ver acima) para cada tipo de efeito a avaliar e, assim, a estimativa da dose absorvida corporal.

Para a biomonitorização de efeitos de exposição a radiações são sobremaneira relevantes os efeitos genéticos. Estes podem compreender as anomalias estruturais instáveis pela análise convencional e bem estabelecida de metáfases para anomalias cromossómicas instáveis ou para micronúcleos; ou as chamadas anomalias estáveis (como translocações *minor*) pela técnica clássica de bandas G (Giemsa) ou pelo método de hibridização *in situ* de fluorescência (FISH), utilizando sondas marcadas com fluorocromos para centrómeros e regiões cromossómicas. A estes poderíamos juntar a determinação da  $\gamma$ -H2AX. O Quadro 1 sumariza os atributos de cada um destes biomarcadores, designadamente os requisitos dos métodos a utilizar para cada um, a sensibilidade de detecção em função da dose absorvida (em Gy) e a janela temporal de duração dos efeitos após irradiação. Tomados no seu todo e tidos em conta, designadamente, os métodos requeridos por menos complexos e a razoável janela temporal,

<b>Biomarcadores – utilidade e limites</b>			
<b>Biomarcador</b>	<b>Método</b>	<b>Sensibilidade</b>	<b>Janela temporal</b>
<b><math>\gamma</math>-H2AX</b>	Imunofluorescência	<b>0.01– 8 Gy</b>	<b>Minutos a dias após irradiação</b>
<b>Dicêntricos</b>	Cromossomas dicêntricos	<b>0.1– 5 Gy</b>	<b>Tempo de sobrevida dos linfócitos</b>
<b>Translocações</b>	FISH de uma cor Bandas G	<b>0.25 – 4 Gy</b>	<b>Anos</b>
<b>Micronúcleos</b>	Ensaio de micronúcleo em células bloqueadas em citocinese	<b>0.2 – 4 Gy</b>	<b>Tempo de sobrevida dos linfócitos</b>

Quadro 1

Principais tipos de biomarcadores utilizáveis na avaliação de exposição a radiação ionizante e respectiva sensibilidade e janela temporal de detecção dos efeitos após irradiação.



parece ser unânime considerar que a detecção de dicêntricos ou os micronúcleos se encontram entre os mais comumente aceites.

Três factores precisam ser considerados na aplicação de tais métodos de dosimetria biológica, para além da facilidade da sua exequibilidade, da sensibilidade e a duração do efeitos (janela temporal):

- (1) As doses de radiação corporais são frequentemente inhomogéneas. Uma comparação da distribuição das anomalias cromossómicas observadas entre as células com as esperadas de uma distribuição de Poisson normal pode permitir concluir falta de homogeneidade da exposição por meio do chamado método de distribuição de Poisson contaminado; cuja aplicação requer um número suficientemente grande de anomalias, isto é, uma exposição a uma dose suficientemente grande a uma taxa de dose elevada.
- (2) A exposição pode ocorrer a uma taxa de dose baixa (por exemplo, de fontes radioactivas dispersas no ambiente), tornando a comparação com exposição *in vitro* menos fidedigna. Como acima referido, a reparação do ADN durante a exposição reduz o componente quadrático para taxas de dose baixas à medida que a exposição é distribuída por um longo período de tempo. Nenhuma solução válida para este problema foi ainda desenvolvida, embora, em teoria, tanto as lesões determinísticas, quanto as anomalias que possam ser reparadas podem consentir a utilização de uma relação de dose linear, o que também pode ser útil quando as doses forem suficientemente grandes.
- (3) O terceiro importante ponto é o da dosimetria biológica ter lugar apenas um certo tempo após a exposição. O desaparecimento relativamente rápido de linfócitos portadores de anomalias instáveis (ver Quadro 1), cuja vida-média será de cerca de 3 anos, limita o seu uso em dosimetria retrospectiva, anos após a exposição. A consideração das anomalias estáveis (translocações *minor* não interferindo com a divisão celular linfocitária), que se acredita persistirem nos linfócitos circulantes, pode parecer mais apropriada em tais situações. No entanto, o exame de um número representativo de células por bandeamento G é extremamente trabalhoso, e o método FISH não é apenas caro, mas ainda não foi totalmente validado em diferentes laboratórios.

Em conclusão, a dosimetria biológica tem sérias limitações exatamente para situações em que a necessidade de informação é mais urgente. Os mais úteis resultados foram obtidos quando um indivíduo foi exposto a uma radiação de dose elevada bastante homogénea em um curto intervalo de tempo, ou seja, acidentes em dispositivos de radiação de alta intensidade. Por outro lado, a dosimetria biológica produziu informação menos satisfatória, mesmo quando as técnicas mais recentes foram utilizadas, para situações em que uma exposição de baixa taxa de dose ocorreu em algum momento no passado, por exemplo, para pessoas que vivem em áreas contaminadas após o acidente de Chernobyl. Tais limitações devem ser tidas em mente, a fim de evitar investigações fúteis e dispendiosas no caso de populações expostas à radioatividade e também, nomeadamente, a agentes químicos potencialmente clastogénicos. Estas considerações já as expendemos anteriormente de forma mais exaustiva (ver 13 e 14).

Como exemplo de uma análise de efeitos genéticos após irradiação em doentes com carcinoma da tiroideia tratados com  $^{131}\text{I}$  que receberam 2590 MBq (70 mCi) e em que foi utilizada a quantificação de

anomalias cromossômicas e de micronúcleos, pode ser analisado um nosso estudo que ilustra cinéticas de aparição de efeitos genéticos (15).

Um outro método que aplicámos à dosimetria biológica por efeitos genéticos, é a determinação da assincronia de replicação dos dois alelos de cada gene em células somáticas. De facto, os nossos dados demonstraram que células irradiadas exibem assincronia de replicação durante a fase S, o que pode ser identificado pela existência em metáfase, após FISH com sondas específicas para alguns genes, que os dois alelos dos genes estudados revelavam assincronia de replicação. Tal foi evidente, designadamente para os genes supressores de tumores TP53 e RB1. Interessante e revelador de efeito não aleatório, foi o resultado de células irradiadas *in vitro*, em que a produção de cromossomas dicêntricos acompanhou, de forma dose-dependente, a percentagem de células em cada fase de replicação (dois alelos replicados DD, apenas um replicado SD, ou nenhum replicado SS), como pode observar-se na Figura 4.

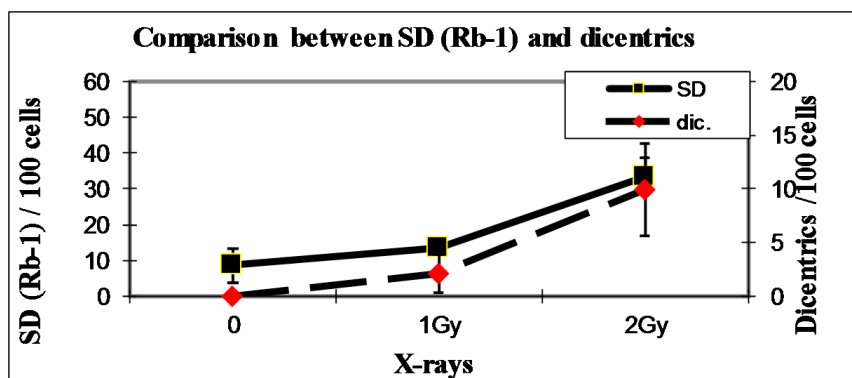


Figura 4

Este método foi ainda por nós utilizado num estudo de dosimetria biológica em indivíduos residentes em áreas com contaminação radioactiva eventual e exposição a resíduos genotóxicos. (16)

### AGRADECIMENTOS

Cumpre-me agradecer aos meus Colegas que contribuíram tanto com o seu saber e labor para este trabalho, designadamente: António Sebastião Rodrigues, Aldina Brás, Octávia Monteiro Gil e Nuno Guerreiro Oliveira, a que muitos outros se juntaram e vêm identificados nas citações referidas. Um agradecimento especial, porém, devido aos Professores Alain Léonard e Georg Gerber, que tanto nos ensinaram.

(Comunicação apresentada à Classe de Ciências na sessão de 20 de outubro de 2016)



## REFERÊNCIAS

1. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC. World Health Organization, 2018 (<https://monographs.iarc.fr/agents-classified-by-the-iarc/>)
2. BEIR VII, Phase 1: "Health Risks from Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation, Phase 1", 1998
3. BEIR VII, Phase 2: "Health Risks from Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation, Phase 2". 2006
4. Rueff J, Rodrigues AS. "Cancer Drug Resistance: A Brief Overview from a Genetic Viewpoint". *Methods Mol Biol.* 1395:1-18. 2016
5. Ionizing Radiation Exposure of the Population of the United States, National Council on Radiation Protection and Measurements, No.93, 1987
6. Santos LS, Silva SN, Gil OM, Ferreira TC, Limbert E, Rueff J. "Mismatch repair single nucleotide polymorphisms and thyroid cancer susceptibility". *Oncol Lett.*;15(5):6715-6726. 2018
7. Azevedo AP, Silva SN, De Lima JP, Reichert A, Lima F, Júnior E, Rueff J. "DNA repair genes polymorphisms and genetic susceptibility to Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms in a Portuguese population: The role of base excision repair genes polymorphisms". *Oncol Lett.*; 13(6):4641-4650. 2017
8. Santos LS, Branco SC, Silva SN, Azevedo AP, Gil OM, Manita I, Ferreira TC, Limbert E, Rueff J, Gaspar JF. "Polymorphisms in base excision repair genes and thyroid cancer risk". *Oncol Rep.*;28(5):1859-1868. 2012
9. Silva SN, Tomar M, Paulo C, Gomes BC, Azevedo AP, Teixeira V, Pina JE, Rueff J, Gaspar JF. "Breast cancer risk and common single nucleotide polymorphisms in homologous recombination DNA repair pathway genes XRCC2, XRCC3, NBS1 and RAD51". *Cancer Epidemiol.*;34(1):85-92. 2010
10. Bastos HN, Antão MR, Silva SN, Azevedo AP, Manita I, Teixeira V, Pina JE, Gil OM, Ferreira TC, Limbert E, Rueff J, Gaspar JF. "Association of polymorphisms in genes of the homologous recombination DNA repair pathway and thyroid cancer risk". *Thyroid.*;19(10): 1067-1075. 2009
11. Rueff J, Gaspar J, Kranendonk M. "DNA polymorphisms as modulators of genotoxicity and cancer". *Biol Chem.*;383(6):923-32. Review. 2002
12. Rueff J, Brás A, Cristóvão L, Mexia J, Sá da Costa M, Pires V. "DNA strand breaks and chromosomal aberrations induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and <sup>60</sup>Co gamma-radiation". *Mutat Res.*;289(2):197-204. 1993
13. Léonard A, Rueff J, Gerber GB, Léonard ED. "Usefulness and limits of biological dosimetry based on cytogenetic methods". *Radiat Prot Dosimetry.*;115(1-4):448-454. Review. 2005
14. Rodrigues AS, Oliveira NG, Gil OM, Léonard A, Rueff J. "Use of cytogenetic indicators in radiobiology". *Radiat Prot Dosimetry.*;115(1-4):455-460. Review. 2005
15. Monteiro Gil O, Oliveira NG, Rodrigues AS, Laires A, Ferreira TC, Limbert E, Léonard A, Gerber G, Rueff J. "Cytogenetic alterations and oxidative stress in thyroid cancer patients after iodine-131 therapy". *Mutagenesis.*;15(1): 69-75. 2000
16. Brás A, Cotrim CZ, Vasconcelos I, Mexia J, Léonard A, Sanzhar I, Akhmatullina N, Rueff J. "Asynchronous DNA replication detected by fluorescence in situ hybridisation as a possible indicator of genetic damage in human lymphocytes". *Oncol Rep.*;19(2):369-375, 2008