

Radiosensibilidad molecular y respuesta tisular al tratamiento con radiación ionizante

Molecular radiosensitivity and tissular response to ionizing radiation treatment

NÚÑEZ, M. I.¹; GUERRERO, R.¹; VALENZUELA, M. T.¹; LÓPEZ, E.²; DEL MORAL, R.²; VILLALOBOS, M.¹ y RUIZ DE ALMODÓVAR, J. M.¹

¹ Laboratorio de Investigaciones Médicas y Biología Tumoral. Facultad de Medicina. Hospital Clínico Universitario. Universidad de Granada. Avda de Madrid s/n. 18071. Granada.

² Servicio de Radioterapia. Hospital Virgen de las Nieves. Granada

RESUMEN

El éxito de la radioterapia en el control de las enfermedades tumorales malignas que afectan al ser humano depende de manera crítica de la dosis total de radiación que se administra, pero lo que realmente limita el nivel de dosis es la tolerancia de los tejidos normales que rodean al tumor y que, por ello, forman parte del volumen tisular sometido a tratamiento. Estudios *in vitro* realizados con fibroblastos obtenidos de pacientes afectos de cáncer han demostrado la utilidad de estas células, y de los ensayos de formación de colonias, en el desarrollo de un test de medida de radiosensibilidad que podría ser aplicado para la predicción de la respuesta de los pacientes. Sin embargo, este tipo de ensayo está aun lejos de ser utilizado en la práctica clínica. Para resolver las dificultades experimentales que se han presentado en el intento de predicción de la radiorespuesta se han aplicado otros procedimientos analíticos. Entre ellos destacan diversas aproximaciones al conocimiento del nivel de daño inducido por la radiación sobre la molécula del DNA. El trabajo experimental desarrollado en los últimos años ha proporcionado datos cuantitativos sobre el número de rupturas dobles de cadena de DNA (dsb) producidas por unidad de dosis y unidad de DNA y se ha considerado este parámetro como una medida de la sensibilidad de las células respecto a la radiación ionizante. En este trabajo se revisan los conocimientos actuales y se incluyen datos preliminares sobre la aplicación del modelo molecular al estudio de radiosensibilidad en dos tipos celulares (células epidérmicas de la piel y linfocitos) procedentes de pacientes oncológicos. Nuestros resultados demuestran que el número de dsb que la radiación induce sobre las células varía significativamente cuando se comparan los resultados obtenidos en diferentes pacientes (1-5 dsb/Gy/unidad de DNA). También hemos podido observar la existencia de una relación, estadísticamente muy significativa, entre el nivel de daño molecular medido simultáneamente en linfocitos y en células epidérmicas procedentes del mismo paciente (p 0.005). Estos datos sugieren que el número inicial de dsb podría ser utilizado como índice de tolerancia de los tejidos sanos a la radiación.

Palabras clave: radiosensibilidad, rupturas dobles de cadena de DNA, fibroblastos, linfocitos, electroforesis de campo pulsado (PFGE).

ABSTRACT

The success of radiotherapy in eradicating tumours depends on the total radiation dose, but what limits this dose is the tolerance of the normal tissues within the treatment volume. *In vitro* studies involving fibroblast survival from cancer patients have demonstrated the theoretical feasibility of a predictive assay (the clonogenic assay) of radiation sensitivity. But such an assay is still far from clinical application. Alternative measures of radiosensitivity have been developed as predictive tests of radioresponse in order to avoid experimental errors. Among them, the initial "apparent" number of DNA double-strand breaks (dsb) induced by radiation has been quantified using Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE). This parameter has been considered as an alternative measure of cell radiosensitivity. In this work we show both, preliminary data and a review of the current knowledge about the molecular model application to the radiosensitivity study using two different normal cell types from the same cancer patient, epidermal skin cells and lymphocytes. A significant interindividual variation in the measured dsb (1-5 dsb/Gy/DNA unit) was demonstrated. A linear correlation was found between molecular damage in lymphocytes and skin samples from the same patient (p 0.005) simultaneously measured. These results suggest that the initial number of dsb could be used as an indicator of the normal tissue *in vivo* tolerance to radiation.

Key words: radiosensitivity, double strand breaks, fibroblasts, lymphocytes, pulsed-field-gel-electrophoresis (PFGE).

Recibido: 15-01-97.

Aceptado: 21-01-97.

BIBLID [0004-2927(1997) 38:2-3; 165-175]

Se acepta de manera generalizada que existen amplias diferencias en los valores que caracterizan la radiosensibilidad intrínseca de células procedentes tanto de tumores humanos como de tejidos peritumorales sanos. Esta disparidad parece estar relacionada con la probabilidad de control tumoral y, quizás, con la tolerancia tisular al tratamiento (1, 2). El éxito de la radioterapia depende de la dosis de radiación total, que a su vez está limitada por el daño que la radiación produce en los tejidos normales circundantes. En este sentido está claro que pacientes sometidos a idénticos esquemas de tratamiento expresan, en mayor o menor grado, las lesiones producidas por la radiación en sus tejidos normales. En efecto, la respuesta tisular a la radioterapia varía entre niveles de daño inapreciable, o mínimo, y reacciones que, por su severidad, obligan a la interrupción del tratamiento. Aunque parte de la desigualdad en la respuesta podría ser explicada en función del azar, en la actualidad hay datos sugerentes de que las variaciones del efecto de la radiación sobre los tejidos normales pueden atribuirse bien a factores relacionados con el tratamiento (esquema de fraccionamiento, volumen del campo de tratamiento, calidad de la radiación, errores dosimétricos, etc.), bien a características inherentes al paciente (radiosensibilidad celular intrínseca, edad del

paciente, anomalías o características genéticas o epigenéticas, etc.) (3). El valor de dosis máxima que se utiliza en protocolos terapéuticos convencionales basados en el empleo de la radiación está determinado, en primer lugar, por el requerimiento de mantener la morbilidad terapéutica en niveles éticamente aceptables. De hecho las respuestas severas observadas en pacientes supuestamente sensibles a la radiación constituyen el criterio "mayor" limitante de dosis. Por otra parte la existencia de diferencias en radiosensibilidad condicionadas intrínseca o genéticamente (4-7), da origen a la siguiente hipótesis de trabajo:

El estudio de la radiosensibilidad celular "in vitro" puede permitir la identificación, entre los pacientes irradiados, de aquellos sobre los que gravita el mayor riesgo de padecer complicaciones radioinducidas de carácter grave como efecto secundario del tratamiento antitumoral. De esta forma podría ofrecerse, a los pacientes oncológicos, una opción terapéutica individualizada que haga posible la reducción de los índices de morbilidad y el aumento, si ello es posible, de la probabilidad de control tumoral.

A nivel experimental se ha demostrado la existencia de una relación estadísticamente significativa entre datos de laboratorio y parámetros clínicos. Así, la radiosensibilidad celular de fibroblastos, obtenidos mediante el estudio de muestras tisulares de piel cultivadas en el laboratorio, correlaciona con la severidad de las reacciones clínicas, evaluadas a través de la valoración de las lesiones que se observan clínicamente en la piel de esos mismos pacientes tras haber sido sometidos a irradiación con fines terapéuticos. Esta asociación entre estudios *in vitro* e *in vivo* ha sido frecuentemente encontrada y parece consistente cuando se comparan las lesiones radioinducidas que se manifiestan en forma tardía (2, 3, 8). Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados hasta la fecha indican una falta de correlación entre radiosensibilidad de los fibroblastos y respuesta tisular aguda frente a la radiación (9-11).

Aun cuando los datos de supervivencia celular derivados del ensayo clonogénico podrían utilizarse en el intento de predecir la radiosensibilidad tisular, su aplicación rutinaria presenta inconvenientes de difícil superación (no es fácil conseguir *in vitro* el crecimiento de los fibroblastos, existen numerosos problemas de contaminación, el tiempo necesario para, una vez tomada la muestra de tejido, conseguir resultados se sitúa en torno a los 3-4 meses, el ensayo de formación de colonias no es suficientemente exacto, etc). Por ello se han desarrollado medidas alternativas de radiosensibilidad que, entre otras variables, permiten cuantificar el daño producido por radiación sobre la molécula del DNA. Existen numerosos métodos para valorar la magnitud de las lesiones moleculares radioinducidas, entre ellos se encuentra la Electroforesis en Gel con técnica de Campo Pulsante (PFGE) que, adecuadamente utilizada, permite determinar el número inicial de rupturas dobles de cadena de DNA

(dsb) producido por radiación así como evaluar el proceso de reagrupamiento de las mismas.

Trabajos previos en este campo de investigación han puesto de manifiesto la existencia de diferencias en la cantidad del daño radioinducido (Daño Inicial, DI) que puede ser observado inmediatamente después del tratamiento de las células, cuando éstas son mantenidas durante todo el experimento a 0 °C, es decir, en condiciones en las que se impide la reparación. Radford (12) ha demostrado que el nivel de DI se relaciona con la radiosensibilidad en distintos modelos celulares y en diversas condiciones experimentales entre las que se incluyen, por ejemplo, las modificaciones de la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular (13, 14) y la presencia o ausencia de radiosensibilizadores o radioprotectores (15-17). Schwartz y col. (18) y Kelland y col. han demostrado que la medida del DI, utilizando la técnica de elución neutra en filtro, podía marcar la diferencia entre una célula sensible y otra resistente a la radiación. Si bien estas observaciones han sido confirmadas por otros autores (4, 7, 19, 20), la relación propuesta no es de carácter general puesto que en otros experimentos y circunstancias, no se ha demostrado que exista correlación entre parámetros moleculares de DI y datos de radiosensibilidad celular (21, 22).

Aun cuando durante el *estadio físico* de la acción de la radiación (depósito de energía tras la interacción de los fotones con las estructuras moleculares de la célula) no deberían existir diferencias entre distintos tipos celulares, en el *estadio químico* (etapa que sigue al estadio anterior) se producen una serie de reacciones radioquímicas que pueden aumentar o disminuir los efectos biológicos de la radiación. Así, la presencia de oxígeno modifica enormemente la cantidad de daño radionducido y esto se refleja en la incidencia de muerte celular (23). Efectos similares se observan tras las alteraciones de la concentración de compuestos con grupos tioles, siendo la eficacia de los mismos mayor cuando las células se irradian en condiciones hipóxicas. La influencia de la concentración de grupos SH se reduce en condiciones óxicas ya que la cinética de fijación del daño por oxígeno es más favorable que la de reparación química llevada a cabo por los tioles (24). Basándose en datos químicos parece poco probable que variaciones inter-celulares de la concentración de sustancias con capacidad radioprotectora sean suficientes como para conseguir un cambio significativo en la supervivencia de células óxicas (24). Sin embargo hay trabajos en los que se demuestra que la manipulación exógena de grupos tioles modifica la sensibilidad de células bien oxigenadas (16). Por ello no se debe descartar la posibilidad de que alteraciones de los niveles endógenos de "Scavengers" modulen la sensibilidad de células frente a la radiación. En este sentido se podría sugerir que las diferencias observadas en la cantidad de daño inicial podrían ser debidas a variaciones en la concentración intracelular de sustancias con capacidad radioprotectora. No

obstante, aun cuando los niveles intracelulares de glutathion varían de unas a otras células, no se ha encontrado ninguna relación entre la concentración de glutathion y la radiosensibilidad celular (25).

Por ello, aunque no está claro que los tioles puedan competir con el oxígeno para originar diferencias relevantes en los niveles de inducción de daño, Ward (24) ha sugerido que los cambios en la concentración intercelular de estas moléculas podrían, a través de mecanismos de reparación química, explicar las diferencias en el nivel de daño inducido.

Sabemos, por otra parte, que las núcleoproteínas desempeñan un papel sumamente importante en la conservación de la integridad estructural y funcional del DNA (26). Y esto es así hasta el punto de que la separación completa de las proteínas sensibiliza la molécula de DNA que, en estas condiciones experimentales, resulta 70 veces más lábil (27). En cierta medida las diferencias en el nivel de daño inicial radioinducido pueden también ser un reflejo del grado de empaquetamiento de la molécula de DNA más que de la fragmentación real de la misma (28), aunque ésta es una explicación simplista puesto que se ha demostrado que los valores de radiosensibilidad molecular dependen marcadamente de la conformación de la molécula del DNA y, por ello, de la cinética celular en una manera que correlaciona con la supervivencia de la célula tras irradiación (29).

Medidas del grado de empaquetamiento de la molécula de DNA podrían ser indicativas de su radiosensibilidad. Es sabido que el DNA en diferentes estados conformacionales tiene distinta capacidad de reparación del daño inducido por la luz ultravioleta. Se ha demostrado también que la radiación produce más daño en regiones del DNA que se están transcribiendo o que están activas, que en regiones o genes que se encuentran inactivos (30). Esto se podría explicar tomando en consideración que existe la posibilidad de que estas diferencias de conformación sean causa de modificaciones en la accesibilidad de los radicales libres a la molécula de DNA (31) y/o del microambiente de distribución de los radicales radioprotectores (24). Hasta ahora los términos de "empaquetamiento del DNA" o "conformación del DNA" se han utilizado en su más amplio sentido. Hablar de la naturaleza de la cromatina se presta a cierta controversia. Nada explica todo. Otros factores como los puntos de unión del DNA a la membrana nuclear, la estructura de esta membrana y el nivel de la concentración de determinados precursores han sido también considerados parámetros capaces de modificar la radiosensibilidad (32).

De una forma muy general podríamos resumir el conocimiento respecto de este tema en la siguiente forma: *La radiación ionizante provoca la muerte de las células eucariotas a través de las lesiones que induce en la estructura del DNA y de las alteraciones funcionales que estas lesiones conllevan.* En ausencia de una demostración experimental suficiente como para definir algu-

na lesión "tipo" como responsable de la muerte celular, la investigación de los procesos moleculares que subyacen a la pérdida de la capacidad clonogénica inducida por la radiación se ha dirigido hacia el estudio de correlación entre lesión molecular y supervivencia celular. No obstante, no está claro porqué las células difieren en su sensibilidad frente a la radiación ionizante. Los estudios de radiosensibilidad a nivel molecular han puesto de manifiesto distintos hechos y sugerido diferentes parámetros cuyas modificaciones explican, al menos parcialmente, las diferencias encontradas y que, por ello, pueden ser considerados como determinantes fundamentales de radiosensibilidad. Son los siguientes:

- 1) El daño inicial medido como rupturas dobles de cadena de DNA inducidas por una dosis unitaria de radiación (4, 5, 7, 19).
- 2) La capacidad celular para reparar el daño radioinducido estimada en términos de cinética de reagrupamiento de las cadenas de DNA (7, 22, 33, 34).
- 3) El daño residual, es decir, la fracción de lesiones que no pueden ser reparadas por las células aun disponiendo de tiempo suficiente para hacerlo (35)

Comoquiera que los parámetros que cuantifican el nivel de daño radioinducido sobre el DNA y la velocidad de reparación de dicho daño están relacionados entre sí (36) se ha sugerido que las células más radiosensibles sufren más dsb/Gy en su genoma y además, en ellas, el proceso de reagrupamiento de las cadenas de DNA rotas por radiación es más lento que el observado en las células resistentes.

Para investigar, de un lado, la hipótesis que confiere a la dotación y expresión genética específica de las células de cada ser humano un papel relevante en la respuesta tisular al tratamiento con radiación y, de otro, la validez del daño inicial como test predictivo de tolerancia hemos sometido a estudio de radiosensibilidad molecular dos tipos diferentes de células normales procedentes de enfermas afectas de cáncer de mama: a) células epiteliales de piel y b) linfocitos periféricos obtenidos a partir de una muestra de sangre.

Las muestras de piel, aproximadamente de 1 cm² de superficie, fueron conseguidas durante la mastectomía de las pacientes. Este material, cortado en pequeños fragmentos, fue disgregado mediante tratamiento durante 20 horas a 37 °C con la siguiente mezcla enzimática: DNA_{asa} (0.05 mg/ml), pronasa (0.05 mg/ml) y colagenasa (0.1 mg/ml). La suspensión así obtenida resulta constituida por células aisladas y pequeños agregados multicelulares de tamaño inferior a 0.1-0.2 mm de diámetro. Para eliminar los enzimas la suspensión se centrifuga a baja velocidad, 500g, 10 min, 4 °C, y el pellet se resuspende en medio de cultivo (Dulbecco Mínimo Esencial suplementado

con el 10% de suero de feto de ternera, DMEM + 10% FCS) en estas condiciones las células se almacenan a temperatura ambiente hasta el momento de ser utilizadas para el ensayo de su radiosensibilidad molecular.

Junto a la obtención de la muestra de piel se realiza una extracción de 10 ml de sangre de la enferma de la que, por centrifugación en gradiente de densidad (Ficoll/Hypaque, Becton Dickinson), se aíslan las células blancas. Las células aisladas se conservan en medio de cultivo, a temperatura ambiente, hasta el momento del ensayo de radiosensibilidad. Ambas muestras, células epidérmicas y linfocitos, se procesan simultáneamente procurando que entre la obtención de las muestras y el inicio del experimento no se sobrepase el tiempo de 24 horas.

El test analítico empleado para cuantificar la cantidad de lesiones que la radiación induce sobre las células de las enfermas se basa en el tratamiento de las muestras celulares, preparadas en agarosa, con radiación electromagnética ionizante a diferentes niveles de dosis comprendidos entre 0 y 45 Gy y la posterior separación de las moléculas de DNA rotas por la radiación utilizando electroforesis de campo pulsante. Los fragmentos de DNA se movilizan en agarosa bajo la influencia del campo eléctrico de acuerdo con su tamaño. Esta técnica permite calcular el número de rupturas dobles de cadena de DNA (5, 20) que se producen por unidad de dosis (Gy) y por unidad de DNA (en nuestro trabajo hemos tomado como unidad de DNA el tamaño medio del cromosoma humano, 200 Mpb).

Utilizar este test de radiosensibilidad molecular nos ha permitido la valoración, de forma paralela, del daño inicial inducido por la radiación sobre la molécula del DNA en dos tipos celulares normales procedentes del mismo paciente. Además nos ha permitido comprobar la existencia de una importante y significativa variación interindividual en la radiosensibilidad molecular en ambos tipos de células: linfocitos y células epidérmicas. En efecto, el nivel de daño inicial cuya estimación surge del cálculo de las pendientes de la relación entre rupturas dobles de cadena de DNA y dosis, correspondiente a cada enferma, cuya representación gráfica se ofrece en la figura 1, ha oscilado entre 1 y 5 dsb/Gy/DNA. Por otra parte, nuestros resultados nos han permitido demostrar la existencia de una relación estadísticamente significativa entre los valores de radiosensibilidad encontrados para uno y otro tipo de células (figura 2, $r = 0.669$, $p = 0.005$). Este resultado permite suponer que los ensayos de radiosensibilidad molecular realizados sobre linfocitos pueden ser utilizados como índices de radiosensibilidad molecular *in vitro* de los tejidos sanos. La posibilidad de emplear este tipo celular como referencia para la predicción de la respuesta de los tejidos sanos a la radiación ha sido recientemente anticipada por Jones (37). La fácil disponibilidad de linfocitos (sólo se necesita una muestra de sangre periférica de los pacientes que van a ser sometidos a radioterapia) y la posibilidad de aplicar sobre ellos las técnicas

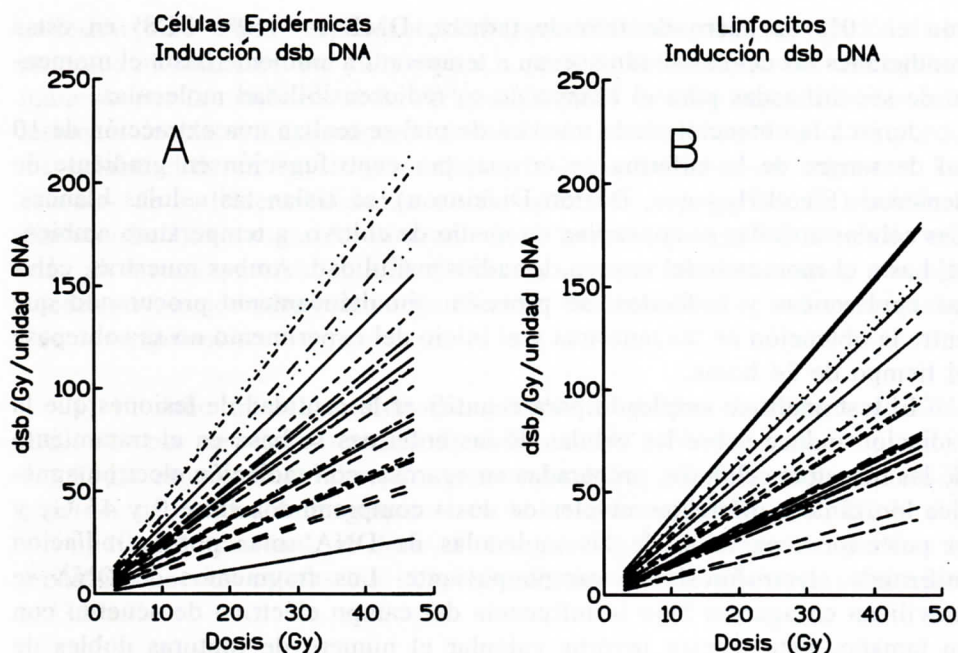


Fig. 1.—a) Células epidérmicas: daño inicial producido por radiación sobre el material genético medido como rupturas dobles de cadena de DNA en función de la dosis; b) Linfocitos: daño inicial producido por radiación sobre el material genético medido como rupturas dobles de cadena de DNA en función de la dosis.

de estimación cuantitativa de lesión molecular, convierte a este tejido en el sustrato teóricamente ideal para la investigación de radiotolerancia. Si los valores de radiosensibilidad encontrados estuvieran determinados a nivel genético, la demostración de elevada sensibilidad en linfocitos, podría indicar una hipersensibilidad en otros tipos de células de los tejidos peritumorales sanos del individuo sometido a tratamiento.

En la actualidad el tratamiento del cáncer, en numerosas localizaciones tumorales, se realiza administrando al tumor una dosis de radiación *tolerable* por los tejidos normales. En algunos casos (seminoma, linfoma) la dosis necesaria para el control es baja y excluye los problemas de tolerancia. Ocasionalmente en algunos tumores de crecimiento rápido se consiguen mejores índices de control reduciendo el tiempo de irradiación sin necesidad de elevar excesivamente la dosis. Estos hechos demuestran la importancia de la individualización de los tratamientos en oncología. Para conseguir este objetivo, es necesario evaluar *in vitro* la radiosensibilidad intrínseca de determi-

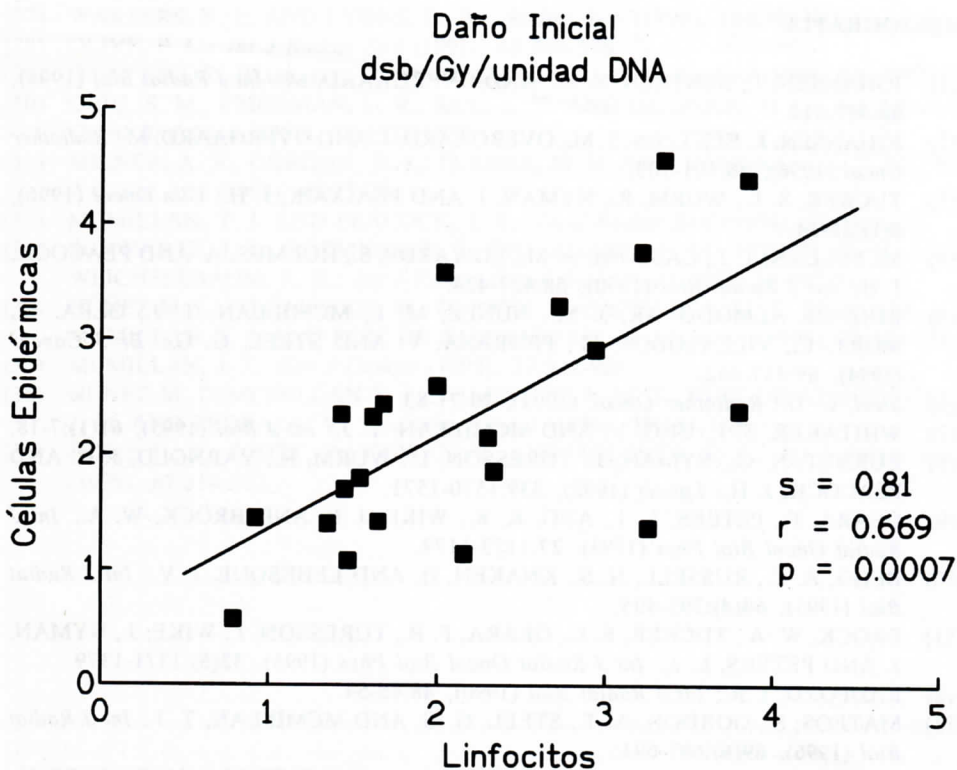


Fig. 2.—Relación entre la radiosensibilidad molecular de ambos tipos celulares normales: linfocitos periféricos y células epidérmicas de la piel. El parámetro de radiosensibilidad molecular utilizado es el número de rupturas dobles de cadena/Gy/unidad de DNA.

nadas células obtenidas del paciente (fibroblastos o linfocitos, por ejemplo) y cuantificar desde el punto de vista clínico y de una manera, tan objetiva como sea posible, la respuesta de la piel de los enfermos al tratamiento.

Posteriormente, los datos obtenidos en el laboratorio se han de poner en relación con la respuesta clínica observada y cuantificada mediante un sistema de gradación adecuado que está siendo consensuado a nivel europeo. Si existiese correlación entre los parámetros *in vitro* y los resultados adversos del tratamiento determinados por el estudio clínico sería posible, al menos teóricamente, identificar aquellos subgrupos de enfermos en los que se espera que la respuesta al tratamiento sea “normal” y distinguirlos de aquellos otros en los que la administración de la dosis puede producir una reacción extrema. Finalmente, esto puede permitir cierta aproximación al principio de individualización terapéutica, objetivo que de ser conseguido puede proporcionar un considerable cambio en los índices de probabilidad de curación e incidencia de morbilidad que caracterizan las aplicaciones terapéuticas de la radiación.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) JOHANSEN, J., BENTZEN, S. M., AND OVERGAARD, M.: *Int J Radiat Biol* (1994), **66**:407-412.
- (2) JOHANSEN, J., BENTZEN, S. M., OVERGAARD, J. AND OVERGAARD, M.: *Radiother Oncol* (1996), **40**:101-109.
- (3) TUCKER, S. L., WURM, R., NYMAN, J. AND PEACOCK, J. H.: *Clin Oncol* (1996), **8**(1):25-34.
- (4) MCMILLAN, T. J., CASSONI, A. M., EDWARDS, S., HOLMES, A. AND PEACOCK, J. H.: *Int J Radiat Biol* (1990), **58**:427-438.
- (5) RUIZ DE ALMODÓVAR, J. M., NÚÑEZ, M. I., MCMILLAN, T. J., OLEA, N., MORT, C., VILLALOBOS, M., PEDRAZA, V. AND STEEL, G. G.: *Br J Cancer* (1994), **69**:457-462.
- (6) Steel, G. G.: *Radiother Oncol*, (1991), **20**:71-83.
- (7) WHITAKER, S. J., UNG, Y. AND MCMILLAN, T. J.: *Int J Biol* (1995), **61**(1):7-18.
- (8) BURNET, N. G., NYMAN, J., TURESSON, L., WURM, R., YARNOLD, J. R. AND PEACOCK, J. H.: *Lancet* (1992), **339**:1570-1571.
- (9) GEARA, F., PETERS, L. J., ANG, K. K., WIKE, J. L. AND BROCK, W. A.: *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (1993), **27**:1173-1179.
- (10) BEGG, A. C., RUSSELL, N. S., KNAKEN, H. AND LEBESQUE, J. V.: *Int J Radiat Biol* (1993), **64**(4):393-405.
- (11) BROCK, W. A., TUCKER, S. L., GEARA, F. B., TURESSON, I., WIKE, J., NYMAN, J. AND PETERS, L. J.: *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (1995), **32**(5):1371-1379.
- (12) RADFORD, I. R.: *Int J Radiat Biol* (1990), **48**:45-54.
- (13) MATEOS, S., GORDON, A. T., STEEL, G. G. AND MCMILLAN, T. J.: *Int J Radiat Biol* (1996), **69**(6):687-693.
- (14) VILLALOBOS, M., BECERRA, D., NÚÑEZ, M. I., VALENZUELA, M. T., SILES, E., OLEA, N., PEDRAZA, V. AND RUIZ DE ALMODÓVAR: *Int J Radiat Biol* (1996), **70**(2):161-169.
- (15) PRISE, K. M., DAVIES, S., STRAFORD, M. R. L. AND MICHAEL, B. D.: *Int J Radiat Biol* (1992), **62**(3):297-306.
- (16) RADFORD, I. R.: *Int J Radiat Biol* (1986), **49**(4):611-620.
- (17) SAPORA, O., BARONE, F., BELLI, M., MAGGI, A., QUINTICLIANI, M. AND TABOCCHINI, M. A.: *Int J Radiat Biol* (1991), **60**(3):364-482.
- (18) SCHWARTZ, J. L., MUSTAFI, R., BECKETT, M. A. AND WEICHSELBAUM, R. R.: *Radiat Res* (1990), **123**:1-6.
- (19) MCMILLAN, T. J., CASSONI, A. M., EDWARDS, S., HOLMES, A. AND PEACOCK, J. H.: *Int J Radiat Biol* (1990), **58**:427-438.
- (20) RUIZ DE ALMODÓVAR, J. M., STEEL, G. G., WHITAKER, S. J. AND MCMILLAN, T. J.: *Int J Radiat Biol* (1994), **65**(6):641-649.
- (21) GIACCIA, A. J., SCHWARTZ, J., SHIEH, J. AND BROWN, J. M.: *Radiother Oncol* (1992), **24**:213-238.
- (22) ZAFFARONI, N., ORLANDI, L., VILLA, R., BEARZATTO, A., ROFSTAD, E. K. AND SILVESTRINI, R.: *Int J Radit Biol* (1994), **66** (3):279-285.
- (23) WHITAKER, S. J. AND MCMILLAN, T. J.: *Int J Biol* (1992), **61**(1):29-41.
- (24) WARD, J. F.: *Int J Radiat Biol*, (1990), **57**:1141-1150.
- (25) CARMICHAEL, J., PARK, J. G., DEGRAFF, W. G., GAMSON, J., GAZDAR, A. F. AND MITCHELL, J. B.: *Eur J Cancer Clin Oncol*, (1988), **24**:1219-1224.
- (26) LJUNGMAN, M., NYBERG, S., NYGREN, J., ERIKSON, M. AND AHNSTROM, G.: *Radiat Res* (1991), **127**:171-176.