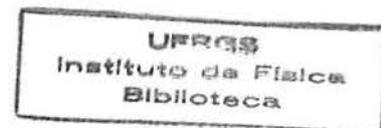


UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE FÍSICA

DOSIMETRIA BIOLÓGICA: avaliação da exposição às radiações
ionizantes através de efeitos biológicos induzidos

Pedro Silva de Almeida

Orientador: Prof. Dr. Edulfo Eduardo Diaz Rios



Trabalho de Conclusão de Curso submetido à
COMGRAD/FIS como parte dos requisitos para
a obtenção do Grau de Bacharel em Física

Porto Alegre
2007

SUMÁRIO

1 RESUMO.....	04
2 INTRODUÇÃO.....	05
3 OBJETIVOS.....	07
4 RADIAÇÃO IONIZANTE.....	07
4.1 Radiação Eletromagnética.....	08
4.2 Radiação Corpuscular.....	09
5 EFEITOS BIOLÓGICOS DAS RADIAÇÕES.....	10
5.1 Transferência Linear de Energia.....	12
5.2 Efeito biológico Relativo.....	14
5.3 Efeitos Diretos e Indiretos.....	15
6 ENSAIO COMETA.....	16
7 METODOLOGIA.....	19
7.1 Reagentes Químicos.....	19
7.2 Cultura de Células.....	20
7.3 Exposição ao Vácuo.....	21
7.4 Irradiação com Partículas Carregadas.....	22
7.5 Ensaio Cometa.....	23
8 RESULTADOS.....	25
9 CONCLUSÃO.....	27
10 REFERÊNCIAS.....	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Deposição de energia num meio material.....	10
Figura 2. Efeitos biológicos das radiações.....	11
Figura 3. Componentes do DNA.....	12
Figura 4. Curva de Bragg.....	13
Figura 5. Protocolo experimental do Ensaio Cometa.....	17
Figura 6. Classificação dos danos no Ensaio Cometa.....	18
Figura 7. Cultivo (A); visualização (B); imagem das células V79 (C).....	20
Figura 8. Equipamento utilizado para teste ao vácuo.....	21
Figura 9. Gerador e Implantador de Íons.....	22
Figura 10. Lise das células (A); eletroforese dos núcleos celulares (B); coloração das lâminas com Ag (C).....	23
Figura 11. Sistema de aquisição de imagens.....	24
Figura 12. Imagens dos núcleos das células V79 após eletroforese.....	25
Figura 13. Índice de danos ao DNA nas células V79 submetidas ao vácuo e irradiação.....	26
Figura 14. Índice de danos ao DNA nas células V79 submetidas à ação de agentes físicos e químicos.....	27

1 RESUMO

Radiação ionizante é importante gerador de danos moleculares. Entre as diversas moléculas encontradas em sistemas biológicos, as macromoléculas de DNA são o alvo que mais compromete a célula quando sofre qualquer tipo de alteração estrutural. Certos tipos de radiação são muito eficazes em danificar o DNA. Partículas alfa e prótons são capazes de ionizar intensamente ao longo de sua trajetória. Os efeitos biológicos produzidos por tais partículas carregadas foram objeto de estudo do presente trabalho, que pretende estabelecer uma curva dose-resposta, baseando-se nos parâmetros envolvidos na interação entre determinadas células e este tipo de radiação.

Nesta tentativa de quantificar os efeitos biológicos, fibroblastos pulmonares de hamster chinês (linhagem permanente V79) foram submetidos a experimentos de exposição ao vácuo e de irradiação com feixe de íons. As possíveis alterações causadas no DNA foram analisadas pelo ensaio citogenético de eletroforese de célula única em gel (ensaio Cometa).

2 INTRODUÇÃO

O estudo das radiações iniciou-se com a observação de um efeito secundário em experimento com raios catódicos. Em 1895, Wilhelm Conrad Röntgen, ao examinar descargas elétricas, percebe que além da luminescência esperada no interior do tubo, houve também a luminescência de um vidro recoberto com platino cianeto de bário, que se encontrava próximo. Por não saber a origem de tal fenômeno, já que os raios catódicos não percorriam mais do que alguns centímetros no ar, Röntgen batizou este novo tipo de radiação como raios X. A existência de tal ente já havia sido prevista teoricamente por Hermann von Helmholtz.

No mesmo ano, Röntgen realizou a primeira radiografia da história, expondo por 15 minutos a mão de sua esposa aos misteriosos raios que penetravam em todo tipo de material. Röntgen esperou apenas 45 dias, sem saber se havia ou não efeitos danosos à vida, para fazer a primeira exposição de um ser humano aos raios X. No ano seguinte, Antoine Becquerel fez o primeiro comunicado sobre a emissão espontânea de radiação (semelhante aos raios X) por compostos de urânio ^[1]. Neste mesmo ano, também foram reportados os primeiros efeitos biológicos a estas novas radiações: dermatite, escamação da pele e irritação dos olhos sendo as lesões mais comuns ^[2].

Nos anos subseqüentes, o estudo dos raios X e dos raios de Becquerel já havia se tornado de grande interesse da comunidade científica, tanto pelo potencial de uso na medicina, quanto por ser um fértil terreno de pesquisa para os físicos e para os químicos da época. Assim, em 1898, Ernest Rutherford dedicou-se a entender os raios de Becquerel. Com apenas um ano de dedicação, Rutherford foi capaz de concluir com seu estudo que os raios de Becquerel se dividiam em dois tipos: um muito penetrante e outro pouco penetrante, mas ambos interagiam com campos elétricos, sendo defletidos em direções opostas por tal campo. Rutherford ainda determinou que a radiação penetrante, denominada beta, consistia nos elétrons, descobertos por J.J. Thomson, enquanto que a radiação pouco penetrante, denominada alfa, eram núcleos de hélio.

Na década seguinte, muitos foram os casos de câncer e leucemia relacionados ao uso indiscriminado de radiação. Muitas eram as práticas que utilizavam tal

ferramenta, inclusive métodos de diagnóstico e terapias alternativas; porém só em 1915 surgiram propostas para proteção radiológica.

Esta pequena cronologia mostra que a preocupação atual com proteção radiológica e os efeitos biológicos da radiação nem sempre figuraram como prioridade no meio científico e tecnológico. Grande parte deste descuido se deve ao desconhecimento dos fenômenos e mecanismos envolvidos nos processos de emissão da radiação e como esta interage com sistemas biológicos. Até mesmo os sistemas biológicos não eram conhecidos plenamente. O modelo linear-quadrático de resposta à radiação foi proposto por Lea e Catchside em 1940, o conceito de transferência linear de energia (LET) foi introduzido em 1943 e a estrutura do DNA foi determinada por Watson e Crick somente em 1953.

Atualmente sabe-se dos riscos que se assume ao utilizar radiação em qualquer atividade, mas esses riscos estão em níveis racionalmente aceitáveis, frente a todo benefício tecnológico que é agregado ao seu uso. Apesar disto, ainda não está perfeitamente claro como as lesões moleculares induzidas pela radiação ionizante se desenvolvem em efeitos celulares como aberração cromossômica, inativação celular, indução de mutação, oncogênese e morte celular.

O principal alvo das radiações ionizantes, no nível celular, é o núcleo, onde se encontram as moléculas de DNA. Esta molécula contém a informação genética que é transferida para a geração seguinte. Manter a estabilidade dos genes é essencial para a sobrevivência celular. Esta estabilidade requer um preciso mecanismo de síntese e replicação do DNA, assim como um mecanismo de reparo de danos. Gene é uma seqüência do DNA responsável por codificar um polipeptídio e a maioria dos genes fornecem instruções para divisão celular e sobre componentes estruturais da célula. Dano no DNA pode causar perda de informação, comprometendo a expressão correta dos genes.

São diversos os processos pelos quais é posto em risco a conservação da informação contida nos genes: agentes químicos, físicos e erros de replicação e de reparação do DNA. Evidentemente a radiação, como agente físico, é capaz de gerar danos importantes na estrutura do DNA. A importância do dano depende da

característica da radiação e da eficiência do mecanismo de reparação presente na célula.

Em nível biológico, as radiações provocam alterações que podem levar até a morte celular. Tal propriedade é usada na radioterapia com a finalidade de eliminar células cancerígenas. Por outro lado, a análise dos danos biológicos provocados nas células pode ser utilizada como indicativo do grau de exposição ao qual ficaram expostas células ou indivíduos; este é o princípio de funcionamento de um "Dosímetro Biológico"^[3].

3 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo estudar os efeitos biológicos provocados pela radiação ionizante de partículas carregadas, determinar os parâmetros envolvidos na interação com células específicas, estabelecer uma curva dose-resposta no sentido que permita determinar a dose de exposição a partir dos danos induzidos na célula.

4 RADIAÇÃO IONIZANTE

Apesar de imperceptível aos sentidos, todos estão expostos o tempo todo à radiação. A maior parte desta radiação natural é inofensiva, pois é de muito baixa energia. A energia necessária para um evento de ionização em átomos de nosso organismo é de alguns eV. Energias menores são capazes apenas de ativar modos vibracionais e rotacionais das moléculas, pois têm energias semelhantes à energia de agitação térmica. Estas são ditas radiações não ionizantes, pois levam a molécula a um estado mais excitado, não conseguindo ejetar nenhum elétron.

Quando a radiação possui uma energia de vários eV, possibilitando a retirada de um ou mais elétrons, ela é dita radiação ionizante. A radiação ionizante é importante, pois pode quebrar ligações químicas necessárias para a manutenção de inúmeros processos bioquímicos e essenciais para o normal funcionamento das células.

A ação da radiação ainda pode ser classificada como direta ou indireta. Partículas carregadas, como alfa e beta, com suficiente energia cinética são capazes de romper a estrutura atômica e ionizar diretamente estruturas com importância biológica. Outros tipos de radiação, como os raios X e raios gama, são indiretamente ionizantes, pois ao atravessar a matéria entregam sua energia ao meio, na sua grande parte por efeito Compton, e são os elétrons de alta velocidade que deixam então um rastro de ionização no meio material.

Cada tipo de radiação (alfa, beta, nêutrons, prótons, gama ou raios-X) interage com a matéria de forma específica. Algumas interagem com maior intensidade, ficando restritas a um pequeno volume, outras, entretanto, conseguem penetrar mais profundamente no meio exposto. Durante esta interação a energia da radiação é transferida para a matéria; essa transferência de energia é o motivo da exposição das células ou indivíduos às radiações. Tal exposição é inevitável nos exames de diagnóstico e imprescindível no tratamento médico.

4.1 Radiação Eletromagnética

O espectro de radiação eletromagnética é composto por inúmeras ondas, que diferem pela frequência, variando continuamente de 10^{24} Hz a 10 Hz nas ondas de uso mais comum. Dentro desta quantidade ampla de frequências, apenas as que excedem 10^{17} Hz é que possuem energia suficiente para ionizar e, portanto causar danos em nível celular.

Raios X e Raios gama são radiações eletromagnéticas que possuem tal capacidade. Ambas têm características iguais, são compreendidas como um campo elétrico e um magnético oscilantes no tempo e se propagando com velocidade da luz no vácuo. De fato, a diferenciação de ambas é feita apenas com base na estrutura atômica que lhes dá origem. Toda radiação eletromagnética originada por um processo envolvendo elétrons de alta energia é denominada raios X. Caso seja produzido pela frenagem dos elétrons, a radiação produzida tem uma distribuição contínua de frequência. Se for originado em uma transição eletrônica, onde um elétron passa de

uma camada mais energética para outra menos energética, o raio X emitido possui uma frequência bem definida, igual à da diferença de energia das camadas envolvidas na transição. A radiação emitida nesta situação é denominada raio X característico, pois pode identificar o elemento que possui transição com tal energia bem definida.

Por outro lado, alguns átomos têm em seu núcleo um excesso de energia, tornando-o instável. Buscando a minimização de energia, o núcleo pode emitir espontaneamente a energia excedente sob forma de radiação. Assim como ocorre com os elétrons, os nucleons (partículas constituintes dos núcleos atômicos) podem estar num estado excitado, e emitindo um raio gama o núcleo atinge o nível energético fundamental.

4.2 Radiação Corpuscular

Entre todas as combinações possíveis de nucleons, poucas são aquelas que constituem um núcleo estável. Uma regra simples para estabilidade é que prótons e nêutron devem ocorrer quase em mesmo número no núcleo. Muitos são os casos em que a estabilidade é maior se um próton for transformado em um nêutron ou vice-versa. Isto é conhecido como decaimento beta. Como a carga se conserva, o núcleo pode emitir uma partícula β^- (elétron), se um nêutron transmutar-se em próton, ou pode emitir uma partícula β^+ (pósitron), se houver excesso de prótons. Estas partículas β são emitidas com certa energia cinética e, por terem carga, são capazes de produzir ionizações.

Mesmo havendo o correto balanceamento entre nêutrons e prótons, núcleos com muitos nucleons (onde a regra simples de estabilidade não é mais válida) ainda são instáveis. O ferro é o elemento mais estável, elementos acima do ferro podem decair espontaneamente em núclídeos mais leves, pois as interações eletromagnéticas e fortes não são capazes de manter a coesão do núcleo. Neste caso, diferentemente do decaimento- β , o número de massa do núcleo se modifica. O processo no qual o núcleo instável, núclídeo pai (com número atômico Z e massa A), dá origem a um núcleo de

hélío (2 prótons e 2 nêutrons), e um nuclídeo filho com número atômico $Z-2$ e massa $A-4$ é chamado de desintegração alfa.

As partículas α possuem maior poder de ionização que as partículas β , devido à sua carga maior. O comportamento no interior de um meio material é diferente para cada tipo de radiação corpuscular. A partícula β , por ser muito mais leve que a partícula α e por ter metade da carga, descreve trajetórias irregulares e produz ionização esparsa, enquanto a partícula α tem uma trajetória mais retilínea, causando ionização concentrada espacialmente ^[4].

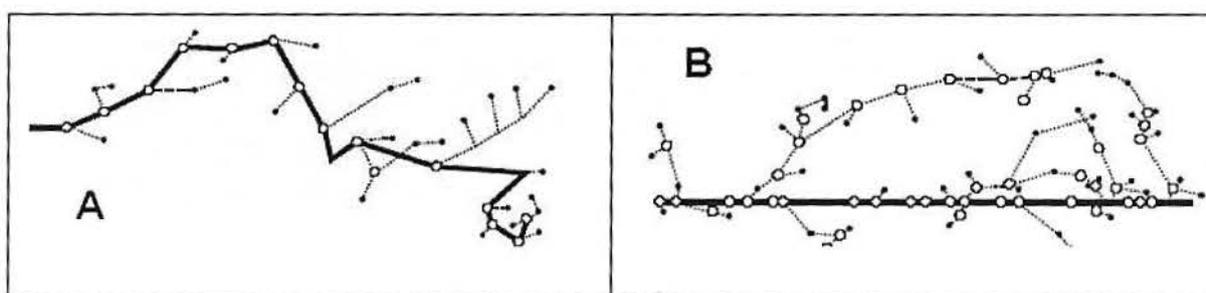


Figura 1. Deposição de energia num meio material. **A-** trajetória de um elétron; **B-** trajetória de uma partícula alfa. Círculos pequenos são excitações e os maiores são ionizações.

5 EFEITOS BIOLÓGICOS DA RADIAÇÃO

Os efeitos biológicos das radiações são resultados principalmente dos danos causados no DNA. A capacidade de reparação é que determina o destino da célula; um reparo bem sucedido pode levar a célula ao estado saudável de novo, um reparo mal sucedido pode levar à formação de câncer e, finalmente, a impossibilidade de reparo leva à morte celular, como mostra a Figura 2.

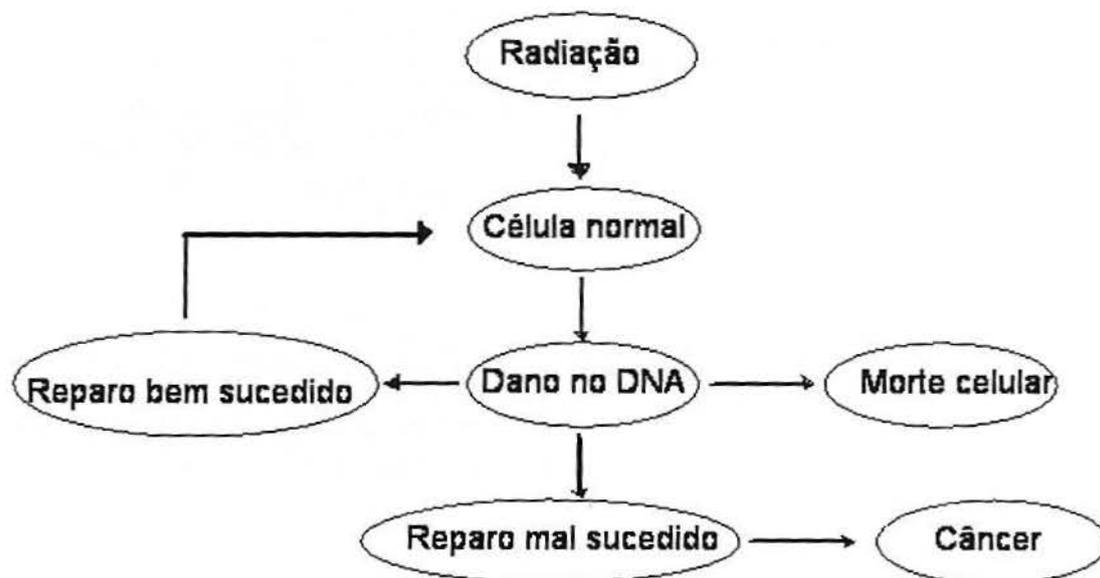


Figura 2. Efeitos biológicos das radiações

Para causar lesão na célula através da radiação ionizantes três fatores são importantes ^[5]:

- dano molecular produzido imediatamente após a absorção de energia;
- fixação do dano remanescente após a ocorrência das reações físico-químicas mais rápidas;
- permanência de danos após os processos metabólicos e de reparação.

A radiação pode induzir danos moleculares variados, como quebra simples da fita, quebra dupla das fitas de DNA e alterações estruturais das bases nitrogenadas.

Por ser um alvo crítico, é importante a compreensão da estrutura do DNA. Determinada em 1953, a estrutura de dupla hélice é composta por duas fitas, mantidas juntas por pontes de hidrogênio. O esqueleto desta macromolécula é uma cadeia de grupos fosfatos e de açúcares que se alternam. Os pares de bases, que conectam as duas fitas, estão ligados ao açúcar, a desoxirribose. Todas as moléculas de DNA possuem o mesmo esqueleto de açúcar e fosfato, o que muda é a seqüência de bases nitrogenadas. As bases encontradas são a citosina, guanina, adenina e timina. As duas primeiras são ligadas entre si por três pontes de hidrogênio e as duas últimas por duas pontes de hidrogênio. Qualquer outra combinação de bases não ocorre, devido à

incompatibilidade espacial para o estabelecimento das pontes de hidrogênio. Deste modo, cada fita de DNA é complementar à outra. Como cada uma das bases que compõe a ponte de hidrogênio se localiza em uma das fitas, a dupla hélice se mantém coesa devido a esta interação das bases. O cromossomo, dentro do qual o DNA encontra-se compactado, tem em torno de 180 Mbp^[6].

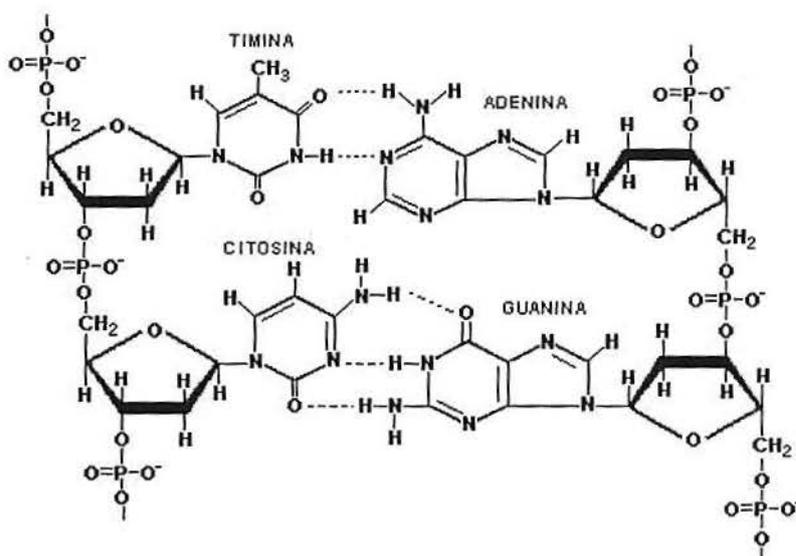


Figura 3. Componentes do DNA

Classificam-se os danos celulares como: letal, quando resulta em morte celular; subletal, se for passível de reparação; e potencialmente letal, que pode ser reparado caso as condições às quais as células estão submetidas sejam alteradas.

O tipo de radiação, a forma de deposição de energia e a estrutura atingida se relacionam de forma a determinar em qual categoria acima os danos se encaixam.

5.1 Transferência Linear de Energia

O conceito de transferência linear de energia, LET na sigla em inglês, é definido como a quantidade de energia transferida ao meio por unidade de distância percorrida

no meio. Fica implícita na definição que esta é uma quantidade que trata de uma média espacial, pois ao analisarmos na escala em que os fenômenos de transferência de energia ocorrem, se percebe que há grande variação da energia absorvida pelo meio em função da profundidade. Apesar disto, LET pode ser usado como parâmetro para caracterizar o poder de ionização e a densidade de ionização de uma dada radiação.

Partículas carregadas depositam sua energia segundo a curva de Bragg, que mostra como a perda de energia por ionização aumenta com a distância percorrida. A maior parte de deposição de energia por evento de ionização ocorre no fim do caminho da partícula, quando a velocidade é menor e há um pronunciado pico (pico de Bragg), que cai rapidamente a zero, onde a partícula atinge profundidade máxima. Esta é uma propriedade importante, pois teoricamente permite que a maior parte da energia seja entregue a uma determinada região, e não igualmente em todo percurso.

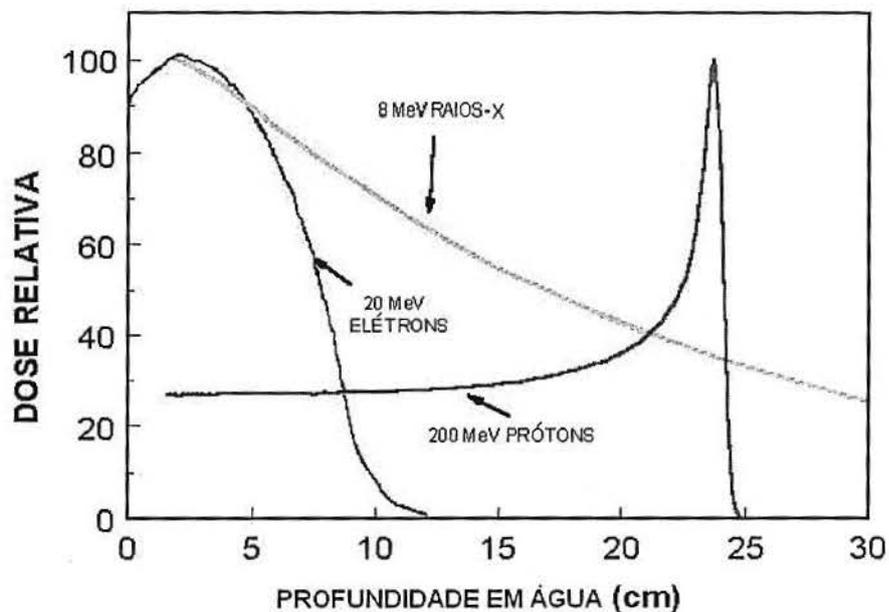


Figura 4. Curva de Bragg

É necessário salientar que as radiações eletromagnéticas, como os raios X e a radiação gama, não possuem esta característica; diferentemente elas transferem sua energia de forma mais homogênea para o meio.

5.2 Efeito Biológico Relativo

Sempre que for necessário fazer algum tipo de previsão quanto a efeitos biológicos de algum agente físico ou químico, é necessário saber qual agente e a qual dose o sistema biológico foi submetido, pois é de conhecimento geral que ao se tratar de sistemas biológicos, a diferença entre veneno e remédio é apenas a dose.

Definimos aqui que dose é a medida de energia absorvida por unidade de massa do organismo exposto à radiação, entretanto doses iguais de diferentes radiações produzem diferentes efeitos biológicos. O que não deve ser muito surpreendente, pois como foi visto, o conceito de LET mostra que as radiações não depositam a energia de forma igual no tecido.

Ao comparar diferentes tipos de radiação é necessário tomar algum tipo de padrão, e o padrão usual é o raio X. Assim define-se efeito biológico relativo, RBE na sigla em inglês, como sendo a razão entre a dose de raio X (D_x) e a dose de um certo tipo de radiação (D_R) que produz o mesmo efeito que D_x :

$$RBE = D_x / D_R$$

Para tal comparação define-se o efeito que se julga mais conveniente. Por exemplo, para calcular RBE de partículas α , pode-se usar a letalidade. Expondo células em cultura a diversas doses de raio X e a diversas doses de partículas α . As doses a serem comparadas para obter o índice RBE serão aquelas que resultarem em 50% de morte celular.

Em análise mais profunda, tem que se levar em conta outros fatores que influenciam na intensidade dano. Os fatores físicos que devem ser considerados são: o fracionamento da dose e taxa de dose, que podem elevar a resistência da célula e a eficiência de reparo de danos. O estado no qual se encontra o sistema biológico também pode torná-lo mais sensível à radiação. A fase do ciclo celular, o metabolismo, o estado proliferativo e a constituição genética são fatores biológicos a considerar.

Também existem fatores químicos que modificam a severidade dos danos. O teor hídrico, o teor de O_2 e a presença de antioxidantes na célula interferem na produção de radicais livres que atacam a molécula de DNA.

5.3 Efeitos Diretos e Indiretos

Até aqui foram mencionados apenas danos causados pela interação direta com o DNA, porém há grandes chances de a radiação interagir com outras moléculas e que o DNA seja atingido de modo indireto.

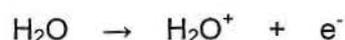
A radiação pode ionizar ou levar os átomos que fazem parte do DNA a um estado excitado, quebrando alguma ligação química entre as bases, entre os grupos fosfatos e a desoxirribose ou entre as bases e o açúcar. Todos estes são efeitos diretos da radiação, pois não há nenhum intermediário entre a deposição de energia e a estrutura molecular. O tempo característico destes processos é da ordem de 10^{-16} segundos.

O processo alternativo à ionização primária do DNA é a ionização de uma molécula simples e a criação de átomos ou moléculas neutras com um elétron não pareado no último orbital, conhecidos amplamente como radicais livres. Essas reações ocorrem numa escala de tempo muito maior que a escala da ionização, 10^{-6} segundos.

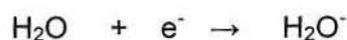
Radicais livres são estruturas altamente reativas quimicamente, capazes de gerar os mesmos danos causados diretamente pela radiação, entretanto a probabilidade de um dano ter origem química é maior que ter origem física.

Pela grande concentração de água em tecidos vivos (cerca de 60-70%), a ionização da molécula da água é o efeito mais provável de interação da radiação ionizante dentro da célula; esta interação, também chamada de radiólise da água, é um importante mecanismo para a produção de radicais livres^[7].

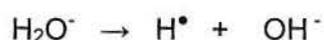
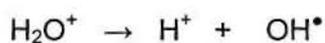
Primeiramente a radiação provoca a ejeção de um elétron da molécula da água e a produção de um íon positivo:



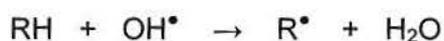
O elétron é prontamente capturado por outra molécula de água, produzindo um íon negativo:



Esses íons possuem um tempo de vida muito curto (ordem de 10^{-10} segundos) e se dissociam espontaneamente produzindo radicais livres (hidroxila e hidrogênio respectivamente):



Um radical livre pode ser produzido em qualquer parte da célula e difundir por uma distância estimada em 4 nm, ou seja o dobro da largura da dupla hélice do DNA; também os radicais interagem com moléculas orgânicas, criando radicais livres orgânicos dentro da célula:



Os radicais livres são responsáveis pelo estresse oxidativo que pode originar processos fisiopatológicos como envelhecimento, arterosclerose, inflamação, doenças hepáticas, mal de Alzheimer, mal de Parkinson, vários tipos de câncer, entre outros. Nos últimos anos, tem sido constante o interesse na busca de soluções para que seja evitada a formação dessas espécies reativas (radicais livres), ou então soluções que impeçam a ação dessas espécies sobre a célula.

6 ENSAIO COMETA

Alterações biológicas induzidas nas células por agentes físicos ou químicos podem ser analisadas utilizando o ensaio cometa. Este ensaio combina a simplicidade da técnica bioquímica de detecção de quebras no DNA com a utilização de poucas células e corresponde a um ensaio citogenético. As vantagens dessa técnica incluem rapidez, baixo custo, sensibilidade na detecção de dano no DNA, obtenção de dados em células individuais e o uso de pequeno número de células para análise ^[8].

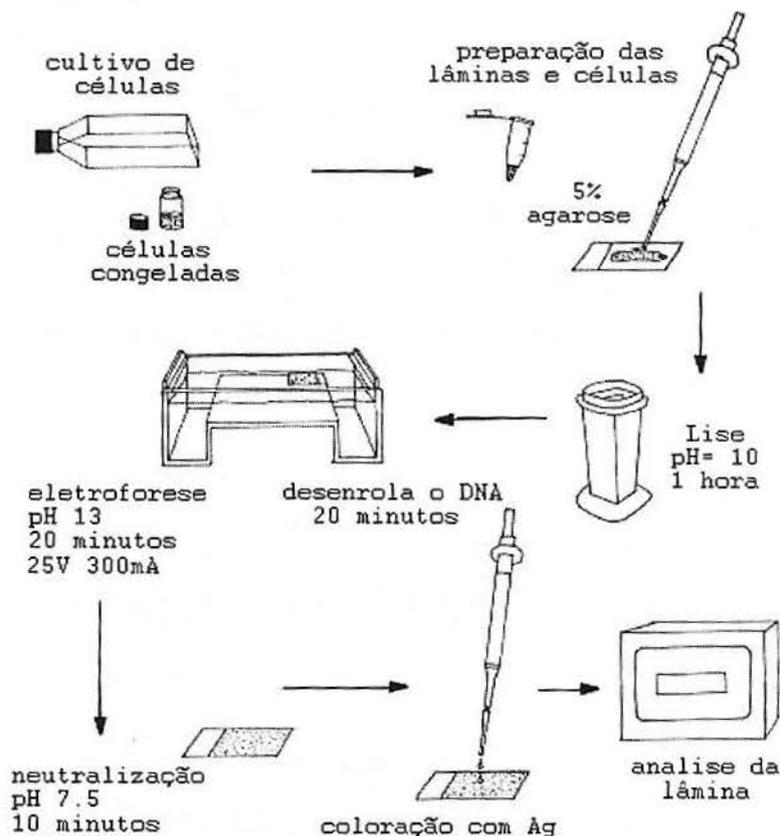


Figura 5. Protocolo experimental do Ensaio Cometa

O teste Cometa ou eletroforese de célula única em gel foi descrito por Östling e Johanson em 1984 e o princípio básico do ensaio leva em conta o comportamento do DNA em células individualizadas e sua organização dentro do núcleo. Para a realização do ensaio (vide figura 5) as células são embebidas em agarose, têm as suas membranas quebradas por detergentes e suas proteínas nucleares extraídas com altas concentrações de sais, restando apenas o nucleóide (parte de DNA do núcleo).

Quando o DNA é submetido à eletroforese, ele migra no gel de agarose, sendo esta migração relacionada com o tamanho da molécula. Pequenos fragmentos migram com maior velocidade que a matriz nuclear. Desta forma, células com DNA danificado formam, após a migração, a figura de um cometa, consistindo em cabeça (matriz nuclear) e cauda (DNA quebrado). A extensão que o DNA migrou está correlacionada

com a quantidade do dano ocorrido, sendo uma cauda mais longa a indicação de um grau maior de quebra no DNA ^[9].

A análise dos danos provocados por agentes físicos ou químicos pode ser realizada visualmente em microscópio óptico de transmissão - quando as células são coradas com nitrato de prata, ou em microscópio de fluorescência - quando coradas com brometo de etídeo. As células são classificadas de acordo com o tamanho da cauda em relação à cabeça (núcleo) em 5 classes de danos: classe 0 - sem cauda (sem dano); classe 1 - com pequena cauda menor que o diâmetro da cabeça; classe 2 - com o comprimento da cauda entre uma e duas vezes o diâmetro da cabeça; classe 3 - com cauda longa superior a duas vezes o diâmetro da cabeça; e classe 4 - cauda longa e mais espalhada (em forma de leque) do que a classe 3 ^[10].

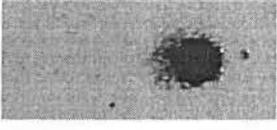
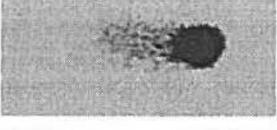
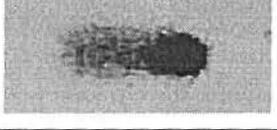
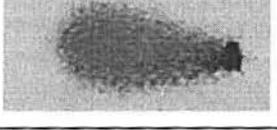
Células Cometa	Relação Cabeça/Cauda	Classes de Danos
	Sem Cauda	0
	≤ 1	1
	1 - 2	2
	≥ 2	3
	Sem Cabeça	4

Figura 6. Classificação dos danos no Ensaio Cometa

Deste modo, o ensaio cometa serve também como medida da genotoxicidade de agentes químicos e tem sido amplamente utilizado no Departamento de Biofísica.

Apesar de a análise visual ser válida segundo normas internacionais, o uso de análise computacional vem sendo cada vez mais empregada para estabelecer esta classificação.

Variando as condições nas quais são realizadas a lise celular e a eletroforese, é possível otimizar a detecção para um determinado tipo de dano molecular. A escolha do pH pode determinar quais tipos de danos podem ser observados ou não. Quebras simples do DNA, por exemplo, são detectadas em pH maior que 12.

7 METODOLOGIA

Para alcançar os objetivos propostos, ou seja, mostrar a possibilidade de quantificar os efeitos biológicos provocados pela radiação altamente ionizante e com pouco poder de penetração uma série de experimentos foram executados. A seguir, são descritos os procedimentos realizados para a avaliação do ensaio cometa em células submetidas ao bombardeamento de um fluxo de prótons e partículas- α .

7.1 Reagentes Químicos

Os reagentes utilizados no cultivo das células e na realização do ensaio cometa foram: meio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), soro bovino fetal (FBS), tripsina-EDTA, L-glutamina e antibióticos, estes, fornecidos pela Gibco BRL (Grand Island, NY, USA); metanosulfonato metil (MMS), peróxido de hidrogênio, t-butilhidro-peróxido (TBOOH), fornecidos pela Sigma (St. Louis, MO, USA); agarose de baixo ponto de fusão e agarose, fornecidos por Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

7.2 Cultura de Células

Nas experiências-piloto foram utilizadas células de linhagem permanente de fibroblastos de pulmão, derivadas de hamster chinês, conhecidas como V79. Tal linhagem é amplamente utilizada em experimentos com substâncias químicas, os quais permitem determinar danos moleculares, grau de genotoxicidade e de citotoxicidade, além dos tipos de agentes mutagênicos produzidos^[11].

Os fibroblastos de pulmão de hamster chinês (Figura 7) crescem aderidos à superfície da garrafa de cultivo, eles possuem espessura média de $5\mu\text{m}$, enquanto o citoplasma possui espessura média de $0.5\mu\text{m}$, de tal modo que o núcleo tenha $4\mu\text{m}$ ^[12].

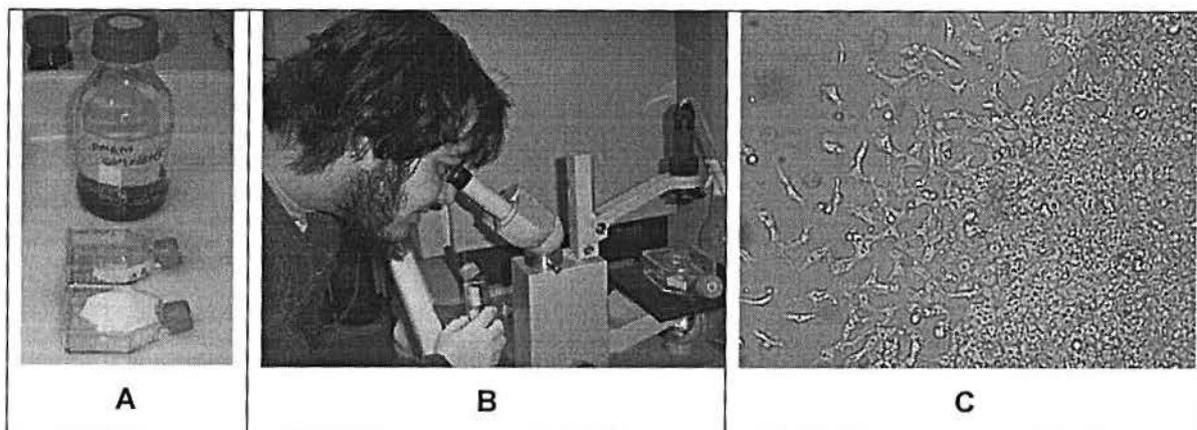


Figura 7. Cultivo (A); visualização (B); imagem das células V79 (C)

É possível considerar, para fins de simulação computacional, que a célula tem a mesma composição que as do baço do homem referência, um típico exemplo de tecido mole^[12]. Isto permite que simuladores como o SRIM sejam utilizados como ferramenta adicional na elaboração de experimentos^[13], já que baço está presente na biblioteca de materiais biológicos do simulador de irradiação das células.

Os experimentos foram planejados através da simulação de irradiações com diferentes íons, incluindo prótons e núcleos de hélio; foi determinada a energia que causa maior número de ionização nas proximidades do núcleo celular e a quantidade

de energia transferida por evento de ionização; tais parâmetros permitem maximizar ou minimizar os efeitos nas células.

A sincronização do ciclo celular é uma facilidade agregada ao uso das células V79, pois dependendo da fase em que se encontra a célula, ela se mostrará mais frágil ou menos frágil à radiação [14].

Células V79 foram cultivadas sob condições padrão em DMEM, suplementadas com 10% de FBS inativado por calor, 0.2mg/mL de L-glutamina, 100 IU/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. As células foram mantidas em pequenas placas de Petri a 37 °C em atmosfera umidificada, contendo 5% de CO₂ no ar onde cresceram por dois dias antes da irradiação.

7.3 Exposição ao Vácuo

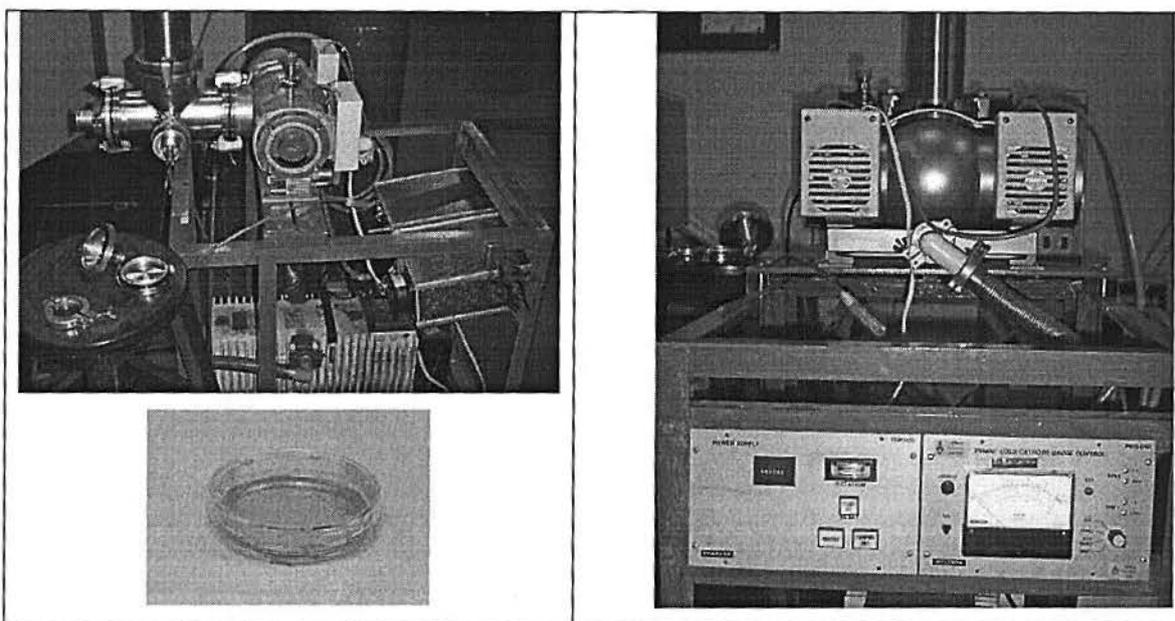


Figura 8. Equipamento utilizado para teste ao vácuo

Um dos desafios desta experiência foi verificar se as células V79 resistiriam às condições sob as quais seriam submetidas durante o funcionamento do implantador iônico. Para tanto, primeiramente, foi aspirado o meio de cultivo que cobria as células e,

após, a monocamada de células foi submetida a vácuo mecânico e a alto vácuo, permanecendo assim por intervalos de tempo variados.

No teste ao vácuo mecânico as células ficaram submetidas a pressão de 4×10^{-1} mbar durante 15 minutos; o teste de alto vácuo foi realizado sob as mesmas condições de pressão de 10^{-5} mbar, mas em intervalos de tempo diferente: primeiro as células ficaram expostas durante 15 minutos e, a seguir, durante 30 minutos. Estes testes foram realizados no Laboratório de Implantação Iônica do Instituto de Física em temperatura ambiente e sem a tampa da placa de Petri.

7.4 Irradiação com Partículas Carregadas

Verificada a resistência das células V79 ao vácuo, elas foram irradiadas no Implantador de Íons sob três condições diferentes: em primeiro lugar, foi utilizado um feixe de prótons com energia de 1 MeV e com fluência de 3×10^9 íons/cm²; em segundo lugar foi utilizado, novamente, um feixe de prótons com energia de 1 MeV, mas com fluência de 1×10^{10} íons/cm²; finalmente, foi utilizado um feixe de partículas α com energias de 1.5 MeV e com fluência de 3×10^9 íons/cm².

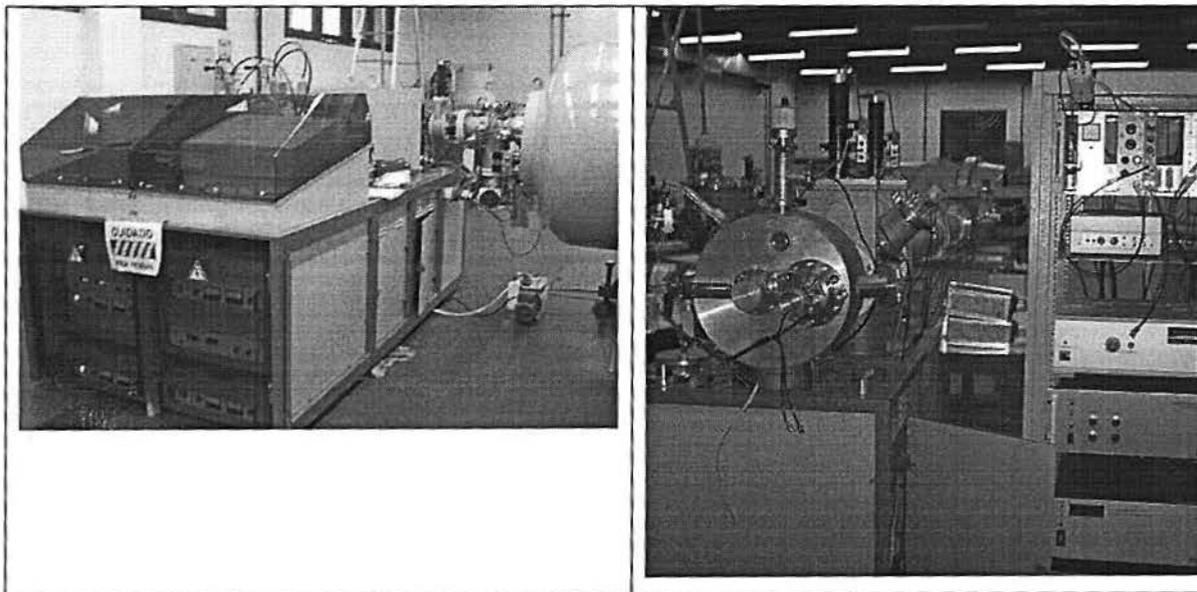


Figura 9. Gerador e Implantador de Íons

7.5 Ensaio Cometa

O ensaio cometa alcalino foi realizado no Departamento de Biofísica, como descrito por Singh ^[15]. As células V79 foram incubadas com várias concentrações de DPDS (diseleneto de difenila) por 3 horas em meio livre de FBS. Após o tratamento, as células foram lavadas com PBS (solução tampão fostato salina) resfriado, tripsina e resuspendidas em meio completo. Então, 20 μ L da suspensão de células (3×10^6 células/mL) foram misturadas com 0.75% agarose de baixo ponto de fusão e, imediatamente, espalhada sobre lâmina de vidro revestida com uma camada de 1% agarose. A agarose solidificou durante 5 minutos a 4°C. As lâminas foram incubadas em solução de Lise resfriada (2.5M NaCl, 10mM Tris, 100mM EDTA, 1% Triton X-100, e 10% DMSO, pH 10.0) a 4°C por pelo menos uma hora para quebrar a membrana celular e remover as proteínas, restando apenas o DNA.

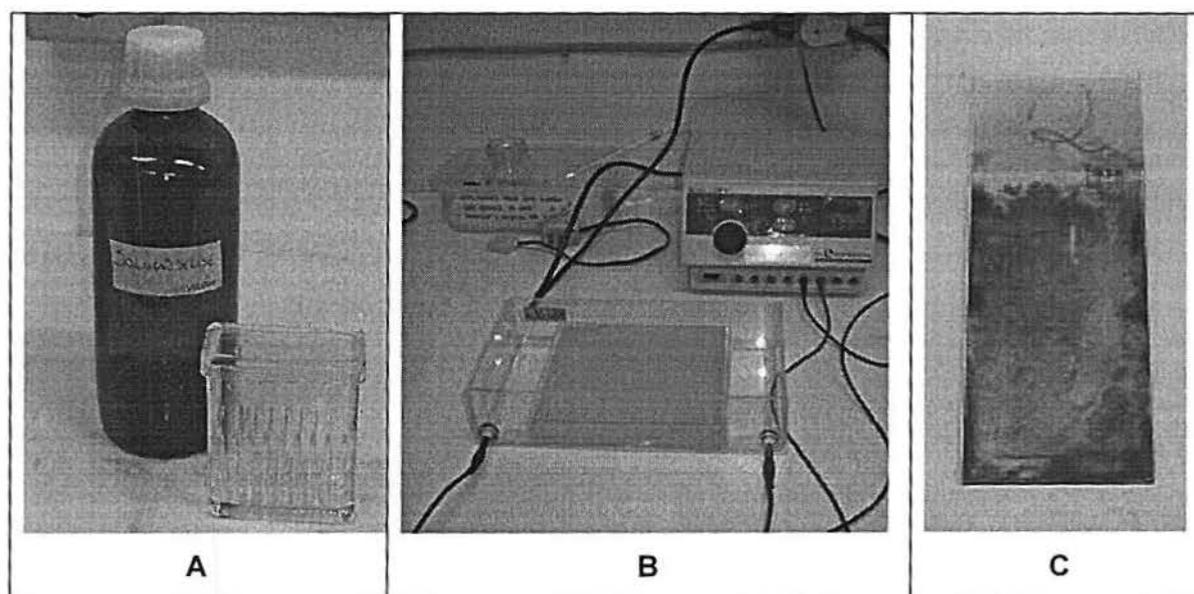


Figura 10. Lise das células (A); eletroforese dos núcleos celulares (B); coloração das lâminas com Ag (C)

Depois da Lise, as lâminas foram colocadas numa unidade de eletroforese horizontal, coberta com solução tampão (300 M NaOH, 1 M EDTA, pH 13.0) por 20

minutos a 4°C para que o DNA se desenrole. A eletroforese foi realizada por 20 minutos a 25V (300mA). Todos os passos acima foram feitos sob luz amarela ou no escuro para prevenir danos adicionais ao DNA. A seguir, as lâminas foram neutralizadas (0.4M Tris, pH 7.5), lavadas em água bidestilada e coradas segundo protocolo padrão de coloração com prata. Após secar durante uma noite, em temperatura ambiente, os géis foram analisados usando microscópio ótico.

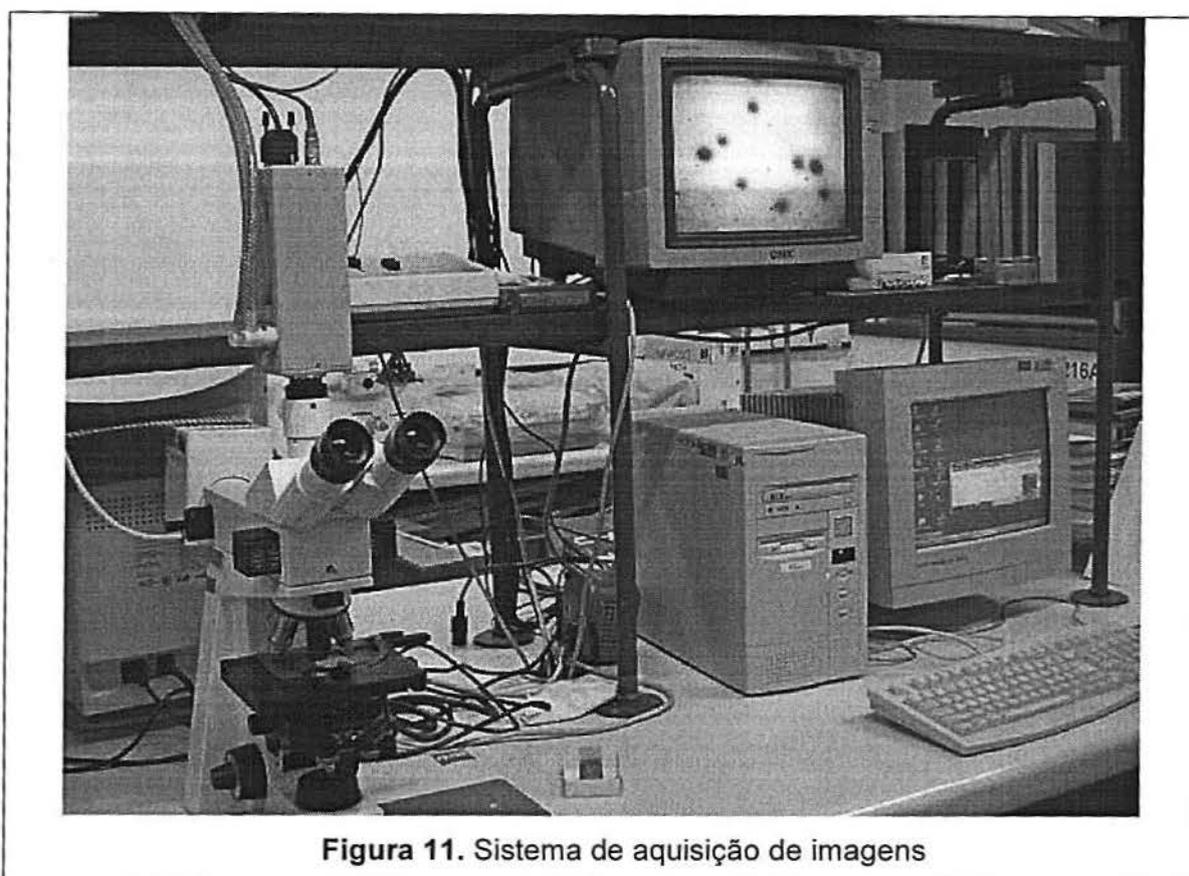


Figura 11. Sistema de aquisição de imagens

Para cada momento do experimento, quais sejam, para o teste de vácuo e para a irradiação das células com partículas carregadas, foram preparadas duas lâminas. A escolha do local de análise dentro da lâmina é aleatória, evitando-se as beiradas. Para a análise estatística dos dados obtidos na observação microscópica, foi utilizado o programa Prisma 4 (Anova One Way Tukey Multiple Comparisons Test).

Os resultados da análise dos dados obtidos após visualização microscópica estão representados na Figura 13 e Figura 14, a seguir. O Controle negativo foi realizado com células não irradiadas.

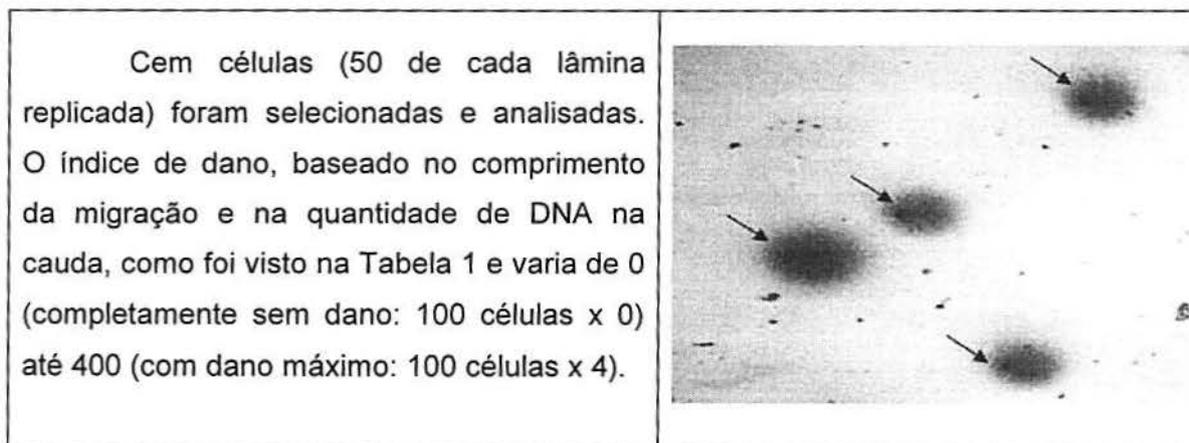


Figura 12. Imagens dos núcleos das células V79 após eletroforese

8 RESULTADOS

Os resultados apresentados na Figura 13 evidenciam:

- o vácuo é tolerado pelas células V79; elas ficam aderidas à placa;
- o teste ao vácuo não produz danos significativos no DNA;
- a irradiação com prótons e com partículas α são altamente lesivas, geram grande número de quebras duplas na fita de DNA;
- os danos apresentados na maioria dos núcleos das células V79, evidenciados através do ensaio cometa, são da classe 4;

Todavia, evidenciou-se que a dose utilizada no Implantador de Íons mostrou-se altamente deletéria, ainda que tenham sido escolhidas as mínimas condições de fluxo produzidas pelo equipamento.

Por outro lado, as experiências mostraram que a escolha das células V79 para irradiação com partículas carregadas foi correta; elas apresentam pouco citoplasma na

direção do feixe de irradiação e suportam bem as condições exigidas no Implantador Iônico.

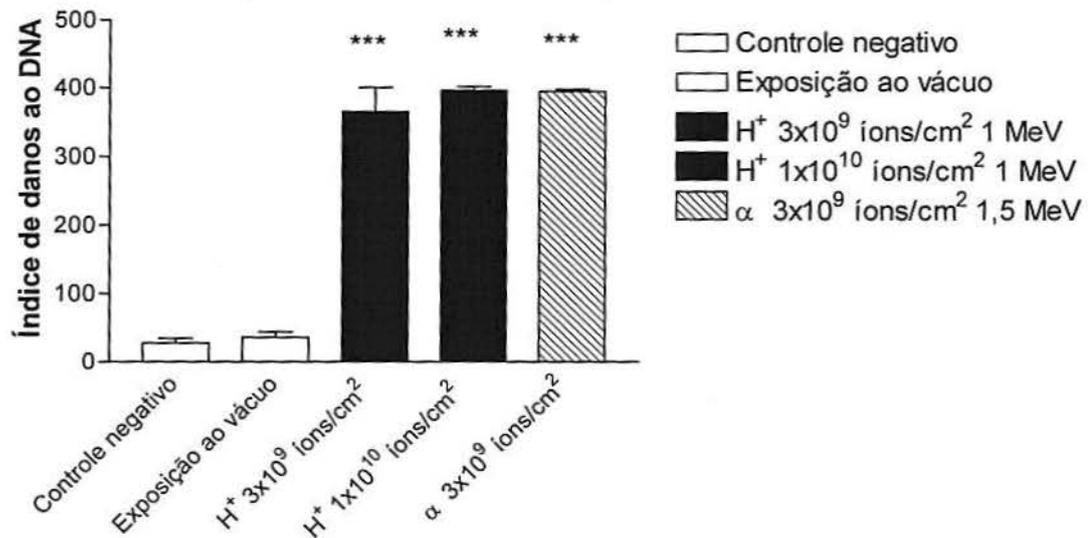


Figura 13. Índice de danos ao DNA nas células V79 submetidas ao vácuo e irradiação

Comparando-se o índice de dano ao DNA induzido pelas radiações nas experiências realizadas e objeto deste trabalho com o índice de dano ao DNA provocado por diferentes agentes mutagênicos usados rotineiramente no Laboratório de Genotoxicidade do Departamento de Biofísica, verificou-se maior eficiência genotóxica na utilização de agentes físicos aos químicos, como mostra a Figura 14.

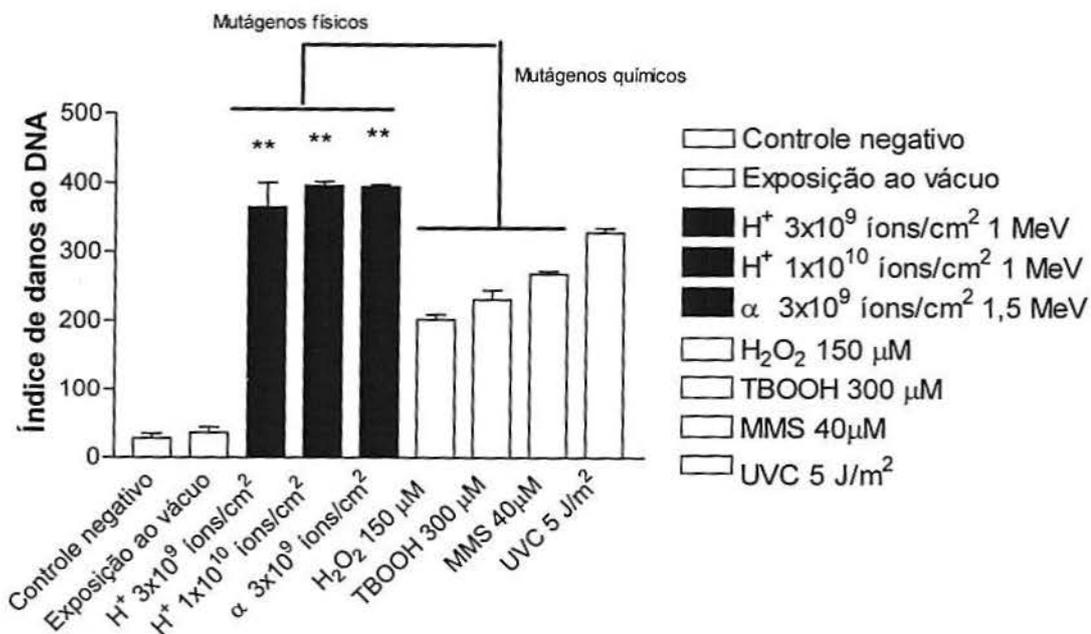


Figura 14. Índice de danos ao DNA nas células V79 submetidas à ação de agentes físicos e químicos

O resultado, conforme indica a Figura 14, despertou o interesse do Laboratório de Genotoxicidade em investigar substâncias radioprotetoras e usar as partículas carregadas como controle positivo em experimentos.

9 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos no experimento, conclui-se que a utilização das células V79 se apresenta como escolha acertada para investigação de irradiação de células com feixes de prótons e partículas α com a finalidade de analisar os efeitos biológicos induzidos.

A dose das radiações utilizadas no Implantador Iônico resultou muito elevada, produzindo danos severos ao DNA das células. É preciso alterar as condições de bombardeamento das células para reduzir os níveis de fluência; com isso serão

produzidos menores danos ao DNA, os quais poderão ser discriminados através do ensaio cometa e, conseqüentemente, poderá ser elaborada curva Dose-Resposta, ou seja, um Dosímetro Biológico.

Por outro lado, os danos provocados por prótons altamente energéticos e partículas alfa justificam a utilização, deste tipo de radiação, para fins de radioterapia seletiva.

A mudança no pH, no qual foi realizado o teste cometa, pode discriminar quebras simples de quebras duplas, permitindo a compreensão mais clara das lesões causadas ao DNA; em complementação a isto, o ensaio de mutagênese poderia avaliar se estes danos são passíveis ou não de reparo.

Ainda, seria interessante investigar a possibilidade de os danos serem detectados por Espectroscopia Micro-Raman, integrando assim mais uma parcela do Instituto de Física ao projeto. A assinatura espectral obtida com Espectroscopia Micro-Raman confocal pode servir como indicativo da quantidade de quebras nas fitas de DNA, já que informação colhida com este método vem de um volume de poucos microns cúbicos^[16], podendo diferenciar dois pontos de análise adjacentes, dependendo da estrutura de cada célula.

A realização deste trabalho permitiu o intercâmbio de estudos interdisciplinares entre laboratórios de pesquisa do Instituto de Física e do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

10 REFERÊNCIAS

- [1] E. Okuno – Radiação: efeitos, riscos e benefícios. Harbra, 1988;
- [2] E. Hall – Radiobiology for the Radiologist. LW&W (2000);
- [3] E.E.Diaz, L.Takimi, E. Ghisolfi - Elaboração de um Dosímetro Biológico . Livro do X Salão de Iniciação Científica, p. 356 (1998);
- [4] W. Martiensen – Radiological Protection. Springer-Verlag (2005);
- [5] H. Nikjoo, R.J.Munson, B.A. Bridges – RBE-LET Relationships in Mutagenesis by Ionizing Radiation. *Journal of Radiation Research*, 40, 85–105 (1999);
- [6] M. Belli, R.Cherubini, M. Dalla Vecchia, V. Dini, G. Esposito, G. Moschini, O.Sapora, C. Signoretti, G. Simone, E. Sorrentino, M. A. Tabocchini - DNA fragmentation in mammalian cells exposed to various light ions. *Adv. Space Res.* 27, 393-399 (2001);
- [7] B. R. Martin – Nuclear and Particle Physics. Wiley (2006);
- [8] E. Rojas, M.C. Lopes, M. Valverde – Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography B*, 722, 225-254 (1999);
- [9] R.R. Tice, M. Hayashi, J.T. MacGregor, D. Anderson, D. Blakey, H.E. Holde, M. Kirsch-Volders, F.B.Jr. Olesen, F. Pacchierotti, R.J. Preston, R. Romagna, H. Shimada, S. Sutov & B. Vannier, Report from working group on the in vivo mammalian bone marrow chromosomal aberration test. *Mutation Research*, 312: 305-312 (1994);
- [10] Villela, I.V.; Oliveira, I.M.; Silva, J. & Henriques, J.A.P., DNA Damage and Repair in Haemolymph Cells of Golden Mussel (*Limnoperna fortunei*) Exposed to Environmental Contaminants. *Mutation Research*, 697: 78-86 (2006);
- [11] R. M. Rosa, J. N. Picada, J. Saffia, J. A. P. Henriques - Cytotoxic, genotoxic, and mutagenic effects of diphenyldiselenide in Chinese hamster lung fibroblasts. *Mutation Research* 628, 87–98 (2007);
- [12] C. M. de Lara, M. A. Hill, T. J. Jenner, D. Papworth and P. O'Neill - Dependence of the Yield of DNA Double-Strand Breaks in Chinese Hamster V79-4 Cells on the Photon Energy of Ultrasoft X Rays. *RADIATION RESEARCH* 155, 440–448 (2001);

- [13] J.A.P.Setti, E.Milhoretto, S.R.Junior, H.R.Schelin, M.C.L.Klock, V.Denyak, R. Rocha, I.Evseev, O.Yevseyeva - Aplicação do Método de Monte Carlo, GEANT 4 e SRIM 2003 no Projeto de um Tomógrafo por Feixe Prótons de Baixa Energia;
- [14] R. P. Bird, N. Rohrig, R. D. Colvett, C. R. Geard, S. A. Marino – Inactivation of synchronized Chinese hamster V79 cells with charged-particle track segments. *Radiation Research* 82, 277-289 (1980);
- [15] N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider - A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.* 175, 184–191 (1988);
- [16] C. M. Krishna, G.D. Sockalingum , G. Kegelaer , S. Rubin, V. B. Kartha, M. Manfait - Micro-Raman spectroscopy of mixed cancer cell populations. *Vibrational Spectroscopy* 38, 95–100 (2005).