Universidade de São Paulo
Instituto de Física

Estudo *in vitro* dos efeitos radiobiológicos no
DNA plasmidial com radiações ionizantes de
baixo LET

Felix Mas Milian

Orientador: Prof. Dr. Airton Deppman

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Airton Deppman	(Orientador - IFUSP)
Prof. Dra. Maria Teresa Moura Lamy	(IFUSP)
Prof. Dra. Rita de Cássia Café Ferreira	(ICB-USP)
Prof. Dr. Odilon Antonio Paula Tavares	(CBPF)
Prof. Dr. Sérgio José Barbosa Duarte	(CBPF)

Tese de doutorado apresentada ao Instituto
de Física para a obtenção do título de
Doutor em Ciências

São Paulo
2006

FICHA CATALOGRÁFICA
Preparada pelo Serviço de Biblioteca e Informação
do Instituto de Física da Universidade de São Paulo

Milian, Felix Mas

Estudo in vitro dos efeitos radiobiológicos no
DNA plamidial com radiações ionizantes de baixo LET.
São Paulo, 2006.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo.
Instituto de Física. Depto. Física Experimental

Orientador: Prof. Dr. Airton Deppman

Área de Concentração: Física Médica

Unitermos:

1.Física experimental; 2. Física Médica; 3. Biofísica;
4. Radiologia.

USP/IF/SBI-060/2006

Dedicatória

Dedico estas páginas a todos los profesores, amigos y familiares que ayudaron en mi educación durante estos veinte y ocho años. Especialmente a mi madre, mi padre y mi hermana, pilares de mi formación y principal fuente de inspiración. A mi sobrino, como un ejemplo de lo que es posible lograr con mucho esfuerzo y un poco de suerte. Y por último, a los cubanos que deseamos la prosperidad de nuestro país y de todas las familias cubanas.

"El deber de un hombre está allí donde es más útil."

José Martí

(Carta a su madre. Montecristi, 25 de marzo de 1895)

Dedico estas páginas a todos os professores, amigos e familiares que ajudaram na minha educação durante estes vinte e oito anos. Especialmente à minha mãe, meu pai e minha irmã, pilares da minha formação e principal fonte de inspiração. A meu sobrinho, como um exemplo do que é possível lograr com muito esforço e um pouco de sorte. E por último, aos cubanos que desejam a prosperidade do nosso país e de todas as famílias cubanas.

"El deber de un hombre está allí donde es más útil."

José Martí

(Carta a sua mãe. Montecristi, 25 de março de 1895)

Agradecimentos

Em primeiro lugar, desejo agradecer a todas aquelas pessoas que me deram a oportunidade de participar deste trabalho: a Oscarito, João, Guzman, às agências brasileiras CNPq e FAPESP e, especialmente, a meu orientador Dr. Airton Deppman pela boa orientação para a realização desta tese.

Agradeço, também, às pessoas que ajudaram e participaram do desenvolvimento do trabalho:

No Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da USP: à professora Dra. Ana Clara Schenberg, Dra. Elizabeth Vicente, Dra. Kazui, Dra. Balan, Dra. Renata, Dr. Gabriel, Dra. Lea, Dr. Ronaldo, Leninha, Norma e aos estudantes, todos que tão amavelmente me receberam e ajudaram durante estes anos. À minha prezada e prestativa Andréia Gouveia, força e alma deste trabalho. E ao Rogério Silva, técnico do irradiador de Césio, por sua paciência e disposição.

No Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, à Elizabeth Somessari e à Célia, responsáveis pelo irradiador de Cobalto 60, por sua excelente atenção e paciência nas dezenas de irradiações. Aos professores Helio, Paulão e Juanito, pela acolhida no frutífero curso de simulação por Monte Carlo.

No instituto de Física: ao professor Dr. Nemitla Added, por seu essencial interesse e participação nas irradiações com prótons, à Eliana, sempre disposta a ajudar, e ao Jorge, pelos proveitosos conselhos.

Desejo agradecer também àquelas pessoas que, com seu bom trabalho e atenção, fazem mais prazenteira a vida dos estudantes no IFUSP: à Tereza, secretária do LAL, à Francisleine Mendez, Éber De Patto Lima e Rodolfo, funcionários da CPG, assim como aos técnicos da oficina mecânica, Carlos e Wilson.

Por último, e não menos importantes, agradeço aos colegas, amigos e seres queridos de Cuba e do Brasil, que me fazem manter sempre o bom humor, a calma, a esperança e os sonhos. Ao Joel, Elaine, César, Dona Cida, Orlando e Fidel, primeiros amigos e família no Brasil. À meus queridos amigos Maritza, Túlio, Kátia e Neivy parceiros no sofrimento e na diversão. À Vicky, pessoa que aprecio muito e que sempre confiou na minha capacidade. Ao meu estimado Fermín e sua família, sempre me estendendo sua mão amiga, ajudando e dando ótimos conselhos. Aos queridos amigos do Coral-USP. A minha querida Ana Maria, que com seu carinho e apoio nestes anos, já é parte inseparável da minha vida. E, finalmente, à minha família e à minha madrinha Cacha, que desde Cuba sempre estiveram comigo.

Resumo

O estudo da interação da radiação com moléculas de DNA tem se intensificado nos últimos anos, determinando avanços nas técnicas experimentais e na compreensão teórica desse fenômeno. No entanto, falta ainda um estudo sistemático e com boa precisão da interação de diferentes radiações com o DNA em condições controladas.

Neste trabalho desenvolveu-se uma técnica experimental que permite o estudo daquela interação com diferentes radiações, permitindo uma análise quantitativa dos efeitos da radiação sobre o DNA, mais especificamente, da produção de *single-* e *double-strand breaks* em moléculas de DNA plasmidial irradiados em solução aquosa com diferentes concentrações de *scavengers*.

Para o desenvolvimento desse trabalho, foram realizados diversos testes para encontrar as condições ideais para se reduzir as incertezas na quantificação das diferentes quebras no DNA. Desenvolveu-se também um programa computacional que permite uma análise precisa da imagem da eletroforese, que oferece ferramentas úteis para a análise quantitativa. Com isso, reduziram-se as incertezas e flutuações experimentais, o que permitiu o estudo da interação radiação-DNA em condições de concentrações de *scavengers* muito baixas.

Os resultados são compatíveis com os dados experimentais, nas condições onde estes já existiam, e compatíveis com o esperado teoricamente nas condições onde não existem dados experimentais para a comparação.

Abstract

The interaction of radiation with DNA molecules has been intensively studied in the last years, allowing improvements on the experimental techniques and on the theoretical comprehension of the phenomena involved in that interaction under controlled conditions. In this work, a new experimental technique has been developed which enables one to study the radiation-DNA interaction for different radiations and with reduced uncertainties, allowing a quantitative analysis of single- and double-strand breaks on DNA in aqueous solutions with different scavenger concentrations.

To this end, many experimental tests were performed in order to find the best experimental condition for reducing the uncertainties. A software was developed for quantitative analysis of the electrophoresis image, offering the most important tools for accurate quantification of the DNA products. An important reduction on uncertainties was achieved, allowing the extension of experimental studies to the low scavenger concentration region.

The results are in good agreement with experimental data at those conditions where these experiments were already performed, and in agreement with the theoretical model where there are no experimental results to compare with.

SUMÁRIO

PARTE I. O TEMA.	Pág.
INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 2. ESTADO DA ARTE.	6
2.1 Irradiação de DNA <i>in vitro</i>	6
CAPÍTULO 3. OBJETIVOS.	16
3.1 Objetivo geral.....	16
3.2 Objetivos específicos	16
 PARTE II. METODOLOGIA	
CAPÍTULO 4. FUNDAMENTOS TEÓRICOS.	17
4.1 Interação das radiações ionizantes com a matéria.....	17
4.1.1 Radiação indiretamente ionizante.....	17
4.1.2 Radiação diretamente ionizante.....	21
4.1.3 Deposição macroscópica de energia. Dose e LET.	24
4.2 Interação das radiações com meio biológico	26
4.2.1 Estrutura do DNA.....	26
4.2.2 Conformações do DNA	28
4.2.3 Classificação dos danos no DNA	29
4.2.4 Mecanismos de interação com o DNA	31
4.2.6 Escala de tempo.....	34
4.2.7 Captadores de radicais (<i>scavengers</i>)	35
4.3 Quantificação dos danos no DNA.....	37
4.3.1 DNA plasmideal	37
4.3.2 Gel de eletroforese.....	38
4.4 Análise dos danos e cálculo dos rendimentos de SSB e DSB.....	40
4.4.1 Equação geral para Teoria de Evento e Alvo (<i>Hit and Target Theory</i>)	40
4.4.2 Rendimento de quebras simples (G(SSB)).	41
4.4.3 Rendimento de quebras duplas (G(DSB)).	42
CAPÍTULO 5. MATERIAIS E MÉTODOS.	44
5.1 Cultivo, extração e purificação do DNA.	44
5.2 Otimização da técnica de eletroforese em gel de agarose.....	45
5.2.1 Materiais e métodos utilizados no estudo.....	46
5.3 Efeito das frações iniciais de DNA SC e Cir nos G(SSB) e G(DSB)	46
5.3.1 Preparação das amostras.....	47

5.3.2 Irradiação das amostras	48
5.3.2 Gel de eletroforese e quantificação	49
5.4 G(SSB) e G(DSB) para irradiações de DNA com gama de ^{60}Co	49
5.4.1 Preparação das amostras.....	50
5.4.2 Irradiação das amostras	52
5.4.3 Géis de eletroforese e quantificação	53
5.5 G(SSB) e G(DSB) para irradiações de DNA com gama de ^{137}Cs	54
5.5.1 Preparação das amostras.....	54
5.5.2 Irradiação das amostras	55
5.5.3 Géis de eletroforese e quantificação	57
5.6 G(SSB) e G(DSB) para irradiações de DNA com prótons de 10 MeV.	57
5.6.1 Preparação das amostras.....	58
5.6.2 Arranjo experimental e cálculo da dose	58
5.6.3 Irradiação das amostras	61
5.6.4 Géis de eletroforese e quantificação	62

PARTE III. RESULTADOS

CAPÍTULO 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
6.1 Resultados da otimização da técnica de eletroforese em gel de agarose	63
6.1.1 Quantificação das bandas de DNA.....	63
6.1.2 Efeito do Brometo de Etídio.....	64
6.1.3 Efeito da concentração de agarose	65
6.1.4 Efeito da quantidade de DNA aplicada por poço do gel.	66
6.1.5 Determinação do melhor número de integrações	67
6.1.6 Metodologia final otimizada. Discussão	68
6.2 Efeito das frações iniciais de DNA SC e Cir nos rendimentos de SSB e DSB. Resultados e discussão	69
6.2.1 Géis de eletroforese e resultados da quantificação.	69
6.2.2 Análise e discussão dos efeitos do DNA Cir inicial sobre o G(SSB).	71
6.2.2 Análise e discussão dos efeitos do DNA Cir inicial sobre o G(DSB).	73
6.3 Quantificação de danos em amostras irradiadas com gama de ^{60}Co	75
6.3.1 Géis e resultados da quantificação das amostras com 10 ng/μl de DNA.	76
6.3.2 Géis e resultados da quantificação das amostras com 50 ng/μl de DNA.	78
6.3.3 Géis e resultados da quantificação das amostras com 200 ng/μl de DNA.	80
6.3.4 Géis e resultados da quantificação das amostras com 500 ng/μl de DNA.	82
6.4 Determinação de G(SSB) e G(DSB) para irradiação com gama de ^{60}Co	84
6.4.1 G(SSB) e G(DSB) para amostras com 10 ng/μl de DNA.....	84

6.4.2 G(SSB) e G(DSB) para amostras com 50 ng/μl de DNA.....	85
6.4.3 G(SSB) e G(DSB) para amostras com 200 ng/μl de DNA.....	86
6.4.4 G(SSB) e G(DSB) para amostras com 500ng/μl de DNA.....	88
6.4.5 Análise e discussão dos efeitos da concentração de DNA e de scavenger na produção de SSB e DSB.....	89
6.5 Quantificação de danos em amostras irradiados com gama de ¹³⁷ Cs.	93
6.6 Determinação de G(SSB) e G(DSB) para irradiação com gama de ¹³⁷ Cs.	97
6.7 Quantificação de danos em amostras irradiadas com prótons de 10 MeV.....	100
6.8 Determinação de G(SSB) e G(DSB) para irradiações com prótons.	104
6.9 Comparação de G(SSB) e G(DSB) gerados pela gama de ⁶⁰ Co, ¹³⁷ Cs e prótons.	106
CAPÍTULO 7. CONCLUSÕES	111
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	114
APÊNDICES	119
APÊNDICE 1 Programa GelAnalis. Descrição.	120
APÊNDICE 2. Estimação do fator de correção para o Brometo de Etídio.	127
APÊNDICE 3. Região e equação de ajuste para o cálculo de G(DSB)	129
APÊNDICE 4. Simulação do Irradiador de gama de Cobalto 60.	133
APÊNDICE 5. Reagentes e soluções utilizadas no trabalho.	149

1. INTRODUÇÃO

Desde o descobrimento das radiações ionizantes, há mais de um século, os campos de estudo e aplicação das mesmas têm se desenvolvido enormemente. Tal é o caso da Radiobiologia. Uma vez conhecida a alta capacidade de penetração da radiação de baixo poder de ionização, esta começou a ser amplamente utilizada nos diagnósticos médicos. Por outro lado, por causa do efeito deletério que altas doses podem causar sobre os tecidos vivos, as radiações são também utilizadas na Radioterapia e na Medicina Nuclear para o tratamento de tumores. Nestes tratamentos, a radiação interage com o tumor, destruindo as células malignas ou impedindo que cresçam e se reproduzam, mas esta ação pode ser exercida também sobre os tecidos sadios afetados durante o tratamento. Porém, os trabalhos científicos têm demonstrado que os tecidos tumorais são mais sensíveis à radiação, já que estes não conseguem reparar os danos produzidos de forma tão eficiente quanto nos tecidos normais, de forma que terminam sendo destruído e bloqueado seu ciclo celular. Fenômenos como estes têm sido objetos de estudo da Radiobiologia durante os últimos 50 anos.

Outro importante fenômeno que tem sido amplamente estudado são os efeitos nos tecidos das radiações ionizantes com diferente Transferência Linear de Energia (LET). É conhecido que, com o aumento do LET da partícula incidente, a eficiência biológica relativa (RBE) aumenta até um ponto máximo, e depois começa a decair. Isto demonstrou a existência de um volume sensível nas células dos tecidos o qual, uma vez atingido na totalidade, o efeito da radiação não varia com o incremento do número de danos por unidade de volume que a radiação pode gerar.

Os avanços tecnológicos do século passado permitiram o estudo detalhado dos componentes celulares e o descobrimento da composição e conformação dos cromossomos presentes no núcleo celular. Estes avanços também se refletiram nos estudos da Radiobiologia que conseguiram chegar até níveis de complexidade cada vez mais baixos para o estudo da interação da radiação com os seres vivos.

As pesquisas em Radiobiologia demonstraram que o DNA representa o alvo biológico mais sensível dentro da célula. O DNA é encarregado de portar a informação genética necessária para o controle do metabolismo da reprodução celular. Danos produzidos nele podem gerar mutações em novas gerações de células ou simplesmente provocar a

morte celular. É por causa disto que o estudo em detalhe do dano das radiações sobre o DNA é de enorme importância.

Ainda hoje, os mecanismos presentes na interação da radiação ionizante com essa molécula não são completamente conhecidos. Por isto, um grande número de experimentos e simulações estão sendo realizados com o objetivo de definir com maior exatidão os processos presentes nesta interação.

Muitos destes estudos são feitos com DNA *in vitro*, fora do ambiente celular. Estes permitem determinar os processos envolvidos na indução de dano num nível mais simples, em ambiente controlado, e sem a presença de mecanismos de reparo. Nestes trabalhos são utilizados cromossomos e DNA plasmidial. Destes, o DNA plasmidial, conformado só por milhares de pares de bases, sem presença de histonas ou outras estruturas, representam a molécula de mais baixo nível de complexidade para os estudos dos efeitos radiobiológicos.

O dano produzido pela radiação ionizante na molécula de DNA *in vitro* pode ser de diferentes tipos. Estes diferem pela origem, complexidade e seu efeito biológico. O dano da radiação pode acontecer tanto pela ionização direta do DNA ou pelo ataque de radicais criados na radiólise da água ao redor dele. Entre os principais tipos de danos no DNA estão as quebras simples e duplas nas cadeias, e os sítios de múltiplos danos locais (LMDS, *locally multiple damage sites*).

As SSBs (*single strand break*) ou quebra simples da cadeia, representa a ruptura da continuidade em uma das duas cadeias que conformam a estrutura do DNA. Produzidas isoladamente, estas podem ser reparadas satisfatoriamente por mecanismos intracelulares, e não modificam muito a estrutura helicoidal do DNA. De forma geral, as SSBs não conduzem diretamente à morte celular.

As quebras duplas (DSB, *double strand break*) são representadas por duas SSBs opostas localizadas em cada uma das duas cadeias que conformam o DNA. Estas podem ficar separadas até 10 pares de bases uma da outra. Estes danos são mais difíceis de reparar que as SSBs. Quando sua reparação é defeituosa esta pode gerar mutações, e nos casos em que não são reparadas podem provocar a morte celular. As quebras duplas apresentam um efeito biológico grande.

O termo LMDS foi introduzido por Ward (1994) para referir-se a duas ou mais lesões pouco espaçadas dentro de duas voltas helicoidais em cadeias opostas do DNA. Mencionadas também como *clustered damage*, elas possuem uma estreita vinculação com o número de ionizações geradas no trajeto da radiação pelo meio e, portanto com a

transferência linear de energia, LET (*Lineal Energy Transfer*) da radiação [Goodhead, 1994]. Por causa da sua grande complexidade e severidade, estas são muito difíceis de reparar e representam o pior dano que a radiação pode provocar. O efeito biológico da LMDS é maior que o da DSB [Goodhead, 1995].

Nos últimos trinta anos, diferentes técnicas de análise de danos em DNA *in vitro* têm permitido realizar um grande número de estudos sobre a produção de SSB e DSB no DNA pela radiação ionizante. De forma experimental, a única LMDS que é possível detectar com precisão é a DSB. Porém novos métodos utilizando enzimas e programas de simulação estão permitindo a estimativa dos danos múltiplos LMDS.

Os resultados obtidos com as irradiações de DNA *in vitro* refletem muitos dos comportamentos encontrados com a irradiação das células e tecidos. Tal é o caso do efeito causado nos tecidos pelo incremento da dose depositada pela radiação incidente. Em irradiações com células encontrou-se que este aumento incrementava a morte celular. Em irradiações com DNA, o aumento da dose provoca o aumento do número de SSB e DSB por molécula de DNA, aumentando com isto a probabilidade de apresentar danos irreparáveis que podem causar a morte celular.

Outro efeito observado com as irradiações de células está vinculado ao LET da partícula incidente. Para doses iguais, as partículas de maior LET provocam uma maior morte celular. Nos trabalhos com DNA *in vitro*, foi encontrado que as radiações de alto LET produzem uma densidade de ionização ao longo da sua trajetória muito maior que as de baixo LET. Desta forma, os danos gerados com alto LET estarão mais concentrados ao redor da trajetória da partícula incidente, causando com isto danos do tipo LMDS que são muito difíceis de reparar. Porém os danos das radiações de baixo LET são mais dispersos pelo DNA e têm uma probabilidade maior de serem reparados. Isto explicaria a diferença entre os efeitos das radiações de baixo e alto LET.

Esta dependência do efeito biológico com o LET foi levada em conta na dosimetria das radiações com a introdução dos chamados fatores de qualidade utilizados na definição de dose equivalente. No final, a dose equivalente recebida é resultado da multiplicação da dose depositada pelo fator de qualidade da radiação. Para radiações com LET menores ou iguais a 3.5 keV/μm este fator é igual à unidade, podendo chegar até 20 para radiações com mais de 175 keV/μm. Isso indica que, na dosimetria, radiações com baixo LET, como são os raios-X e radiação gama, possuem os mesmos efeitos biológicos para as mesmas condições de exposição, e só dependerão da dose depositada.

Uma divergência com respeito a esta afirmação tem sido levantada recentemente, e será introduzida a seguir.

Durante a última década, vários trabalhos com DNA *in vitro* têm tentado quantificar a dependência das quebras com respeito ao LET. Na maioria deles, os estudos comparam os danos gerados por uma radiação de baixo LET, provenientes de fontes de raios-X, gama de ^{60}Co ou de ^{137}Cs , com irradiações com partículas alfa e íons de diferentes energias obtidos em aceleradores. Porém, em nenhum deles, é feita uma comparação quantitativamente rigorosa dos efeitos das radiações gama de baixo LET.

Geralmente, as condições de irradiação, o tipo de DNA e a metodologia utilizada por cada grupo de trabalho são diferentes uma das outras. Portanto, muitos dos resultados encontrados apresentam divergências relacionadas a diferenças nas técnicas experimentais. Até recentemente, as possíveis diferenças entre esses resultados de irradiações com gama não foram levados em conta e seus efeitos foram considerados equivalentes. Com o passar do tempo, os novos desenvolvimentos tecnológicos têm melhorado e produzido ferramentas e metodologias que têm diminuído os erros associados nestes tipos de experimentos. Por isso, ainda hoje, múltiplas experiências continuam sendo realizadas para quantificar com precisão a dependência dos danos no DNA com o LET da partícula incidente.

Num trabalho recente, foi realizado pela primeira vez uma quantificação do efeito radiobiológico em DNA *in vitro* entre gamas de fontes de ^{60}Co e ^{137}Cs , e prótons de baixo LET de forma simultânea, com as mesmas condições experimentais [Leloup, 2005]. Neste trabalho, foi encontrada uma diferença entre os efeitos destes três tipos de radiação que coloca em dúvida as considerações atuais para o cálculo da RBE e dose equivalente das radiações com baixo LET, segundo a qual o efeito da radiação gama de ^{60}Co e ^{137}Cs é considerado equivalente. Os resultados mostraram que as irradiações com gama de ^{137}Cs geraram um maior número de SSB e DSB que as irradiações com ^{60}Co . Os autores sugerem que esta diferença pode ser causa de diferenças nos espectros de energias dos elétrons secundários gerados por cada irradiação, mas apontam a necessidade de maiores estudos dedicados ao tema.

Levando em conta a importância e o interesse para a Radiobiologia que representam a análise e a quantificação dos danos no DNA *in vitro* com irradiações de baixo LET, foi desenvolvido no presente trabalho, um conjunto de experimentos com irradiação de DNA plasmidial com radiação gama de ^{60}Co , ^{137}Cs e prótons de 10 MeV em diferentes condições. Neste trabalho, todo o DNA utilizado foi preparado, irradiado, e analisado

com os mesmos métodos e procedimentos experimentais. Também foi utilizada uma técnica de purificação de DNA que visou diminuir a presença de impurezas nas amostras, melhorando a exatidão dos resultados. Nosso trabalho apresenta também uma discussão sobre os métodos de quantificação e as mais prováveis fontes de erros na quantificação das DSB.

A estrutura geral do trabalho foi dividida em três partes: ‘O TEMA’, ‘METODOLOGIA’ e ‘RESULTADOS’.

Na primeira parte, ‘O TEMA’, é descrito no capítulo dois o Estado da Arte sobre o problema proposto. Nele são mostrados os principais trabalhos realizados na área. A seguir, no capítulo três, são apresentados os objetivos do trabalho.

Na segunda parte, ‘METODOLOGIA’, expõe-se a teoria e a metodologia desenvolvida para o estudo. Para isto, no capítulo quatro, são introduzidos os fundamentos teóricos necessários para a compreensão do trabalho e no capítulo cinco, são detalhados os materiais e métodos utilizados.

Na terceira parte, ‘RESULTADOS’, são mostrados e discutidos os resultados do trabalho. De forma que, no capítulo seis, são descritos e discutidos os dados obtidos nas irradiações com gama de ^{60}Co , gama de ^{137}Cs e prótons. As conclusões finais do trabalho são apresentadas no capítulo sete.

Finalmente, nos apêndices, são incluídos alguns importantes trabalhos e resultados complementares necessários para o desenvolvimento da pesquisa, e que se colocados no texto principal, poderiam desviar a atenção do objetivo principal.

CAPÍTULO 2. ESTADO DA ARTE.

2.1 Irradiação *in vitro* de DNA

A irradiação *in vitro* de DNA é uma metodologia amplamente utilizada para o estudo dos mecanismos de produção de danos biológicos nos seres vivos. Uma vez demonstrado que o DNA representa o alvo mais importante dentro da célula, numerosos estudos começaram a ser realizados neste campo. Os principais objetivos destes trabalhos foram determinar e quantificar os processos presentes na produção de danos no DNA pela radiação, sua eficiência de reparação e os efeitos que isto gera nas células.

No início, os trabalhos estudaram a radioquímica do processo de interação das radiações com o DNA. Uma vez isolado de células ou vírus, o DNA, marcado com carbono 14 ou outros elementos, era irradiado em diferentes condições. Os danos eram caracterizados por cromatografia analisando a distribuição e frequência das espécies derivadas das reações químicas com o DNA [Teoule et al. 1974, Dizdaroglu et al. 1975 e 1976, Stelter et al. 1975, Lafleur et al., 1975, Ryznar et al. 1975, Hissung et al. 1978, Ward et al. 1978]. Estes trabalhos apresentaram importantes avanços na compreensão e determinação dos processos químicos durante a radiólise do DNA.

Outros trabalhos dirigiram os esforços no estudo da dependência da produção de quebras simples e duplas no DNA em função da dose e sua relação com a inativação das células [Block et al. 1973, van der Schans 1973 e 1978, Lafleur et al. 1979]. Nestes estudos foram utilizados DNA de bacteriófagos, que modificam sua forma de acordo com tipo de quebra produzido pela radiação. Nestes trabalhos foi mostrado que o plasmídeo de DNA, inicialmente em forma circular superenovelado passa à forma circular relaxado com a indução de uma SSB, enquanto que a geração DSB, tanto na molécula circular superenovelada como na circular relaxada, leva o plasmídeo de DNA à forma linear [van der Schans 1969, 1973 e 1978]. Estes primeiros trabalhos foram realizados analisando os plasmídeos de DNA irradiado em gradientes de sacarose. Porém, a centrifugação em gradientes de sacarose mostrou um baixo poder de separação, especialmente para o DNA em forma circular relaxada e linear. Isto fez com que inicialmente só fossem quantificados os rendimentos de quebras relacionados com o DNA circular superenovelado.

Com a introdução da técnica de eletroforese em gel de agarose nos estudos de interação da radiação com o DNA, foi possível a separação dos plasmídeos de DNA em circular relaxado e linear e, portanto, a análise das quebras duplas em função da dose. Duas

técnicas eram utilizadas para a quantificação dos plasmídeos de DNA no gel: a espectrometria e fluorescência do corante Brometo de Etídio. Na espectrometria, a região do gel com as três conformações de DNA era escaneada com luz UV de 260 nm e 310 nm. O padrão a 260 nm indicava a presença de DNA e o padrão de 310 nm era considerado como fundo. Subtraindo um do outro era possível quantificar as frações das moléculas em cada forma [Provrik et al. 1977, Chiu and Oleinick 1980, van Touw et al. 1985, Yamamoto et al. 1985]. O principal problema desta técnica eram os altos níveis de fundo que apresentavam. Na técnica de eletroforese com Brometo de Etídio, uma câmara fotográfica capta a fluorescência do Brometo de Etídio ligado ao DNA submetido à luz UV de 254 nm. Neste caso os níveis de fundo são muito menores, porém existia o inconveniente da dependência da ligação do Brometo com a forma do DNA [Lloyd et al. 1978, Hempel and Mildener 1987]. No entanto, a introdução desta técnica melhorou muito a detecção de SSB e permitiu a estimativa da probabilidade de indução de DSB.

Neste período, diferentes modelos tentaram descrever de forma matemática ou estatística os padrões encontrados de quebras em função de dose e seus efeitos nas células [Freifelder and Trumbo 1969, Block and Loman 1973, van der Schans 1978, van Touw 1985, Cowan et al. 1987, 1990, Mark 1989]. Porém, nestes modelos, não foram considerados os danos complexos que a radiação podia causar no DNA intracelular. Em vários trabalhos, Ward e Goodhead sugeriram a existência de mecanismos que provocariam danos complexos no DNA (LMDS, conhecido também como *clustered damage*). Estes seriam gerados pelo ataque múltiplo numa região do DNA de radicais derivados da radiólise da água [Ward 1981, 1985, 1988, 1994a, 1994b, Goodhead 1994, 1995]. Estes trabalhos evidenciaram uma possível relação entre a produção de LMDS, o LET da radiação, a capacidade de *scavenger* da solução e seus efeitos biológicos. Os danos complexos deveriam ser mais difíceis de serem reparados e provocariam mutações genéticas ou a morte celular. Radiações de alto LET deveriam gerar uma maior densidade de radicais ao longo da sua trajetória aumentando a probabilidade de produção de DSB e LMDS [Goodhead 1994, 1995]. Da mesma forma, o aumento da capacidade de captura de radicais ao redor do DNA (*scavenging capacity*) deveria diminuir a produção dos danos no DNA.

Estas considerações provocaram a realização de numerosos experimentos de irradiação de DNA em diversas condições a partir da década de noventa. O objetivo principal era a quantificação das SSB e DSB em função das características do DNA, tipo de radiação incidente e propriedades do meio.

Entre os trabalhos mais relevantes está o estudo comparativo de irradiação de DNA com nêutrons rápidos e gama, feito por Spothem-Maurizot [Spotheim-Maurizot et al. 1990] no qual começam a ser mostradas e quantificadas as diferenças nos mecanismos de produção de quebras por radiações de diferentes LET. Ao mesmo tempo, Roots [Roots et al. 1990], fez uma extensa revisão sobre a formação de quebras induzidas por feixes de partículas altamente ionizantes (alto LET). O objetivo era comparar a produção de quebras em DNA *in vitro* (minicromossomos) com as geradas no DNA celular. No estudo foram feitas irradiações com núcleos de baixa energia que cobriam um espectro de Z desde o Helio até o Urânio (LET de 16 keV/um até 1.6E5 keV/um). Estes foram comparados com irradiações de baixo LET feitas com raios-X e raios gama de ^{60}Co . Os resultados de produção de quebras em função do LET mostraram que também dependem do tipo de núcleo utilizado e que diminuía com o aumento do LET para cada íon. Isto indicava que o LET não poderia ser o único parâmetro para caracterizar a produção de quebras no DNA. Outra revisão mais extensa sobre este assunto foi feita anos depois por Taucher-Scholz e Kraft [Taucher-Scholz and Kraft 1999], que utilizaram também partículas altamente energéticas para irradiar plasmídeos de DNA em solução aquosa. Estes autores compilaram uma extensa base de dados sobre a produção de SSB e DSB em função da qualidade da radiação. O trabalho cobriu a faixa de LET entre 5 a 16000 keV/ μm , utilizando diferentes partículas (desde Helio até Urânio). Os resultados mostraram que a produção dos danos depende da densidade dos eventos de ionização no caminho da partícula, o que pode favorecer a produção de DSB, mas também as reações de recombinação dos radicais. Outro fenômeno importante é a dependência com a velocidade da partícula. Para íons altamente pesados, as seções de choque de produção de SSB e DSB diminuía com a velocidade para partículas com um mesmo LET. Estes trabalhos mostram grande dependência da produção das quebras do padrão de ionização gerado no caminho da radiação no meio aquoso.

Como mencionado no parágrafo anterior, na análise teórica da interação da radiação com o DNA foram introduzidas técnicas de Monte Carlo para simular a produção dos eventos físicos e químicos presentes na ionização dos meios aquosos ao longo do caminho das partículas e seu efeito sobre o DNA. Diversos códigos de simulação foram gerados para a modelação desta interação, como indicado na tabela 2.1 [Nikjoo et al. 2001].

Tabela 2.1 Códigos de simulação de transporte de radiações em radiobiologia [Nikjoo et al. 2001]

Código	Meio	Partícula	Energia	Referencia
ATRACK	todos	e- & íons	até GeV	Buttd and Katz 1967
MOCA8	água (v, l)	e-	10eV-100keV	Paretzke 1987
OREC	água (l)	e-	10eV- 1 MeV	Turner et al. 1983
STBRGEN	água (l)	p, alfa	0.3-4 MeV/u	Chatterjee and Holley 1993
		e-	0.1-2 keV	
		íons	0.3- GeV	
CPA100	água (l)	e-	10eV-100 keV	Terrissol and Beaudre 1990
DELTA	água (v, l)	e-	10eV -100 keV	Zaider et al. 1983
		p, alfa	0.3-4 MeV	
ETRACK	água (v)	e-	10eV-10 keV	Ito 1987
TRION	água (v, l)	e-	10eV-1 MeV	Lappa et al. 1993
		p, alfa	0.3- 4 MeV	
KURBUC	água (v)	e-	10 eV-10 MeV	Uehara et al. 1993
TRACEL	água (v, l)	e-	10 eV-1 MeV	Tomita et al. 1997
PARTRAC	água (v, l)	e-, p & íons	0.3-GeV	Dingfelder et al. 1998
MOCA14	água (v)	p & alfa	0.3- 4 MeV	Wilson and Nikjoo 1981
PITS	Biológico	íons	0.3-GeV, MeV/u	Wilson and Nikjoo 2000
LEPHIST	Água	p	1keV-1MeV	Uehara et al. 2001

Alguns dos códigos anteriores foram adaptados para o estudo da produção de quebras no DNA. Tais são os casos dos códigos: ATRACK, PITS (derivado da série MOCA) e PARTRAC. Cada um utiliza diferentes métodos e modelagens do DNA. Dentro deles um dos mais utilizados é o código PARTRAC, que tem sido amplamente implementado nos últimos anos para o estudo da interação com o DNA [Friendland et al. 1995, 1997, 1998, 1999, 2002, 2003, 2005]. Este código possibilita a simulação do transporte de elétrons, fótons, prótons e íons em células e quantificar os prováveis danos diretos e indiretos no DNA. Esse código incorpora um modelo realista do DNA no nível atômico, conseguindo descrever completamente o genoma celular. No entanto, os parâmetros que são utilizados neste e em outros códigos são ajustados a dados experimentais obtidos de irradiações de DNA e células com radiação gama. Para isto, o PARTRAC trabalha com três níveis diferentes de organização do DNA. Estes são: DNA linear (plasmídeos), minicromossomos (SV40) e cromatina compacta (DNA celular). Os resultados encontrados com este código descrevem relativamente bem os dados experimentais de irradiação com gama destes três tipos de DNA, apesar das oscilações que os dados apresentam [Vavolta et al. 2003].

Paralelamente ao desenvolvimento destes códigos, os estudos experimentais continuam obtendo diversos dados sobre a interação das radiações ionizantes com o DNA em

diferentes condições. Estes resultados são continuamente utilizados para o ajuste e comparação destes códigos de simulação. Entre estes experimentos, existe uma linha que estuda os efeitos das radiações sobre o DNA plasmidial. A principal diferença do DNA plasmidial com respeito ao DNA minicromossomal está na estrutura no nível molecular. O plasmídeo representa uma estrutura mais simples e pequena, sem a presença de histonas. Isto faz com que o DNA plasmidial seja mais sensível aos efeitos da radiação [Vavolta et al. 2003].

Diversos trabalhos têm estudado os rendimentos de produção de quebras simples e duplas, G(SSB) e G(DSB), em DNA plasmidial com diferentes tipos de plasmídeos, radiações e capacidade de captar radicais livres (capacidade de *scavenging*). A partir dos anos noventa, uma grande quantidade de dados obtidos com irradiações de DNA plasmidial e minicromossomal, irradiados com gama de ^{137}Cs e núcleos de Hélio, foram relatados pelo grupo de Milligan [Milligan et al. 1993a, 1993b, 1996a, 1996b, Jones et al. 1993, 1994]. Nestes trabalhos, foram estudadas principalmente duas dependências: uma relacionando os rendimentos de quebras do DNA *in vitro* com a concentração e o tipo de plasmídeo utilizado, e a outra caracterizando o efeito do tipo de *scavenger* utilizado e sua capacidade de *scavenging* na solução (concentração) sobre a produção de quebras no DNA. Os resultados obtidos nestes trabalhos foram de extrema importância para a caracterização das constantes de reação do radical hidroxila (*OH) com o DNA. Estes parâmetros foram encontrados aplicando sobre os dados modelos cinéticos não homogêneos e muitos deles são utilizados atualmente nos códigos de simulação mencionados anteriormente. Estes trabalhos apresentaram os primeiros estudos do efeito do LET sobre o DNA plasmidial utilizando γ de ^{137}Cs e núcleo de Hélio, mostrando que inclusive nesse nível de simplicidade da molécula de DNA, a densidade de ionização no caminho da partícula incidente pode ter uma influência muito importante.

Outros autores também utilizaram o DNA plasmidial para seus estudos de interação das radiações com o DNA. Tal é o caso de Klimczak [Klimczak et al. 1993] que mediu os rendimentos do número de SSB e DSB (G(SSB) e G(DSB)) gerados por radiação gama de ^{60}Co em função da concentração de *scavengers* *OH , utilizando misturas de água e álcool. Neste trabalho, observou-se que estes rendimentos eram proporcionais à dose e que as quebras letais diminuía com o aumento da capacidade de *scavenging*. Outros trabalhos estudaram a produção de quebras simples e duplas em plasmídeos induzidos por raios-X do Al_k e partículas alfa [Fulford et al. 2001]. Eles encontraram concordância entre os resultados experimentais e as simulações. Porém, obtiveram uma diferença sistemática

duas ou três vezes maior, para as simulações de DSB com respeito aos dados experimentais.

Uma das principais limitações do trabalho com DNA plasmidial está na sua radiosensibilidade a impurezas presentes no meio. Estas impurezas são introduzidas nos processos de purificação do DNA. Entre estas impurezas estão as substâncias captadoras de radicais, que chamaremos neste trabalho de *scavengers*. A presença de pequenos restos de estas substâncias na solução pode variar a capacidade de *scavenging* do meio e provocar variações nos resultados obtidos. Este fenômeno representa a principal causa pela qual a maioria das irradiações de DNA é feita com capacidades de *scavenging* muito superiores às das possíveis impurezas, dando uma maior estabilidade aos resultados obtidos [Milligan et al. 1993]. Por esta razão, os avanços nas técnicas de purificação e na metodologia de análise dos danos fazem com que os resultados de irradiações de plasmídeos estejam continuamente sendo estudados e melhorados. De forma paralela, vários trabalhos se voltam para o estudo das deficiências do processo de quantificação dos danos por gel de eletroforese para obter melhoras na metodologia [Kusukawa et al. 1999, Shuterland et al. 2001, Miller et al. 2001, White et al. 2001]. As mudanças e cuidados sugeridos por estes grupos permitem aumentar a precisão e confiabilidade dos resultados obtidos.

Atualmente, muitos grupos continuam dirigindo seus esforços ao estudo do efeito de radiações de diferentes LET sobre o DNA plasmidial [Milligan et al. 2001, Brons et al. 2003, Zhao et al. 2003, Cassou et al. 2005, Culard et al. 2005, Konishi et al. 2005]. Muitos deles dedicam-se ao efeito de radiações de alto LET como prótons e partículas alfa por causa da crescente utilização desses tipos de radiações nos tratamentos contra o câncer. Os resultados desses grupos têm sido comparados com os de irradiações de baixo LET para caracterizar diferenças nos danos gerados por cada um deles [Collins et al. 2005, Leloup 2005, Tsoulou et al. 2005, Usami et al. 2005].

Recentemente, foram publicados resultados comparativos de produção de SSB, DSB e *clustered damage* de DNA plasmidial irradiado com partículas de alto e baixo LET [Leloup et al. 2005]. Nesse trabalho foram utilizados prótons de 1.03, 19.3 e 249 MeV (25.5, 2.7, e 0.39 keV/um), núcleo de Helio de 26 MeV (25.5 keV/um) e raios gama de ^{60}Co e ^{137}Cs . Foi utilizado DNA plasmidial em soluções com duas capacidades de *scavenger* diferentes. Este trabalho foi o primeiro a quantificar os efeitos radiobiológicos em DNA plasmidial *in vitro* com radiações gama de ^{60}Co , ^{137}Cs , e prótons de baixo LET. Os resultados mostraram uma diferença entre os danos produzidos pelas diferentes

radiações gama. Em geral, os rendimentos obtidos para as irradiações com ^{60}Co foram menores que para aquelas com ^{137}Cs e com prótons de 249 MeV. A explicação sugerida para este fenômeno foi associada a estrutura dos caminhos destas radiações. O espectro de energia dos elétrons secundários emitidos durante a passagem de cada uma delas pelo meio é diferente, e portanto, os efeitos provocados também são diferentes [Leloup et al. 2005]. Ainda nesse trabalho é discutida a possível consequência desta diferença nos efeitos das radiações gamas de ^{60}Co e ^{137}Cs nos cálculos de RBE. As atuais considerações que são feitas comparando os efeitos dos diferentes raios gama do ^{60}Co e o ^{137}Cs como equivalentes não seriam precisas e, portanto a conclusão foi que este fenômeno deve ser medido mais sistematicamente e caracterizado com uma maior exatidão.

Nas tabelas 2.2 e 2.3 apresentamos uma série de dados de irradiações de plasmídeos encontrados na literatura. Estes foram resultados de estudos que comparavam radiação de alto e baixo LET. Com exceção do trabalho de Leloup e seus colaboradores (2005), os outros trabalhos só realizaram irradiações ou com radiação gama de ^{60}Co ou de ^{137}Cs , uma vez que as incertezas nos métodos não mostravam diferença entre estes tipos de radiações.

Tabela 2.2 Compilação de dados de irradiações de DNA plasmidial com gama de ^{60}Co .

Gama de ^{60}Co (LET 0.267 keV/ μm)						
Referência	DNA (pb ‡)	Conc. [ng/ μl]	Scavenger	S.Capac* [1/s]	SSB [1/GyDa †]	DSB [1/GyDa †]
Root et al.. 1990	SV40 DNA (5243)	20	Tris-HCl, MgCl ₂	1.2E+06	2.3E-08	7.0E-10
O'Neill et al.. 1997			Tris-Hcl, Etanol	6.0E+08	4.0E-10	1.0E-11
Klimczak et al. 1993	pBR322	100	sem <i>scavenger</i>	6.5E+05	7.5E-08	2.3E-09
			Tris+EDTA	1.9E+07	6.8E-09	5.1E-11
				3.1E+07	6.5E-09	7.0E-11
			Glicerol, Tris, EDTA	8.8E+07	-	1.7E-11
				2.21E+08	1.31E-09	8.54E-12
				6.0E+08	5.6E-10	6.5E-12
				9.8E+08	4.4E-10	4.3E-12
				1.93E+09	3.78E-10	3.79E-12
				5.75E+09	1.88E-10	3.14E-12
Leloup et al. 2005	pHAZE (10327)	1000	Glicerol	3.8E+06	8.5E-09	1.6E-10
				3.8E+08	5.5E-10	2.7E-11

‡ pares de bases (pb), † Dalton(Da)= 1.66E-27 kg. * scavenging capacity (S. Capac.).

Tabela 2.3 Compilação de dados de irradiações de DNA plasmidial com gama de ^{137}Cs .

Gama de ^{137}Cs (LET 0.395 keV/ μm)						
Referência	DNA (pb ‡)	Conc. [ng/ μl]	Scavenger	S.Capac* [1/s]	SSB [1/GyDa †]	DSB [1/GyDa †]
Milligan et al. 1993a	pUC18 (2686)	20	DMSO	3.80E+06	1.8E-08	
		100			1.0E-08	
		500			1.2E-08	
		900			1.1E-08	
		1500			1.0E-08	
	SV40 (5243)	10	DMSO	3.8E+06	1.5E-08	
		50			1.2E-08	
		150			6.0E-09	
		200			1.0E-08	
		250			1.2E-08	
	pEC (10810)	300	DMSO	3.8E+06	1.3E-08	
		50			5.2E-09	
		100			1.0E-08	
		2500			5.2E-09	
Jones et al. 1993	SV40 (5243)	833	DMSO	5.7E+06	5.0E-09	8.5E-11
				5.7E+07	9.0E-10	1.1E-11
				3.8E+08	2.0E-10	5.0E-12
				3.8E+09	1.0E-10	3.0E-12
				7.6E+09	8.0E-11	2.0E-12
	SV40 (5243)	1024	DMSO	3.8E+06	2.6E-10	6.0E-12
Milligan et al. 1996	pUC18, pEC	500	DMSO	3.8E+05	5.0E-08	4.0E-10
					4.0E-08	7.5E-11
				3.8E+06	1.2E-08	1.1E-10
				3.8E+07	3.0E-09	9.0E-12
				3.8E+08	6.0E-10	6.0E-12
				3.8E+09	2.0E-10	8.0E-13
Leloup et al. 2005	pHAZE (10327)	1000	Glicerol	3.8E+06	1.8E-08	3.1E-10
				3.80E+08	1.0E-09	2.00E-11
	pEC (10810)	50	DMSO	3.8E+06	5.2E-09	
					1.0E-08	
					5.2E-09	

$\ddagger$ pares de bases (pb), † Dalton(Da)= 1.66E-27 kg. * scavenging capacity (S. Capac.).

Os dados de forma geral mostram uma diminuição na produção de SSB e DSB com o aumento da capacidade de *scavenging*. Para irradiações com ^{60}Co , as SSB vão de 7.5E-8

$\text{Gy}^{-1} \text{Da}^{-1}$ até $1.9\text{E}-10 \text{ Gy}^{-1} \text{Da}^{-1}$ para capacidades de *scavenging* de $6.5\text{E}5 \text{ s}^{-1}$ e $5.8\text{E}9 \text{ s}^{-1}$, respectivamente [Klimczak et al. 1993]. Para as irradiações com ^{137}Cs , temos desde $5.0\text{E}-8 \text{ Gy}^{-1} \text{Da}^{-1}$ até $2.0\text{E}-10 \text{ Gy}^{-1} \text{Da}^{-1}$ para capacidades de $3.8\text{E}5 \text{ s}^{-1}$ e $3.8\text{E}9 \text{ s}^{-1}$, respectivamente [Milligan et al. 1996]. É importante salientar nestes dados que as ordens de grandeza são similares entre os tipos de irradiações, porém existem muitas incertezas que não permitem definir diferenças entre elas.

O mencionado no parágrafo anterior é mostrado nas figuras 2.1 e 2.2. Os $\text{G}(\text{SSB})$ e $\text{G}(\text{DSB})$ são representados em função da capacidade de *scavenging* da solução. É possível notar grande flutuação entre os diversos experimentos, o que pode ser causado pelas diferenças entre as metodologias utilizadas em cada experimento.

Figura 2.1 Rendimentos de produção de quebras simples em plasmídeos irradiados com gama de ^{60}Co e ^{137}Cs (Tabela 2.2 e 2.3).

Figura 2.2 Rendimentos de produção de quebras duplas em plasmídeos irradiados com gama de ^{60}Co e ^{137}Cs (Tabela 2.2 e 2.3).

O presente trabalho de tese concentra-se no estudo do efeito das radiações de baixo LET de gama de ^{60}Co e ^{137}Cs com o objetivo de caracterizar esta interação e as possíveis diferenças reportadas na literatura. Irradiações com prótons de 10 MeV serão também realizadas e analisadas no mesmo contexto. As irradiações são feitas com o mesmo tipo de DNA nas mesmas condições e com a mesma metodologia, para melhor caracterizar a interação das diferentes radiações com o DNA.

CAPÍTULO 3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

1. Realizar um estudo *in vitro* do efeito das radiações de baixo LET, especificamente gama de ^{60}Co e de ^{137}Cs , sobre o DNA plasmidial.
2. Medir e comparar com o efeito radiobiológico gerado por prótons de um LET maior.
3. Analisar os Efeitos Biológicos Relativos (RBE) destas três radiações.
4. Determinar se existe alguma diferença a nível molecular para o RBE entre as radiações de baixo LET.

3.2 Objetivos específicos

1. Desenvolvimento e otimização de uma técnica para a quantificação dos danos produzidos no DNA pela radiação ionizante.
2. Realizar irradiações de DNA plasmidial com gama de ^{60}Co em diferentes concentrações de *scavenger* e de glicerol para estudar os efeitos destes parâmetros na produção de quebras simples e duplas.
3. Realizar irradiações de DNA com gama de ^{137}Cs nas mesmas capacidades de *scavenging* no caso do ^{60}Co .
4. Realizar irradiações de DNA com prótons de 10 MeV nas mesmas condições que nos dois casos anteriores.
5. Determinar os rendimentos das produções de SSB e DSB para as irradiações com radiação gama de ^{60}Co , de ^{137}Cs e prótons de 10 MeV.
6. Finalmente, analisar os resultados e determinar as características dos efeitos produzidos por estas três radiações sobre o DNA plasmidial *in vitro*.

CAPÍTULO 4. FUNDAMENTOS TEÓRICOS.

4.1 Interação das radiações ionizantes com a matéria

A radiação ionizante se caracteriza por sua capacidade de excitar e ionizar os átomos do meio com o qual interage. Exemplos de radiações ionizantes são os raios-X, radiação gama, elétrons rápidos, partículas carregadas pesadas (prótons, deutérons e íons) e nêutrons. Pela natureza de interação, as radiações podem se classificar em radiações indiretamente ionizantes e diretamente ionizantes. A primeira denominação é aplicada no caso de partículas eletricamente neutras cujas interações são principalmente por colisões ou interações com os núcleos dos átomos do meio. A segunda é aplicada ao caso de partículas carregadas eletricamente, as quais interagem com o campo eletromagnético dos átomos.

4.1.1 Radiação indiretamente ionizante

Radiações indiretamente ionizantes, como os fótons, possuem um grande número de possíveis mecanismos de interação com a matéria. Os mecanismos predominantes são descritos a seguir:

Efeito fotoelétrico

No efeito fotoelétrico o fóton incidente é completamente absorvido pelo átomo alvo e em seu lugar é liberado um elétron de uma de suas camadas externas. Esta interação é feita com o átomo todo e não com elétrons livres.

A energia cinética do fotoelétron liberado é dada por:

$$T = h\nu - E_b \quad [4.1]$$

Aqui $h\nu$ é a energia do fóton incidente e E_b a energia de ligação do fotoelétron no átomo. O átomo ionizado rapidamente, completa o buraco na camada ou com um elétron livre do meio ou fazendo um rearranjo dos elétrons das outras camadas, gerando assim um ou mais raios-X característicos. Em geral, estes raios-X são reabsorvidos perto do ponto de origem. Em outros casos, a emissão de um elétron Auger carregando a energia atômica de excitação substitui o raio-X característico.

A ocorrência do efeito fotoelétrico é predominante para baixas energias do raio gama incidente. Meios com alto número atômico Z possuem maior probabilidade para esta interação. De forma aproximada uma expressão analítica para a seção de choque do efeito fotoelétrico seria:

$$\tau \cong Const. \times \frac{Z^n}{E_\gamma^3} \quad [4.2]$$

onde E_γ representa a energia do raio gama. A potencia n varia entre 4 e 5 dentro da região de energia de interesse para raios gama.

Efeito Compton

No efeito Compton, ou interação incoerente, é a interação do fóton incidente que ocorre com elétrons fracamente ligados. O fóton é desviado um ângulo θ da sua direção original, transferindo parte da sua energia ao elétron de recuo. O angulo de espalhamento pode ter qualquer valor, e a energia transferida ao elétron varia de zero a grandes frações da energia inicial do raio gama.

A relação entre o ângulo de espalhamento θ e a energia final do fóton obtida a partir das leis de conservação da energia e o momento, e dada por:

$$h\nu' = \frac{h\nu}{1 + \frac{h\nu}{m_0c^2}(1 - \cos\theta)} \quad [4.3]$$

onde $h\nu$ é a energia do fóton incidente e $h\nu'$ a energia do fóton espalhado. O termo m_0c^2 corresponde à massa em repouso do elétron (0.511 MeV).

A probabilidade de ocorrência do espalhamento Compton por átomo (σ_c), depende do número de elétrons disponíveis como alvos de espalhamento e portanto aumenta com Z .

Produção de Pares

A produção de pares é energeticamente possível para os casos onde a energia do raio gama excede duas vezes a massa em repouso do elétron (1.02 MeV). A interação tem lugar no campo coulombiano do núcleo e na realidade só para raios gama de altas

energias é que esta interação é predominante. Nesta interação o fóton é absorvido e substituído por um par elétron– positron com energias cinéticas T^- e T^+ respectivamente.

A energia cinética media recebida em cada produção é:

$$\bar{T} = \frac{h\nu - 1.022 MeV}{2} \quad [4.4]$$

Depois de freado o positron é aniquilado no meio e dois fótons de aniquilação são gerados como produtos secundários da interação. Não existe uma expressão simples para a probabilidade da produção de pares pelos núcleos (κ), mas sua magnitude varia aproximadamente com o quadrado do número atômico Z do meio.

Coeficiente de atenuação linear

Todas estas formas de interação fazem com que o fóton tenha uma probabilidade de interação μ com o meio em função do caminho percorrido, da energia e o meio que atravessa, chamada coeficiente de atenuação linear. Esta probabilidade pode ser determinada conhecendo as probabilidades de interação τ , σ_c , κ correspondente com os efeitos fotoelétrico, Compton, produção de pares e Rayleigh respectivamente, obtendo:

$$\mu = \tau + \sigma_c + \kappa \quad [4.5]$$

Assim o número de fótons transmitidos I , num material de espessura t , de uma quantidade inicial I_o será:

$$I = I_o e^{-\mu \cdot t} \quad [4.6]$$

Esta equação só é valida para uma boa geometria e para um feixe estreito. Na figura 4.1a é mostrada a dependência energética do coeficiente de atenuação linear para os diferentes processos de interação dos fótons com os meios.

Figura 4.1 (a) Dependência energética do coeficiente de atenuação linear em função da energia. (b) Predomínio dos efeitos fotoelétrico, Compton e produção de pares em função da energia e do número atômico.

O predomínio de uma interação sobre outra depende em geral da energia do fóton e o Z do material. A figura 4.1b mostra as regiões predominantes de cada tipo de interação.

O coeficiente de atenuação linear é limitado por sua variação com a densidade do meio. Assim, é mais comum à utilização do coeficiente de atenuação de massa. Esse coeficiente é definido como μ/ρ , onde ρ é a densidade do meio. A figura 4.2, mostra a dependência do coeficiente de atenuação de massa em função da energia do fóton para diferentes materiais. Para uma energia do fóton dada o coeficiente de atenuação de massa sempre será o mesmo independentemente do estado físico do meio (líquido, sólido ou gasoso).

Figura 4.2 Dependência do coeficiente de atenuação de massa em função da energia do fóton para diferentes materiais

Para o caso de compostos mistos o coeficiente pode ser calculado como:

$$\left(\frac{\mu}{\rho}\right)_m = \sum_i w_i \left(\frac{\mu}{\rho}\right)_i \quad [4.7]$$

onde o fator w_i representa a fração de massa do elemento i na mistura ou no composto químico. Com isto a quantidade de fótons transmitidos num material de espessura t e densidade ρ e para boa geometria é

$$I = I_o \cdot e^{-\left(\frac{\mu}{\rho}\right)\rho \cdot t} \quad [4.8]$$

4.1.2 Radiação diretamente ionizante

O mecanismo de interação das partículas carregadas é diferente das neutras. Neste caso, o campo elétrico coulombiano da partícula carregada interage continuamente em todo o caminho percorrido por elas com o campo dos elétrons orbitais do meio. Em dependência da proximidade do encontro com os elétrons, o impulso transmitido pela partícula carregada pode excitar o elétron a uma camada superior do átomo (excitação) ou removê-lo completamente do átomo (ionização). A velocidade da partícula incidente é diminuída em cada processo de interação por causa da transferência de energia ao elétron. A energia máxima que uma partícula carregada de massa m e energia E pode transferir para um elétron de massa m_o numa colisão simples é $4Em_o/m$. Isso representa

uma perda de energia pequena por colisão e implica em que a partícula primária transfira sua energia inicial após muitas interações durante sua passagem pelo meio até a parada total. Isto junto com o fato de que estas interações eletromagnéticas acontecem em todas as direções faz com que as trajetórias das partículas carregadas pesadas mantenham-se praticamente retas ao longo do seu passo pelo meio (exceto no seu ponto final).

Os principais produtos da interação das partículas carregadas são átomos excitados e pares de íons. Os pares de íons são formados pelo elétron livre e o íon positivo gerado do átomo com o elétron removido. Em algumas interações os elétrons tirados dos átomos podem escapar com energia cinética suficiente para provocar outras ionizações através do mesmo mecanismo. Estes elétrons são denominados raios delta (*delta rays*) e representam a forma indireta de como a energia das partículas carregadas é transferida ao meio.

O poder que os diferentes meios possuem para interagir com as partículas carregadas pode ser avaliado através do poder de freamento (Stopping Power). O poder de freamento linear S é definido como o diferencial de energia perdida pela partícula dentro do material por diferencial de comprimento do caminho,

$$S = -\frac{dE}{dx}, \quad [4.9]$$

O valor $-dE/dx$ ao longo do caminho é chamado perda específica de energia (*specific energy loss*) ou taxa de perda de energia. A formula de Bethe representa uma expressão clássica que a descreve:

$$-\frac{dE}{dx} = \frac{4\pi e^4 z^2}{m_o v^2} NB, \quad [4.10]$$

onde

$$B \equiv Z \left[\ln \frac{2m_o v^2}{I} - \ln \left(1 - \frac{v^2}{c^2} \right) - \frac{v^2}{c^2} \right] \quad [4.11]$$

Nesta expressão, v e z são a velocidade e a carga da partícula primária, N e Z são o número de átomos e o número atômico do átomo do meio, m_o a massa em repouso do elétron, e e a carga do elétron. O parâmetro I representa o potencial médio de excitação e ionização do meio que é determinado experimentalmente para cada elemento. Para partículas carregadas não relativistas ($v \ll c$), somente o primeiro termo de B é significativo. Esta equação é válida para diferentes tipos de partículas cujas velocidades permaneçam grandes se comparadas com as velocidades dos elétrons orbitais.

Da expressão é possível inferir que, para uma partícula não relativista $-dE/dx$ varia como $1/v^2$ ou o inverso da energia cinética. Também que, partículas incidentes com maior carga, ou materiais com maior número atômico e altas densidades, produzirão uma maior perda específica de energia. A expressão de Bethe deixa de ser aplicável para partículas com baixas energias, onde aumenta a probabilidade de troca de carga entre a partícula e o meio, podendo se neutralizar a carga com a captura de elétrons.

A perda específica de energia para partículas carregadas em função da distancia de penetração tem um comportamento muito característico, é conhecida como curva de *Bragg*. Inicialmente $-dE/dx$ aumenta com a perda de energia como $1/E$ até um máximo, e no final a curva cai a zero devido a redução da carga pela captura de elétron. Na figura 4.3, observa-se o perfil traçado pela deposição de energia em função da penetração no meio, denominado pico de Bragg.

Figura 4.3 Exemplos de transferência linear de energia em função da distancia de penetração em tecido para vários íons mostrando os picos de Bragg característicos.

Casos em que a partícula atravessa um meio com pequena espessura e só parte da sua energia inicial é depositada, esta pode ser calculada como:

$$\Delta E = \left(-\frac{dE}{dx} \right)_{\text{médio}} \cdot t \quad [4.12]$$

onde t é a espessura do material e $(-dE/dx)_{\text{médio}}$ é a perda específica média de energia da partícula nesse meio. Se a perda de energia é pequena esta pode ser aproximada ao valor tabulado para a energia da partícula incidente. Nos casos em que isto não acontece o método de obtenção não é simples e devem ser levadas em conta outras considerações para o cálculo da perda da energia cinética inicial.

Nestes casos é utilizado o conceito de alcance que define o alcance médio que uma partícula com energia inicial E_o pode penetrar num determinado meio. Este parâmetro é calculado em função da perda de energia, $-dE/dx$, como:

$$R = \int_0^{E_o} \frac{dE}{(-dE/dx)} \quad [4.13]$$

Em ocasiões o alcance ou a perda específica de energia para materiais feitos de misturas ou compostos químicos não estão disponíveis. Nestes casos a regra de Bragg-Kleeman pode ser aplicada e o termo $-dE/dx$ por átomo da mistura será:

$$\frac{1}{N_m} \left(-\frac{dE}{dx} \right)_m = \sum_i W_i \frac{1}{N_i} \left(-\frac{dE}{dx} \right)_i \quad [4.14]$$

Onde N é a densidade atômica, W_i representa a fração atômica do i -ésimo componente na mistura (subscrito m).

Assim, conhecendo o alcance em todos os materiais constituintes o alcance pode ser achado como:

$$R_m = \frac{M_m}{\sum_i n_i (A_i/R_i)} \quad [4.15]$$

onde R_i é o alcance no elemento i , n_i é o número de átomos por elemento i na molécula, A_i é o peso atômico do elemento i , e M_m o peso molecular do composto.

4.1.3 Deposição macroscópica de energia. Dose e LET.

Para a medição do efeito produzido pela radiação ionizante a nível macroscópico se utiliza o conceito de dose. A dose corresponde ao valor esperado de energia depositada pela partícula incidente na matéria por unidade de massa pontual. Sua unidade no sistema internacional é o Gray (Gy), onde $Gy=J/kg$.

Como será visto mais adiante o dano biológico está relacionado com a quantidade de ionizações produzidas pela radiação no meio. Na passagem da radiação por um material, parte da energia se consome nas ionizações dos átomos que liberam elétrons com determinada energia cinética. A energia depositada é proporcional ao número de ionizações, e portanto a dose fica diretamente relacionada com o dano biológico produzido.

O dano biológico vai depender também do tipo de partícula e da energia. Assim é necessário, para a análise do dano biológico das radiações, o conceito de Transferência Linear de Energia (LET, *Linear Energy Transfer*). O LET descreve a quantidade de

energia que é depositada localmente pela radiação por diferencial de trajetória ($-dE/dx$) o que é vinculado diretamente com termo de perda específica de energia explicada na seção anterior. O LET vai depender do tipo de radiação, da energia e do meio.

Radiações como os raios-X e raios gamas são considerados como de baixo LET ou ligeiramente ionizantes. Por outro lado nêutrons rápidos, prótons e partículas carregadas pesadas são considerados de alto LET ou altamente ionizantes. Entretanto o fato de ter fornecido uma mesma dose num meio com radiação de altas e baixas LET, não indica que os efeitos biológicos sejam iguais. Em ambos os casos a energia depositada é a mesma, mas a distribuição espacial dos processos de ionização será diferente. As partículas de alto LET produzem um grande número de ionizações ao longo do seu caminho, ao contrario das partículas de baixo LET onde esse número não é tão grande.

Figura 4.4 Diferenças na densidade de ionizações para partículas de baixo a alto LET [Goodhead 1994].

A figura 4.4 mostra uma representação dos elétrons secundários gerados ao longo do caminho da radiação gama (baixo LET) e de partículas alfa (alto LET) num núcleo celular. Também mostra como a distribuição das ionizações das partículas alfa é mais concentrada ao longo do seu caminho. Isto faz com que a interação desta radiação com o DNA seja mais efetiva, porém a distribuição espacial das ionizações não seja tão homogênea como para a radiação de baixo LET.

A dependência entre a estrutura do caminho (*track structure*) das radiações e seu efeito biológico a nível molecular continua sendo amplamente estudado.

4.2 Interação das radiações com meio biológico

Os efeitos das radiações ionizantes nos materiais biológicos são conseqüências da absorção da energia associada ao seu passo pelo meio. As principais interações são ionizações, excitações e dissociações das moléculas do meio atravessado. No caso de interação com matéria viva estes fenômenos podem produzir modificações à escala atômica e molecular que provocam importantes conseqüências a nível biológico.

As células eucariotes possuem duas estruturas fundamentais: o citoplasma e o núcleo. O núcleo representa a principal estrutura sensível a radiações. Ele guarda na macromolécula de DNA as informações genéticas necessárias para as funções vitais. Os efeitos das radiações na molécula de DNA podem provocar modificações no funcionamento ou inclusive a morte da célula. Já, a dose necessária no citoplasma para produzir um dano celular relevante é muito maior que para o núcleo celular. Por esta causa o DNA representa o alvo mais sensível aos efeitos das radiações nos seres vivos.

4.2.1 Estrutura do DNA

Antes de estudar os efeitos das radiações no DNA é necessário conhecer sua composição.

O DNA se classifica como um polímero de nucleotídeos. Cada nucleotídeo do DNA é formado por três partes: uma base nitrogenada, um açúcar (desoxirribose) e um grupo fosfato, figura 4.5.

Açúcar (desoxirribose)

Figura 4.5 Estrutura química das partes do DNA. Bases nitrogenadas, açúcar. Estrutura e enlace dos nucleotídeos.

Um nucleotídeo (desoxinucleotídeo) consiste em uma molécula de desoxirribose com um fosfato ligado em uma posição e uma das quatro bases nitrogenadas ligada à outra posição. Os átomos de carbono do açúcar desoxirribose de um nucleotídeo são sempre numerados do mesmo modo. A base está sempre ligada ao carbono 1 e o grupamento fosfato está sempre ligado ao carbono 5, figura 4.5. Na molécula do DNA, milhares destes nucleotídeos estão agrupados em uma cadeia, pela união dos grupos fosfatos, ligados ao carbono 5 de uma molécula de desoxirribose, com o carbono número 3 de uma segunda molécula desoxirribose.

Figura 4.6. Modelo da molécula de DNA. (a) Representação da sua composição química. (b) Diferentes desenhos do DNA

As ligações formadas entre as moléculas de desoxirribose, através do grupo fosfato são chamadas de ligações fosfodiéster. A estrutura do DNA tem forma de uma dupla hélice. As pontes de hidrogênio entre os pares de bases complementares (adenina com timina e guanina com citosina) mantêm o DNA em forma helicoidal, figura 4.6.

4.2.2 Conformações do DNA

O DNA encontra-se nos seres vivos de diferentes maneiras, dependendo do nível de complexidade do organismo. Nos eucariotes o DNA encontra-se numa forma semi-ordenada dentro do núcleo celular, agregado as proteínas estruturais (as histonas), e é chamado cromatina (figura 4.7).

Figura 4.7 Diferentes conformação do DNA. A) cromossomo em organismos eucariotos. B) DNA de procariotos. C) Plasmídeos.

Nos organismos procariotos (bactérias), os quais não têm membrana nuclear, o DNA encontra-se disperso no citoplasma, e ainda separados do DNA cromossômico por pequenos anéis chamados de plasmídeos.

Determinar qual tipo de DNA será utilizado nos estudos de interação com as radiações é muito importante já que os processos de formação de danos, as metodologias de análise e os resultados obtidos apresentam significativas diferenças.

4.2.3 Classificação dos danos no DNA

O efeito direto e indireto das radiações sobre o DNA pode produzir principalmente dois tipos de quebras: quebras simples chamadas SSB (*Single Strand Break*) e quebras duplas chamadas (*Double Strand Break*), como ilustradas na figura 4.8. Existem também as quebras complexas conhecidas como LMDS (*locally multiple damaged site*) ou *clustered damage* que são geradas por partículas carregadas de alto LET [Ward 1994].

As SSB ocorrem com mais frequência ao nível da união fosfodiéster entre o fosfato e a desoxirribose, mas também podem ocorrer sobre a ligação base-desoxirribose. Uma grande parte destas modificações é feita pela ação dos radicais livres que serão explicados posteriormente.

Figura 4.8 Quebras da cadeia do DNA. SSB e DSB provocadas por mecanismos diretos e indiretos.

A DSB corresponde à perda da continuidade das cadeias do DNA. Em média ocorrem quando duas SSB são formadas em ambas as fitas, em sítios próximos, ao redor de menos de 3 bases de distancia, embora possam ocorrer com até 10 pb de distância. Este tipo de quebra pode ser produzido por uma só partícula (partículas de alto LET) ou pela combinação de duas SSB em cadeias complementares, como ilustra a figura 4.9.

Figura 4.9 Origem de quebra dupla provocada por duas quebras simples em cadeias opostas.

A energia requerida para a produção de uma SSB é de uns 10-20 eV. Uma dose entre 1 a 1.5 Gy de radiação eletromagnética gera aproximadamente umas 1000 SSB e entre 50-100 DSB por célula. Mas esta dose só produz a morte de cerca de 50% das células de mamífero no volume irradiado. Isto demonstra a existência de mecanismo de reparo nas células.

Os mecanismos de reparo restabelecem a cadeia de DNA ao seu estado original. Existem diversos tipos de reparo de DNA nos diferentes organismos vivos. Nos seres humanos mecanismos permitem reparar SSB de forma relativamente rápida, na ordem de minutos. Já no caso de DSB pela grande complexidade do dano, são necessárias horas para fazer o reagrupamento da cadeia, resultando muitas vezes em erros ou mutações que produzem a morte celular.

Figura 4.10 Comparação entre a produção de quebras por um elétron e uma partícula alfa. A radiação de alto LET é capaz de produzir danos múltiplos em pequenas regiões do DNA.

As quebras complexas ou *clustered damage* são consequência da alta densidade de ionizações ao longo do caminho percorrido que caracterizam os núcleos pesados de alto LET. Os elétrons secundários e os radicais gerados no entorno da molécula podem provocar múltiplos danos que se concentram numa pequena região do DNA, como ilustra a figura 4.10. Estas quebras são muito difíceis de reparar, e como consequência pode resultar em mutações genéticas e/ou a morte celular. Em irradiações com fontes de baixo LET este dano não é predominante.

4.2.4 Mecanismos de interação com o DNA

O dano das radiações no DNA pode ser de duas formas: de forma direta ou por ação indireta. No caso da ação direta a interação da radiação é com os átomos que conformam a molécula de DNA (denominamos de forma reduzida TH) produzindo ionizações ou excitações por meio da interação coulombiana.

No caso da interação indireta, a radiação interage com as moléculas e átomos que formam o meio onde se encontra o DNA, produzindo principalmente radicais livres que podem se difundir e interagir com a molécula de DNA. Na ação indireta o principal meio de interação é água que representa 80% da célula, de modo que a radiólise da água representa o principal mecanismo indireto de interação das radiações com o DNA (figura 4.11).

Figura 4.11 Mecanismos de interação indireta e direta. Acima: A ionização do meio gera a produção de radicais livres que provocam o dano no DNA. Abaixo: A ionização provoca o dano diretamente na cadeia do DNA.

Nos modelos que descrevem a radiólise da água, esta pode dividir-se em quatro etapas [Atkins 2001]. A etapa física (até 10^{-15} s), onde a energia depositada leva à ionização e à excitação da molécula de água, com formação de $H_2O^+ + e^-$, e H_2O^* , respectivamente,

A seguir, na etapa físico-química (entre 10^{-15} s e 10^{-12} s), as espécies altamente instáveis, formadas na etapa física, se decompõem rapidamente nas espécies radiolíticas primárias e^-_{aq} , $H^\bullet$, $HO^\bullet$, O_2^- e H_3O^+ . Para isto, primeiro a molécula excitada H_2O^* se decompõe, dando origem aos radicais livres hidroxila $HO^\bullet$ e hidrogênio $H^\bullet$,

O íon produzido no processo (a) sofre uma reação com a molécula de água formando a espécie hidroxônio H_3O^+ e um radical hidroxila,

Por outro lado, o elétron expulso na reação (a) é cercado por moléculas de água, formando o elétron solvatado e^-_{aq} ,

Após 10^{-12} s as espécies radiolíticas estão formadas (*clusters*), e entra-se na etapa química heterogênea, na qual, durante os 10^{-6} s que se seguem, terão tempo de difundir-se para a solução podendo também reagir entre si por numerosas vias. Algumas das vias de recombinação são as reações do tipo radical-radical, que dão origem à formação de produtos moleculares como o hidrogênio (H_2), peróxido de hidrogênio (HO_2H) e água,

A presença de oxigênio no meio pode produzir outras reações químicas, como

Ao fim de um microssegundo, a distribuição de radicais e espécies moleculares atinge o equilíbrio na solução, encontrando-se presentes com os seguintes rendimentos radiolíticos (G, expressos em $\mu\text{mol J}^{-1}$ de energia absorvida):

Espécie	G($\mu\text{mol J}^{-1}$)
e_{aq}^-	0,28
$H^\bullet$	0,06
$HO^\bullet$	0,28
H_2	0,047
H_2O_2	0,073
O_2^-	0,0027

Depois de cerca de um microssegundo entra-se na fase química homogênea, onde as espécies primárias podem continuar a reagir ou não entre si, mas também com qualquer soluto presente na solução. Dos produtos da radiólise, o efeito mais letal nos meios biológicos é produzido pelo radical hidroxila $HO^\bullet$.

O radical hidroxila é uma espécie extremamente reativa. As suas reações com o DNA podem resultar em quebras de cadeia (simples ou duplas), formação de ligações cruzadas (base/base ou base/proteína), modificações do açúcar (formação de centros abásicos) e modificações das bases. Há varias décadas, tem sido estudada a cinética das reações deste radical com numerosos compostos em fase líquida. Apesar de ter sido determinada a velocidade de reação do radical, os mecanismos presentes nestes processos ainda não são totalmente conhecidos. De um modo geral, sabe-se que o radical reage por três tipos de mecanismos: adição a uma ligação múltipla em sistemas insaturados, abstração de um átomo de hidrogênio e oxidação monoelectrónica.

Nas reações com moléculas aromáticas como o DNA, a adição a uma ligação dupla ocorre com muita maior probabilidade do que a abstração de um átomo de hidrogênio. Da adição do radical $HO^\bullet$, resulta um radical intermediário instável que pode evoluir por diversas vias. Uma possibilidade é a eliminação de um íon hidróxido com a formação de um íon radical-cátion, ou outra evolução pode ser a formação de um radical neutro pela eliminação de uma molécula de água. No caso das bases do DNA, a principal decomposição do produto intermediário é a eliminação formal de um átomo de hidrogênio, o que dá origem a um produto de hidroxilação estável. Estes produtos finais constituem modificações permanentes responsáveis pelos fenômenos de mutações, como indicado na figura 4.12. Os íons radicais ou neutros podem dar origem também a quebras de ligações carbono-carbono nas pontes de fosfatos ou na desoxirribose provocando as quebras simples e duplas na cadeia do DNA. Estes íons

radicais ou radicais neutros podem também provocar transposições ou a formação de radicais peróxidos quando a reação ocorre em presença de dioxigênio.

Figura 4.12 Esquema simplificado de reação do radical hidroxila com uma base de DNA. São mostrados os produtos intermediários e os produtos finais. [Vieira 2006]

4.2.6 Escala do tempo

As rupturas produzidas pelos efeitos diretos e indiretos, logo depois da deposição inicial de energia pela radiação, dão lugar a uma série de reações físico-químicas que podem terminar criando diversas consequências biológicas. Estas reações respondem a uma escala de tempo que é dividida inicialmente nas etapas física, físico-química e química. Na etapa física acontece a transferência de energia ao sistema irradiado produzindo a ionização e excitação dos átomos. O tempo do processo é da ordem de 10^{-18} a 10^{-15} s. Na etapa físico-química acontece a perda do excesso de energia presente no sistema. Originam-se reações íon-molécula, a dissociação das espécies excitadas e a formação dos radicais livres. A duração desta etapa é de 10^{-15} a 10^{-12} s. Na etapa química acontece a difusão das espécies acumuladas e suas reações químicas. A duração deste processo é de 10^{-12} até 1 segundo. Existem outras etapas que devem ser consideradas para seres vivos e que são mostradas na tabela 4.1.

Tabela 4.1. Domínio temporal da ação das radiações.

	<u>Tempo</u>	<u>Eventos</u>
Etapa física	10^{-18}	Partícula ionizante atravessa a molécula Ionização
Etapa físico-química	10^{-15}	Excitação: vibração molecular, dissociação molecular, termalização dos elétrons
Etapa química heterogênea	10^{-12}	Difusão dos radicais livres
	10^{-10}	Reação dos radicais livres com o soluto
	10^{-8}	Formação dos produtos moleculares
Etapa química homogênea	10^{-6}	Conclusão das reações químicas
Etapa bioquímica	1s	Reações enzimáticas, processo de reparo.
Etapa Biológica	1h	Início dos processos que podem gerar instabilidade genômica, aberrações, mutações, e morte celular.
Efeitos primários	dias	Morte das células tronco (stem cell), dano a tecido sadio ou proliferação de células.
Efeitos tardios	meses	Fibroses, telangiectasia, danos na pele, danos na medula espinal, e danos no sistema sanguíneo.
Carcinogêneses	anos	Aparição de tumores e tumores secundários associados.
	muitos anos	

4.2.7 Captadores de radicais (*scavengers*)

Algumas substâncias podem ser utilizadas para captar os radicais hidroxila produzidos na radiólise da água. Variando sua concentração na solução, estas podem ser utilizadas para o estudo dos mecanismos de reação do radical com outras moléculas do meio. A principal reação neste caso é a abstração de um átomo de hidrogênio pelo radical $HO^{\bullet}$. Os resultados desta reação são radicais fracamente oxidantes e muito menos reativos do que o radical hidroxila.

Os *scavengers* são amplamente utilizados para estudar a geração de radicais hidroxila pela radiação ionizante e seu efeito na molécula de DNA. A presença do mesmo na solução durante a irradiação gera uma competição entre as reações radical-DNA e radical-scavenger.

Esta competição entre DNA e o scavenger pelo radical hidroxila pode ser analisada aproximadamente como uma reação de segundo-grau (Milligan 1993). A reação entre o radical-scavenger vai depender das constantes de reação do radical com o DNA (k^{DNA}) e com o scavenger (k^{scav}),

Aplicando a cinética de competição, temos que

$$\frac{1}{G_{SSB}} = \frac{1}{G_{SSB}^o} + \frac{k^{scav}}{k^{DNA} G_{SSB}^o} \cdot \frac{C_{scav}}{C_{DNA}},$$

onde G_{SSB} e G_{SSB}^o representa o rendimento de produção de quebras simples no DNA na presença e na ausência de *scavenger* respectivamente, C_{DNA} a concentração do DNA, e C_{scav} a concentração do *scavenger*.

Para esta aproximação, num gráfico de $1/G_{SSB}$ em função de $1/C_{DNA}$, encontra-se uma linha reta com intercepto $1/G_{SSB}^o$ e pendente $[k^{scav} C_{scav}]/[k^{DNA} G_{SSB}^o]$. De forma alternativa, representando $1/G_{SSB}$ em função de C_{scav} encontra-se uma linha com intercepto $1/G_{SSB}^o$ e inclinação $[k^{scav}]/[k^{DNA} G_{SSB}^o C_{DNA}]$. O valor de k^{scav} pode ser encontrado na literatura. Por meio de experimentos, podem ser calculados os rendimentos de produção de quebras simples G_{SSB} para diferentes concentrações de DNA e *scavenger*. Desta forma, é possível quantificar de forma indireta a velocidade de reação do radical hidroxila com o DNA (k^{DNA}) [Milligan et al. 1996].

4.3 Quantificação dos danos no DNA

4.3.1 DNA plasmidial

No estudo da interação das radiações com o DNA, é muito utilizado o DNA plasmidial por sua facilidade para a determinação das SSB e DSB. Os plasmídeos são moléculas de DNA circulares que ficam separadas do DNA cromossômico nas células que os replicam. Depois de isolados, os plasmídeos encontram-se na forma circular superenovelado (SC, *supercoiled*). Quando acontece uma SSB em uma de suas fitas, as tensões moleculares são rompidas e o DNA passa de SC para uma forma circular relaxado (Cir, *relaxed circular*). No caso de acontecer uma DSB, a continuidade da cadeia se perde e os extremos da ruptura tendem se a afastar, passando para a forma linear (Lin, *lineal*), como esquematizado na figura 4.13.

Figura 4.13 Representação do DNA circular superenovelado (SC), circular relaxado (Cir.) e linear (Lin.).

Uma amostra contendo uma boa quantidade de plasmídeo em forma SC, ao ser submetido à radiação ionizante, terá no final os plasmídeos numa diversidade de formas. Em função da dose recebida, estes plasmídeos podem ser encontrados nas formas: circular superenovelado (SC) que não foi afetado pela radiação, circular relaxado (Cir), onde só aconteceram SSB, linear (Lin), onde se produziram DSB, e nos casos onde a dose seja muito elevada, no DNA linear podem ser produzidas múltiplas DSB passando a DNA degradado (D, também chamado fracionado), como indicado na figura 4.14. Esta distribuição está diretamente relacionada com a geração de SSB e DSB dentro da população de plasmídeos, conseguindo-se desta forma estudar os processos de produção de SSB e DSB através das distribuições das formas SC, Cir e Lin, em função de diferentes parâmetros.

Figura 4.14 Esquema de transformação do DNA para a ocorrência das quebras simples e duplas [Goodhead 1994].

4.3.2 Gel de eletroforese

As diferentes conformações dos plasmídeos presentes nas amostras irradiadas podem ser separadas e quantificadas utilizando a técnica de eletroforese em gel de agarose. Neste processo, um gel separa as moléculas de DNA de acordo a sua forma ou peso molecular, e a fluorescência do corante Brometo de Etídio sob luz UV permite sua localização e quantificação. A figura 4.15 mostra uma representação da eletroforese em gel de agarose. A agarose no gel forma fibras helicoidais que se agregam em estruturas superenoveladas formando uma malha tridimensional com canais com diâmetros entre 50 a 200 nm. Um pente colocado durante a solidificação do gel deixa uma distribuição de poços onde as amostras de DNA são carregadas. O gel submerso em uma solução tampão é submetido a uma diferença de potencial. O DNA migra em direção ao anodo por causa da densidade de cargas elétricas residuais negativas que possui. No gel, a matriz polimérica só permite os movimentos em uma direção e produz uma resistência à passagem do DNA que depende, entre outros fatores, do tamanho da molécula. Desta forma, moléculas de DNA de menor tamanho migrarão mais rápido que as maiores. A

mobilidade do DNA no gel dependerá também do tipo e concentração de agarose utilizado, do campo elétrico aplicado e da presença ou não de Brometo de Etídio.

Figura 4.15 Desenho de montagem experimental para corrida de gel de eletroforese.

Para a quantificação das bandas de DNA que foram separadas no gel, utiliza-se o Brometo de Etídio. Este composto químico se liga por forças de Van der Waal às bases do DNA. Ao permanecer em um plano perpendicular ao das bases pode provocar a diminuição da velocidade de migração do DNA. Por outro lado esta ligação permite o deslocamento do comprimento de onda da fluorescência do DNA. Submetido à luz ultravioleta de 254nm o DNA absorve e transmite para o brometo que, a emite novamente com comprimento de onda de 590nm. Esta radiação está no espectro da luz visível na região do vermelho-alaranjado [Sambrook e Russell, 2001]. A emissão de luz do brometo ligado ao DNA é de 20 a 30 vezes maior que o do não ligado permitindo desta forma detectar pequenas quantidades de DNA na ordem de nanogramas. A imagem da emissão do brometo é fotografada utilizando um filtro de luz laranja e convertida a escala de cinzas. A intensidade luminosa de cada banda da imagem é proporcional à quantidade de massa de DNA. Para géis previamente corados com brometo, o DNA plasmidial em forma superenovelada migrará mais rapidamente, seguido do linear e finalmente o circular, como mostra a figura 4.16.

Figura 4.16. Imagem de gel de eletroforese. O sentido da migração do DNA é do catodo ao anodo. À direita é mostrada a separação do DNA em suas três conformações circular superenovelado (SC), circular relaxado (Cir) e linear (Lin).

4.4 Análise dos danos e cálculo dos rendimentos de SSB e DSB

4.4.1 Equação geral para a Teoria de Evento e Alvo. (*Hit and Target Theory*)

A Teoria de Evento e Alvo (*Hit and Target Theory*) tem tido uma grande importância histórica. Ela modela de uma forma aproximada todos os danos que a radiação causa sobre células, tecidos e até as quebras do DNA. A teoria se baseia no uso de tratamentos estatísticos Poissonicos para descrever as curvas de respostas em função da dose dos fenômenos de interação com as radiações. Na teoria, as interações ao longo do caminho da radiação são consideradas como eventos discretos e aleatórios.

A fórmula geral da teoria representa o caso no qual um número n de eventos, são necessários para produzir uma lesão em cada um dos m alvos [Zimmer 1961]. Se o número de eventos estocásticos produzidos é h , então a fração de sobrevivência, $F_{n,m}$ para o caso de n eventos por cada m alvos será

$$F_{n,m} = 1 - (1 - F_{n,1})^m, \quad [4.16]$$

onde

$$F_{n,1} = e^{-h} \cdot \sum_{r=0}^{n-1} \frac{h^r}{r!}, \quad [4.17]$$

representa a probabilidade Poissonica de que um alvo simples sobreviva até n eventos.

Os casos de particular interesse são: a inativação por evento simples, alvo simples (*single hit, single target, $n=1, m=1$*) e a inativação por evento simples, e alvos múltiplos (*single hit, multi-target, $n=1, m>1$*).

No caso da inativação $n=1$, $m=1$, a fração de sobrevivência da estrutura biológica analisada, substituindo na equação 4.17, fica

$$F_{1,1} = e^{-h} . \quad [4.18]$$

Neste caso a curva de resposta se caracteriza por uma linha com inclinação constante num gráfico semilogarítmico. Definindo $h=D/D_{37}$, quando $F_{1,1} = e^{-1}$ a fração de sobrevivência é 0.3679(37%), o que conduz ao conhecido fato de que, quando a dose é igual a D_{37} , em média existe um evento por alvo.

No caso da inativação com um evento simples para múltiplos alvos ($n=1$, $m>1$) a fração de sobrevivência $F_{1,m}$ será:

$$F_{1,m} = 1 - (1 - e^{-h})^m . \quad [4.19]$$

Para um número grande de alvos, m , a equação [4.19] pode ser expandida usando o teorema binomial para realizar uma boa aproximação, obtendo

$$F_{1,m} = m \cdot e^{-h} . \quad [4.20]$$

4.4.2 Rendimento de quebras simples (G(SSB)).

O dano simples no DNA corresponde a um evento do tipo inativação por evento simples e alvo múltiplo, já que só é necessária uma quebra para o DNA passar da forma SC para Cir. Portanto, a fração de DNA SC, F_{SC} em função da dose, D , pode ser encontrada como

$$F_{SC} = F_{SC}^o \exp\left(-\frac{D}{D_{37}}\right), \quad [4.21]$$

onde F_{SC}^o , representa a fração inicial de DNA SC. Neste caso, a dose D_{37} indicará que, em média, teremos uma quebra simples por alvo considerado. Portanto, por unidade de dose, a probabilidade de termos uma quebra por alvo será $1/D_{37}$. No caso dos estudos com DNA *in vitro*, os alvos associados com $1/D_{37}$ são o número de moléculas e o número de pares de bases.

Os resultados dos rendimentos dados em números de moléculas com uma quebra simples por unidade de energia ($\mu\text{mol J}^{-1}$) são calculados como:

$$G_{SSB}[\mu\text{mol} \cdot \text{J}^{-1}] = \frac{\text{moleculasDNA}}{\text{massa da solução}} \cdot \frac{1}{D_{37}} = \frac{C_{DNA} \cdot V}{\rho \cdot V} \cdot \frac{1}{D_{37}} =$$
$$G(SSB)[\mu\text{mol} \cdot \text{J}^{-1}] = \frac{C_{DNA}[\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}]}{\rho[\text{kg} \cdot \text{dm}^{-3}] \cdot D_{37}[\text{Gy}]} \quad [4.22]$$

onde C_{DNA} representa a concentração do DNA em moles por decímetro cúbico e ρ é a densidade da solução (geralmente considerada 1 g/cm^3 no meio aquoso).

Outra forma de apresentar os rendimentos de quebras simples é em unidades de Gray por Dalton ($\text{Gy}^{-1}\text{Da}^{-1}$). Neste caso, a probabilidade de quebra por unidade de Gy é normalizada por unidade de massa atômica de DNA. Para isto a probabilidade $1/D37$ é dividida pela massa molecular em Dalton do DNA estudado. Em média, a massa molecular de um par de base, pb , da cadeia dupla do DNA tem 650 Da, portanto o peso molecular total será: $pb \times 650 \text{ Da}$, ficando o rendimento como

$$G(SSB)[\text{Gy}^{-1} \cdot \text{Da}^{-1}] = \frac{1}{D_{37}[\text{Gy}] \cdot pb \cdot 650[\text{Da}]} . \quad [4.23]$$

Esta última expressão é a mais utilizada para apresentar os resultados, já que permite comparar rendimentos encontrados com DNA diferentes e em distintas condições.

4.4.3 Rendimento de quebras duplas (G(DSB)).

Nos estudos de interação das radiações com o DNA, encontra-se que na medida em que a dose recebida na amostra é incrementada o DNA SC presente na amostra vai diminuindo exponencialmente. O DNA SC passa então a DNA circular, aumentando-se a presença deste dentro da população com aumento da dose.

Figura 4.17. Representação do comportamento das porcentagens do DNA nas diferentes com formações dentro de uma amostra em função da dose. O DNA degradado não está sendo levado em conta. O DNA SC apresenta um comportamento exponencial decrescente e o Lin um comportamento linear em função da dose.

Por outro lado a produção de rupturas duplas, e portanto da presença de DNA linear, vai depender do LET da radiação ionizante e do número de quebras simples presentes no DNA circular. O aumento do número quebras no DNA circular aumenta a probabilidade

de produção de quebras duplas. Na medida em que o número de quebras duplas continua incrementando o DNA linear passa para DNA degradado. Nos casos em que a presença de DNA degradado é baixa, a formação de rupturas duplas estimada de forma aproximada como uma função linear em função da dose, os modelos estatísticos têm demonstrado que a forma analítica para sua estimativa é complicada e depende de numerosos parâmetros [Cowan 1987, Cowan 1990], figura 4.17.

No caso da determinação dos rendimentos das quebras duplas, estes são reportados na literatura nas mesmas unidades que as quebras simples, porém existem diferenças nos procedimentos de cálculo da probabilidade de quebras DSB por unidade de Dose, P_{DSB} . Um grupo de trabalhos da literatura calcula esta probabilidade ajustando a fração de DNA sem quebras duplas (SC+Cir) a uma exponencial de primeira ordem [Roots et al. 1990, Klimczak et al. 1993] da forma

$$F_{SC+Cir}^I = 1 - F_{Lin}^I = F_{SC+Cir}^0 \cdot \exp(-P_{DSB} \cdot D) . \quad [4.24]$$

Em outros casos, a exponencial é de segunda ordem [Taucher-Scholz and Kraft 1999] da forma

$$F_{SC+Cir}^{II} = 1 - F_{Lin}^{II} = F_{SC+Cir}^0 \cdot \exp[-(P_{DSB} \cdot D + \beta \cdot D^2)] . \quad [4.25]$$

Outros ajustam a fração de DNA linear a uma equação de primeiro grau [Jones et al. 1993, Milligan et al. 1996b] do tipo

$$F_{Lin}^{III} = P_{DSB} \cdot D + F_{Lin}^0 . \quad [4.26]$$

Em outros casos, onde a forma da curva do DNA linear não tem um comportamento linear, as curvas têm sido ajustadas a equações de segundo grau [Milligan et al. 1996a] do tipo

$$F_{Lin}^{IV} = A \cdot D^2 + P_{DSB} \cdot D + F_{Lin}^0 . \quad [4.27]$$

Nos casos anteriores, o termo P_{DSB} é utilizado para calcular os rendimentos de quebras duplas em unidades de $\mu\text{mol } J^{-1}$ e $\text{Gy}^{-1}\text{Da}^{-1}$ de forma similar ao das SSB,

$$G(DSB)[\mu\text{mol} \cdot J^{-1}] = \frac{C_{DNA}[\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}] \cdot P_{DSB}[\text{Gy}^{-1}]}{\rho[\text{kg} \cdot \text{dm}^{-3}]} \text{ ou} \quad [4.28]$$

$$G(DSB)[\text{Gy}^{-1} \cdot \text{Da}^{-1}] = \frac{P_{DSB}[\text{Gy}^{-1}]}{\#pb \cdot 650[\text{Da}]} . \quad [4.29]$$

É de se esperar que as diferentes maneiras em que os rendimentos são calculados sejam a causa das divergências observadas entre os resultados na literatura.

CAPÍTULO 5. MATERIAIS E MÉTODOS.

Neste capítulo se apresentam materiais e métodos utilizados para o desenvolvimento dos estudos realizados neste trabalho de Tese. A organização dos procedimentos responde aos trabalhos de:

1. Cultivo e purificação do DNA.
2. Otimização da técnica de eletroforese em gel de agarose.
3. Efeito das frações iniciais de DNA Superenovelado e Circular nos rendimentos de SSB e DSB.
4. G(SSB) e G(DSB) para irradiações de DNA com gama de ^{60}Co .
5. G(SSB) e G(DSB) para irradiações de DNA com gama de ^{137}Cs .
6. G(SSB) e G(DSB) para irradiações de DNA com prótons de 10 MeV.

5.1 Cultivo, extração e purificação do DNA.

O estudo da interação radiação-DNA requer uma grande quantidade de DNA plasmideal, em sua maioria em forma circular superenovelada. O DNA deve estar livre de impurezas como restos de proteínas, RNA, lipídios, etc. Diferentes kits de purificação são comercializados atualmente com o objetivo de preparar o DNA para diversos usos. Mas trabalhos têm demonstrado que muitos deles não proporcionam a pureza necessária para este tipo de estudo [Milligan et al. 1993, Shao et al. 1999]. Neste trabalho o DNA utilizado é o plasmídeo Bluescript II phagemid da Stratagene® (pBs KS+) de 2961 pares de bases. Para a purificação foi utilizado um protocolo modificado que permite obter grandes quantidades de DNA plasmideal com boas condições de pureza [Gouveia 2004].

Para o processo de replicação foi utilizado o método de eletroporação. O DNA foi isolado da *Escherichia coli* DH5 α . O RNA e as proteínas foram extraídos por meio de centrifugação em gradientes isopícnicos de cloreto de cério. O resto dos elementos químicos captadores de radicais foi removido por diafiltração em buffer de Tampão de eluição (TE).

A concentração e a pureza do DNA foram estimadas por espectrofotometria medindo a absorvância das amostras às ondas eletromagnéticas da região ultravioleta. No presente trabalho, os principais comprimentos de onda cuja absorção é medida são: 260 nm, 280

nm, e 320 nm. Para 260 nm, a absorbância do DNA é máxima, a qual permite estimar a concentração do mesmo na amostra. A absorbância em 280 nm indica a presença de proteínas e a absorbância a 320 nm é utilizada para fazer correções de fundo. A absorbância a 260 nm é dada em unidades de DO_{260} (Densidade Óptica). Para o DNA de fita dupla, uma unidade de DO_{260} corresponde com uma concentração de 50 µg/ml. Desta forma é possível estimar a concentração de DNA numa amostra. Para amostras com baixa intensidade iônica e pH controlado a relação DO_{260}/DO_{280} fornece uma estimativa da pureza do ácido nucleico. Graus de purezas aceitáveis para este tipo de estudo devem estar entre 1.8 e 2.0 que correspondem a 50% a 100% de ácidos nucleicos [Sambrook and Russel, 2003]. As medidas foram feitas no espectrofotômetro modelo “U-2000 Double-beam spectrophotometer” de la HITACHI do ICB1 da USP. Os resultados obtidos nas medições da relação DO_{260}/DO_{280} para o plasmídeo utilizado no trabalho estiveram todos acima de 1.92 (65%).

5.2 Otimização da técnica de eletroforese em gel de agarose.

Os trabalhos que utilizaram a técnica de eletroforese têm mostrado que corridas com porcentagens de agarose altos, voltagens pequenas e tempos de corrida grandes, são condições favoráveis para o aproveitamento do poder separador do gel de eletroforese [Hugh W.White 2001]. Porém, neste trabalho, o número de amostras irradiadas é muito elevado (da ordem de centenas). Neste caso as recomendações anteriores fazem com que a técnica fique muito demorada. Portanto, foi necessário realizar uma otimização que permitisse obter resultados de forma rápida e confiável.

Na bibliografia científica, pode se encontrar trabalhos que estudaram o efeito de alguns fatores sobre a técnica de gel de eletroforese. Os principais fatores são: a concentração de agarose, a temperatura de solidificação, o tempo de corrida, a voltagem aplicada, o tamanho do poço de amostra e a concentração de DNA [Noriko Kusakawa 1999]. Outros têm estudado fatores relacionados com o processo de aquisição com câmeras CCD e alinhamento das imagens como: a iluminação, tempo de exposição, alinhamento, resolução e formato do arquivo da imagem [Max Dell Miller Jr 2001]. Em nosso trabalho de otimização foram estudados os efeitos de alguns destes fatores a fim de melhorar a exatidão dos resultados e agilizar o processo de análise. Utilizando o programa GelAnalis [Apêndice 1], desenvolvido dentro do presente trabalho, outros

novos fatores foram estudados também. Entre eles: o modo de seleção das bandas de DNA, a eliminação do fundo no gel, e os ajustes a distribuições de probabilidade.

5.2.1 Materiais e métodos utilizados no estudo

Para os trabalhos de otimização da técnica de análise, o DNA utilizado foi o mesmo das irradiações (pBs KS+). Algumas mostras foram digeridas com a enzima Hind III para obter DNA em forma linear. Também foi utilizado o Ladder de massa High DNA Mass Ladder da Invitrogen™ e 1Kb Plus DNA Ladder da GibcoBRL™. Toda a instrumentação para a confecção dos géis foi da Eppendorf®.

Três concentrações diferentes de agarose foram estudadas: 0.7%, 0.8% e 1.0%. Imersos em TBE 0.5x, foram corridos géis pré-corados com Brometo de Etídio a 0.5 µg/ml e outros sem. Estes sem Brometo de Etídio foram corados posteriormente à corrida num banho de água destilada com Brometo a 0.5 µg/ml. Diferentes voltagens, quantidade de DNA por poço e tempos de corrida foram aplicados a fim de determinar as melhores condições para a separação das bandas num tempo razoável.

As imagens digitais dos géis foram adquiridas utilizando o Eagle Eye CCD *video camera system* do ICB da USP. A luminosidade da imagem era controlada pelo tempo de exposição ao CCD. Este é medido em número de integrações, onde uma integração equivale a 1/30 seg. Este foi outro parâmetro a estudar dentro do trabalho. As imagens finais foram guardadas em escala de cinzas, formato BMP, e com 8 bits de resolução. Para a quantificação das bandas foi utilizado o programa GelAnalis implementado especificamente com este objetivo [Apêndice A1].

Os resultados do trabalho de otimização da técnica de eletroforese são apresentados no capítulo 6, seção 6.1.

5.3 Efeito das frações iniciais de DNA SC e Cir nos G(SSB) e G(DSB).

O DNA uma vez purificado e extraído do gradiente de césio encontra-se na sua maior parte em forma circular superenovelado (SC). No entanto, com o tempo, o DNA mantido a uma temperatura superior a 4 °C pode sofrer quebras nas suas cadeias, diminuindo a fração de DNA SC e aumentando a presença de DNA circular relaxado.

Segundo o modelo probabilístico proposto por Cowan (1987), a diferença de frações iniciais de DNA SC e Cir nas amostras não iria modificar os rendimentos de produção de rupturas simples e duplas. Em seu modelo teórico, ele considera que este fenômeno

pode ser interpretado como um deslocamento para a esquerda da curva exponencial que descreve a produção de quebras simples, mas mantendo o decaimento da curva constante e, portanto a taxa de produção de quebras, figura 5.1.

Figura 5.1 Modelo de quebras de Cowan. $SC = \exp[-(\mu_0 + \mu \cdot D)]$. Onde μ é independente da quantidade inicial de DNA em forma SC.

As irradiações realizadas possuíam o DNA com diferentes frações de DNA SC por causa do tempo transcorrido entre sua purificação e a data de irradiação. Por este fato foi realizado um estudo com o objetivo de definir se efetivamente a diferença na população inicial de DNA não modificava os rendimentos de produção de SSB e DSB. Este trabalho foi feito no irradiador de ^{60}Co tipo Gammacell-200 situado no IPEN. Esta escolha foi devido à disponibilidade de irradiação e a possibilidade de obter altas doses em tempos razoáveis.

5.3.1 Preparação das amostras

Para o estudo se possuía dois estoques de Plasmídeo pBKs com DNA em forma SC e Cir em concentração de 746 ng/ μl e 400 ng/ μl respectivamente, e livres de *scavengers*. Estas concentrações foram medidas no espectrofotômetro. O primeiro estoque apresentava uma degradação do DNA SC da ordem de 10%, o qual se encontrava em forma circular. No segundo estoque, todo o DNA estava em forma circular.

Com os dois estoques anteriores foram preparados quatro tipos de amostras com diferentes porcentagens de DNA SC e Cir. As amostras possuíam DNA numa concentração de 100 ng/ μl e Glicerol a 2 mM, para dar uma pequena estabilidade ao DNA. Na tabela 5.1 é mostrada a forma de preparo das soluções.

Tabela 5.1 Forma de preparo de amostras para o estudo

Soluções	SC-Cir			
	90%-10%	70%-30%	60%-40%	0%-100%
746 ng/ μ l (90%SC-10%Cir)	33,5 μ l	19,7 μ l	11,8 μ l	-
400 ng/ μ l (100% Cir)	-	25,7 μ l	40,4 μ l	62,5 μ l
Glicerol 0,00365%	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
Água destilada	116,5 μ l	104,6 μ l	97,8 μ l	87,5 μ l
Total	250 μl	250 μl	250 μl	250 μl

As amostras foram denominadas 90%-10%, 70%-30%, 60%-40% e 0%-100%, onde os números representam aproximadamente as porcentagem de DNA SC e Cir de cada amostra.

5.3.2 Irradiação das amostras

Como foi utilizado Gammacell-200 do IPEN, um trabalho de simulação do irradiador foi feito com o objetivo de determinar a distribuição da taxa de dose no interior da câmara de amostras, com respeito à dose central [Apêndice 3]. Esta simulação foi realizada devido a que a atividade na fonte anular do irradiador não está distribuída de forma homogênea. O principal objetivo foi determinar se esta heterogeneidade da atividade produzia diferenças nas doses recebidas nas amostras que eram irradiadas simultaneamente numa geometria cilíndrica dentro do irradiador.

Os resultados mostraram uma boa simetria de irradiação num raio de até 8 cm do centro da câmara e que a dispersão máxima da dose nos pontos de irradiação das amostras foi de cerca de 3%. O cálculo da taxa de dose central coincidiu com o valor experimental medido.

Este valor experimental é medido regularmente pelo Laboratório de Dosimetria do Centro de Tecnologia das Radiações. Para isto, é utilizado o dosímetro Fricke (dosímetro de referência) juntamente com os resultados de intercomparação junto ao IDAS (*International Dose Assurance*, serviço oferecido pela IAEA).

Para a irradiação foram colocados 15 μ l de todas as amostras em tubos da Eppendorf de 0.5 ml. Em total foram preparados 13 tubos por cada tipo de amostra.

As doses recebidas no Gammacell 220 de ^{60}Co foram 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 70, 100, 130, 180 e 250 Gy. A taxa de dose central na câmara de irradiação, no dia de irradiação foi de 3.67 kGy/h. Foi utilizado o suporte de amostras de quatro lugares e tomou-se o cuidado de que as soluções se encontrassem no fundo do tubo da Eppendorf, figura 5.2. Os porta amostras foram colocados no centro da câmara de irradiação por meio de uma base de isopor.

Figura 5.2 Suporte de amostra. Modelo para 4 amostras

5.3.2 Gel de eletroforese e quantificação

As amostras irradiadas foram imediatamente preparadas para sua corrida no gel de eletroforese adicionando-se 2,5 µl de Stop Mix e 8 µl de água destilada. Com isto obtivemos 25 µl de amostra a 60 ng/µl de DNA aproximadamente. Para as corridas foram colocados 10 µl por poço do gel. O gel foi corrido segundo a metodologia otimizada resultado da seção 5.2. Os géis de 0.7% de agarose e com 0.5 µg/ml de Brometo foram corridos por 2 horas a um potencial de 5 V/cm. As imagens do gel foram obtidas no EAGLE EYE, guardadas em formato BMP com resolução de 640x480 pixels e quantificadas utilizando o programa GelAnalysis. A luminosidade das bandas SC foi multiplicada pelo fator de enlace do Brometo igual a 1.7, determinado no Apêndice 2.

Os resultados do estudo dos efeitos das frações iniciais de DNA SC e Cir são apresentados no capítulo 6, seção 6.2.

5.4 G(SSB) e G(DSB) para irradiações de DNA com gama de ^{60}Co .

Neste estudo, foram realizadas irradiações de soluções contendo o DNA em diferentes concentrações e com distintas quantidades de *scavengers*. Os objetivos foram definir os efeitos que estes dois parâmetros geram sobre os G(SSB) e G(DSB) no plasmídeo de DNA, irradiado com raios gama do ^{60}Co .

No trabalho foram irradiadas amostras de DNA em solução aquosa (livre de *scavengers*) em concentrações de 10, 50, 200 e 500 ng/µl. Também foram feitas irradiações em amostras com as mesmas concentrações de DNA e com presença de *scavengers* (Glicerol) nas concentrações de 2, 20 e 200 mM. No total foram 16 ambientes diferentes.

5.4.1 Preparação das amostras

O DNA utilizado foi o pBKs. Uma vez conhecida sua concentração na amostra estoque de 753(4) ng/μl, foram preparadas os estoques correspondentes as 16 condições de ambiente diferentes para a irradiação. O *scavenger* utilizado neste caso foi o Glicerol, já que sua capacidade de captura a 200 mM ($3,8 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$) é similar ao ambiente celular [Klimczak et al. 1993]. O DMSO (dimethyl sulfoxide) não foi utilizado porque os radicais secundários derivados dele são reativos com o DNA [Milligan et al. 1996].

No caso do Glicerol (peso molecular 92,10 g/mol), este se encontrava numa solução de 87% em água. Os cálculos mostraram que para preparar uma amostra de 300 μl de volume total com 2 mM de Glicerol, a quantidade de Glicerol necessária era de 0.0439 μl, o qual é impossível de pipetar com os instrumentos disponíveis, por isto o glicerol foi diluído varias vezes para garantir que o volume a pipetar tivesse o menor erro possível. As amostras estoque foram preparadas em tubos da Eppendorf de 500 μl, e para a irradiação foram adicionados 15 μl por dose em tubos da Eppendorf de 0.5 ml.

O volume final em cada amostra dependeu do número de doses que seriam submetidas, preparando menores volumes para aquelas com menor concentração. No caso de amostras sem *scavengers* a forma de preparação é mostrada na tabela 5.2

Tabela 5.2 Amostras sem Glicerol

Nome da amostra	Vol.DNA estoque. (753)	Massa DNA	Vol. Sol. Glicerol	Vol. H ₂ O	Vol.Final	Conc. DNA final
10ng/μl-0mM	3.39 μl	2550 ng	0 μl	251.61 μl	255	10 ng/μl
50ng/μl-0mM	16.93 μl	12750 ng	0 μl	238.07 μl	255	50 ng/μl
200ng/μl-0mM	75.70 μl	57000 ng	0 μl	209.30 μl	285	200 ng/μl
500ng/μl-0mM	209.16 μl	157500 ng	0 μl	105.84 μl	315	500 ng/μl

Para a irradiação foram preparadas 15, 15, 17 e 19 amostras de 10, 50, 200 e 500 ng/μl respectivamente. Todas com 15 μl. Estas quantidades respondem com a quantidade de doses que foram dadas para cada concentração.

Para as amostras com 2 mM de Glicerol foi preparada primeiramente uma solução de Glicerol diluído de forma tal que 100 μl de solução de Glicerol em 400 μl de volume final total fossem equivalente a 2mM de Glicerol. A forma de preparo foi

$$\begin{array}{rcl}
 10 \mu\text{l} & \text{(Glicerol 87\%=8.7\mu\text{l de Glicerol})} & \\
 + 585 \mu\text{l} & \text{H}_2\text{O destilada ultra pura} & \\
 \hline
 595 \mu\text{l} & \text{(Glicerol 1.462\%=8.7 \mu\text{l de Glicerol})} &
 \end{array}$$

Com a solução anterior

$$\begin{array}{r} 20 \mu\text{l} \text{ (Glicerol } 1.462 \% = 0.2924 \mu\text{l de Glicerol)} \\ + 480 \mu\text{l} \text{ } H_2O \text{ destilada ultra pura} \\ \hline 500 \mu\text{l} \text{ (Glicerol } 0.05848 \% = 0.2924 \mu\text{l)} \end{array}$$

Conhecendo a relação anteriormente mencionada de que 100 μl da solução a 0.05848% de Glicerol em 400 μl de solução total corresponde a 2 mM de Glicerol, as amostras a irradiar foram preparadas segundo a tabela 5.3.

Tabela 5.3 Mostras com 2 mM de Glicerol

Nome da amostra	Vol.DNA estoq. (753)	Massa DNA	Vol. Glice. 0.05848%	Vol. H ₂ O	Vol.Final	Conc. DNA final
10ng/ μl -2mM	3.78 μl	2850 ng	71.25 μl	209.97 μl	285	10 ng/ μl
50ng/ μl -2mM	18.92 μl	14250 ng	71.25 μl	194.83 μl	285	50 ng/ μl
200ng/ μl -2mM	75.70 μl	57000 ng	71.25 μl	138.05 μl	285	200 ng/ μl
500ng/ μl -2mM	209.16 μl	157500 ng	209.16 μl	27.09 μl	315	500 ng/ μl

Neste caso o número de amostras a irradiar foi 17, 17, 17 e 19 para 10, 50, 200 e 500 ng/ μl respectivamente, todas com 15 μl .

No caso das amostras com 20 mM de Glicerol, a forma de preparo foi similar ao caso anterior. A solução de Glicerol foi preparada mantendo a razão de 100 μl de solução de Glicerol em 400 μl de volume final total sendo equivalente a 20 mM de Glicerol da forma:

$$\begin{array}{r} 16.81 \mu\text{l} \text{ (Glicerol } 87 \% = 14.63 \mu\text{l de Glicerol)} \\ + 83.19 \mu\text{l} \text{ } H_2O \text{ destilada ultrapura} \\ \hline 100 \mu\text{l} \text{ (Glicerol } 14.63 \% = 14.63 \mu\text{l de Glicerol)} \end{array}$$

Com a solução anterior

$$\begin{array}{r} 20 \mu\text{l} \text{ (Glicerol } 14.63 \% = 2.926 \mu\text{l de Glicerol)} \\ + 480 \mu\text{l} \text{ } H_2O \text{ destilada ultrapura} \\ \hline 500 \mu\text{l} \text{ (Glicerol } 0.5852 \% = 2.926 \mu\text{l)} \end{array}$$

Conhecendo a relação de 100 μl de Glicerol a 0.5852% em 400 μl de solução final, que representa 20 mM de Glicerol, as amostras foram preparadas segundo a tabela 5.4.

Tabela 5.4 Mostras com 20 mM de Glicerol

Nome da amostra	Vol.DNA estoq. (753)	Massa DNA	Vol. Glice. 0.5852%	Vol. H ₂ O	Vol.Final	Conc. DNA final
10ng/ μl -20mM	3.78 μl	2850 ng	71.25 μl	209.97 μl	285	10 ng/ μl
50ng/ μl -20mM	19.92 μl	15000 ng	75.00 μl	205.08 μl	300	50 ng/ μl
200ng/ μl -20mM	87.65 μl	66000 ng	82.50 μl	159.85 μl	330	200 ng/ μl
500ng/ μl -20mM	189.24 μl	142500 ng	71.25 μl	24.51 μl	285	500 ng/ μl

Neste caso, o número de amostras a irradiar foi 17, 18, 20 e 21 para 10, 50, 200 e 500 ng/μl respectivamente, todas com 15 μl.

Seguindo a mesma metodologia as amostras com 200 mM de Glicerol foram preparadas cumprindo com a razão de 100 μl de solução de Glicerol em 400 μl de volume final total é equivalente a 200mM de Glicerol. Neste caso a solução foi

$$\frac{33.63 \mu\text{l} \text{ (Glicerol } 87\%=29.26 \mu\text{l de Glicerol)} + 466.37 \mu\text{l} \text{ H}_2\text{O destilada ultrapura}}{500 \mu\text{l} \text{ (Glicerol } 5.852\%=29.26 \mu\text{l)}}$$

Conhecendo a relação de 100 μl de Glicerol a 5.852% em 400 μl de solução final, representa 200 mM de Glicerol, as amostras foram preparadas segundo a tabela 5.5.

Tabela 5.5 Mostras com 200 mM de Glicerol

Nome da mostra	Vol.DNA estoq. (753)	Massa DNA	Vol. Glice. 5.852%	Vol. H ₂ O	Vol.Final	Conc. DNA final
<i>10ng/μl-200mM</i>	4.78 μl	3600 ng	90.00 μl	265.22 μl	360 μl	10 ng/μl
<i>50ng/μl-200mM</i>	24.90 μl	18750 ng	93.75 μl	256.35 μl	375 μl	50 ng/μl
<i>200ng/μl-200mM</i>	107.57 μl	81000 ng	101.25 μl	196.18 μl	405 μl	200 ng/μl
<i>500ng/μl-200mM</i>	239.04 μl	180000 ng	90.00 μl	30.96 μl	360 μl	500 ng/μl

Neste caso o número de amostras a irradiar foi 17, 18, 20 e 21 para 10, 50, 200 e 500 ng/μl respectivamente, todas com 15 μl.

5.4.2 Irradiação das amostras

Para a irradiação foi utilizado o mesmo Gammacell-220 mencionado no ponto 5.3.2. As condições de irradiação foram similares só que neste caso o suporte de amostras foi substituído por um de 16 lugares, permitindo a irradiação simultânea das 16 amostras (figura 5.3). Uma base de isopor permitia a colocação das amostras no centro da câmara. A taxa de dose central na câmara no dia da irradiação foi de 3.63 kGy/h.

Antes de cada irradiação era comprovado que todas as soluções encontravam-se completamente na parte inferior dos tubos da Eppendorf, garantindo que todos os volumes irradiados foram de 15 μl.

Figura 5.3 Suportes de amostras. Modelo para irradiação simultânea de 16 amostras.

A dose das amostras foi controlada pelo tempo de irradiação. A tabela 5.6 mostra as doses e os tempos reais de irradiação onde foi levada em conta também a dose de transição que representa a dose recebida nas amostras durante o trajeto da gaveta do irradiador para acima e abaixo. Por esta causa alguns tempos de irradiação foram menores que se fossem calculados sô com a taxa de dose central.

Tabela 5.6 Tempos de irradiação para cada dose.

Dose (Gy)	10	20	30	40	50	60	70	80	100
Tempo	6.8 s	16.7 s	29.8 s	39.7 s	49.6 s	59.5 s	69.4 s	79.3 s	99.2 s
Dose (Gy)	120	140	160	180	200	250	300	350	400
Tempo	119 s	139 s	159 s	179 s	198 s	249 s	298 s	347 s	397 s
Dose (Gy)	500	700	1000	1200	1500	2000	2500		
Tempo	496 s	694 s	992 s	19.8 min	24.8 min	33.1 min	41.3 min		

5.4.3 Géis de eletroforese e quantificação

Os géis de eletroforese e a quantificação foram feitos seguindo a metodologia apresentada na seção 5.3.3.

Os resultados de G(SSB) e G(DSB) para irradiações de DNA plasmidial com gama de ^{60}Co são apresentados no capítulo 6, seções 6.3 e 6.4.

5.5 G(SSB) e G(DSB) para irradiações de DNA com gama de ^{137}Cs .

Neste item é apresentada a metodologia utilizada para a realização das irradiações de DNA com gama de ^{137}Cs . O principal objetivo foi a caracterização do dano produzido no DNA pela radiação em diferentes capacidades de *scavenging* para serem comparados com os danos gerados nas irradiações com gama de ^{60}Co . Neste caso a concentração de DNA não foi variada já que esta não influi significativamente nos rendimentos de geração de SSB e DSB (expressos em $\text{Gy}^{-1}\text{Da}^{-1}$). O anterior foi mostrado nos resultados do item 5.4. No estudo foram encontrados os G(SSB) e G(DSB) (ver definição no capítulo 4, seções 4.4.2 e 4.4.3) para o DNA em soluções sem *scavenger* e com 2 mM, 20 mM e 200 mM de Glicerol.

5.5.1 Preparação das amostras

Nas irradiações com ^{137}Cs foi utilizado o mesmo plasmídeo pBs KS+ das irradiações com ^{60}Co . Neste caso a concentração de DNA na amostra estoque foi de 265 ng/ μl , com 90% de ácidos nucleicos e 99% do plasmídeo em forma *supercoiled*. O *scavenger* utilizado foi o Glicerol para manter as condições similares às irradiações com ^{60}Co . As irradiações foram feitas em quatro ambientes diferentes para o DNA: sem *scavenger*, com 2 mM de Glicerol, 20 mM e 200 mM. O Glicerol encontrava-se numa solução estoque a 87%. Foi necessário fazer várias dissoluções para atingir as concentrações necessárias nas amostras a irradiar. A seguir são detalhados os passos para a preparação das amostras.

As soluções estoques utilizadas foram:

- Solução DNA: 265 ng/ μl
- Solução Glicerol 87% (1.26 g/ cm^3): neste caso a concentração de Glicerol foi $1.096\text{g}/\text{cm}^3 = 1.096 \cdot 10^{-3} \text{ g}/\mu\text{l}$. Peso molecular 92.10 g/mol.

O primeiro objetivo foi a preparação de três soluções de glicerol tais que 100 μl num total de 450 μl representassem 2mM, 20 e 200mM. Desta forma sobriariam 350 μl para colocar a água e o DNA. Os passos de preparação são mostrados na tabela 5.7.

Tabela 5.7 Mostras com 200 mM de Glicerol

Nome da dissolução	Solução glicerol	Conc. Inic. Glicerol	Vol. H_2O	Vol.Final	Conc.Final Glicerol
<i>SOL-1 (200 mM)</i>	75,63 μl Estoque (87%)	1.096E-3 g/ μl	924,37 μl	1000 μl	8,289-5 g/ μl
<i>SOL-2 (20 mM)</i>	100 μl de SOL-1	8,289-5 g/ μl	900 μl	1000 μl	8,289-6 g/ μl
<i>SOL-3 (2 mM)</i>	100 μl de SOL-2	8,289-6 g/ μl	900 μl	1000 μl	8,289-7 g/ μl

Posteriormente foram preparadas as amostras para a irradiação.

As amostras sem presença de *scavenger* foram preparadas diretamente na concentração do estoque de DNA. Como os resultados das irradiações com ^{60}Co mostraram que as amostras com as menores concentrações sofreram muitas quebras para doses baixas fazendo impossível sua quantificação, foi decidido manter a maior concentração de DNA (265 ng/ μl). Como também foi demonstrado nos resultados descritos na seção 6.4 do capítulo 6, esta decisão não influenciou significativamente nos resultados, uma vez normalizados em quebras simples e duplas por unidade de dose e de Dalton.

As irradiações foram feitas em tubos da Eppendorf de 0.5 ml, similares aos usados no caso do ^{60}Co . Nas amostras sem *scavenger* foram colocados 10 μl do estoque de DNA.

Nos casos de amostras com *scavenger* a concentração para a irradiação foi menor do que a amostra estoque. O objetivo foi diminuir os tempos de irradiação necessários para danificar todas as moléculas. Os 450 μl de estoque destes tipos de amostras foram preparados como mostra a tabela 5.8.

Tabela 5.8 Mostras com 200 mM de Glicerol

Nome da mostra	Vol.DNA estoq. (265ng/ μl)	Vol. Solução de Glicerol	Vol. H_2O	Vol.Final	Conc. DNA final
<i>Cs-2mM</i>	150 μl	100 μl de SOL-3	200 μl	450 μl	88,3 ng/ μl
<i>Cs-20mM</i>	150 μl	100 μl de SOL-2	200 μl	450 μl	88,3 ng/ μl
<i>Cs-200mM</i>	150 μl	100 μl de SOL-1	200 μl	450 μl	88,3 ng/ μl

Para a irradiação foram colocados 30 μl de cada um dos estoques anteriores em tubos da Eppendorf de 0.5 ml.

5.5.2 Irradiação das amostras

Para os trabalhos com gama de ^{137}Cs foi utilizado o irradiador modelo IBL 637 situado no ICB-4 da USP. Desenhado para investigações biológicas, este possui uma câmara de irradiação de forma cúbica com 40 cm de aresta. A fonte de ^{137}Cs é formada por quatro tubos selados de aço inox que contêm o material radioativo. O bloco das fontes no momento de irradiação fica a 25 cm da base da câmara e no final é guardado num compartimento blindado, figura 5.4.

A geometria do irradiador permitiu que as amostras fossem colocadas num mesmo plano horizontal no centro da câmara de irradiação.

A taxa de dose foi determinada pelo Laboratório de Dosimetria do IF-USP no dia 27 de outubro de 2005 utilizando dosímetros de Termoluminescentes de LiFG [Okuno 2005].

A taxa de dose central na base da câmara foi de 1.31 Gy/min com 5% de erro. Este valor coincide relativamente bem com o valor de 1.322 Gy/min calculado utilizando a equação de desintegração e a taxa de dose no ano da sua construção e calibração (1990),

$$\dot{D} = \dot{D}_o \exp\left(-t \cdot \frac{\ln 2}{30.15 \text{ yr}}\right), \quad [5.1]$$

onde t é o tempo transcorrido (15 anos) e $\dot{D}_o$, a taxa de dose inicial (1.866 Gy/min).

Utilizando esta mesma equação foi calculada a nova taxa de dose no mês da irradiação (março 2006) obtendo uma taxa de dose de 1.29 Gy/min.

Figura 5.4 Irradiador IBL 637. A) Foto do irradiador. B) Curvas de isodose. C) Posições do irradiador.

A taxa de dose mencionada anteriormente (1.31 Gy/min) foi encontrada em uma revisão da documentação do irradiador. Por causa da ausência do responsável da dosimetria a taxa de dose tinha sido erroneamente reportada, com uma estimativa de 1.5 vezes maior que a real, causada por uma má leitura do informe do Laboratório de Dosimetria do IFUSP [Okuno 2005]. Por este motivo as doses reais e corrigidas depositadas nas amostras foram calculadas dividindo a dose planejada por um fator 1.5. Baseados nas observações das irradiações com ^{60}Co as doses planejadas inicialmente foram, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 12, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1400, 1600, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4400, 4654 e 4900 Gy. Estas dependeram das condições das amostras. Aquelas que possuíam maior concentração de Glicerol receberam doses maiores. As doses recebidas foram cumulativas e as amostras foram retiradas do suporte à medida que alcançavam as doses planejadas, figura 5.5.

Figura 5.5 Geometria das amostras no irradiador de ^{137}Cs IBL-637. As amostras ficaram num plano horizontal e foram retiradas à medida que acumulavam as doses predefinidas para cada uma.

5.5.3 Géis de eletroforese e quantificação

Posteriormente a irradiação, foram adicionados 20 μl de água destilada e 3 μl de *Stop Mix* para as amostras sem *scavenger* totalizando 33 μl em cada uma. Desta forma a concentração final para a aplicação no gel foi de 80 ng/ μl , recomendável para aplicação no gel (resultados do ponto 5.2). Para o resto das amostras só foram adicionados 3 μl de *Stop Mix*, obtendo uma concentração final de 80 ng/ μl , igual ao das amostras sem *scavenger*. Os géis de eletroforese e a quantificação foram feitos seguindo a metodologia apresentada na seção 5.3.3.

Os resultados de G(SSB) e G(DSB) para irradiações de DNA plasmidial com gama de ^{137}Cs são apresentados no capítulo 6, seções 6.5 e 6.6.

5.6 G(SSB) e G(DSB) para irradiações de DNA com prótons de 10 MeV.

A seguir são apresentados os procedimentos realizados para a irradiação do DNA plasmidial com prótons. O principal objetivo desta irradiação foi obter dados preliminares de rendimentos de quebras simples e duplas que permitissem realizar comparações quantitativas com relação aos dados obtidos com radiação gama.

Por causa do reduzido tempo de máquina para realizar as irradiações, o DNA foi irradiado somente em duas condições extremas. Estas foram: sem presença de *scavenger* e com 200 mM de Glicerol. A concentração de DNA foi mantida constante.

5.6.1 Preparação das amostras

O DNA utilizado para este trabalho foi o mesmo plasmídeo pBKs. Na data de preparação das amostras o estoque de DNA foi o mesmo que o utilizado nas irradiações com gama de ^{60}Co . Com ele foram preparadas dois tipos de amostras, uma sem *scavenger* e a outra com Glicerol a 200 mM, ambas com DNA na concentração de 200 ng/ μl . A preparação das duas soluções foram realizadas de forma similar às amostras 200ng/ μl -0mM e 200ng/ μl -200mM, apresentadas nas tabelas das irradiações com gama de ^{60}Co da seção 5.4.1.

5.6.2 Arranjo experimental e cálculo da dose

As irradiações com prótons foram feitas no feixe externo do acelerador tipo Pelletron situado no Instituto de Física da USP. Foi utilizado um porta-amostra desenhado especificamente para esta irradiação [Echeimberg 2003].

O DNA foi depositado na parte central, e vedado com folhas de Makrofol. Logo o conjunto foi parafusado e colocado num suporte, figura 5.6. Este suporte para porta-amostra foi projetado para ser encaixado na antena presente no Pelletron, e manter os alvos perpendiculares ao feixe espalhado de 20° , em relação ao eixo de incidência, figura 5.7. Para isto um feixe de prótons com energia de 14 MeV atinge uma folha de alumínio de 0,5 mm de espessura e, ao colidir com os núcleos de Al, sofre espalhamento elástico. Segundo a equação de espalhamento de Rutherford, a 20° são encontrados prótons com 10 MeV. Vários motivos levaram a esta configuração. Um foi diminuir a taxa de dose e a elevação da temperatura levando em conta que a corrente média do feixe central era de 600 nA, e o outro foi permitir controlar a dose nas amostras utilizando um copo de Faraday no final do feixe. figura 5.7.

Figura 5.6. Porta-amostras e suporte. As amostras são depositadas no centro do porta-amostras e vedadas com Makrofol.

Para a estimativa da dose foi utilizada a metodologia desenvolvida por [Echeimberg 2003]. Medindo o número de prótons que chegam ao copo de Faraday (carga integrada) é possível estimar por Rutherford o número de prótons que chegaram às amostras. Multiplicando estes pela energia depositada e dividindo pela massa da amostra é determinada a dose.

Figura 5.7. Montagem das peças na saída do feixe de prótons. As amostras ficam perpendiculares ao feixe espalhado de 20°.

O suporte que é colocado na antena possui uma capacidade para seis porta-amostras. Para a calibração do número de prótons que chegam às seis posições em função do número de prótons que chegam ao Copo de Faraday, dois detectores de estado sólido foram colocados em cada um destes lugares. Os resultados mostraram uma boa simetria do feixe e que os prótons esperados a 20°, N_p (calculados por Rutherford) apresentaram um valor 7.14 maior que os medidos, atribuído à coleta de carga no copo de Faraday. Levando em conta isto foi introduzido um fator de correção f_c , igual a 0.14 (1/7.14) multiplicando a N_p [Echeimberg 2003].

O número de prótons que chegam à amostra calculada a partir da carga integrada no Copo de Faraday será:

$$n_p = f_c \cdot N_p = f_c \cdot \left[\left(\frac{d\sigma}{d\Omega} \right)_{Rut} \cdot d\Omega \cdot \eta \cdot \frac{q_i}{e^-} \right], \quad [5.2]$$

onde $d\Omega$ é o ângulo sólido determinado pela amostra, $(d\sigma/d\Omega)_{Rut}$ representa a seção de choque de espalhamento Rutherford para 20°, η é a densidade superficial de núcleos na janela espalhadora de Alumínio por m², q_i é a carga integrada no copo de Faraday em Coulomb, e^- é a carga do elétron.

A energia depositada pelos prótons que chegam à amostra foi determinada por meio de simulações. A curva de transferência linear de energia dos prótons foi obtida na

simulação do montagem de irradiação no GEANT 3.2.1. A energia depositada foi estimada integrando a região do gráfico que representa o volume da amostra de DNA [Echeimberg 2003].

Figura 5.8 Curva de transferência Linear de Energia para prótons de 10 MeV simulada com o GEANT [Echeimberg 2003].

A equação final para o cálculo da dose é:

$$D = \frac{n_p \cdot [\overline{LET} \cdot \Delta l]}{m}, \quad [5.3]$$

onde o termo entre colchetes representa a energia depositada, sendo $\overline{LET}$ a transferência linear de Energia média na região de comprimento Δl no gráfico, correspondente à espessura da amostra de DNA e m é massa da amostra. O valor de $\overline{LET}$ na região de irradiação foi de $5 \text{ keV}/\mu\text{m} = 8\text{E-}16 \text{ J}/\mu\text{m}$ ($1\text{eV} = 1.6\text{E-}19 \text{ J}$) e o Δl de 0.26 mm . A massa da amostra $\rho \cdot S \cdot \Delta l$ foi de $5.11 \times 10^{-6} \text{ kg}$, onde ρ é a densidade da solução ($\approx 10^{-3} \text{ g/mm}^3$), S a área da seção transversal da amostra (circulo de 2.5 mm de radio e área 19.6 mm^2). O volume de cada amostra era aproximadamente $5 \mu\text{l}$.

Substituindo os dados anteriores se obtém que

$$D = \left(\frac{q_i}{e} \right) \cdot 4.07 \times 10^{-8} \text{ Gy}. \quad [5.4]$$

A taxa de dose vai depender do número de prótons que chegam ao copo de Faraday na unidade do tempo e, por conseguinte da corrente do Feixe. Esta corrente não é totalmente estável durante o experimento, nem a taxa de dose, porém em média a taxa de dose na irradiação foi de 11.9 Gy/min .

5.6.3 Irradiação das amostras

As irradiações das amostras foram feitas em quatro grupos (A, B, C e D) com o objetivo de repetir as doses três vezes. Amostras de 5 µl foram pipetadas nos porta-amostras e fixadas no suporte, acoplado na antena do sistema de irradiação. Na tabela 5.9 aparecem as amostras que foram colocadas em cada uma das posições do irradiador. O número indica a dose recebida, a letra a ordem de irradiação e o número (1) se não apresentava *scavenger*, o (2) se continham Glicerol. No momento em que uma amostra recebia a dose planejada, a mesma era substituída por outra amostra. As doses maiores foram dadas de forma cumulativa. A dose recebida foi controlada pela carga integrada no copo de Faraday.

Tabela 5.9 Amostras e doses das quatro irradiações A, B, C e D feitas com prótons.

Irradiação A						
Posição no suporte	1	2	3	4	5	6
Amostras	150-A1	400-A1	400-A1	400-A2	400-A2	150-A2
	250-A1					250-A2
	30-A1	40-A1	40-A1	40-A2	40-A2	30-A2
	10-A1					10-A2
	20-A1	70-A1	70-A1	70-A2	70-A2	20-A2
	50-A1					50-A2
Irradiação B						
Posição no suporte	1	2	3	4	5	6
Amostras	30-B1	30-B1	40-B1	40-B2	30-B2	30-B2
	10-B1	10-B1			10-B2	10-B2
	20-B1	20-B1	70-B1	70-B2	20-B2	20-B2
	50-B1	50-B1			50-B2	50-B2
	150-B1	150-B1	400-B1	400-B2	150-B2	150-B2
	250-B1	250-B1			250-B2	250-B2
Irradiação C						
Posição no suporte	1	2	3	4	5	6
Amostras	300-C1	300-C1	700-C1	700-C2	500-C2	500-C2
	200-C1	200-C1				
	110-C1	110-C1			200-C2	200-C2
	90-C1	90-C1				
Irradiação D						
Posição no suporte	1	2	3	4	5	6
Amostras	300-D1	700-D1	700-D1	700-D2	700-D2	500-D2
	200-D1					
	110-D1					
	90-D1					
						200-D2

No término da irradiação de cada amostra o porta-amostra era lavado com água destilada, secado e preparado com uma nova amostra.

5.6.4 Géis de eletroforese e quantificação

Todas as amostras de 5 µl e 200ng/µl de DNA, foram completadas com 15 µl de água destilada e 2 µl de *Stop Mix*, resultando num volume final de 22 µl. Os géis de eletroforese foram corridos nas mesmas condições que no caso das irradiações com gama, 10 µl por poço em géis de 0.7% de agarose, num potencial de 5 V/cm e durante duas horas. As imagens guardadas em formato BMP foram analisadas utilizando o programa GelAnalis.

Os resultados dos rendimentos de quebras simples e duplas com prótons são apresentados no capítulo 6, seção 6.7.

CAPÍTULO 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos em cada um dos trabalhos desenvolvidos na tese. Primeiramente são mostrados os resultados do estudo de otimização da técnica de eletroforese mencionado no epígrafe 5.2. Posteriormente são mostrados os resultados e as análises para os estudos 5.3, 5.4, 5.5 e 5.6, envolvendo irradiações com gama de ^{60}Co e ^{137}Cs e irradiações com prótons de 10 MeV.

6.1 Resultados da otimização da técnica de eletroforese em gel de agarose

Para realizar o estudo de otimização da técnica de eletroforese, os géis corridos e fotografados eram quantificados com o programa GelAnalis, desenvolvido para este propósito. Portanto, o primeiro passo foi estudar como realizar uma boa quantificação das bandas utilizando o programa.

6.1.1 Quantificação das bandas de DNA

O processo de quantificação foi dividido em três partes: trabalho com o fundo, análise das bandas, e relatório dos dados. No trabalho com o fundo foi removida a luminosidade produzida pelo Brometo de Etídio presente no gel e que não estava ligado ao DNA. Em nosso caso, este se encontrava na concentração de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ dentro do gel. Em geral, o nível de fundo gerado pelo Brometo não ligado foi muito baixo, já que sua fluorescência é de 20 a 30 vezes menor que o DNA ligado [Sambrook and Russell 2001]. Porém, nos casos em que a presença de DNA foi baixa e o número de integrações é grande, a presença deste fundo se fez relevante. Para a remoção do fundo foi utilizada principalmente a ferramenta do programa que permite eliminar um valor fixo para todos os pixels da imagem. Nas ocasiões em que a distribuição do Brometo não era homogênea, o fundo foi eliminado da imagem por meio de equações lineares [Apêndice 1]. Os resultados mostraram que o melhor critério para a remoção foi tentar minimizar os níveis de fundo sem chegar a afetar as conformações das bandas. Um predomínio da cor negra na imagem final do gel indicava uma boa remoção.

Na análise das bandas, para os géis com boa remoção de fundo, o método de seleção da banda por meio de regiões retangulares mostrou bons resultados. Nestes casos a variação do tamanho do retângulo não introduziu nenhuma variação na luminosidade óptica integrada. Já nos casos em que aconteceu uma leve superposição de bandas ou

existiu presença de algum fundo, a ferramenta de seleção automática por cor de tolerância (veja Apêndice 1, seção 3), mostrou melhores resultados. Em certos casos isolados, onde o DNA fracionado misturava-se com DNA linear, somente era possível utilizar a ferramenta de ajuste simultâneo de picos (veja Apêndice 1, seção 3). Os dois tipos de relatórios que o programa produz (veja apêndice 1, seção 4), foram guardados em todo momento, permitindo desta forma analisar os passos feitos em cada quantificação e importar os resultados em programas de análise como o Microsoft Excel e Microcal Origin.

6.1.2 Efeito do Brometo de Etídio

Também foi estudado o efeito dos géis pré-corados e pós-corados com Brometo de Etídio na quantificação das bandas de DNA. Os resultados obtidos das corridas mostraram primeiramente que, para as amostras contendo os três tipos de DNA do estudo (SC, Cir e Lin), os géis pré-corados apresentaram um maior poder de separação nas mesmas condições de corridas, figura 6.1.

A melhoria na separação das bandas no caso dos géis pré-corados é devida à intercalação do Brometo na molécula de DNA. O mesmo se liga num plano perpendicular ao do eixo da molécula de DNA, aumentando desta forma a resistência que o gel oferece à migração das moléculas. Por outro lado, esta resistência não será igual para todos os tipos de DNA. O DNA SC tem uma aderência menor ao Brometo [Anexo2] que o Cir e Lin, desta forma o DNA circular superenovelado migra a uma velocidade maior aumentando desta forma a separação com respeito às outras bandas. Isto pode ser observado também na figura 6.1.

Figura 6.1. Esquerda: Gel pré-corado com Brometo. Direita: Gel corado após corrida. O gel da esquerda mostrou um maior poder de separação das bandas SC, Cir e Lin que o da direita.

Na quantificação do Ladder de Massa (padrão de massa) nos géis previamente corados (pré-corados) a linearidade da luminosidade com respeito à massa foi muito melhor que no gel corado posteriormente (pós-corados), como mostra a figura 6.2. Uma possível explicação é que, para os géis pré-corados, a eficiência de intercalação do Brometo é muito maior, já que o DNA vai ao encontro do corante ao longo do seu caminho. No outro caso, o corante é quem vai até o DNA por difusão para se intercalar. É possível de observar esta deficiência na ligação através da quantificação das bandas do Ladder de massa da figura 6.1. Esta quantificação é mostrada na figura 6.2. No gráfico é apreciável como no caso das amostras pós-coradas há perda da linearidade à medida que a massa de DNA aumenta.

Figura 6.2 Curva de calibração de luminosidade óptica integrada em função da massa. O gel pré-corado mostrou uma melhor linearidade que o pós-corado com Brometo. Pontos ajustados a funções de segundo grau.

6.1.3 Efeito da concentração de agarose

Para estudar o efeito da concentração de agarose foram corridos géis com concentrações de 0.7%, 0.8% e 1.0%. Os resultados obtidos mostraram que os géis com 0.7% conseguiram uma boa separação dos três tipos de DNA num tempo de duas horas. Já para os géis com 1% o tempo necessário para uma boa separação foi de 3 horas. Estas observações estiveram condicionadas à voltagem aplicada. Em todos os casos observou-se que corridas com voltagens altas (entre 7.5 e 12 V/cm) podiam aumentar muito a velocidade de migração do DNA, que terminava saindo do gel pelo extremo inferior

antes de se conseguir uma boa separação das bandas. Por outro lado, corridas com voltagens muito pequenas (entre 2 a 4 V/cm) melhoravam o poder de separação, mas o tempo de corrida aumentava muito (entre 4 e 6 horas). Os resultados mostraram que os géis com 0.7% de agarose e com um potencial de 5 V/cm permitiam uma ótima separação das bandas em 2 horas aproximadamente.

6.1.4 Efeito da quantidade de DNA aplicada por poço do gel.

Outro parâmetro que foi estudado na hora de correr o gel é a quantidade de DNA a colocar por poço para ser separado pelo Gel. Uma quantidade muito elevada de DNA pode fazer com que o tamanho das bandas seja muito grande e estas terminem se sobrepondo uma à outra. Por outro lado, quantidades muito pequenas podem produzir bandas muito estreitas, as quais aumentam os erros na quantificação. Por isso foi estudada qual era a melhor quantidade de DNA a ser aplicada por poço.

Em nosso estudo foram utilizados dois tipos de pentes para gerar os poços no gel. Um para géis pequenos produzindo 8 lugares e o outro para géis grandes produzindo 15 poços. As dimensões de cada poço foram 5x2x4mm e a altura em média dos géis preparados de 6 mm.

Quatro amostras com concentrações diferentes de DNA foram aplicadas nos 15 poços do Gel. Três tipos de amostras foram repetidas quatro vezes e uma só três. As amostras tinham presença de DNA SC e Cir e as concentrações foram de 9, 45, 80 e 90 ng/μl, e o volume aplicado foi de 10 μl

Figura 6.3 Gel com diferentes quantidades de DNA aplicadas. Foram aplicados 10 μl de soluções com 9, 45, 80 e 90 ng/μl de DNA.

Os resultados mostraram que para aplicações nos poços com as concentrações de 9 ng/μl e 45 ng/μl as separações das bandas foram as melhores, no entanto a relação entre o fundo e a densidade ótica integrada das bandas foram as maiores, aumentando os erros na quantificação. Por outro lado, para bandas com mais de 900 ng pode-se observar que

as bandas começam a se sobrepor, figura 6.3. Portanto foi decidido utilizar para o trabalho aplicações de cerca de 800 ng de DNA por poço do gel para realizar a separação das três conformações por eletroforese.

6.1.5 Determinação do melhor número de integrações

Outro fator importante antes de realizar a quantificação das bandas de DNA está relacionado com o número de integrações (tempo de exposição) com que deve ser feita a fotografia do gel de eletroforese. Para o estudo foram quantificadas as bandas do Ladder de massa num gel fotografado com diferentes tempos de exposição. A seguir foi analisada a linearidade da luminosidade em função da massa em cada banda, figura 6.4. Os resultados mostraram que poucas integrações conservam de forma satisfatória a linearidade. Por outro lado, com o incremento do número de integrações é possível apreciar melhor o comportamento apresentado pelo fundo assim como a forma e quantidade das bandas de DNA, figura 6.5.

Figura 6.4 Imagem de Ladder de massa com quatro integrações diferentes e luminosidade das bandas em função das massas.

Figura 6.5 Perfil das imagens dos géis da figura 6.5 mostrando como com o aumento do número de integrações o comportamento do fundo pode ser melhor apreciado, mas a saturação faz com que nem todas as bandas aumentem sua DOI (densidade óptica integrada).

A perda da linearidade da DOI em função da massa para o Ladder com o aumento do número de integrações é provocada pela aparição de saturação da luminosidade nas bandas de DNA. Isto é provocado pela impossibilidade dos CCD (*Couple Charge Device*) da câmera de converter a luz que chega neles a um valor maior que 255. O software do sistema de aquisição da imagem do gel permite observar se a fotografia apresenta saturação, assim como o programa de quantificação também mostra se tem saturação. Nas imagens da figura 6.4 é mostrada em vermelho a saturação das bandas. Com o aumento do número de integrações a cor vermelha se faz predominante indicando que existe perda de informação na imagem.

O critério final escolhido para a exposição das imagens foi escolher o maior número de integrações em que a imagem não apresenta nenhuma saturação. Isto garantiu obter a maior quantidade de informação do gel mantendo a linearidade entre a luminosidade e a massa de DNA.

6.1.6 Metodologia final otimizada. Discussão

Os resultados da otimização da técnica de eletroforese permitiram obter uma metodologia rápida, eficiente e precisa para a análise de um grande número de amostras em pouco tempo.

Para realizar a separação das diferentes conformações finais do DNA irradiado foram utilizados géis com 0.7% de agarose, corados previamente com Brometo de Etídio a uma concentração de 0.5 µg/ml. Em todas as corridas os géis foram submetidos a um gradiente de voltagem de 5 V/cm. Com este gradiente em duas horas os géis separavam de 450ng a 800ng de DNA plasmidial em suas três conformações: circular superenovelado, circular relaxado e lineal.

As imagens dos géis foram tomadas com o sistema *Eagle Eye CCD video camera system*[®] com um tamanho de 640x480 pixels e 8bits de resolução. Antes de tomar as fotografias dos géis, foi colocado primeiro um padrão de prova para ajustar a posição e o foco da câmera CCD. Depois era colocado o gel a fotografar. A luminosidade das bandas na fotografia final foi controlada através do número de integrações (1/30 segundos). As fotografias dos géis foram feitas com o maior número de integrações tal que não causassem a saturação luminosa das bandas. As imagens finais foram guardadas em formato de mapa de bit, BMP (*BitMap Picture*), sem compressão para evitar a perda de informação das imagens comprimidas. Posteriormente, com as fotos e o programa GelAnalis foram realizadas as quantificações das bandas do DNA. No

processo de quantificação primeiro foi removido o fundo. Para isso, tomou-se como referência o perfil do fundo nas regiões do gel onde não existia DNA. A seguir as bandas foram selecionadas por retângulos ou por cor de tolerância e quantificadas. Os passos de quantificação e os resultados foram guardados em dois arquivos separados. Posteriormente os dados da luminosidade foram importados no programa Microsoft Excel e desta forma foi possível calcular as frações de DNA em cada conformação para as diferentes amostras. As luminosidades de DNA SC foram multiplicadas pelo fator 1.7 para levar em conta a deficiência no enlace do Brometo de Etídio [Apêndice 2].

6.2 Efeito das frações iniciais de DNA SC e Cir nos rendimentos de SSB e DSB. Resultados e discussão.

A seguir são mostrados os resultados do estudo sobre o efeito das frações iniciais de DNA nas formas circular superenovelado e circular relaxado sobre os rendimentos de quebras simples e duplas.

6.2.1 Géis de eletroforese e resultados da quantificação.

Abaixo são mostrados os géis de eletroforeses das amostras com diferentes percentagens de DNA SC e Cir, assim como suas respectivas quantificações, figuras 6.6 a 6.9.

Amostras 90%-10%

Figura 6.6 Acima: Gel de irradiação com gama de ^{60}Co para amostras com 90%SC+10%Cir inicial. Doses: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 70, 100, 130, 180, 250 Gy. As linhas servem para guiar a vista. Abaixo: Quantificação das bandas.

Amostras com 70%-30%

Figura 6.7 Acima: Gel de irradiação com gama de ^{60}Co para amostras com 70%SC+30%Cir inicial. Doses: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 70, 100, 130, 180, 250 Gy. As linhas servem para guiar a vista. Abaixo: Quantificação das bandas.

Amostras 60%-40%

Figura 6.8 Acima: Gel de irradiação com gama de ^{60}Co para amostras com 60%SC+40%Cir inicial. Doses: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 70, 100, 130, 180, 250 Gy. As linhas servem para guiar a vista. Abaixo) Quantificação das bandas.

Amostras 0%-100%

Figura 6.9 Acima: Gel de irradiação com gama de ^{60}Co para amostras com 0%SC+100%Cir inicial. Doses: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 70, 100, 130, 180, 250 Gy. As linhas servem para guiar a vista. Abaixo: Quantificação das bandas.

6.2.2 Análise e discussão dos efeitos do DNA Cir inicial sobre o G(SSB).

Com os valores das frações de DNA circular superenovelado dos resultados da seção anterior, é possível calcular os rendimentos de produção de rupturas simples e duplas em unidades de $\mu\text{mol/J}$ e $\text{Gy}^{-1}\text{Da}^{-1}$ (veja capítulo 4, seção 4.4.2 e 4.4.3). Na figura 6.10 são mostrados os ajustes exponenciais e na tabela 6.1 são reportados os rendimentos calculados destes ajustes.

Figura 6.10 Frações de DNA SC com 90%, 70% e 60%, ajustados a função $y = y_0 \exp(-\lambda * D)$, irradiado com raios gama de ^{60}Co .

Os cálculos dos rendimentos foram feitos utilizando as equações 4.22, e 4.23, onde a concentração de DNA foi $5.20\text{E-}2 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (100 ng/ μl) e o número de pares de base foi 2961 bp.

Tabela 6.1 G(SSB) em função da fração inicial de DNA SC.

Razão SC-Cir	λ [Gy^{-1}]	D_{37} [Gy]	G(SSB) [$\mu\text{mol J}^{-1}$]	G(DSB) [$\text{Gy}^{-1}\text{Da}^{-1}$]	erro
90%-10%	3.45(0.10)E-2	28.74(0.85)	1.81(0.05)E-3	1.81(0.05)E-8	3.0%
70%-30%	3.58(0.13) E-2	27.92(1.01)	1.86(0.07)E-3	1.86(0.07)E-8	3.6%
60%-40%	3.67(0.15) E-2	27.13(1.11)	1.92(0.08)E-3	1.92(0.08)E-8	4.1%
Média	3.58(0.38)E-2	27.93(2.98)	1.86(0.20)E-3	1.86(0.20)E-8	10.7%

Nos gráficos da figura 6.11 são mostrados os valores de rendimento de quebras simples nas duas unidades comumente utilizadas na bibliografia.

Figura 6.11 Rendimentos de produção de quebras simples para diferentes quantidades iniciais de DNA circular superenovelado.

Dos resultados é possível concluir que, efetivamente, como previsto pelo modelo de [Cowan 1987], a variação na quantidade inicial de DNA SC não afeta a produção de

quebras simples. Os resultados mostram também que na medida em que a percentagem inicial de SC diminui o erro na estimativa do G_{SSB} aumenta. Isto faz com que não seja recomendável utilizar percentagens pequenas de DNA SC inicial. No entanto, para percentagens maiores do 70%, os resultados mostram-se confiáveis.

6.2.3 Análise e discussão dos efeitos do DNA Cir inicial sobre o G(DSB).

No trabalho também foi analisado o efeito das diferentes quantidades de DNA inicial circular relaxado na produção das quebras duplas. Na figura 6.12 são mostradas as percentagem de DNA linear em função da dose para as amostras com diferentes quantidades de DNA circular relaxado inicial.

Figura 6.12 Percentagem de DNA linear em função da dose para amostras com 10%, 30%, 40% e 100% de DNA circular relaxado inicial, irradiado com raios gama de ^{60}Co .

À primeira vista, é possível observar que as quatro curvas no início possuem diferentes taxas de produção de DNA linear, tendo uma maior taxa aquelas amostras com maior quantidade de DNA circular. No entanto, à medida que continua a produção de quebras pela radiação (aumento da dose), é apreciável que a taxa de produção de DNA linear, e, portanto de quebras duplas, tende a ser a mesma para os quatro tipos de amostras. Uma possível explicação a isto é que no momento inicial as amostras com maior quantidade de DNA são mais propensas à indução de quebras duplas. O DNA circular relaxado inicial pode possuir várias SSB em diferentes partes da dupla cadeia, mas que não chegam a converter-se em DSB. Nestas condições, a probabilidade de produzir uma DSB é alta. À medida que a dose aumenta, são produzidos DSB neste DNA Cir inicial que vai passando a Lin e simultaneamente uma nova geração de DNA circular relaxado vai aparecendo como produto das taxa de quebras simples no DNA circular

superenovelado inicial, como já foi demonstrado na seção anterior. Esta taxa vai ser igual em todas as amostras estudadas, portanto, depois de desaparecer a quantidade inicial de DNA circular relaxado a geração nas amostras de DNA circular relaxado e de DNA linear passa a ser um processo similar em todos os casos.

Na figura 6.13 é mostrado os ajuste das frações lineares das amostras a polinômios de segundo grau.

Figura 6.13 Ajuste das frações lineares a polinômios de segundo grau ($y = A + B \cdot D + C \cdot D^2$). Para os cálculos de rendimentos de quebras duplas é utilizado o termo linear B da equação.

Os valores de rendimentos de quebras duplas, $G(\text{DSB})$, obtido a partir destes ajustes são mostrados na tabela 6.2. Para os cálculos foram utilizadas as equações 4.28 e 4.29. O resto dos parâmetros do cálculo foram similares aos do $G(\text{SSB})$.

Tabela 6.2 G_{SSB} em função da fração inicial de DNA SC.

Razão SC-Cir	Slope [Gy^{-1}]	G_{DSB} [$\mu\text{mol J}^{-1}$]	G_{DSB} [$\text{Gy}^{-1}\text{Da}^{-1}$]	erro
90%-10%	3.92(0.21)E-3	2.04(0.11)E-4	2.04(0.11)E-9	5.4%
70%-30%	4.34(0.29)E-3	2.26(0.15)E-4	2.25(0.15)E-9	6.8%
60%-40%	6.76(0.40)E-3	3.52(0.20)E-4	3.51(0.20)E-9	5.8%
0%-100%	5.75(0.34)E-3	2.99(0.18)E-4	2.99(0.18)E-9	6.0%

Neste caso é possível notar que os resultados dos rendimentos de quebras duplas, para amostras com menos de 30% de DNA circular relaxado inicial, são compatíveis. Para quantidades maiores, a curva começa a perder a linearidade e o termo linear no ajuste começa a ter uma importância menor provocando flutuações e se afastando do valor real, como mostra a figura 6.14. Para observar melhor esta compatibilidade, foram

agregadas na figura 6.14, bandas que representa a zona de possíveis valores de G(DSB) para as amostras com 10% e 30% de DNA circular relaxado inicial, respectivamente.

Figura 6.14 Rendimentos de produção de quebras duplas para diferentes quantidades iniciais de DNA Circular. As bandas em vermelho e azul representam a zona do possível valor de G(DSB) para as amostras com 10% e 30% de DNA circular relaxado inicial, respectivamente.

Deste estudo pode-se concluir que a presença de DNA circular relaxado inicial nas amostras em estudo em percentagens menores que 30% não produzem variações significativas nos resultados de rendimentos de quebras simples e duplas. Porém, é recomendável tentar reduzir a presença do mesmo para obter resultados com maior exatidão.

6.3 Quantificação de danos em amostras irradiadas com gama de ^{60}Co .

Abaixo são apresentados os resultados das quantificações dos danos obtidos nas irradiações de DNA com gama de ^{60}Co em diferentes condições de concentração e capacidade de *scavenging*. Estes estão agrupados em função da concentração de DNA de cada amostra.

6.3.1 Géis e resultados da quantificação das amostras com 10 ng/μl de DNA.

As figuras 6.15 a, b, c, d e e mostram os géis corridos para as amostras de 10 ng/μl.

Figura 6.15. Imagens em escala colorida dos géis para amostras de 10 ng/μl; a) Sem *scavenger* e de 0 a 180 Gy. b) Com 2mM de Glicerol e de 0 a 180 Gy. c) Com 20 mM e de 0 a 180 Gy. d) Com 200 mM e de 0 a 180 Gy. e) Resto das doses para as mostras de 2 mM, 20 mM, e 200 mM de Glicerol.

Os géis foram quantificados usando o software GelAnalysis. Os resultados das quantificações são mostrados na figura 6.16. Os mesmos foram corrigidos pelo fator 1.7 do enlace do Brometo. O gel da amostra de 10 ng/μl sem *scavenger* não foi quantificado já que todo o DNA foi quebrado para a primeira dose de 10 Gy.

Figura 6.16 Resultados da quantificação dos géis de 10ng/ μ l. a) gel com 2 mM de Glicerol, b) com 20 mM de glicerol, c) com 200 mM. Foram adicionadas linhas para melhor seguimento dos pontos.

6.3.2 Géis e resultados da quantificação das amostras com 50 ng/μl de DNA.

As figuras 6.17 a, b, c, d e mostram os géis corridos para as amostras com 50ng/μl de DNA.

Figura 6.17 Imagens em escala colorida dos géis para amostras com 50 ng/μl de DNA; a) Sem *scavenger* e de 0 a 180 Gy. b) Com 2 mM de Glicerol e de 0 a 180 Gy. c) Com 20 mM e de 0 a 180 Gy. d) Com 200 mM e de 0 a 180 Gy. e) Resto das doses para as mostras de 20 mM, e 200 mM.

A quantificação dos géis é mostrada nos gráficos da figura 6.18. Neste caso, o gel sem *scavenger* também não foi quantificado.

Figura 6.18 Resultados da quantificação dos géis de 50ng/μl. a) gel com 2 mM de Glicerol, b) com 20 mM de glicerol, c) com 200 mM. Foram adicionadas linhas para melhor seguimento dos pontos.

6.3.3 Géis e resultados da quantificação das amostras com 200 ng/μl de DNA.

As figuras 6.19 a, b, c, d, e e f mostram os géis corridos para as amostras de 200ng/μl.

Figura 6.19 Imagens em escala colorida dos géis para amostras de 200 ng/μl. a) Sem *scavenger* e de 0 a 180 Gy. b) Com 2mM de Glicerol e de 0 a 180 Gy. c) Com 20mM e de 0 a 180Gy. d) Resto das amostras com 2mM e 20mM. e) Com 200 mM e de 0 a 180 Gy. f) Resto das doses para as mostras de 200 mM.

A quantificação dos géis é mostrada nos gráficos da figura 6.20.

Figura 6.20 Resultados da quantificação dos géis de 200ng/ μ l. a) Sem *scavengers*, b) Gel com 2 mM de Glicerol, c) Com 20 mM de Glicerol, d) Com 200 mM. Foram adicionadas linhas para melhor seguimento dos pontos.

6.3.4 Géis e resultados da quantificação das amostras com 500 ng/μl de DNA.

As figuras 6.21 a, b, c, d, e e f mostram os géis corridos para as amostras de 500ng/μl.

Figura 6.21 Imagens em escala colorida dos géis para amostras com 500 ng/μl de DNA. a) Sem *scavenger* e de 0 a 180 Gy, b) Com 2 mM de Glicerol e de 0 a 180 Gy. c) Com 20 mM e de 0 a 350Gy, d) Resto das amostras com 2 mM e 20 mM. e) Com 200 mM e de 0 a 350 Gy. f) Resto das doses para as amostras de 200 mM.

A figura 6.22 mostra os resultados da quantificação das bandas, pelo programa GelAnalís.

Figura 6.22 Resultados da quantificação dos géis com 500 ng/μl de DNA. a) Sem *scavengers*. b) Gel com 2 mM de Glicerol. c) Com 20 mM de Glicerol. d) Com 200 mM. Foram adicionadas linhas para melhor seguimento dos pontos.

6.4 Determinação de G(SSB) e G(DSB) para irradiação com gama de ⁶⁰Co

Ajustando os resultados das quantificações da seção anterior, e utilizando as equações 4.22, 4.23, 4.28 e 4.29, foram calculados os rendimentos de quebras simples e duplas para cada condição do DNA e o ambiente irradiado.

6.4.1 G(SSB) e G(DSB) para amostras com 10 ng/μl de DNA

Na figura 6.23 é mostrado o ajuste da percentagem de DNA circular superenovelado a uma função exponencial. As contastes de decaimento assim como os G(SSB) para cada ambiente, são reportados na tabela 6.3.

Figura 6.23. Ajuste das percentagens SC em função da dose para as amostras com 10ng/μl de DNA e em diferentes ambientes de scavengers.

Para o cálculo dos rendimentos em μmol/J a concentração de DNA utilizada foi 5.20E-3 μmol/dm⁻³ equivalente a 10 ng/μl.

Tabela 6.3. G(SSB) para amostras com 10ng/μl

Amostra	λ [Gy ⁻¹]	D ₃₇ [Gy]	G(SSB) [μmol J ⁻¹]	G(SSB) [Gy ⁻¹ Da ⁻¹]	erro
10ng/μl-2sc	6.642(0.594)E-2	15.06(1.34)	3.45(0.31)E-4	3.46(0.31)E-8	9.0%
10ng/μl-20sc	1.408(0.045)E-2	71.02(2.27)	7.32(0.23)E-4	7.33(0.23)E-9	3.1%
10ng/μl-200sc	1.89(0.11)E-3	529.1(30.7)	9.83(0.57)E-4	9.84(0.57)E-10	5.8%

Na figura 6.24 são mostrados os ajustes das frações lineares em função da dose. Os rendimentos de produção de quebras duplas são reportados na tabela 6.4.

Figura 6.24 Ajuste das frações lineares em função da dose para as amostras com 10ng/μl de DNA e em diferentes ambientes de scavengers.

Tabela 6.4 G(DSB) para amostras de 10ng/μl

Amostra	Slope [Gy ⁻¹]	G(DSB) [μmol J ⁻¹]	G(DSB) [Gy ⁻¹ Da ⁻¹]	erro
10ng/μl-2sc	9.28(0.32)E-4	4.82(0.16)E-6	4.82(0.16)E-10	3.4%
10ng/μl-20sc	3.62(0.11)E-4	1.88(0.52)E-6	1.88(0.53)E-10	2.8%
10ng/μl-200sc	7.56(0.20)E-5	3.93(0.10)E-7	3.93(0.79)E-11	2.6%

6.4.2 G(SSB) e G(DSB) para amostras com 50 ng/μl de DNA

Na figura 6.25 e na tabela 6.5 são mostrados os ajustes das percentagens SC assim como os resultados dos rendimentos de quebras simples para as amostras com 50 ng/μl de DNA.

Figura 6.25 Ajuste das percentagens SC em função da dose para as amostras com 50ng/μl de DNA.

A concentração utilizada para os cálculos foi de $2.60\text{E-}2 \mu\text{mol dm}^{-3}$ o equivalente a $50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ para um DNA com 2961 pb .

Tabela 6.5 G(SSB) para amostras com $50\text{ng}/\mu\text{l}$

Amostra	$\lambda \text{ [Gy}^{-1}\text{]}$	$\text{D}_{37} \text{ [Gy]}$	$\text{G(SSB)}[\mu\text{mol J}^{-1}]$	$\text{G(SSB)}[\text{Gy}^{-1}\text{Da}^{-1}]$	erro
50ng/ μl -2sc	4.072(0.164)E-2	24.56(0.99)	1.06(0.04)E-3	2.12(0.09)E-8	4.2%
50ng/ μl -20sc	1.109(0.044)E-2	90.17(3.58)	2.88(0.11)E-4	5.78 (0.23)E-9	4.0%
50ng/ μl -200sc	1.68(0.05)E-3	595.2(17.7)	4.37(0.13)E-5	8.75(0.26)E-10	3.0%

A seguir são mostrados, na figura 6.26, os ajustes para as frações lineares e os resultados dos rendimentos de produção de quebras duplas, tabela 6.6.

Figura 6.26 Ajuste das frações lineares em função da dose para as amostras com $50\text{ng}/\mu\text{l}$ de DNA e em diferentes ambientes de scavengers.

Tabela 6.6 G(DSB) para amostras de $50\text{ng}/\mu\text{l}$

Amostra	$\text{Slope [Gy}^{-1}\text{]}$	$\text{G(DSB)} [\mu\text{mol J}^{-1}]$	$\text{G(DSB)} [\text{Gy}^{-1}\text{Da}^{-1}]$	erro
50ng/ μl -2sc	9.68(0.41)E-4	2.52(0.11)E-5	5.03(0.21)E-10	4.2%
50ng/ μl -20sc	3.73(0.12)E-4	9.71(0.30)E-6	1.94(0.60)E-10	3.1%
50ng/ μl -200sc	7.81(0.23)E-5	2.03(0.59)E-6	4.06(0.12)E-11	2.9%

6.4.3 G(SSB) e G(DSB) para amostras com $200 \text{ ng}/\mu\text{l}$ de DNA

Neste caso foi possível realizar a análise das amostras sem presença de *scavenger*. A figura 6.27 e a tabela 6.7 mostram os ajustes e os resultados para as amostras com $200 \text{ ng}/\mu\text{l}$. A concentração de DNA para os cálculos neste caso foi $1.04\text{E-}1 \mu\text{mol dm}^{-3}$.

Figura 6.27 Ajuste das percentagens SC em função da dose para as amostras com 200 ng/μl de DNA.

Tabela 6.7 G(SSB) para amostras com 200ng/μl

Amostra	λ [Gy ⁻¹]	D ₃₇ [Gy]	G(SSB) [μmol J ⁻¹]	G(SSB) [Gy ⁻¹ Da ⁻¹]	erro
200ng/μl-0sc	1.66(0.19)E-1	6.02(0.69)	1.73(0.20)E-2	8.65(1.00)E-8	11.5%
200ng/μl-2sc	3.32(0.15)E-1	30.2(1.3)	3.45(0.15)E-3	1.73(0.08)E-8	4.5%
200ng/μl-20sc	1.00(0.03)E-2	100(3)	1.04(0.03)E-3	5.21(0.16)E-9	3.1%
200ng/μl-200sc	1.19(0.02)E-3	840(14)	1.24(0.02)E-4	6.20(0.10)E-10	1.7%

A seguir, na figura 6.28 e na tabela 6.8 são mostrados os ajustes para o DNA linear e os rendimentos de quebras duplas para as amostras com 200 ng/μl.

Figura 6.28 Ajuste das frações lineares em função da dose para as amostras com 200ng/μl de DNA e em diferentes ambientes de scavengers.

Tabela 6.8 G(DSB) para amostras de 200ng/μl

Amostra	Slope [Gy ⁻¹]	G(DSB) [μmol J ⁻¹]	G(DSB) [Gy ⁻¹ Da ⁻¹]	erro
200ng/μl-0sc	4.37(0.25)E-3	4.54(0.14)E-4	2.27(0.13)E-9	5.8%
200ng/μl-2sc	1.05(0.46)E-3	1.09(0.18)E-4	5.44(0.24)E-10	4.4%
200ng/μl-20sc	4.58(0.18)E-4	4.76(0.04)E-5	2.38(0.93)E-10	3.9%
200ng/μl-200sc	8.41(0.56)E-5	8.75(0.05)E-6	4.37(0.29)E-11	6.7%

6.4.4 G(SSB) e G(DSB) para amostras com 500ng/μl de DNA

Neste caso também foi possível o análise de amostras sem presença de *scavengers*. A figura 6.29 e a tabela 6.9 mostram os ajustes e os resultados dos rendimentos de quebras simples para as amostras com 500 ng/μl de DNA.

Figura 6.29 Ajuste das percentagens SC em função da dose para as amostras com 500ng/μl de DNA.

Para o cálculo dos rendimentos a concentração de DNA utilizada foi de 2.60E-1 μmol dm⁻³.

Tabela 6.9 G(SSB) para amostras com 500ng/μl

Amostra	λ [Gy ⁻¹]	D ₃₇ [Gy]	G(SSB) [μmol J ⁻¹]	G(SSB) [Gy ⁻¹ Da ⁻¹]	erro
500ng/μl-0sc	7.521(0.734)E-2	13.3(1.3)	1.95(0.19)E-2	3.92(0.38)E-8	9.8%
500ng/μl-2sc	3.347(0.185)E-2	29.9(1.7)	8.70(0.48)E-3	1.74(0.10)E-8	5.5%
500ng/μl-20sc	1.085(0.031)E-2	92.2(2.6)	2.82(0.08)E-3	5.65(0.16)E-9	2.8%
500ng/μl-200sc	1.42(0.03)E-3	704(15)	3.69(0.08)E-4	7.40(0.16)E-10	2.1%

A figura 6.30 mostra o ajuste da fração de DNA linear em função da dose para as amostras com 500 ng/μl. Na tabela 6.10 são reportados os rendimentos de quebras duplas para estas amostras.

Figura 6.30 Ajuste das frações lineares em função da dose para as amostras com 500ng/μl de DNA e em diferentes ambientes de *scavengers*.

Tabela 6.10 G(DSB) para amostras de 500ng/μl

Amostra	Slope [Gy ⁻¹]	G(DSB) [μmol J ⁻¹]	G(DSB) [Gy ⁻¹ Da ⁻¹]	erro
500ng/μl-0sc	1.82(0.12)E-3	4.74(0.30)E-4	9.47(0.61)E-10	6.4%
500ng/μl-2sc	9.33(0.51)E-4	2.43(0.13)E-4	4.85(0.27)E-10	5.5%
500ng/μl-20sc	4.37(0.27)E-4	1.14(0.07)E-4	2.27(0.14)E-10	6.1%
500ng/μl-200sc	8.16(0.59)E-5	2.12(0.15)E-5	4.24(0.30)E-11	7.2%

6.4.5 Análise e discussão dos efeitos da concentração de DNA e de *scavenger* na produção de SSB e DSB

A figura 6.31 mostra os rendimentos de moléculas com quebras simples e duplas em função da concentração de DNA para os diferentes ambientes. É possível observar que com o aumento da quantidade de DNA na amostra aumenta o rendimento de moléculas com quebras simples e duplas por unidade de energia. No entanto isto não acontece com as amostras livres de *scavenger*. Neste caso, a variação é muito pequena. Este resultado era esperado, já que foi observado por outros autores (Milligan 1993). A possível explicação para isto é que nestas condições (ausência de *scavenger*), o efeito indireto é altamente predominante. Este efeito vai depender da taxa de produção do radical hidroxila. Portanto todos os radicais que conseguem escapar da zona de *spurs* (Jonah and Miller 1977) vão interagir com o DNA independentemente da sua concentração. A densidade de radicais será igual em todas as amostras sem *scavenger* e, portanto, a

probabilidade de quebras para qualquer concentração de DNA. Por outro lado à presença de *scavenger* faz com que se estabeleça uma competição entre os DNA e os captadores pela reação com os radicais produzidos na radiólise. Neste caso, o aumento da concentração de DNA produz um aumento na taxa de reação radical-DNA, diminuindo a taxa de reação radical-*scavenger*. Isto explica o incremento nos rendimentos de SSB e DSB com o aumento da concentração de DNA.

Figura 6.31 Rendimentos de moléculas com quebras simples e duplas em função da concentração do plasmídeo na amostra e para diferentes concentrações de *scavenger*.

Também é possível observar que com o aumento da concentração de *scavenger*, mantendo a mesma concentração de DNA, temos uma diminuição das moléculas com quebras. Neste caso, de forma similar, o incremento da quantidade de *scavenger* aumenta a taxa de reação radical-*scavenger*, diminuindo a taxa de reação radical-DNA e, portanto a produção de moléculas com danos.

Figura 6.32 Rendimentos de moléculas com quebras simples e duplas em função da concentração de *scavenger* na amostra e para diferentes concentrações de plasmídeo.

A figura 6.32 mostra mais claramente como o aumento da concentração de *scavenger* diminui o número de moléculas com quebras simples e duplas de forma praticamente linear num gráfico log-log.

Outro resultado importante e também esperado foi o rendimento de produção de quebras por par de base ($\text{Gy}^{-1}\text{Da}^{-1}$). Neste caso os G(SSB) e G(DSB) são reportados normalizados pelo número total de pares de base da molécula de DNA e pela dose, representando, portanto o rendimento ou probabilidade de quebras por par de base e por Gy. Esta forma de expressar os resultados é útil para realizar comparações com outros experimentos da literatura, onde os DNA utilizados podem ter cadeias com comprimentos diferentes.

A figura 6.33 mostra os rendimentos de quebras simples e duplas normalizadas em função da concentração de DNA. É possível observar que neste caso a variação dos G(SSB) e G(DSB) em função da quantidade de DNA é pequena, mantendo-se constante para amostras com iguais concentrações de *scavenger*. Isto mostra que na presença de *scavenger* o número de moléculas danificadas vai ser quase linearmente proporcional à concentração de DNA na amostra, o que já foi visto nas seções anteriores.

É observável que isto não ocorre no caso de amostras sem *scavenger*. Neste caso o aumento da concentração de DNA faz que o número de quebras por molécula diminua. Isto é evidente na figura 6.33, onde vemos que o incremento de DNA não produz incrementos no número de moléculas danificadas, portanto o número de quebras por moléculas vai diminuir à medida que aumenta sua concentração.

Figura 6.33 Rendimentos de produção de quebras simples e duplas em função da concentração de DNA para diferentes concentrações de *scavenger*.

Na tabela 6.11 são apresentados a média e as incertezas, dos rendimentos obtidos para as diferentes concentrações de plasmídeo, em função da capacidade de *scavenging* para as irradiações com raios gama de ^{60}Co . A capacidade de *scavenging* sem a presença de Glicerol foi aproximada a 10^5 s^{-1} .

Tabela 6.11 Média dos G(SSB) e G(DSB) em função da capacidade de *scavenging*.

Capacidade <i>scavenging</i> [s^{-1}]	G(SSB) [$\text{Gy}^{-1}\text{Da}^{-1}$]	erro	G(DSB) [$\text{Gy}^{-1}\text{Da}^{-1}$]	erro
1.0E5	4.51(0.72)E-8	15.9%	1.18(0.11)E-9	9.4%
3.8E6	1.90(0.10)E-8	5.1%	4.58(0.21)E-10	4.6%
3.8E7	5.78(0.19)E-9	3.2%	1.86(0.07)E-10	3.8%
3.8E8	6.84(0.16)E-10	2.4%	3.52(0.15)E-11	4.1%

Na figura 6.34, os resultados obtidos neste trabalho são comparados com os encontrados na literatura. Os rendimentos de quebras simples estão de acordo com os obtido pelos outros grupos e só nas quebras duplas encontra-se um ligeiro incremento. Este aumento da sensibilidade do DNA às quebras duplas pode estar relacionado com a melhora nas condições do DNA utilizando o novo método de purificação, e a presença de DNA circular relaxado nas amostras. Porém os resultados a 200 mM se aproxima muito aos mais recentes, encontrados por [Leloup 2005].

Figura 6.34 Comparação dos $G(\text{SSB})$ e $G(\text{DSB})$ com a literatura para gama de ^{60}Co .

Com os resultados anteriores na seção 6.9 é realizada uma discussão comparando os efeitos entre as irradiações com gama de ^{60}Co , ^{137}Cs e prótons.

6.5 Quantificação de danos em amostras irradiadas com gama de ^{137}Cs .

A seguir são mostrados os géis e resultados das quantificações das amostras de DNA irradiadas com gama de ^{137}Cs . Os resultados foram ordenados pela capacidade de *scavenging* da solução. As doses foram divididas por 1.5 tendo em conta o erro encontrado na taxa de dose reportada durante a irradiação (seção 5.52). A luminosidade do DNA SC foi multiplicada pelo fator de correção do enlace do Brometo, 1.7.

DNA sem *scavenger*

Os géis das figuras 6.35 e 6.36 mostram as bandas de DNA para doses entre 0 a 600 Gy.

Figura 6.35 Géis das amostras irradiadas sem a presença de scavengers. De esquerda a direita, Gel 1: Ladder, 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 5 Gy, Gel 2: 9, 12, 15, 20, 25, 30, 40 e 50 Gy.

Figura 6.36 Géis das amostras irradiadas sem a presença de *scavenger*. De esquerda a direita, Gel 3: 70, 100, 150, 200, 250 e 300 Gy, Gel 4: 150, 200, 250, 300, 400, 500 e 600 Gy.

Na figura 6.37 é mostrada a quantificação dos géis para as amostras irradiadas com gama de ^{137}Cs e sem presença de *scavenger*.

Figura 6.37 Quantificação dos géis 1, 2, 3 e 4 para as amostras irradiadas sem *scavenger*.

DNA com 2 mM de glicerol

Os géis das figuras 6.38 e 6.39 mostram as bandas de DNA para as doses de 0 a 1600 Gy das amostras com 2 mM de glicerol.

Figura 6.38 Géis das amostras irradiadas com 2 mM de glicerol. De esquerda à direita, Gel 1: 0, 12, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 Gy, Gel 2: 70, 80, 90, 100, 120, 150, 200 e 250 Gy.

Figura 6.39 Géis das amostras irradiadas com 2 mM de glicerol. De esquerda à direita, Gel 3: 0, 300, 350 e 400 Gy; Gel 4: 350, 400, 500, 600, 800, 1000, 1200, 1400 e 1600 Gy.

Na figura 6.40 é mostrada a quantificação dos géis para as amostras irradiadas com gama de ^{137}Cs e 2 mM de glicerol.

Figura 6.40 Quantificação dos géis 1, 2, 3 e 4 para as amostras irradiadas com 2mM de glicerol.

DNA com 20 mM de Glicerol

Os géis das figuras 6.41 e 6.42 mostram as bandas de DNA para as doses de 0 a 3000 Gy das amostras com 20 mM de glicerol.

Figura 6.41 Géis das amostras irradiadas com 20 mM de glicerol. De esquerda à direita, Gel 1: 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 e 150 Gy, Gel 2: 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 e 500 Gy.

Figura 6.42 Géis das amostras irradiadas com 20 mM de glicerol. De esquerda à direita, Gel 3: 0, 0, 600, 800, 1000, 1200, 1400 e 1600 Gy, Gel 4: 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 2000, 2500 e 3000 Gy.

Na figura 6.43 é mostrada a quantificação dos géis para as amostras irradiadas com gama de ^{137}Cs e 20 mM de glicerol.

Figura 6.43 Quantificação dos géis 1, 2, 3 e 4 para as amostras irradiadas com 20 mM de glicerol.

DNA com 200 mM de Glicerol

Os géis das figuras 6.44 e 6.45 mostram as bandas de DNA para doses de 0 a 4900 Gy.

Figura 6.44 Géis das amostras irradiadas com 200 mM de glicerol. De esquerda à direita, Gel 1: 0, 50, 100, 150, 200 e 300 Gy, Gel 2: 300, 400, 500, 600, 700, 800 e 900 Gy.

Figura 6.45 Géis das amostras irradiadas com 200 mM de glicerol. De esquerda à direita, Gel 3: 0, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 2000 e 2500 Gy, Gel 4: 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4400, 4654 e 4900 Gy.

Na figura 6.46 é mostrada a quantificação dos géis para as amostras irradiadas com gama de ^{137}Cs e 200 mM de glicerol.

Figura 6.46 Quantificação dos géis 1, 2, 3 e 4 para as amostras irradiadas com 200 mM de glicerol.

6.6 Determinação de G(SSB) e G(DSB) para irradiação com gama de ^{137}Cs .

Com os resultados das quantificações, e utilizando as equações 4.22, 4.23, 4.28 e 4.29, podem ser calculados os rendimentos de quebras simples e duplas para o DNA irradiado em cada ambiente.

Na figura 6.47, são mostrados os ajustes das percentagens de DNA superenovelado a uma função exponencial para as quatro condições de irradiação. As constantes de decaimento, assim como os G(SSB) para cada ambiente, são reportadas na tabela 6.12. Para os cálculos dos rendimentos em $[\mu\text{mol/J}]$ foram utilizadas as concentrações $1.38\text{E}-1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ e $4.58\text{E}-2 \mu\text{mol dm}^{-3}$ correspondentes às concentrações de 265 ng/ μl e 88 ng/ μl respectivamente.

Figura 6.47 Ajuste das percentagens SC em função da dose para as amostras com irradiadas em diferentes ambientes de *scavengers*.

Tabela 6.12 Rendimentos de quebras simples (G(SSB)).

Amostra	λ [Gy ⁻¹]	D ₃₇ [Gy]	G(SSB) [μmol J ⁻¹]	G(SSB) [Gy ⁻¹ Da ⁻¹]	erro
265ng/μl-0sc	7.60(0.13)E-2	13.1(0.2)	1.05(0.02)E-02	3.95(0.07)E-08	1.7%
88ng/μl-20sc	3.13(0.05)E-2	31.9(0.5)	1.43(0.03)E-03	1.63(0.03)E-08	1.7%
88ng/μl-20sc	6.61(0.17)E-3	151(4)	3.02(0.08)E-04	3.43(0.09)E-09	2.6%
88ng/μl-200sc	1.25(0.05)E-3	799(34)	5.72(0.25)E-05	6.50(0.28)E-10	4.3%

Para o cálculo dos rendimentos das quebras duplas as frações de DNA linear foram ajustadas a funções lineares e com frações menores de 15% (discussão no Apêndice 4). A figura 6.48 mostra os resultados dos ajustes. Com o coeficiente linear da equação, foram calculados os rendimentos para quebras duplas que são mostrados na tabela 6.13.

Figura 6.48 Ajuste das percentagens SC em função da dose para as amostras com 200 ng/μl de DNA.

Tabela 6.13 Rendimentos de quebras duplas (G_{SSB}) para amostras de 10ng/μl

Amostra	Slope [Gy ⁻¹]	G(DSB) [μmol J ⁻¹]	G(DSB) [Gy ⁻¹ Da ⁻¹]	erro
265ng/μl-0sc	1.76(0.47)E-3	2.43(0.07)E-4	9.14(0.25)E-10	2.7%
88ng/μl-20sc	7.30(0.25)E-4	3.34(0.11)E-5	3.79(0.13)E-10	3.4%
88ng/μl-20sc	2.45(0.13)E-4	1.12(0.06)E-5	1.28(0.07)E-10	5.2%
88ng/μl-200sc	6.88(0.18)E-5	3.15(0.08)E-6	3.57(0.09)E-11	2.6%

Na figura 6.49 são comparados os dados com a literatura. Os resultados mostram estar de acordo com os encontrados por outros grupos. Similarmente às irradiações com ⁶⁰Co, as quebras duplas tiveram um valor maior. Isto pode estar relacionado com a alta pureza do DNA, o que pode aumentar sua sensibilidade à radiação. Porém, nossos resultados encontram-se próximos aos mais recentes reportados por [Leloup 2005].

Figura 6.49 Comparação dos $G(SSB)$ e $G(DSB)$ com a literatura para gama de ^{137}Cs .

Estes resultados serão discutidos junto aos obtidos nas irradiações com ^{60}Co e prótons na seção 6.9.

6.7 Quantificação de danos em amostras irradiadas com prótons de 10MeV.

No processo de quantificação dos danos no DNA nas irradiações com prótons, aconteceu um incidente que retardou a quantificação em alguns meses. Como foi apresentado na seção 6.1.2, o Brometo de Etídio presente no gel gera também uma mudança na mobilidade do DNA de acordo com a sua conformação. A figura 6.1 mostra como sem a presença de Brometo de Etídio no gel, a separação entre as bandas SC e Lin praticamente não existe, dificultando a quantificação.

Durante a quantificação com prótons foi utilizada uma nova solução estoque de Brometo de Etídio, já que a antiga tinha acabado. Mas não foi percebido que a nova solução possuía o Brometo numa concentração dez vezes menor. Como resultado as bandas SC e Lin começaram a aparecer juntas, dificultando sua quantificação. Só uns meses depois de ir conferindo exaustivamente cada passo desde a preparação das amostras até sua separação no gel de eletroforese foi encontrado o erro.

Independentemente disto as amostras foram quantificadas considerando a banda circular superenovelado e linear como uma só, até que posteriormente pudessem ser separadas.

6.7.1 Quantificação de amostras sem *scavengers*.

A figura 6.50 mostra a quantificação das bandas SC+Lin e Cir feitas em dezembro de 2004 para cada uma das irradiações com prótons nas amostras sem *scavenger*. Neste caso observa-se que as bandas SC e Lin foram quantificadas como uma só.

Figura 6.50 Quantificação para irradiações com prótons de DNA sem *scavenger* realizada em 2004. A) Quantificação SC+Lin devido a união das bandas. B) Quantificação das bandas de DNA circular.

Na figura 6.51 é mostrada a média com sua variância para o conjunto de dados anteriores.

Figura 6.51 Valor médio para os resultados de irradiações com prótons de DNA sem *scavenger* do ano 2004.

Em maio de 2005 depois de encontrado o problema na confecção dos géis, foram refeitas todas as análises das amostras. Neste caso, encontrou-se uma pequena degradação no DNA que alterou ligeiramente os resultados encontrados. Na figura 6.52 isto é observável na diminuição do DNA SC inicial e alguns dos valores do DNA circular. Na segunda quantificação, algumas amostras irradiadas em importantes doses tinham acabado por causa das repetições tentando achar o problema na quantificação. Este foi o caso das amostras para 10 Gy, 90 Gy, 110 Gy e 200 Gy. Para doses maiores, o DNA passou à forma fracionada.

Figura 6.52 Dados de quantificação de 2004 e 2005 para amostras de DNA sem *scavenger*. Os dados de 2005 apresentam as três formas do DNA.

Para estimar o valor da fração de DNA SC nas amostras de 10 Gy e 20 Gy, os dados de DNA linear para doses maiores a 30 Gy foram ajustados a uma função de segundo grau. Para a estimativa dos dados de SC+Lin, foi subtraído o valor desta função em 10 Gy e 20 Gy respectivamente. Na figura 6.53 é mostrada a média dos resultados finais utilizados para a análise.

Figura 6.53 Resultados finais utilizados para a análise da irradiação com prótons do DNA sem *scavenger*.

6.7.2 Quantificação de amostras com 200 mM de Glicerol.

Para as amostras de DNA com 200 mM irradiadas com prótons são reportados os dados obtidos da quantificação realizada em 2005. A presença de Glicerol em uma alta concentração nas amostras ajudou a manter a estabilidade do DNA (figura 6.54).

Figura 6.54 Quantificação para irradiações com de DNA com 200 mM de Glicerol. A) Quantificação do DNA circular superenovelado. B) DNA circular relaxado. C) DNA linear. Os valores não estão corrigidos com o fator 1.7 relacionado com a aderência do Brometo [Apêndice 2].

Os dados anteriores não foram corrigidos por 1.7, correspondente ao fator de aderência do Brometo [Apêndice 2]. Fazendo a multiplicação e a normalização obtém-se os resultados finais mostrados na figura 6.55.

Figura 6.55 Resultados finais utilizados para a análise da irradiação com prótons do DNA com 200mM de Glicerol.

Os resultados da quantificação obtidos para ambos os experimentos mostraram uma reprodutibilidade aceitável apesar dos problemas apresentados na metodologia. Porém se faz evidente a necessidade de uma maior sistematicidade para melhorar a precisão destes dados.

6.8 Determinação de G(SSB) e G(DSB) para irradiações com prótons.

Com os dados mostrados anteriormente, foram calculados os rendimentos de quebras simples e duplas para as irradiações com prótons. Neste caso, como, nos outros, foram utilizadas as equações 4.22, 4.23, 4.28 e 4.29. Para o cálculo dos rendimentos em $[\mu\text{mol/J}]$, foi utilizada a concentração de DNA $1.04\text{E-}1 \mu\text{mol dm}^{-3}$, correspondente a $200 \text{ ng}/\mu\text{l}$. A figura 6.56 e a tabela 6.14 mostram os ajustes e os resultados do cálculo de G(SSB) para os dois tipos de amostras irradiadas.

Figura 6.56 Ajustes das percentagens de DNA circular superenovelado irradiados com prótons. Amostras sem scavenger e com 200 mM de Glicerol.

Tabela 6.14 G(SSB) para amostras sem *scavenger* e com 200 mM de glicerol irradiadas com prótons

Amostra	λ [Gy ⁻¹]	D ₃₇ [Gy]	G(SSB) [μmol J ⁻¹]	G(SSB) [Gy ⁻¹ Da ⁻¹]	erro
200ng/μl-0mM	1.18(0.10)E-1	8.5(0.7)	1.23(0.10)E-02	6.15(0.52)E-08	8.5%
200ng/μl-200mM	6.03(0.41)E-03	165.8(11.3)	6.27(0.42)E-04	3.13(0.21)E-09	6.8%

Para o cálculo dos rendimentos de quebras duplas, os dados das frações de DNA linear foram ajustados a funções lineares. Por causa do reduzido número de dados, o critério de ajuste foi estendido até os pontos menores que 20% de DNA linear. Com isto foi possível obter uma estimativa melhor do valor do G(DSB).

Na figura 6.57 e na tabela 6.15 são mostrados o ajuste dos dados e os resultados obtidos para os dois tipos de amostras irradiadas.

Figura 6.57 Ajustes de frações de DNA linear para irradiações com prótons para amostras sem *scavenger* e com 200 mM de Glicerol.

Tabela 6.15 G(DSB) para amostras irradiadas com prótons.

Razão SC-Cir	Slope [Gy ⁻¹]	G(DSB) [μmol J ⁻¹]	G(DSB) [Gy ⁻¹ Da ⁻¹]	erro
0mM	4.84(0.28)E-3	5.03(0.30)E-04	2.51(0.15)E-09	5.9%
200mM	3.08(0.52)E-04	3.20(0.53)E-05	1.60(0.27)E-10	16.7 %

Os resultados obtidos mostram o mesmo comportamento encontrado com as irradiações com gama de ⁶⁰Co e de ¹³⁷Cs. A amostra com presença de *scavenger* mostrou uma redução nos rendimentos das quebras simples e duplas. Estes resultados serão comparados e discutidos na próxima seção.

6.9 Comparação de G(SSB) e G(DSB) gerados pela gama de ^{60}Co , ^{137}Cs e prótons.

A seguir são comparados os efeitos das irradiações com prótons e raios gamas de ^{60}Co e ^{137}Cs . As figuras 6.59 e 6.60 mostram os G(SSB) e G(DSB) em função da concentração de Glicerol.

Figura 6.59 Comparação dos G(SSB), para gama de ^{60}Co e ^{137}Cs , e prótons em função da concentração de Glicerol.

Figura 6.60 Comparação entre os G(DSB), para raios gama de ^{60}Co e ^{137}Cs , e prótons em função da concentração de Glicerol.

Das figuras 6.59 e 6.60, é possível observar que os efeitos da gama de ^{60}Co e ^{137}Cs diminuem de forma similar na medida em que a presença do *scavenger* aumenta, porém

esta diminuição não acontece do mesmo modo para as irradiações com prótons. Isto poderia ser explicado levando-se em conta que, com o aumento da presença de *scavenger*, a componente do efeito indireto na produção do dano no DNA diminui, tornando-se mais relevante a componente direta do efeito da radiação. Para amostras sem *scavenger*, a componente direta representa menos do 1% da produção de danos, podendo chegar até o 35% para uma capacidade de *scavenging* de $3.8 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ (equivalente a 200 mM de Glicerol), [Klimczak et al. 1993, Chapman et al. 1973]. O efeito direto está diretamente relacionado ao padrão da trajetória da partícula e sua deposição de energia (LET). Como o LET dos prótons ($\sim 5 \text{ keV}/\mu\text{m}$) é maior que o da radiação gama ($\sim 0.3 \text{ keV}/\mu\text{m}$) o efeito direto será mais efetivo para prótons que para gama. Isto explica como os resultados de quebras simples e duplas é maior para prótons que para radiação gama com o aumento da concentração de *scavenger*.

Um dos objetivos principais deste trabalho concentra-se em determinar se existe alguma diferença entre os efeitos radiobiológicos no DNA causado pelas radiações de baixo LET. Analisando a razão de DSB/SSB é possível determinar a influência da partícula na produção de danos biológicos. Radiações com altos valores de DSB/SSB apresentam um alto efeito radiobiológico, já que isto indica que sua efetividade para gerar danos irreparáveis ou mutagênicos (DSB) por quebras SSB induzidas é maior.

Na figura 6.61, são mostradas as razões de DSB/SSB para as irradiações utilizadas no trabalho. Estas são comparadas com irradiações feitas por [Taucher-Scholz 1999] com núcleos de carbono e oxigênio de alto LET.

Figura 6.61 Razão de DSB/SSB para gama de ^{60}Co e ^{137}Cs , e prótons em função da concentração de Glicerol.

Com exceção da irradiação com prótons sem Glicerol, os dados mostram que, dentro das incertezas, não existe uma diferença significativa entre as razões das DSB/SSB para os três tipos de radiação e para cada capacidade de *scavenging* em separado. O aumento destas razões com o aumento da concentração de *scavenger* mostra como o efeito da estrutura do caminho da radiação (efeito direto) se faz mais relevante por causa da diminuição dos radicais *OH e o padrão de quebras mais homogêneo que estes podem provocar. Já ao comparar estas razões com as das reportadas para as radiações de alto LET, observa-se que a probabilidade de gerar quebras duplas é muito maior para os íons de alto LET como o Carbono e o Oxigênio.

O Efeito Biológico Relativo (RBE) nos materiais biológicos pode ser definido como a razão entre o efeito biológico produzido pela radiação de estudo dividido entre o efeito de uma radiação de referência.

$$RBE = \frac{Efeito_{radiação}}{Efeito_{referência}}.$$

Na literatura, esta definição é aplicada para o estudo do RBE em células, e também pode ser aplicado nos estudos de DNA. Nas irradiações de plasmídeos *in vitro*, o efeito mais significativo do ponto de vista biológico é a produção de DSB. Autores [Taucher-Scholz 1999] definem o RBE nos estudos de DNA como

$$RBE = \frac{G(DSB)_{radiação}}{G(DSB)_{referência}},$$

onde, como G(DSB) de referência utilizado é o da radiação de mais baixo LET, geralmente raios-X.

Neste caso utilizaremos como referência os G(DSB) obtidos para as irradiações com raios gama de ⁶⁰Co, por serem os de menor LET. Na tabela 6.16 são mostrados os RBE calculados para as irradiações realizadas neste trabalho junto com as calculadas da literatura.

Tabela 6.16 RBE calculados para raios gama de Co e Cs, prótons e da referência [Leloup et al. 2005]

Concitração de Glicerol [mM]	RBE γ - ⁶⁰ Co	RBE γ - ¹³⁷ Cs	RBE p-10 MeV	RBE γ - ¹³⁷ Cs [Leloup 2005]
0	1.00(0.19)	0.78(0.11)	2.75(0.31)	-
2	1.00(0.09)	0.83(0.14)	-	1.94(0.80)
20	1.00(0.08)	0.69(0.09)	-	-
200	1.00(0.08)	1.01(0.10)	4.55(0.95)	0.74(0.16)

É possível observar que, com exceção dos RBE para 20 mM de Glicerol, todos os RBE para irradiações feitas com ^{60}Co e ^{137}Cs são compatíveis, figura 6.62. A diferença encontrada para 20 mM de Glicerol não impede poder afirmar que, de forma geral, os efeitos de ambas as radiações sobre o DNA plasmidial podem ser considerados equivalentes a nível molecular. É observado também que para a concentração de Glicerol de 200 mM, ambos RBE são iguais. Considerando que, para esta concentração a capacidade de scavenging é similar à encontrada na célula, é possível inferir que o efeito de ambas as radiações a nível celular deverá ser o também mesmo.

Fazendo-se a mesma análise com as irradiações com prótons, observa-se que estes possuem um efeito 2.8 (0.3) e 4.6 (1.0) vezes maior que o do ^{60}Co sem a presença de scavenger e com 200 mM de Glicerol respectivamente. Isto evidencia a relação entre o efeito biológico, o LET da radiação e as propriedades do material biológico. Para uma radiação de um LET maior, neste caso os prótons, o RBE aumentou. Isso pode ser causa da alta densidade de radicais ao longo do caminho que as radiações de alto LET provocam. O aumento do RBE com o aumento da capacidade de scavenger estaria relacionado com a efetividade na produção de danos diretos da radiação gama de ^{60}Co e dos prótons, conhecendo que para esta capacidade de *scavenging* o efeito direto é responsável por 35% dos danos [Chapman et al. 1973]. Neste caso a efetividade dos prótons para produzir quebras duplas se mostra maior que a dos raios gama.

Figura 6.62 Efeitos Biológicos Relativos (RBE) do ^{137}Cs e prótons de 10 MeV, em relação a gama de ^{60}Co .

Desta forma, é possível concluir que para irradiação de DNA *in vitro* foram encontrados padrões similares aos das irradiações de células e tecidos. Os efeitos biológicos relativos das radiações de baixo LET também podem ser considerados como equivalentes a nível molecular.

CAPÍTULO 7. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi desenvolvido um método experimental para o estudo da interação das radiações com DNA plasmidial em solução aquosa. Para isso, os seguintes testes foram realizados:

1) Efeito do Brometo de Etídio.

Estudou-se a linearidade da luminosidade em função da quantidade de DNA com géis pré-corados e pós-corados (ver seção 6.1.2). Verificou-se que o gel pré-corado apresenta maior linearidade. Por isto, adotamos géis pré-corados em nossas análises.

2) Efeito da concentração de agarose e da tensão para eletroforese

Estudou-se a melhor concentração de agarose e a tensão ótima a ser aplicadas no gel de eletroforese. Verificou-se que as condições ótimas foram obtidas com 0.7% de agarose e potencial de 5 V/cm (ver seção 6.1.3).

3) Efeitos da quantidade de DNA e do número de integrações

Estudaram-se os efeitos da quantidade de DNA sobre o processo de quantificação das bandas de eletroforese. Verificou-se que o melhor valor utilizado foi de 800 ng de DNA em cada poço do gel.

No estudo do número de integrações, verificou-se que a condição ótima é aquela em que se utiliza o máximo de integrações possíveis sem que ocorra saturação da luminosidade. Esta condição pode ser obtida com ajuda do programa GelAnalis desenvolvido neste trabalho (ver seções 6.1.4, 6.1.5 e apêndice 1).

4) Efeito da fração de DNA circular nas amostras inicial nos G(SSB) e G(DSB).

Estudou-se o efeito da presença de DNA na forma circular na amostra a ser irradiada sobre a quantificação das bandas. Verificou-se que não há efeito relevante sobre os resultados, como previsto por Cowan [1985] (ver seção 6.2). Porém, amostras com pequenas frações de DNA superenovelado apresentam incertezas maiores (ver seção 6.2.2).

Estes testes permitiram encontrar as melhores condições de trabalho, e reduzir as incertezas na quantificação das bandas de DNA a níveis aceitáveis para os objetivos deste trabalho.

Após a otimização do método experimental e da análise, passamos aos estudos da interação entre as radiações gama e prótons com o DNA em soluções diversas. As irradiações com prótons foram feitas no acelerador Pelletron do IFUSP, com prótons de $E=10\text{MeV}$. As irradiações com raios gama de ^{60}Co foram feitas no irradiador

Gammacell-220 do CTR-IPEN. As irradiações com ^{137}Cs foram feitas no irradiador IBL 637 do ICB4 na USP.

Foram quantificadas, nas amostras irradiadas, as frações de DNA nas formas superenovelada, circular relaxada e linear em função da dose aplicada, variando a concentração de DNA e a concentração de scavenger nas soluções. O comportamento dessas frações em função da dose se encontra dentro do esperado e em acordo com os dados da literatura, com a rápida diminuição da fração de DNA-superenovelado, o aumento e posterior diminuição da fração de DNA circular, e o aumento praticamente linear da fração de DNA na forma linear, à medida que a dose aumenta.

Foram determinados os rendimentos de quebras simples (G(SSB)) e duplas (G(DSB)). Verificou-se que G(SSB) diminui com a concentração de scavenger, como era esperado, evidenciando a ação do scavenger sobre os radicais livres gerados na radiólise da água. Verificou-se também que esse rendimento é equivalente para as irradiações com gama de ^{60}Co e ^{137}Cs , dentro das incertezas experimentais, em acordo com as considerações de RBE para células, mas em desacordo com resultados experimentais publicados recentemente [Leloup et al. 2005]. O rendimento de quebras simples para prótons é compatível com aquele para gama de ^{60}Co e ^{137}Cs nas irradiações sem adição de scavenger. No caso de soluções com 200 mM de glicerol, o G(SSB) para prótons resultou superior àqueles com gama. As incertezas não permitem uma análise conclusiva nessa comparação. São necessárias irradiações com prótons para concentrações intermediárias de Glicerol.

A análise do G(DSB) mostrou resultados semelhantes àqueles para G(SSB). Para todas as soluções os G(DSB) para as irradiações realizadas com gama de ^{60}Co e ^{137}Cs são compatíveis entre si. Na medida em que se aumenta a concentração de Glicerol o rendimento diminui de forma linear. Para soluções sem scavenger e com 200 mM de Glicerol, o G(DSB) para prótons se mostrou superior àqueles para raios gama. Este resultado indica que a ação dos radicais livres e dos *scavengers* depende do processo de ionização e da densidade de radicais formados. De fato, sendo o LET dos prótons ($\sim 5 \text{ keV } \mu\text{m}^{-1}$) consideravelmente superior àqueles dos raios gamas ($\sim 0.3 \text{ keV } \mu\text{m}^{-1}$), a estrutura do rastro de radicais formados ao longo da trajetória das partículas é diferente em cada caso. Observa-se que, com uma densidade maior de radicais, a ação dos scavengers é menos eficiente. Isto pode estar relacionado ao aumento da relevância das quebras diretas sobre as indiretas, resultado da adição de scavengers [Klimczak et al 1993 e Chapman et al 1973].

De forma geral, os resultados obtidos em função da concentração de scavenger se encontram em acordo com o esperado, conforme a literatura sobre o tema.

A análise do número de quebras por moléculas induzidas pela radiação (rendimentos em $\text{Gy}^{-1}\text{Da}^{-1}$) em função da concentração de DNA mostrou que os G(SSB) e G(DSB) permanecem constantes quando aumenta a concentração de DNA nas soluções contendo *scavengers* (ver figura 6.33). No entanto, um comportamento diferente é observado no caso de solução sem scavenger, onde o rendimento diminui com o aumento da concentração de DNA. Isto pode ser resultado do próprio efeito scavenger do DNA na interação com os radicais. Vale lembrar que, neste trabalho, foi utilizado um procedimento experimental que resulta em alto grau de pureza do DNA [Gouveia 2004]. Isto, associado à redução das incertezas obtidas com a otimização da técnica de análise feita neste trabalho, permitiu estender as medidas de quebras de DNA até concentrações muito reduzidas de scavenger.

Foram realizados cálculos de RBE em DNA plasmideal com respeito às irradiações com gama de ^{60}Co . Os resultados mostraram que não existe uma diferença significativa entre os efeitos biológicos gerados pela radiação gama proveniente do ^{60}Co e do ^{137}Cs . De forma que o efeito destas duas radiações pode ser considerado equivalente inclusive ao nível molecular. Já o efeito biológico gerado pelos prótons de $\sim 5 \text{ keV}/\mu\text{m}$ foi bem maior, apesar do grande erro associado. Novas irradiações com prótons permitirão minimizar este erro, melhorar a precisão deste resultado e encontrar novos valores de RBE para LET maiores.

Finalmente, este trabalho permitiu o desenvolvimento de uma técnica de alta precisão para o estudo das quebras induzidas pela radiação em moléculas de DNA em solução aquosa. A aplicação aos casos dos raios gama do ^{60}Co , ^{137}Cs e prótons de 10 MeV permitiu reproduzir dados experimentais existentes e estender para condições ainda não testadas experimentalmente, como aquelas com concentração nula de *scavengers*. Os resultados são compatíveis com o esperado pelos modelos teóricos e com os dados experimentais existentes. Os resultados obtidos neste trabalho se apresentam como uns dos poucos que estudaram *in vitro*, e com boa precisão, o efeito radiobiológico das radiações de baixo LET em DNA plasmidial. Os dados aqui mostrados poderão ser utilizados em próximas análises teóricas, assim como em validações de modelos biofísicos de interação da radiação com o DNA.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Atkins, P. e Jones, L. *Princípios de Química*. Bookman, Porto Alegre. Cap. 19, p. 879-905 (2001).
- Block, J., Loman, H., The effects of gamma-radiation in DNA. *Current Topics in Radiation Research Quarterly*, 9, 165-245 (1973).
- Brons, S.; Taucher-Scholz, G.; Scholz, M.; Kraft, G. A track structure model for simulation of strand breaks in plasmid DNA after heavy ion irradiation. *Radiation and Environmental Biophysics*, 42 (1): 63-72 (2003).
- Butts, J.J., Katz, R., Theory of RBE for heavy ion bombardment of dry enzymes and viruses. *Radiation Research*, 30, 855-871 (1967).
- Cassou, K.; Ros, D.; Kazamias, S.; Klisnick, A.; Jamelot, G.; Guilbaud, O.; Rus, B.; Kozlova, M.; Polan, J.; Prag, A.R.; Stupka, M.; Eot-Houllier, G.; Sage, E.; Begusova, M.; Stisova, V.; du Penhoat, M.A.H.; Touati, A.; Chetoui, A. Study of damages induced in DNA by X-UV laser irradiation at 21.2 nm. *Journal de Physique IV*, 127: 177-180 (2005).
- Chapman, J.D., Reuvers, A.P., Borsa, J., Greenstock, C.L. Chemical radioprotection and radiosensitization of mammalian cells growing in vitro. *Radiation Research*. 56, 291-306 (1973)
- Chatterjee, A., Holley, W., Computer simulation of initial events in the biochemical mechanisms of DNA damage, *Advances in Radiation Biology*, 17, 181-226 (1993).
- Chiu, S.M., Oleinick, N.L., The role of DNA damage and repair in the function of eukaryotic genes: Radiation induced single strand breaks and their rejoining in chromosomal and extrachromosomal DNA of Tetrahymena. *Radiation Research* 82, 146-161 (1980).
- Collins, C.; Zhou, X.F.; Wang, R.; Barth, M.C.; Jiang, T.; Coderre, J.A.; Dedon, P.C. Differential oxidation of deoxyribose in DNA by gamma and alpha-particle radiation. *Radiation Research*, 163 (6): 654-662 (2005).
- Cowan R., Cuplin D., Gates D. Asymptotic results for a problem of DNA breakage. *Journal of Applied probability*. 27 (2), 433-439 (1990).
- Cowan, R., Collis, CH.M., and Grigg, G.W., Breakage of double-stranded DNA due to single-stranded Nicking, *Journal of Theoretical Biology*, 127, 229-245 (1987).
- Culard, F.; Bouffard, S.; Charlier, M. High-LET irradiation of a DNA-binding protein: Protein-protein and DNA-protein crosslinks. *Radiation Research*, 164 (6), 774-780 (2005).
- Diengfelder, M., Hantke, D., Inokuti, M., Paretzke, H.G. Electron inelastic-scattering cross sections in liquid water. *Radiation Physics and Chemistry*, 53, 1-18 (1998).
- Dizdaroglu, M., Neuwald, K., von Sonntag, C., Radiation Chemistry of DNA Model Compounds, IX*. Carbohydrate Products in the gamma-radiolysis of Thymidine in Aqueous Solution. The Radical-Induced Scission of the N-Glycosidic Bond. *Z-Naturforsch.* 31b, 227-233 (1976).
- Dizdaroglu, M., Schulte-Frohlinde, D., von Sonntag, C., Radiation Chemistry of DNA, II*. Strand Break and Sugar Release by gamma-irradiation of DNA in aqueous solution. The effect of oxygen. *Z. Naturforsch.* 30c, 826-828 (1975).
- Echeimberg, J. O. Desenvolvimento de um método experimental para medidas de quebras de fitas simples (SSB) e fita Dupla (DSB) em moléculas de DNA irradiadas por prótons de 10 MeV. Tese de Mestrado. I.F. USP, 2003.
- Freifelder, D., and Trumbo, B., Matching of single-strand breaks to form double strand breaks in DNA. *Biopolymers*, 7, 681-693 (1969).
- Friendland, E., Jacob, P., Paretzke, H.G. Sotok, T. Monte Carlo simulation of production of short DNA fragments by low-linear energy transfer radiation using higher-order DNA models. *Radiation Research*, 150, 170-182 (1998).
- Friendland, W., Bernhardt, P., Partzke, H.G., Dingfelder, M., Simulation of DNA damage after proton and low LET irradiation. *Radiation Protection Dosimetry*, 99 (1-4), 99-102 (2002).
- Friendland, W., Bernhardt, P., Partzke, H.G., Dingfelder, M., Simulation of DNA damage after proton irradiation. *Radiation Research*, 159, 401-410 (2003).

- Friendland, W., Dingfelder, M., Jacob, P., Partzke, H.G., Calculated DNA double-strand break and fragmentation yield after irradiation with He ions. *Radiations Physics and Chemistry*, 72, 279-286 (2005).
- Friendland, W., Jacob, P., Paretzke, H.G., Merzagora, M., Ottolenghi, A., Simulation of DNA fragment distribution after irradiation with photons. *Radiation and Environmental Biophysics*, 38, 39-47 (1999).
- Friendland, W., Jacob, P., Paretzke, H.G., Perzl, M. Stork, T. Simulation of strand breaks and short DNA fragments in the biophysical model PARTRAC. In *Microdosimetry-An Interdisciplinary Approach, Proceeding of the 12th Symposium on Microdosimetry*. Thomas Graham House, Science Park, Milton Road, Cambridge CB4 4WF. The Royal Society of Chemistry (1997).
- Friendland, W., Jacob, P., Paretzke, H.G., Perzl, M. Target model of chromatin fiber for DNA damage modeling. In *10th Inter. Congress of radiation Research*, Wurzburg, Germany (1995).
- Fulford, J., Nikjoo, H., Goodhead, D.T., O'Neill, P. Yields of SSB and DSB induced in DNA by Al_K ultra soft X-rays and alfa-particles: comparison of experimental and simulated yields. *International Journal of Radiation Biology*, 77(10), 1053-1066 (2001).
- Gammacell-220 Excel. Multi-Purposed Research Irradiator. MDS Nordion Inc. TSGCBR01-001.(2001).
- Goodhead, D.T. Molecular and cell models of biological effects of heavy ion radiations. *Radiation Environmental Biophysics*, 34, 67-72 (1995).
- Goodhead, D.T., Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *International Journal of Radiation Biology*, 65(1), 7-17 (1994).
- Gouveia, A. N., Estudo quantitativo do efeito da radiação gama sobre DNA em solução aquosa. Dissertação de Mestrado, USP, São Paulo (2004).
- Hasegawa, K., Yoshioka, H., DNA damage by various radiations. *Radiation Research Physics and Chemistry*, 1, 81-84 (1997).
- Hempel, K., Mildenerberger, E., Determination of G-values for single and double strand breaks induction in plasmid DNA using agarose gel electrophoresis and a curve-fitting procedure, *International Journal of Radiation Biology*, 52(1), 125-138 (1987).
- Hissung, A., von Sonntag, C., Radiolysis of Cytosine, 5-Methyl Cytosine and 2-Deoxycytidine in Deoxygenated aqueous solution. A pulse spectroscopic and pulse conductometric study of the OH adduct. *Z.Naturforsch.*33b, 321-328 (1978).
- Ito, A. Calculation of double strand breaks probability of DNA for low LET radiations based on track structure analysis. *Nuclear and Atomic data for Radiotherapy and related Radiobiology*. International Atomic Energy Agency, IAEA, Vienna 1987.
- Jones, G.D.D., Boswell, T.V., Lee, J., Milligan, J.R., Ward, J.F., Weinfeld, M. A comparison of DNA damage produced under conditions of direct and indirect action of radiation. *International Journal of Radiation Biology*, 66(5), 441-445 (1994).
- Jones, G.D.D., Milligan, J.R., Ward, J.F., Calabro-Jones, P.M., Aguilera, J.A. Yield of strand breaks as a function of scavenger concentration and LET for SV40 irradiated with He ions. *Radiation Research*, 136, 190-196 (1993).
- Jonah, C. D. and Miller, J. R. Yield and decay of the OH radical from 200 ps to 3 ns. *J. Phys. Chem.* 81, 1974-1977 (1977).
- Klimczak, U., Ludwig, D.C., Mark, F., Rettberg, P., Schulte-Frohlinde, D. Irradiation of plasmid and phage DNA in water-alcohol mixtures: strand breaks and lethal damage as a function of scavenger concentration. *International Journal of Radiation Biology*, 64(5), 497-510 (1993).
- Konishi, T.; Yasuda, N.; Takeyasu, A.; Ishizawa, S.; Fujisaki, T.; Matsumoto, K.; Furusawa, Y.; Sato, Y.; Hieda, K. Irradiation system of ions (H-Xe) for biological studies near the Bragg peak Review of Scientific Instruments, 76 (11): Art. No. 114302 (2005).
- Kusakawa, N., Ostrovsky, M.V., Garner, M.M., Effect of gelation conditions on the gel structure and resolving power of agarose-based DNA sequencing gels. *Electrophoresis*, 20, 1455-1461 (1999).
- Lafleur, M.V.M., Loman, H., Block, J., On the role of phosphate in the irradiation of DNA in aqueous

- solutions. *International Journal of Radiation Biology*. 27(2), 197-200 (1975).
- Lafleur, M.V.M., Woldhuis, J., Loman, H., Alkali-labile sites and post-irradiation effects in gamma-irradiated biologically active double-stranded DNA in aqueous solution. *International Journal of Radiation Biology*, 36, 241-247 (1979).
- Lappa, A.V., Bigildeev, E.A., Burmistrov, D.S., Vasilyev, O.N. Trion code for radiation action calculations and its applications in microdosimetry and radiobiology. *Radiation Environmental Biophysics*, 32, 1-19 (1993).
- Leloup C., Garty G., Assaf G., Cristovao A., Breskin A., Chechik R., Shcemelinin S., Paz-Elizur T., Livneh Z., Schulte R.W., Bashkirov V., Milligan R., and Grosswendt B., Evaluation of lesion clustering in irradiated plasmid DNA. *International Journal of Radiation Biology*, 81(1), 41-54 (2005).
- Lloyd, R.S., Haidle, C.W., Robberson, D.L., Bleomycin specific fragmentation of double stranded DNA. *Biochemistry*, 17, 1890-1896 (1978).
- Mark, F., Becker, U., Herak, J.N., Schulte-Frohlinde, D. Radiolysis of DNA in aqueous solution in the presence of scavenger: A kinetic model based on a nonhomogeneous reaction of OH radicals with DNA molecules of spherical or cylindrical shape. *Radiation Environmental Biophysics*, 28, 81-99 (1989).
- Miller Jr, M.D., Acey, R.A., Lee, L.Y-T., Edwards, A.J. Digital imaging considerations for gel electrophoresis analysis systems. *Electrophoresis*, 22, 791-800 (2001).
- Milligan, J.R., Aguilera, J.A., Paglinawan, R.A., Ward, J.F., Limoli, C.L., DNA strand break yields after post-high LET irradiation incubation with endonuclease-III and evidence for hydroxyl radical clustering. *International Journal of Radiation. Biology*. 77, 155 – 164 (2001).
- Milligan, J.R., Aguilera, J.A., Ward, J.F. Variation of Single-strand break yield with scavenger concentration for plasmid DNA irradiated in aqueous solution. *Radiation Research*, 133, 151-157 (1993a).
- Milligan, J.R., Aguilera, J.A., Ward, J.F. Variation of Single-strand break yield with scavenger concentration for the SV40 minichromosome irradiated in aqueous solution. *Radiation Research*, 133, 158-162 (1993b).
- Milligan, J.R., Aguilera, J.A., Wu, C.C.L., Ng, J.Y.Y., Ward, J.F. The difference that linear energy transfer makes to precursors of DNA strand breaks. *Radiation Research*, 145, 442-448 (1996a).
- Milligan, J.R., Arnold, A.D., Ward, J.F. The Effect of Superhelical Density on the Yield of Single-Strand Breaks in gamma-Irradiated Plasmid DNA. *Radiation Research*. 132, 69-73 (1992)
- Milligan, J.R., Ng, J.Y-Y., Wu, C.C.L., Aguilera, J.A., Ward, J.F., Kow, Y.W., Wallace, S.S., Cunningham, R.P. Methylperoxyl Radicals as intermediates in the damage to DNA irradiated in aqueous Dimethyl Sulfoxide with gamma rays. *Radiation Research*, 146, 436-443 (1996b).
- Nikjoo, H., Uehara, S., Khvostunov, I.G., Cucinotta, F.A., Wilson, W.E., Goodhead, D.T. Monte Carlo track structure for radiation biology and space applications. *Physica Medica*, 17, Supplem.1, 38-44 (2001)
- O'Neill, P., Cunniffe, S.M.T., Stevens, D.L., Botchway, S.W., Nikjoo, H. Strand break induction in DNA by aluminum K ultra soft X-rays: comparison of experimental data and track structure analysis. *Microdosimetry an interdisciplinary approach*. The Royal Society of Chemistry, pp 81-84 (1997).
- Okuno, Emico. Relatório das doses equivalentes dos trabalhadores do Irradiador IBL 637-ICB. Laboratório de Dosimetria. IFUSP. 2005
- Paretzke, H.G., Radiation track structure theory in kinetics of no homogeneous processes. Freeman GR Ed. New York. John Wiley and Sons, 89-170 (1987).
- Provirk, L.F., Wubker, W., Kohnlein, W., Hutchinson, F., DNA double-strand breaks and alkali labile bonds produced by bleomycin. *Nucleic Acids Research*, 4, 3573-3580 (1977).
- Roots, R., Holley, W., Chatterjee, A., Irizarry, M., Kraft, G., Te formation of strand breaks in DNA after high-LET irradiations: a comparison of data from in vitro and cellular systems. *International*

- Journal of radiation Biology, 58(1), 55-69 (1990).
- RSICC Computer Code Collection. MCNP4C. Monte Carlo N-Particle transport Code System. (2000).
- Ryznar, L., Drasil, V., Relative Frequency of formation of base radio product, single and double strand breaks on irradiation of diluted aqueous solution of DNA. *Radiochem. Radioanal. Letters*, 22(5) 351-355 (1975).
- Sambrook, J. and Russell, D.W. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001).
- Schans, G.P. van der, Aten, J.B.T., Blok, J. Determination of molecular weight distribution of DNA by means of sedimentation in a sucrose-gradient. *Analytical Biochemistry*, 32, 14-30 (1969).
- Schans, G.P. van der, Bleichrodt, J.F., Blok, J. Contribution of various types of damage to inactivation of biologically active double-stranded circular DNA by gamma-irradiation. *International Journal of Radiation Biology*, 23, 133-150 (1973).
- Schans, G.P. van der, Gamma-ray induced double-strand breaks in DNA resulting from randomly-inflicted single strand breaks: Temporal local denaturation, a new phenomenon? *International Journal of Radiation Biology*, 33, 105-120 (1978).
- Shao, C., Saito, M., Yu, Z. Radiation induced DNA strand breaks measured by a modified method of gel scanning. *Radiat. Phys. Chem.* 56: 547-551(1999)..
- Shuterland, J.C., Monteleone, D.C., Trunk, J.G., Bennett, P.V., Shuterland, B.M. Quantifying DNA damage by gel electrophoresis, electronic imaging and number-average length analysis. *Electrophoresis*, 22, 843-854 (2001).
- Spotheim-Murizot, M., Charlier, M., Sabattier, R., DNA radiolysis by fast Neutrons. *International Journal of Radiation Biology*, 57(2), 301-313 (1990).
- Stankus, A.A., Xapsos, M.A., Kolanko, C. J., Gerstenberg H. M. and Blakely. W. F., Energy deposition events produced by fission neutrons in aqueous solutions of plasmid DNA. *International Journal of Radiation Biology*, 68, 1, 1-9 (1995).
- Stelter, L., von Sonntag, C., Schulte-Frohlinde, C., Radiation Chemistry of DNA-Model Compounds, VII*. On the Formation of 5-Deoxy-D-erythro-pentos-4-ulose and the identification of Twelve Further Products from gamma-irradiated aqueous solution of ribose-5-phosphate. *Z.Naturforsch*, 30b, 656-657 (1975).
- Taucher-Scholz, G., Kraft, G., Influence of Radiation Quality on the Yield of DNA strand breaks in SV40 DNA irradiated in solution. *Radiation Research*, 151, 595-604 (1999).
- Teoule, R., Bonicel, A., Bert, C., Cadet, J., Polverelli, M., Identification of Radio products resulting from the breakage of Thymine Moiety by Gamma irradiation of E. coli DNA in an Aerated Aqueous Solution. *Radiation Research*, 57, 46-58(1974).
- Terrisol, M., Beaudre, A., Simulation of space and time evolution of radiolytic species induced by electrons in water. *Radiation Protection Dosimetry*, 31, 171-175 (1990).
- Tomita, H., Kai, M., Kusama, T., Ito, A. Monte Carlo simulation of physicochemical processes of liquid water radiolysis-The effects of dissolved oxygen and OH scavenger. *Radiation Environmental Biophysics*, 36, 105-116 (1997).
- Touw, J.H. van, Verberne, J.B., Retel, J., Loman, H., Radiation-induced strand breaks in X174 replicative from DNA: an improved experimental and theoretical approach. *International Journal of Radiation Biology*, 48(4), 567-578 (1985).
- Tsoulou, E.; Kalfas, C.A.; Sideris, E.G. Conformational properties of DNA after exposure to gamma rays and neutrons. *Radiation Research*, 163 (1): 90-97 (2005).
- Turner, J.E., Magee, J.L., Wright, H.A., Chatterjee, A., Hamm, R.N., Ritchie, R.H., Physical and chemical development of electron tracks in liquid water. *Radiation Research*, 93, 437-449 (1983).
- Uehara, S., Nikjoo, H., Goodhead, D.T. Cross-sections for water vapour for the Monte Carlo electron track structure code from 10 eV to the MeV region. *Physics in Medicine and Biology*, 38, 1841-1858 (1993).

- Uehara, S., Toburen, L.H., Nikjoo, H. Development of a Monte Carlo track structure code for low-energy protons in water. *International Journal of Radiation Biology*, 77920, 139-154 (2001).
- Usami, N.; Furusawa, Y.; Kobayashi, K.; Frohlich, H.; Lacombe, S.; Le Sech, C. Fast He²⁺ ion irradiation of DNA loaded with platinum-containing molecules. *International Journal of Radiation Biology*, 81 (7): 515-522 (2005).
- Vavolta, A., Ballarini, F., Friendland, W., Jacob, P., Ottolenghi, A., Paretzke, H.G., Modelling study on the protective role of OH radical scavengers and DNA higher-order structures in induction of single and double strand break by gamma radiation. *International Journal of Radiation Biology*, 79(8), 643-653 (2003).
- Vieira, A.C. Radicais oxidantes: da Química à Biologia. *Química*. No.100, pág 66-71 (2006).
- Ward, J.F., Biochemistry of DNA lesion. *Radiation Research*, 104, S103-S111 (1985).
- Ward, J.F., DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation and reparability. *Progress in Nucleic Acids and Molecular Biology*, 35, 95-125 (1988).
- Ward, J.F., Kuo, I., Radiation Damage to DNA in Aqueous Solution: A comparison of the response of the Single-stranded form with that of the double-stranded form. *Radiation Research*. 75, 278-285 (1978).
- Ward, J.F., Milligan, J.R., and Jones, G.D.D., Biological consequences of non-homogeneous energy deposition by ionizing radiation. *Radiation Protection dosimetry*, 52, 271-276 (1994a).
- Ward, J.F., Some biochemical consequences of the spatial distribution of ionizing radiation produced free radicals. *Radiation Research*, 86, 185-195 (1981).
- Ward, J.F., The complexity of DNA damage: relevance to biological consequences. *International Journal of Radiation Biology*, 66(5), 427-432 (1994).
- White, H.W., Wu, M. Factors affecting quantitation of DNA bands in gels using a charge-coupled device imaging system, *Electrophoresis*. 22, 860-863 (2001).
- Wilson, W.E., Nikjoo, H.A Monte Carlo code for Positive Ions Tracks Simulations. *Radiations Environmental Biophysics*, 38, 97-104 (2000).
- Wilson, W.E., Paretzke, H.G., Calculation of distribution of energy imparted and ionizations by fast protons in nanometers sites. *Radiation Research*, 81, 521-537 (1981).
- Yamamoto, O., Fuji, J., Ogawa, M., Difference in DNA strand breaks by gamma and beta irradiations: an in vitro study. *Biochemistry International*, 11, 217-233 (1985).
- Zaider, M., Brenner, D.J., Wilson, W.E., The applications of track calculations to radiobiology 1. A Monte Carlo simulation of protons tracks. *Radiations Research*, 95, 231-247 (1983).
- Zhao, Y.; Tan, Z.; Du, Y.H.; Qiu, G.Y. Electrophoresis examination of strand breaks in plasmid DNA induced by low-energy nitrogen ion irradiation. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research section B-Beam interactions with Materials and Atoms*, 211 (2): 211-218 (2003).
- Zimmer, K.G. *Studies on Quantitative Radiation Biology*. 1st ed. Edinburgh and London: Oliver and Boyd, 124 (1961).

APÊNDICES

APÊNDICE 1 Programa GelAnalis. Descrição.

1. Programa para quantificação de bandas.

O programa GelAnalis foi desenvolvido para realizar a quantificação das bandas de eletroforese. Para sua implementação foi utilizada a linguagem de programação Delphi por sua estrutura orientada a objeto e seus vastos recursos para a interface Windows. Seu princípio de funcionamento baseia-se no trabalho com os pixels da imagem como se fosse uma matriz. Os índices e o valor de cada um dos elementos matriciais é definido pelas coordenadas X e Y de cada pixel e o nível de cor (0 a 255) respectivamente. A origem de coordenadas é tomada no ângulo superior esquerdo. O eixo X representa a posição horizontal, e o eixo Y a posição vertical.

O programa permite que a visualização destes pixels possa ser em escala de cinzas ou em forma colorida. A imagem colorida responde a uma escala de cores que vai desde o azul para o nível 1 até o vermelho para o nível 255. Para uma melhor visualização do nível zero, este é representado com a cor negra.

Figura A1.1 Tela principal do programa GelAnalis.

O processo de quantificação foi dividido em três passos: trabalho com o fundo, análise e relatório dos dados. Acionando os botões à esquerda na parte superior da tela, figura A1.1, é possível ativar cada um destes passos. O programa permite medir a densidade

ótica integrada para cada banda do gel, mas realizando certa calibração também é possível reportar os resultados em unidades de massa.

2.Trabalho com o fundo

O trabalho com o fundo refere-se à remoção da luminosidade que o Brometo não-ligado a DNA ou RNA pode produzir. Para essa remoção, o programa apresenta dois métodos. No primeiro é subtraído um valor constante de nível de cor de todos os elementos da matriz (pixels) que representam a imagem. O segundo método permite definir, usando equações lineares, uma função para a remoção do fundo, isto é, o valor a subtrair para cada pixel da imagem vai depender da ordenada Y do mesmo. Este segundo método é útil para os casos em que o fundo não apresenta um valor constante.

Para ajudar na determinação do nível de fundo o programa possui duas linhas guias. Estas linhas podem se movimentar livremente na direção X (horizontal) utilizando os botões de posicionamento (linhas verticais brancas na figura A1.1). Na seção do trabalho com o fundo são mostradas três curvas de cores azul, verde e vermelha. As curvas azul e verde representam os valores de cor dos pixels ao longo do eixo Y (vertical) definido pelas posições das linhas guias. A curva vermelha mostra o valor da cor média sobre toda a linha guia vertical. Posicionando as linhas guias entre as bandas a quantificar, o programa reporta o valor médio do fundo na linha guia esquerda e a curva vermelha do gráfico define o perfil médio da região definida. Caso o perfil do fundo seja constante, é recomendável eliminar de todos os pixels o valor do fundo médio reportado pelo programa. Em caso contrario, pode ser utilizado o conjunto de equações lineares para simular o perfil do fundo no eixo vertical da forma:

$$Bck_Y = \begin{cases} 0 < y < y_1 \rightarrow Bck = m_1 y + n_1 \\ y_1 < y < y_2 \rightarrow Bck = m_2 y + n_2 \\ \vdots \\ y_{n-1} < y < y_n \rightarrow Bck = m_n y + n_n \end{cases}$$

Para maior facilidade no programa a criação e ajustes destas equações são realizados graficamente mediante a geração e movimentação de vértices no gráfico do fundo. O número de equações é ilimitado e a movimentação dos vértices ajusta automaticamente os parâmetros $m_{1..n}$ e $n_{1..n}$, figura A1.2.

Figura A1.2. Perfil para remoção de fundo utilizando equações lineares.

Em nosso estudo, definimos como uma boa remoção de fundo os casos em que o nível de fundo era o mais baixo possível sem chegar a afetar as formas das bandas. Um predomínio da cor negra nas imagens dos géis nos indicava uma boa remoção, figura A1.3.

Figura A1.3. Imagem do gel antes e depois da remoção do fundo.

3. Procedimento de análise

Para realizar a quantificação o programa possui dois modos de seleção das bandas. O primeiro é o modo mais comum, no qual a banda é determinada por uma região retangular definida por um vértice de início (X_o, Y_o) e um final (X_f, Y_f). Neste caso a quantificação (Q) resulta na somatória dos valores de cor dos pixels da região.

$$Q = \sum_{X_o, Y_o}^{X_f, Y_f} P_{X,Y}$$

O outro modo de seleção utiliza o procedimento conhecido como “magicwand” para a determinação da fronteira com base num valor de tolerância (T). Para isto, primeiramente é selecionado um pixel inicial na banda a quantificar. O programa, mediante um ciclo, compara os oito pixels circundantes com o valor de tolerância T e seleciona aqueles que possuem cor igual ou superior ao valor T (figura A1.4). A seguir a mesma operação é realizada com os pixels selecionados na iteração anterior. A

condição de parada é que não existam novos pixels circundantes que possam ser selecionados, figura A1.4.

Figura A1.4. a) Operação realizada por iteração. O valor dos pixels adjacentes é comparado com um valor de tolerância. b) Exemplo de região selecionada em três iterações e com um valor de tolerância para a seleção de 100. c) Exemplos de bandas de DNA selecionada com cor de tolerância 5 e 50 respectivamente.

Neste caso, a quantificação resulta na somatória dos valores de cor de todos os pixels selecionados. O programa permite que esta somatória possa ser realizada de duas formas. A primeira é somando os valores reais de cada um dos pixels ($P_{X,Y}$) na região selecionada. A segunda forma é somando as diferenças acima do valor de tolerância ($P_{X,Y}-T$). Esta segunda opção permite utilizar em certos casos o valor de tolerância T como um valor de fundo local para uma banda de DNA específica.

Na análise das bandas de DNA, o programa mostra em histogramas a distribuição dos pixels em função da cor e em função da concentração. Também, dois gráficos mostram os histogramas de luminosidade óptica integrada em função da posição X e Y respectivamente na região selecionada. Estes gráficos são úteis para a determinação da cor de tolerância utilizada na seleção automática.

O programa possui um procedimento para o ajuste de múltiplos picos, que é útil no caso de sobreposição de bandas. Foram utilizadas duas funções de distribuição aproximadas devido ao grande número de parâmetro que definem as distribuições do DNA no Gel e que não são conhecidos no momento da quantificação. Para os casos com perfil da banda simétrico é utilizada a função Gaussiana. Para os casos assimétricos, a função Extreme. O método de ajuste foi o de Gauss-Marquard.

Definido $z = (x - x_c)/w$ onde x , x_c e w são: a ordenada, a ordenada do valor máximo do pico e a largura do pico respectivamente; as funções de ajuste foram:

$$Extreme: y = y_o + A_1 \cdot e^{(-e^{-Z_1} - Z_1 + 1)} + A_2 \cdot e^{(-e^{-Z_2} - Z_2 + 1)} + \dots + A_N \cdot e^{(-e^{-Z_N} - Z_N + 1)}$$

$$GaussAmp: y = y_o + A_1 \cdot e^{-\frac{Z_1^2}{2}} + A_2 \cdot e^{-\frac{Z_2^2}{2}} + \dots + A_N \cdot e^{-\frac{Z_N^2}{2}}$$

Onde y_o representa o nível de fundo, N é o número de picos e A é a altura dos picos. A figura A1.5 mostra um exemplo de ajuste às duas funções. Este método de quantificação permite ajustar até quatro picos simultaneamente.

Figura A1.5. Exemplo de ajuste de três bandas. Acima: função Extreme. Abaixo: função GaussAmp.

Nesta seção também é possível exportar os valores da região selecionada para seu tratamento com outros programas de análises. Esta exportação pode ser realizada em três formatos: matriz, coordenadas ou perfil. No formato “matriz”, o arquivo TXT gerado possui um arranjo de números organizados em filas e colunas que contém o valor da cor dos pixels selecionados. No formato “coordenadas” escreve em cada linha do arquivo de saída as coordenadas e o cor de cada pixel da seleção. Por último o formato “perfil” reporta o histograma de cor escrevendo no arquivo a luminosidade integrada no eixo X (horizontal) em função da posição no eixo Y (vertical) da região selecionada.

4. Relatórios

O GelAnalis apresenta uma seção para o relatórios dos resultados. Nesta seção, na parte superior, são mostrados todos os passos executados pelo usuário. Na parte inferior os resultados das análises são escritos consecutivamente. Esta seção é mostrada na janela principal do programa, figura A1.1, no ângulo superior direito. É permitido para o usuário modificar e guardar cada um destes blocos. Esta facilidade é útil para realizar discussões sobre os resultados obtidos com diferentes formas de análise. Isto permite também que os resultados possam ser importados em outros programas de análise como o Excel ou Microcal Origin.

5. Calibração dos resultados

Calibrações de luminosidade em massa podem ser realizadas no próprio programa. Para isto é necessário um Ladder de massa na imagem do gel que possa ser utilizado como referência. As luminosidades medidas para cada banda do Ladder são ajustadas à massa reportada pelo fabricante. O ajuste da reta é realizado por mínimos quadrados. Após a calibração os resultados das quantificações passam a ser dados em unidades de massa.

6. Provas de calibração do programa.

Durante o desenvolvimento do programa foram realizadas provas de seleção e quantificação. As imagens de prova foram geradas utilizando o programa Adobe Photoshop. As mesmas apresentavam um tamanho e distribuição de cores conhecidos. Imagens de matrizes com formatos de cilindros, esferas, e cones foram geradas.

Figura A1.6. Padrão de prova com cones. Acima são mostradas as imagens em escala cinza e colorida. No centro: em azul o perfil na linha central e em vermelho a cor média da região em função da coordenada Y (horizontal). Abaixo: ajuste $y = mx$ entre a luminosidade medida e a teórica. No ajuste $m = 0.9985$ (0.0002).

Os resultados de quantificação encontrados com o programa mostraram uma excelente coincidência com os valores e perfis desenhados. A figura A1.6 mostra a

quantificação dos pixels com o formato de cones. As pequenas diferenças entre os valores calculados e os medidos foram por causa da representação discreta que estas figuras geométricas apresentam na forma de pixels. No caso em que foram utilizados prismas quadrados, os valores teóricos e medidos coincidiram exatamente.

7. Considerações finais

O programa GelAnalis mostrou ser uma boa ferramenta para realizar quantificações rápidas e precisas de bandas de DNA em géis de eletroforese. Suas aplicações podem se estender a qualquer problema que precise quantificar os tons de cinza em regiões de imagens, como pode ser o caso de placas fotográficas expostas a radiação, colônias de células etc. O programa gerado dentro do projeto foi registrado no Instituto da Proteção Intelectual (INPI) em nome da Universidade de São Paulo.

APÊNDICE 2. Estimativa do fator de correção para o Brometo de Etídio.

Neste estudo foi determinado o valor do fator de aderência do Brometo de Etídio no DNA *supercoiled* com respeito ao DNA circular e linear para nossas condições de análise. A metodologia utilizada foi similar à utilizado por Milligan et al. (1993). O método consistiu em utilizar o princípio de que a fluorescência das bandas de DNA em gel de eletroforese é proporcional à sua massa. Desta forma, colocando quantidades iguais de massa de DNA em conformações diferentes (*supercoiled*, circular e linear) pode se encontrar o fator que fará com que as fluorescências das suas bandas sejam iguais. Este fator é conhecido como fator de correção para o enlace do Etídio ao DNA *supercoiled* (Correction Factor for Ethidium Binding).

Para a experiência foram utilizadas amostras inicialmente com DNA SC e Cir. Uma metade da amostra foi digerida parcialmente com a enzima Hind III para diminuir o DNA SC. No final, a amostra tinha DNA nas formas SC, Cir e Lin. O objetivo da digestão parcial foi manter os níveis de fundo das amostras iniciais e finais similares.

Denominando F_{SC} , F_{Cir} , e F_{Lin} como as intensidades da fluorescência das bandas *supercoiled*, circular e linear respectivamente, deve se cumprir que:

$$f \cdot F_{SC}^A + F_{Cir}^A = f \cdot F_{SC}^B + F_{Cir}^B + F_{Lin}^B$$

onde os supra índices A e B denotam as amostras não-digeridas e semidigeridas respectivamente. Com isto é possível determinar o fator como:

$$f = \frac{F_{Cir}^B + F_{Lin}^B - F_{Cir}^A}{F_{SC}^A - F_{SC}^B}$$

No experimento, uma amostra aquosa de 800µl com DNA a 100ng/µl, foi dividida em três partes iguais de 260 µl. Na amostra A, não foi realizada nenhuma modificação. A amostra B, foi submetida a um choque térmico, para quebrar qualquer ligação entre os DNA da solução. Por último, a amostra C foi digerida com a enzima Hind III com o objetivo de linearizar parte do DNA SC (4 µl de enzima mais 4 µl de Buffer R, 1h30min min. a 37°C, desativando com 20 min. a 65°C). Posteriormente, para manter as concentrações iguais, os volumes das amostras foram igualados. As concentrações de DNA em todas as amostras foram medidas novamente usando espectrofotômetro. Os resultados das medições nos três casos foram similares. De todas as amostras foram extraídos 41.2 µl (4000ng de DNA). Adicionou-se 8 µl de Stop Mix e 30.8 µl de água destilada, totalizando 80ul com concentração final de 50ng/ µl.

Utilizando a metodologia apresentada no capítulo 5 (Materiais e Métodos) foi corrido e fotografado um gel de eletroforese com cada uma das amostras aplicadas duas vezes em lugares distantes do gel.

Das quantificações pôde-se concluir que a amostra à qual se aplicou o choque térmico apresentou um incremento na fração circular com a diminuição do SC. A causa disto provavelmente foi a indução de rupturas pelo calor aplicado, como foi observado por Touw et al. (1985)

A figura A2.1 mostra a somatória da fluorescência na região selecionada em função da distância de migração. Para cada amostra no gel, a região selecionada teve o mesmo tamanho. A linha de divisão do DNA Linear do *supercoiled* foi determinada aproximando a banda SC a uma função Gaussiana, onde a linha denota uma largura do pico de 3σ (99%).

Figura A2.1. a) Gel com amostras sem digestão(A), com choque térmico(B) e semi-digerida (C). b) Gráfico da densidade óptica integrada em função da distancia de migração para as amostras A, B e C. Os números denotam: 1- pico de DNA circular, 2- pico linear, 3- pico *supercoiled*, 4- denota o ponto de separação entre o DNA Lin e o SC.

Considerando a área à esquerda do ponto 4 como $F_{Cir}+F_{Lin}$ e a da parte direita como F_{SC} , foi possível calcular o fator correção do enlace do Etídio, f . O procedimento foi realizado várias vezes, obtendo um valor final de 1.74 ± 0.15 . O valor encontrado está de acordo com o fator 1.7 reportado por Spothem-Maurizot (1990) e por Stankus (1995). Por outro lado, este fator não coincide com o 1.4 reportado por Milligan (1992), onde, no entanto foram encontrados fatores entre 1.1 e 2.0, dependendo da concentração do Brometo de Etídio e da densidade superhelicoidal do DNA.

APÊNDICE 3. Região e equação de ajuste para o cálculo de G(DSB)

Como foi mencionado na seção 4.4.3 do capítulo 4, uma das causas das diferenças entre os resultados reportados de G(DSB) pode estar vinculada as diferentes formas para o cálculo de P_{DSB} . Portanto, a definição da região de trabalho e a equação de ajuste é um passo muito importante.

As principais equações utilizadas na literatura para determinar P_{DSB} são

$$F_{SC+Cir}^I = 1 - F_{Lin}^I = F_{SC+Cir}^0 \cdot \exp(-P_{DSB} \cdot D), \quad [A3.1]$$

$$F_{SC+Cir}^{II} = 1 - F_{Lin}^{II} = F_{SC+Cir}^0 \cdot \exp[-(P_{DSB} \cdot D + \beta \cdot D^2)], \quad [A3.2]$$

$$F_{Lin}^{III} = P_{DSB} \cdot D + F_{Lin}^0, \quad [A3.3]$$

$$F_{Lin}^{IV} = A \cdot D^2 + P_{DSB} \cdot D + F_{Lin}^0. \quad [A3.4]$$

Observando a forma das funções, é possível observar que deve existir um limite onde sejam aproximadamente equivalentes. Expandindo em serie de Mac-Laurin as funções A3.1 e A3.2,

$$F_{SC+Cir}^I = F_{SC+Cir}^0 \cdot \exp(-P_{DSB} \cdot D) = F_{SC+Cir}^0 \left[\sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-P_{DSB} \cdot D)^n}{n!} \right], \quad [A3.5]$$

$$F_{SC+Cir}^{II} = F_{SC+Cir}^0 \left[\sum_{n=0}^{\infty} \frac{f^{(n)}(0)}{n!} D^n \right], \quad [A3.6]$$

onde $f^{(n)}(0)$ representa a derivada n -esima da função A3.2 com $D=0$. Considerando o limite onde $P_{DSB} \cdot D$ é pequeno, e tomando só até o termo quadrático dos expansões, teremos para a função A3.5,

$$\begin{aligned} F_{SC+cir}^I &= F_{SC+Cir}^0 \left[1 - P_{DSB} \cdot D + \frac{(P_{DSB} \cdot D)^2}{2} \right] = \\ &= F_{SC+Cir}^0 \left(1 - P_{DSB} \cdot D - (P_{DSB}^2/2) \cdot D^2 \right). \end{aligned} \quad [A3.7]$$

Lembrando que $F_{SC+Cir} = 1 - F_{Lin}$, é substituindo obtemos

$$F_{Lin}^I = F_{Lin}^0 + P'_{DSB} \cdot D + A \cdot D^2, \quad [A3.8]$$

onde $P'_{DSB} = P_{DSB} \cdot F_{SC+Lin}^0$, e $A = (P_{DSB}^2/2) \cdot F_{SC+cir}^0$.

Da mesma forma para a função 4.31, obtemos:

$$F_{Lin}^{II} = F_{Lin}^0 + P'_{DSB} \cdot D + B \cdot D^2, \quad [A3.9]$$

onde $B = F_{SC+Lin}^0 \cdot [(P_{DSB}^2 - 2\beta)/2]$.

Da equação A3.8 e A3.9 pode-se observar a equivalência com as funções A3.3 e A3.4 para valores pequenos de $P_{DSB} \cdot D$. Esta equivalência é mostrada graficamente a seguir.

A figura A3.1 mostra três funções de produção de DNA linear obtidas pelas equações A3.1-A3.3, onde $F_{Lin}=1-F_{SC+Cir}$. Para a construção P_{DSB} foi considerado igual a 0.01 e β igual 0.00015, valores médios dos resultados experimentais.

Figura A3.1 Frações de DNA linear com as mesmas P_{DSB} , construídas com função linear, exponencial linear e exponencial quadrática.

As figuras A3.2 a A3.4, mostram o valor de P_{DSB} encontrado nos ajustes de cada uma das três funções anteriores utilizando as equações A3.1-A3.4.

Figura A3.2 Valores de P_{DSB} em função de μ para o ajuste da função exponencial quadrática para as equações de F_{Lin}^I , F_{Lin}^{II} , F_{Lin}^{III} , F_{Lin}^{IV} .

Figura A3.3 Valores de P_{DSB} em função de μ para o ajuste da função linear para as equações de F_{Lin}^I , F_{Lin}^{II} , F_{Lin}^{III} , F_{Lin}^{IV} .

Figura A3.4 Valores de P_{DSB} em função de μ para o ajuste da função exponencial linear para as equações de F_{Lin}^I , F_{Lin}^{II} , F_{Lin}^{III} , F_{Lin}^{IV} .

Das figuras A3.1, A3.2, A3.3 e A3.4 é possível observar o demonstrado com a expansão em séries. No limite em que $\mu \rightarrow 0$, os valores de P_{DSB} convergem ao mesmo resultado.

Os gráficos anteriores mostram também como cada função de ajuste é ótima para certo tipo de curva. No entanto, a função de ajuste quadrática (eq. A3.4) mostrou a menor divergência nos três tipos de ajustes para valores de μ menores que 0.2.

Isto permitiu definir a função e a região para realizar o ajuste da fração Linear de DNA. Considerando que $\mu = P_{DSB} \cdot D = D/D_{37}$, temos que uma dose limite para um bom ajuste será $D = \mu \cdot D_{37} = 0.2 \cdot D_{37}$. Na prática, muitas vezes, para este valor de dose o número de pontos experimentais é muito pequeno, pelo que junto a este critério utilizaremos um ajuste linear e a condição de que F_{Lin} seja pequeno (menor que 15%), similar a alguns

trabalhos da literatura [Milligan 1993a, 1993b, 1996a, 1996b]. Desta forma, os resultados obtidos neste trabalho estarão mais próximos dos obtidos pelas diferentes formas de análises presentes na bibliografia.

APÊNDICE 4. Simulação do Irradiador de gama de ^{60}Co .

Como foi mencionado no capítulo 5, os métodos e procedimentos relacionados com a parte física do trabalho são explicados neste capítulo, incluindo a simulação do experimento, a determinação da taxa de dose e a irradiação das amostras.

A simulação do experimento e a determinação experimental da taxa de dose possuem uma estreita vinculação e se complementam entre si. Para as irradiações com ^{60}Co foi utilizado um irradiador modelo Gammacell220 da Atomic Energy of Canada instalado no Centro de Tecnologias das Radiações (CTR) no IPEN. No ano 1997 o irradiador foi recarregado mantendo 26 fontes de 16.6 Ci e adicionando 9 fontes, 8 delas com 1467 Ci e 1 com 264 Ci. Nosso principal interesse com a simulação foi definir como esta modificação muda o campo de irradiação dentro da câmara de amostras do irradiador, já que de forma experimental fica muito difícil de determinar. No entanto, a taxa de dose no centro da câmara encontra-se bem definida experimentalmente e tem sido utilizada como controle do tempo de irradiação. Desta forma, a taxa de dose central experimental foi utilizada como referência para validar os resultados das simulações.

Por outro lado, os métodos e procedimentos relacionados com a irradiação das amostras incluem o detalhamento da preparação das amostras, a instalação experimental assim como os tempos de irradiação e doses recebidas.

1. Gammacell-220. Descrição do Irradiador

O irradiador é composto por:

- uma fonte cilíndrica de ^{60}Co , encerrada permanentemente dentro de uma blindagem de chumbo,
- uma gaveta cilíndrica,
- um mecanismo que move a gaveta para cima e para baixo ao longo da linha central da fonte,
- e o sistema eletrônico para seu funcionamento.

A gaveta do irradiador pode se encontrar em duas posições, uma onde a câmara de amostras fica acima do irradiador permitindo desta forma o acesso para a colocação das amostras, e outra posição onde a câmara fica no centro da fonte anular de ^{60}Co (posição de irradiação). A figura A4.1 mostra o esquema do irradiador.

Figura A4.1 Desenho do irradiador modelo Gammacell-220. Vistas superior, lateral e frontal.

1.1 Fonte cilíndrica de ^{60}Co .

A fonte cilíndrica de aço inox pode conter até 48 lápis de fontes de ^{60}Co , duplamente selados, de 21.11 cm de comprimento. Estes ficam em uma formação cilíndrica de 20.91 cm de diâmetro, figura A4.2.

Figura A4.2 Desenho da gaiola de fontes que pode conter até 48 lápis de fontes de ^{60}Co .

1.2 Gaveta

A gaveta de 149.86 cm de altura e 16.51 cm de diâmetro é dividida em três partes, superior, câmara de mostras e parte inferior. A parte superior é um cilindro de aço recheado com chumbo de 16.51 cm de diâmetro e 36.51 cm de comprimento contendo um tubo de acesso no centro de 3.17 cm de diâmetro interno. O tubo de acesso permite a introdução de acessórios dentro da câmara de amostras. A câmara de amostra consiste num cilindro de paredes delgadas de alumínio com diâmetro interior de 15.49 cm e 20.47 cm de altura. A porta de acesso tem 20.07 cm de altura e 15.24 cm de largura. A parte inferior da gaveta é formada por um tubo de aço recheado de chumbo como a parte superior de 30.5 cm de comprimento. Um tubo interno de 1.11 cm de diâmetro no seu interior permite a drenagem de líquidos derramados na câmara de mostras.

1.3 Suporte de amostras

Para garantir a uniformidade na dose recebida pelas amostras foram construídos suportes com geometrias cilíndricas para os tubos da Eppendorft que continham as amostras. Um dos suportes tem capacidade para 16 amostras o outro, para quatro. No modelo de 16 lugares, as amostras ficam a um raio de 2.5 cm com respeito ao centro da câmara, e no segundo modelo de 4 lugares o raio é de 2 cm. Estes suportes são colocados sobre bases de isopor delgado para que as amostras fiquem no centro da câmara.

1.4 Características radioativas do irradiador

O ^{60}Co se desintegra com um tempo de vida médio de 5.271 anos a Níquel 60 estável. O ^{60}Co emite dois raios gama de cascata com energias de 1.1732 MeV a 1.3325 MeV, dando uma energia combinada de 2.5057 MeV.

A atividade total do irradiador dependerá da distribuição e atividade dos lápis assim como do tempo transcorrido desde sua construção e calibração. O Gammacell-220 do CTR-IPEN foi recarregado no dia 23-9-97, contendo naquele momento 26 fontes de 16.6 Ci, uma fonte de 264 Ci, e 8 fontes de 1467 Ci, totalizando 35 fontes é uma atividade total de 12432 Ci. A atividade atual pode ser calculada como $A = A_o \cdot \exp(-\lambda \cdot t)$ onde λ é a constante de desintegração e t o tempo transcorrido em anos. A constante de desintegração pode ser calculada como $\lambda = \ln 2 / \tau$, onde τ é o tempo de vida médio para o ^{60}Co , obtendo $\lambda = 0.1315 \text{ ano}^{-1}$.

2. Simulação da taxa de dose

Neste trabalho foi utilizado o código de transporte de radiação MCNP para a simulação do campo de irradiação interno do irradiador Gammacel-220 do CTR no IPEN. Os objetivos principais foram: o cálculo da taxa de dose central, a estimativa da distribuição espacial interna da taxa de dose assim como suas variações relativas no campo de irradiação. Desta forma seria possível estimar e fazer correções nas doses recebidas nas amostras irradiadas de acordo com o ponto no qual foram colocadas dentro da câmara de irradiação. Um dos motivos que nos levou a realizar este tipo de simulação é a não homogeneidade no campo de radiação em todos os pontos da câmara de amostras do irradiador, devido a diferenças entre as fontes radioativas que possui.

2.1 MCNP. Métodos de cálculo de taxa de dose.

O programa de Monte Carlo MCNP é atualmente um dos códigos mais amplamente utilizados para simulações na área de transporte de radiação envolvendo nêutrons, fótons, elétrons, prótons entre outros. O mesmo consegue trabalhar com geometrias tridimensionais e permite estimar uma grande quantidade de parâmetros da simulação. Isto faz com que o código seja muito utilizado em aplicações como as de proteção radiológica, modelagem de instalações nucleares, detectores e blindagem de radiação entre outras.

O código utiliza para a simulação o método de Monte Carlo, o qual reproduz teoricamente o processo estatístico de interação da radiação com a matéria. Neste método são simulados sequencialmente os eventos probabilísticos individuais produzidos no processo de interação da radiação. Na simulação do transporte de radiação cada partícula é seguida desde a fonte, onde ocorre seu nascimento, ao longo de sua vida até sua morte (escape, absorção, etc). Neste procedimento, as distribuições de probabilidade são randomicamente amostradas usando-se dados de transporte de radiação tabulados.

Para realizar cálculos, fazer medições e obter resultados de parâmetros específicos o MCNP utiliza o procedimento denominado Tally. O MCNP possui 7 Tallies diferentes (F1, F2, F4, F5, F6, F7, F8) e cada uma delas determina um parâmetro diferente.

Para o cálculo de taxa de dose normalmente é utilizada o Tally F6, mas utilizando fatores de conversão de fluxo em dose podem ser utilizadas as Tallies F4 e F5, tabela 1.

Tabela 1 Tallies utilizadas para o cálculo da taxa de dose

<u>Tally</u>	<u>Quantidade Fn</u>	<u>Unidade Fn</u>	<u>Descrição</u>
F4:P	$W \cdot T_1 / V$	$1/\text{cm}^2$	Estimativa do fluxo de fótons na célula
F5:P	$W \cdot p(\mu) \cdot \exp(-\lambda) / (2\pi R^2)$	$1/\text{cm}^2$	Fluxo de fótons num detector pontual ou anel
F6:P	$W \cdot T_1 \cdot \sigma_T(E) \cdot H(E) \cdot \rho_a / m$	MeV/gm	Estimativa da energia depositada

Obs: A letra P depois do Fn indica que o cálculo é feito para fótons (*Photons*).

onde:

W	=	Peso da partícula.
W_s	=	Peso da fonte.
E	=	Energia da partícula (MeV).
T_1	=	Comprimento do track (cm).

V	=	Volume (cm^3).
$p(\mu)$	=	Função densidade de probabilidade. μ : co-seno do ângulo entre a trajetória da partícula e o detector.
λ	=	Caminho livre médio total até o detector.
$\sigma_T(E)$	=	Seção de choque microscópica total (barns)
$H(E)$	=	Heating number (MeV/colisão)
ρ_a	=	Densidade atômica (átomos/barn-cm).
m	=	Massa da célula

Os resultados que são reportados nas Tallies são normalizados por partícula emitida pela fonte, pelo que para obter o resultado real os valores devem ser multiplicados pelo número de partículas emitidas pela fonte. No caso das Tallies F4 e F5, o código reporta o fluxo de fótons que passam pelo volume em estudo. Com os fatores de conversão de fluxo em dose [RSICC 2000 (manual de MCNP apêndice H)] é possível determinar a taxa de dose. Para converter a Tally F6 em unidades de rem/h ou Gy/h é preciso multiplicar pelo fator de conversão de MeV/g em rem ou Gy. As equações finais para o cálculo da taxa de dose foram:

$$\dot{D}(F4)[mrem/h] = F4 * A(Bq) * fatorConversão(E) \quad [A4.1]$$

$$\dot{D}(F5)[mrem/h] = F5 * A(Bq) * fatorConversão(E) \quad [A4.2]$$

$$\dot{D}(F6)[mrem/h] = F6 * A(Bq) * fator(MeV/gm \rightarrow mrem) * 3600seg \quad [A4.3]$$

onde:

$A(Bq)$: atividade da fonte = 1 Ci = $3.7 * 10^{10}$ Bq

$fatorConversão(E)$: fator de conversão de fluxo em dose em função da energia. Appendix H manual MCNP4C[3].

$fator(MeV/gm \rightarrow mrem)$: fator para conversão de MeV/gm a mrem. Valor = $1.60219 * 10^{-5}$

$massa(gm)$: massa da célula em gramas.

Para reportar os valores em Gy/h é necessário multiplicar os resultados em rem/h por 0.01 (para o ar, $1\text{rem} \approx 1\text{rad} = 0.01\text{Gy}$). No apêndice H do manual do MCNP existem duas tabelas para os coeficientes de conversão de fluxo em dose em função da energia

do fóton. Uma é a ICRP-21 e a outra a ANSI 1977. Provas de calibração mostraram que com a tabela ANSI eram obtidos resultados mais exatos.

2.2 Validação da simulação.

Para validar a simulação tínhamos como referência para o Gammacell-220 do IPEN que a taxa de dose central medida no dia 8/7/2005 ($A = 4370 \text{ Ci}$) era de 3,63 kGy/h, mas para validar os resultados das dispersão da dose na câmara de amostras foram utilizados os dados do manual do Gammacell-220 Excel da MDS-Nordio [Gammacell-220 Excel 2001]. No manual do modelo Excel são reportadas cinco taxas de doses centrais em função da atividade nominal da fonte, Tabela 2.

Tabela 2. Atividade e taxa de dose central para o Gammacell-200 Excel
[Gammacell-220 Excel 2001].

Atividade nominal da fonte		Taxa de dose central
TBq	Ci	($\pm 10\%$)
89.0	2400	2 kGy/h (0.2 Mrad/h)
222.5	6000	5 kGy/h (0.5 Mrad/h)
445.0	12000	10 kGy/h (1.0 Mrad/h)
667.5	18000	15 kGy/h (1.5 Mrad/h)
890.0	24000	20 kGy/h (2.0 Mrad/h)

Neste manual aparece também uma distribuição experimental do campo de dose para o modelo Excel. Figura A4.3.

Figura A4.3 Distribuição típica de dose para o Gammacell 220 Excel. Plano vertical arbitrário ao longo do eixo central. Todos os valores então em percentagens relativas à dose central.

3 Simulação do irradiador de referência Gammacell-220 Excel.

3.1 Construção geométrica.

Para a construção do irradiador foram utilizadas numerosas superfícies. O principal objetivo era tentar reproduzir o maior número de detalhes a fim de obter uma maior exatidão no resultado final com respeito ao valor verdadeiro. As 48 fontes foram construídas utilizando 48 cilindros cujas posições foram calculadas para ficarem à mesma distância do eixo central $Z=0$. Também foram construídos os revestimentos de aço inox da gaiola e dos cilindros da gaveta, assim como a câmara de amostras feita de alumínio. A blindagem externa de chumbo também foi fielmente construída deixando a possibilidade de futuros cálculos dosimétricos de exposição ocupacional. A figura A4.4 mostra os detalhes da geometria construída no MCNP. O interior da câmara de amostras foi recheado com cubos de 0.5 cm de aresta para fazer os cálculos de fluxo por F4 e de dose por F6.

Figura A4.4 Gammacell-220 Excel. a) Geometria do Gammacell em posição de irradiação. b) Detalhe das fontes e a câmara de mostras. Azul - ar, Verde-chumbo, Laranja – Cobalto 60, Ciano - aço, Vermelho - alumínio.

3.2 Definição de fontes

A definição de fontes utilizou o cartão SDEF definindo uma fonte de fótons cilíndrica com diâmetro e extensão igual ao de todos os lápis de ^{60}Co e paralelas ao eixo Z. As energias das partículas foram 1.1732 e 1.3325 MeV cada uma com peso 2. A posição da

fonte correspondeu com uma distribuição D4 dos possíveis 48 lugares onde o cilindro pode ser colocado. Estas posições coincidem com o eixo das células de ^{60}Co na geometria. Esta forma de construção permite variar facilmente as probabilidades de emissão de cada fonte de acordo com sua atividade. Isto resultou muito útil para a simulação do irradiador do IPEN onde nem todas as fontes possuem igual atividade. A figura A4.5 mostra a distribuição da origem das partículas considerando 48 fontes com igual atividade. É possível observar que a geração das partículas é totalmente homogênea dentro da região definida pelas fontes de ^{60}Co .

Figura A4.5 Origem de partículas nas 48 posições com igual probabilidade.

3.3 Definição das Tallies

Para a simulação foram utilizadas as Tallies F4, F5 e F6. As Tallies F4 e F6 executadas sobre as estruturas repetidas em forma de cubos de 0.5 cm uniformemente distribuídos dentro da câmara de amostras. O cubo no centro da câmara tinha as coordenadas $X=0, Y=0$ e $Z=0$. Dois tipos de cálculos foram feitos, um para os cubos encontrados no planos $X=0$ e o outro para aqueles em $Z=0$. Os cálculos para o plano $X=0$ ($Y=-6...6$ e $Z=-10...10$) reportaram a distribuição espacial da dose no plano vertical central e para $Z=0$ ($X=-6...6$ e $Y=-6...6$) foi encontrada a distribuição da dose no plano horizontal central.

No caso da Tally F5, existiu uma limitação, já que só era possível colocar 20 detectores por simulação, portanto foram realizadas varias simulações. Para determinar a

distribuição no plano $X=0$ foram realizadas 13 simulações correspondentes as coordenadas $Y=-6, -5, -4, \dots, 4, 5, 6\text{cm}$ cada uma com Z variando entre -9cm a 9cm com passo 1cm . Similarmente foram realizadas 13 simulações com $Z=0$ e $X=-6, \dots, 6$.

3.5 Resultados da simulação de validação

As figuras A4.6 e A4.7 mostram os resultados das simulações da taxa de dose e da dispersão com respeito à dose central para o irradiador tipo Excel utilizando a Tally F5. Os cálculos realizados com as Tallies F4 e F6 resultaram muito demorados (da ordem de semanas) e as flutuações estatísticas foram altas com respeito às divergências da dose na câmara de amostras. O valor de atividade da fonte considerado foi de 6000 Ci . Segundo a referência [Gammacell-220 Excel 2001] o valor de taxa de dose esperado era de 5000 Gy/h . Para a simulação foram rodados 13 arquivos de entrada cada um com 300000 historias. Os tempo de simulação foi de arredor de 45 min, e os erros do 0.3%.

Figura A4.6 Simulação da taxa de dose no irradiador Gammacell200-Excel da referência utilizando Tally F5. Corte nos planos $Z=0$ (esquerda) e $X=0$ (direita). Taxa de dose central de 5139 (102) Gy/h.

A figura A4.8 mostra uma comparação entre os resultados das taxas de dose central simuladas e o valor de 5 kGy da referência. É possível observar que de forma geral todos os resultados estão de acordo com o valor de referência, mas os cálculos feitos utilizando as Tallies F5 e F6 estão mais perto do valor verdadeiro. Os erros grandes nos resultados com F4 e F6 são devido ao pequeno número de histórias corridas, mas para sua redução seriam necessários muitos dias de cálculo. Uma comparação entre a dispersão da taxa de dose com respeito à central simulada com F5 (figura A4.7) e a distribuição de referência (figura A4.3) revela que ambas apresentam uma boa coincidência, o que nos permitiu validar o procedimento de simulação.

Figura A4.7 Dispersão com respeito à dose central do irradiador do Gammacell200-Excel utilizando Tally F5. Corte nos planos Z=0 (esquerda) e X=0 (direita). As unidades dos eixos são centímetros. Unidades da escala de cores em percentagem.

Figura A4.8 Comparação entre o valor de referência (vermelho) e as taxas de dose centrais calculadas utilizando as Tallies F4:p, F5:p e F6:p (verde).

Podemos concluir que a construção geométrica, a definição de fontes e o procedimento de cálculo de dose foram satisfatórios, o qual nos permitira realizar a simulação do irradiador Gammacell 220 do IPEN, do qual não possuímos muitas referências, além da taxa de dose central.

4. Simulação do irradiador do IPEN

4.1 Definição das fontes

Depois de ter testado os procedimentos de simulação com o irradiador tipo Excel, foi simulada a taxa de dose para o irradiador Gammacell do IPEN. Neste caso só foram modificadas as taxas de emissão das fontes de ^{60}Co seguindo a distribuição das 35 fontes com as quais foi calibrado no dia 23/9/1997. A figura A4.9 mostra a distribuição dos pontos de origem das partículas. Observa-se que, neste caso, a distribuição não é homogênea. As 8 fontes com 1467 Ci têm uma probabilidade maior de emitir que a de 264 Ci e as 26 de 16,6 Ci.

Figura A4.9 Distribuição espacial na simulação da origem das partículas na fonte anular. A distribuição responde as intensidades e ao número de fontes presente no irradiador do IPEN (8 fontes de 1467 Ci, 1 fonte de 264 Ci e 26 fontes de 16,6 Ci, total 12432 Ci em 23/9/97).

4.2 Taxa de dose central de referência

A taxa de dose de referência para 2005 foi de 3.63 (0.18) kGy/h, que corresponde com uma atividade $A = 12432 \cdot \exp(-0.1315 \text{ yr}^{-1} \cdot 8 \text{ yr}) = 4342 \text{ Ci}$

4.3 Resultados da simulação do Gammacell-220 do IPEN

As figuras A4.10 e a4.11 mostram os resultados das taxas de doses e sua variação espacial dentro da câmara, obtido nas simulações utilizando a Tally F5. Como no caso anterior, as simulações com F4 e F6 foram muito demoradas e imprecisas. Os numeros de histórias, tempos e erros foram similares as do Gammacell200-Excel. Os resultados de taxa de dose central mostrados na figura A4.10 e A4.12 também coincidem muito bem com o valor experimental.

Um dos nossos objetivos com a simulação era verificar se a distribuição não homogênea das fontes causava grandes variações na distribuição do campo de dose dentro da câmara de irradiação e sobre as amostras. Comparando as figuras A4.7 e A4.11 é possível apreciar certa variação espacial nas curvas de isodose no plano vertical, mas no plano horizontal central ainda é mantida uma simetria cilíndrica num diâmetro de 6 cm aproximadamente. Nesta região, a taxa de dose varia até 3% por acima do valor central. Os suportes de amostras utilizados não superam os 5 cm de diâmetro pelo qual a dose recebida terá um incremento de até 3% aproximadamente.

Figura A4.10 Simulação da taxa de dose no irradiador Gammacell220 do IPEN utilizando *Tally F5*. Corte nos planos Z=0 (esquerda) e X=0 (direita). Taxa de dose central 3753 (75) Gy/h.

Na figura A4.12 são comparados os resultados obtidos utilizando as Tallies F4, F5, e F6 com respeito ao valor experimental da taxa de dose central. Os resultados mostram uma boa coincidência entre os resultados da simulação e os dados experimentais, apesar dos grandes erros dos cálculos por F4 e F6.

Figura A4.11 Dispersão com respeito à dose central do irradiador Gammacell220 do IPEN utilizando Tally F5. Corte nos planos Z=0 (esquerda) e X=0 (direita).

Figura a4.12 Comparação entre o valor de referência (vermelho) e as taxas de dose centrais calculadas utilizando as Tallies F4:p, F5:p e F6:p (verde).

4.4 Conclusão

Como conclusão, é possível afirmar que a simulação do irradiador Gammacell-220 do IPEN foi bem sucedida. A não homogeneidade das fontes não produz grandes variações dentro da simetria da dispersão da dose no interior da câmara de amostras. E a taxa de doses recebida no DNA colocado nos porta amostras construídos para as irradiações não superam em mais de 3% a taxa de dose central.

5 Código de entrada ao MCNP

Código de entrada ao MCNP da simulação do irradiador Gammacell-220 Excel e do IPEN.

```

Irradiador GammaCell 220 Excel
c esferas de 2.4 cm de diametro epaciadas 0.5 cm
1 4 -8.9 (-1:-2:-3:-4:-5:-6:-7:-8:-9:-10:-11:-12: $fontes de
cobalto
-13:-14:-15:-16:-17:-18:-19:-20:-21:-22:
-23:-24:-25:-26:-27:-28:-29:-30:-31:-32:
-33:-34:-35:-36:-37:-38:-39:-40:-41:-42:
-43:-44:-45:-46:-47:-48) 82 -85 imp:p=1
2 1 -0.001205 51 -52 82 -85 #1 imp:p=1 $espaco de ar
3 2 -8.02 50 -51 82 -85 imp:p=1 $acero inox 1
4 2 -8.02 52 -53 82 -85 imp:p=1 $acero inox 2
5 2 -8.02 -53 80 -82 imp:p=1 $base de fonte
c 6 5 1 (-71 82 -85) (70:-83:84)(91:-84) imp:p=1
$aluminio da camara com buraco
6 5 -2.70 (-71 82 -85) (70:-83:84) imp:p=1 $aluminio da
camara
7 1 -0.001205 -50 71 82 -85 imp:p=1 $espacio de aire
10 0 -70 83 -84 fill=2 imp:p=10 $camara temporaria
11 2 -8.02 70 -71 90 -80 imp:p=1 $cubierta Drawer inferior
12 3 -11.34 -70 90 -80 imp:p=1 $blindagem drawer
inferior
13 2 -8.02 91 -71 85 -92 (-86:70) imp:p=1 $drawer
superior
14 3 -11.34 91 -70 86 -92 imp:p=1 $chumbo de
drawer sup
c 15 1 1 -91 84 -92 imp:p=1 $tubo de acesso com
buraco
15 1 -0.001205 -91 85 -92 imp:p=1 $tubo de acesso
26 3 -11.34 -93 94 -95 71 (53:-80:85) imp:p=1 $blindagem
chumbo
27 3 -11.34 -98 71 95 -96 imp:p=1 $cone de chumbo
28 3 -11.34 -99 71 96 -97 imp:p=1 $protector superior
50 1 -0.001205 -100 (93:-94:95) (71:-90:92)#27 #28 imp:p=1
$chumbo externo
200 1 -0.001205 -120 imp:p=1 u=1
201 1 -0.001205 120 imp:p=1 u=1
300 0 130 -131 132 -133 134 -135 u=2 fill=1 lat=1 imp:p=1
100 0 100 imp:p=0

c SUPERFICIES
c fontes
1 c/z 9.813 0.000 0.640
2 c/z 9.729 1.281 0.640
3 c/z 9.479 2.540 0.640
4 c/z 9.066 3.755 0.640
5 c/z 8.498 4.907 0.640
6 c/z 7.785 5.974 0.640
7 c/z 6.939 6.939 0.640
8 c/z 5.974 7.785 0.640
9 c/z 4.907 8.498 0.640
10 c/z 3.755 9.066 0.640
11 c/z 2.540 9.479 0.640
12 c/z 1.281 9.729 0.640
13 c/z 0.000 9.813 0.640
14 c/z -1.281 9.729 0.640
15 c/z -2.540 9.479 0.640
16 c/z -3.755 9.066 0.640
17 c/z -4.907 8.498 0.640
18 c/z -5.974 7.785 0.640
19 c/z -6.939 6.939 0.640
20 c/z -7.785 5.974 0.640
21 c/z -8.498 4.907 0.640
22 c/z -9.066 3.755 0.640
23 c/z -9.479 2.540 0.640
24 c/z -9.729 1.281 0.640
25 c/z -9.813 0.000 0.640
26 c/z -9.729 -1.281 0.640
27 c/z -9.479 -2.540 0.640
28 c/z -9.066 -3.755 0.640
29 c/z -8.498 -4.907 0.640
30 c/z -7.785 -5.974 0.640
31 c/z -6.939 -6.939 0.640
32 c/z -5.974 -7.785 0.640
33 c/z -4.907 -8.498 0.640
34 c/z -3.755 -9.066 0.640
35 c/z -2.540 -9.479 0.640
36 c/z -1.281 -9.729 0.640
37 c/z 0.000 -9.813 0.640
38 c/z 1.281 -9.729 0.640
39 c/z 2.540 -9.479 0.640
40 c/z 3.755 -9.066 0.640
41 c/z 4.907 -8.498 0.640
42 c/z 5.974 -7.785 0.640
43 c/z 6.939 -6.939 0.640
44 c/z 7.785 -5.974 0.640
45 c/z 8.498 -4.907 0.640
46 c/z 9.066 -3.755 0.640
47 c/z 9.479 -2.540 0.640
48 c/z 9.729 -1.281 0.640
c porta fonte
50 cz 9. $diametro interno1 aço
51 cz 9.171 $diametro interno2 aço
52 cz 10.455 $diametro externo 1
53 cz 11. $diametro externo 2
c
c DRAWER
70 cz 7.745
71 cz 8.255
c planos DRAWER
80 pz -12.235
82 pz -10.735
83 pz -10.235
84 pz 10.235
85 pz 10.875
86 pz 12.375
c drawer inferior
90 pz -90
c drawer superior
91 cz 1.585
92 pz 47.385
c blindagem
93 cz 38
94 pz -39.37
95 pz 20.32
96 pz 39.37
97 pz 55.88
98 kz 59.03 0.9636
99 cz 19.3
c entonro
100 so 150
c estrutura repetida
120 so 0.24
130 px -0.25
131 px 0.25
132 py -0.25
133 py 0.25
134 pz -0.25
135 pz 0.25

mode p
c fonte
SDEF RAD D1 AXS 0 0 1 EXT D2 ERG D3 PAR 2 POS D4
WGT 2
c radio
SI1 0 0.60
SP1 -21 1
c distribuicao para extension

```

Apêndice 4. Simulação do irradiador de gama de ^{60}Co

```
SI2 -10.735 10.375
SP2 0 1
c energias
SI3 L 1.1732 1.3325
SP3 D 1 1 1
c
SI4 L 9.813 0.000 0.640
9.729 1.281 0.640
9.479 2.540 0.640
9.066 3.755 0.640
8.498 4.907 0.640
7.785 5.974 0.640
6.939 6.939 0.640
5.974 7.785 0.640
4.907 8.498 0.640
3.755 9.066 0.640
2.540 9.479 0.640
1.281 9.729 0.640
0.000 9.813 0.640
-1.281 9.729 0.640
-2.540 9.479 0.640
-3.755 9.066 0.640
-4.907 8.498 0.640
-5.974 7.785 0.640
-6.939 6.939 0.640
-7.785 5.974 0.640
-8.498 4.907 0.640
-9.066 3.755 0.640
-9.479 2.540 0.640
-9.729 1.281 0.640
-9.813 0.000 0.640
-9.729 -1.281 0.640
-9.479 -2.540 0.640
-9.066 -3.755 0.640
-8.498 -4.907 0.640
-7.785 -5.974 0.640
-6.939 -6.939 0.640
-5.974 -7.785 0.640
-4.907 -8.498 0.640
-3.755 -9.066 0.640
-2.540 -9.479 0.640
-1.281 -9.729 0.640
0.000 -9.813 0.640
1.281 -9.729 0.640
2.540 -9.479 0.640
3.755 -9.066 0.640
4.907 -8.498 0.640
5.974 -7.785 0.640
6.939 -6.939 0.640
7.785 -5.974 0.640
8.498 -4.907 0.640
9.066 -3.755 0.640
9.479 -2.540 0.640
9.729 -1.281 0.640
c
*****
c Para o irradiador Gammacell-220 Excel
c (distribuição homogênea)
c
SP4 D 1 1 1 1 1 1 1 1 1
1 1 1 1 1 1 1 1 1
1 1 1 1 1 1 1 1 1
1 1 1 1 1 1 1 1 1
1 1 1 1 1 1 1 1 1
c
c Para irradiador Gammacell-200 IPEN
c (distribuição não homogênea)
c
SP4 D 0.00 0.00 2.12 0.00 0.00 11.80 0.00
0.13 0.13 0.13 0.00 11.80 0.00 0.13
0.13 0.13 0.00 11.80 0.13 0.13 0.13
0.13 0.13 11.80 0.13 0.13 0.13 0.13
0.13 11.80 0.13 0.13 0.13 0.13 0.00
11.80 0.00 0.13 0.13 0.13 0.00 11.80
0.00 0.13 0.13 0.13 0.00 11.80
c
c
*****
c materiais
c ar
m1 6000 -0.0001 7014 -0.7553 8000 -0.2318 18000 -0.0128
c aço
m2 26000 61.8
6000 0.08
28000 20.0
25000 2
14000 1
15000 0.045
16000 0.03
c chumbo
m3 82000 1
c Cobalto
m4 27000 1
c alumínio
m5 13000 1
c Tallies
c fatores de conversão ANSI
DE4 0.01 0.03 0.05 0.07 0.1 0.15 0.2 0.25 0.3
0.35 0.4 0.45 0.5 0.55 0.6 0.65 0.7 0.8
1.0 1.4 1.8 2.2
DF4 3.96E-6 5.82E-7 2.90E-7 2.58E-7 2.83E-7
3.79E-7 5.01E-7 6.31E-7 7.59E-7 8.78E-7
9.85E-7 1.08E-6 1.17E-6 1.27E-6 1.36E-6
1.44E-6 1.52E-6 1.68E-6 1.98E-6 2.51E-6
2.99E-6 3.42E-6
DE14 0.01 0.03 0.05 0.07 0.1 0.15 0.2 0.25 0.3
0.35 0.4 0.45 0.5 0.55 0.6 0.65 0.7 0.8
1.0 1.4 1.8 2.2
DF14 3.96E-6 5.82E-7 2.90E-7 2.58E-7 2.83E-7
3.79E-7 5.01E-7 6.31E-7 7.59E-7 8.78E-7
9.85E-7 1.08E-6 1.17E-6 1.27E-6 1.36E-6
1.44E-6 1.52E-6 1.68E-6 1.98E-6 2.51E-6
2.99E-6 3.42E-6
F4:p (200<300[0:0 -12:12 -20:20]<10)
F14:p (200<300[-12:12 -12:12 0:0]<10)
F6:p (200<300[0:0 -12:12 -20:20]<10)
F16:p (200<300[-12:12 -12:12 0:0]<10)
SD4 0.057906 $volume da celula
SD14 0.057906
SD6 0.057906
SD16 0.057906
nps 3E8
print
c ptrac event=src max=10000 write=pos file=asc
```

APÊNDICE 5. Reagentes e soluções utilizadas no trabalho.

A5.1 EDTA 0.5 M pH 8.0 (1000 ml)

1. EDTA 186.1 g
2. H₂O 800 ml
3. Agitar vigorosamente.
4. Ajustar pH com NaOH e ir adicionando água até 1000 ml.

A5.2 TBE 10X (1000 ml)

1. 108 g de Tris Base
2. 55 g de ácido bórico
3. 40 ml de EDTA (0.5 M)
4. Completar com H₂O até 1000 ml.

A5.3 Stop Mix 10x (100ml)

1. 20 ml de EDTA (0.5 M)
2. 0.5 g Azul de Bromofenol
3. 50% Glicerol
4. Completar com H₂O até 100ml

A5.4 TBE 0.5X (Tampão)

1. 50 ml de TBE 10x
2. 950 ml de H₂O

A5.5 Gel de eletroforese

1. 100 ml de TBE 0.5X
2. 0.7 g de agarose
3. Aquecer até dissolução
4. Adicionar Brometo de Etídio para concentração de 0.5 µg/ml.