MICHELLE MENDES MORON

**EFEITO DA AÇÃO COMBINADA DE RADIAÇÃO GAMA E
CAMPO ELÉTRICO ESTÁTICO EM CÉLULAS HUMANAS**

São Paulo

2008

Efeito da ação combinada de radiação gama e campo elétrico estático em células humanas

MICHELLE MENDES MORON

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo

2008

Efeito da ação combinada de radiação gama e campo elétrico estático em células humanas

MICHELLE MENDES MORON

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. João Dias de Toledo Arruda Neto

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Helena Regina Comodo Segreto

São Paulo

2008

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Moron, Michelle Mendes.

Estudo da ação combinada de radiação gama e campo elétrico estático em células humanas / Michelle Mendes Moron. -- São Paulo, 2008.

Orientador: João Dias de Toledo Arruda Neto.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Efeitos biológicos da radiação e outros agentes físicos.

Versão do título para o inglês: Study of the combined action of gamma radiation and static fields in human cells.

Descritores: 1. Radiologia 2. Radiação gama 3. Reparo de DNA 4. Ciclo celular 5. Curvas de sobrevivência 6. Radioterapia I. Arruda Neto, João Dias de Toledo II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia III. Título.

ICB/SBIB118/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Michelle Mendes Moron.

Título da Dissertação: Estudo da ação combinada de radiação gama e campo elétrico estático em células humanas.

Orientador(a): João Dias de Toledo Arruda Neto.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº 244/08, referente ao projeto intitulado: *“Efeito da ação combinada de radiação gama e campo elétrico estático na viabilidade celular de células humanas”* sob a responsabilidade de **Michelle Mendes Moron**, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 19 de março de 2008.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEEA - ICB/USP

PROF. DR. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

*Em primeiro lugar, dedico este trabalho a Deus, pois sem
Ele, nada seria possível.*

*Ao meu Pai, exemplo de pessoa íntegra, correta e
paciente, que me transmitiu exemplos que construíram
meu caráter. Agradeço-lhe pelo esforço contínuo de me
proporcionar sempre o melhor e por tudo aquilo que
continua a fazer por mim.*

*À minha mãe, exemplo vivo de uma verdadeira lutadora,
incansável, trabalhadora, detentora de características
que marcam qualquer filho, lutando sempre ao lado da
família. O meu muito obrigado por jamais me deixar
desistir de meus sonhos.*

*Ao meu irmão, que sempre me apoiou e sempre será um
grande amigo.*

*Ao Fábio, pelo apoio, compreensão e amor que me foi
concedido, mesmo nas ocasiões mais difíceis.*

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho contou com o apoio, o estímulo e o carinho de muitas pessoas: professores, amigos, colegas, familiares... Cada um, ao seu modo, contribuiu para que eu pudesse encontrar a força e o incentivo necessários para transpor os obstáculos e as dificuldades encontradas. Por isso, aqui vai meu sincero agradecimento a todos que me ajudaram, de alguma forma, a realizar esse trabalho.

Ao meu orientador Prof. Arruda, por ter me orientado de maneira tão sensata e inteligente, permitindo com que este sonho tornasse realidade, pelos inúmeros ensinamentos que levarei sempre comigo, por ter sido compreensivo e paciente e por dar todo apoio nos momentos em que mais precisei. Muito obrigada por tudo.

À minha co-orientadora Dra. Helena Segreto, Departamento de Radioterapia – UNIFESP, pela orientação científica, incentivo, apoio, conselhos, pela dedicação intensa em melhorar cada vez mais este trabalho, por ter me ensinado o valor do trabalho e o amor à profissão, pelas inúmeras correções. Enfim, agradeço pela amizade, pelo aprendizado e pela proveitosa colaboração. Agradeço também a toda sua equipe, especialmente, o físico Adelmo pelo apoio técnico.

Ao laboratório de Bioquímica-Butantan, em especial ao Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria que me recebeu muitíssimo bem, pela colaboração imprescindível, pelo incentivo e entusiasmo. Agradeço também aos seus alunos que sempre me ajudaram quando precisei, principalmente, Rogério Novo pela dedicação.

À Jacqueline Jacysyn, do Laboratório de Imunologia – ICB IV, pela ótima recepção, pela prontidão que sempre atendeu aos meus pedidos e por permitir que utilizasse suas instalações sempre quando solicitada.

Ao Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck, pelas sugestões e por abrir as portas do seu laboratório para realização de experimentos que enriqueceram este trabalho. Ao seu aluno Luis Zirnberger, pela simpatia, atenção e colaboração científica.

Ao técnico Rogério Silva, do Departamento de Radiação da Imunologia-ICB IV, que irradiou minhas amostras e muito contribuiu para este trabalho.

À amiga Debora Soares, minha confidente, por todos os momentos que passamos juntas, bons e ruins, mas que renderam uma grande amizade.

À amiga Enia Coutinho, que durante minha estadia no laboratório e mesmo após minha saída, nunca mediu esforços para me ajudar e me ensinou muita coisa.

À simpatia em pessoa, Flávia Rocha, pela convivência agradável e bem humorada, pela sua disposição incondicional e principalmente por me ajudar com os passes.

Aos companheiros da Física, Geórgia, Gabriela, Rafael e Érika pela colaboração.

Aos meus pais Manoel e Maria do Carmo, pelo apoio incondicional, por terem me ensinado o valor do trabalho, dignidade e respeito. Ao meu irmão Michel pelo companheirismo.

Ao meu namorado Fábio, pelas inúmeras vezes que me ajudou a montar minhas apresentações, pela cumplicidade e dedicação.

A todos meus amigos por tornarem minha vida mais completa.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

“Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar, não apenas planejar, mas também acreditar”.

(Anatole France)

RESUMO

MORON, M. M. **Estudo da ação combinada de radiação gama e campo elétrico estático em células humanas.** 2008. 99 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

O princípio básico da radioterapia é o de maximizar o dano no tumor e de minimizá-lo nos tecidos sadios vizinhos. Diversas estratégias têm sido realizadas com o intuito de aumentar a radiosensibilidade celular, entre elas a utilização de campos exógenos. Neste trabalho visamos estudar o efeito da exposição de células humanas à radiação ionizante e em associação a campos elétricos exógenos estáticos. A linhagem T47D de células de carcinoma ductal mamário foi irradiada com gamas no intervalo 0 – 8 Gy. Através da curva de sobrevivência foram obtidas informações quanto à radiosensibilidade dessa linhagem. A taxa de mortalidade celular por Gray exibiu um máximo em 2 Gy, sendo então esta a dose de irradiação mais eficiente. A viabilidade celular da linhagem T47D exposta à radiação gama e campo elétrico estático (CEE) de 1.250 V/cm foi cerca de 12% inferior à viabilidade observada apenas com irradiação. Quando aplicado isoladamente por 24 e 72 horas o CEE não induziu toxicidade. A imunofluorescência realizada na linhagem normal MRC5 (fibroblasto de pulmão humano normal), irradiada com e sem exposição ao CEE, quantificou a expressão da histona γ -H2AX. A quantidade de histonas fosforiladas foi cerca de 40% maior após irradiação com 2 Gy mais CEE aplicado por 1h, indicando que o campo elétrico interferiu negativamente no processo de reparo das quebras duplas de DNA. A análise de citometria de fluxo (FACS) permitiu investigar a interferência da radiação gama associada ao campo elétrico estático na distribuição das células nas fases do ciclo celular. Verificou-se que em células T47D tratadas com 1 e 2 Gy por 24 horas o CEE também interferiu negativamente no processo de reparo do DNA, notadamente pelo maior acúmulo de células na fase S. Portanto, concluímos que campos elétricos estáticos e exógenos são capazes de interferir negativamente no reparo celular e, presumivelmente, com o reparo do DNA.

Palavras-chave: T47D-carcinoma ductal mamário. Radiação gama. Campo elétrico estático. Histona H2AX. Reparo de DNA.

ABSTRACT

MORON, M. M. **Study of the combined action of gamma radiation and static electric fields in human cells.** 2008. 99 f. Master thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

The basic principle of radiotherapy is the one of maximizing damage to the tumor, while minimizing it in neighboring health tissues. Several strategies have been worked out aiming at increasing cellular radiosensitivity, and among them is the use of exogenous fields. Our goal in this work is the study in human cells of the effect resulting from the association of irradiation with exposure to exogenous static electric fields. The T47D cell line of breast cancer cells was irradiated with gammas in the 0 – 8 Gy doses range. The corresponding survival curve provided information on the radiosensitivity of this cell line. The rate of cell deaths per Gray in the 0 – 8 Gy range exhibited a maximum at 2 Gy, which corresponds to the most efficient irradiation dose. The viability of this T47D cells exposed to both gamma radiation and 1.250 V/cm static electric field (SEF) was about 12% lower than when only irradiated. The sole exposure of the cells to SEF by 24 and 72 hours didn't induce toxicity. Immunofluorescence runs carried out in irradiated normal MRC5 cell line of human lung fibroblast, without and with exposition to a SEF, have quantified the expression of the γ -H2AX histone. The amount of phosphorylated histones was approximately 40% higher after irradiation with 2 Gy plus exposure to a SEF by 1 hour, showing that the electric field negatively interfered in the repairing process of the DNA double strand breaks. The flow cytometry analysis with FACS allowed the investigation of a possible interference of radiation and SEF in the cell distributions among the cellular cycle phases. It was found that in T47D cells treated with 1 and 2 Gy by 24 hours the SEF also negatively interfered in the DNA repairing process, as evidenced by the higher accumulation of cells in the S phase. Therefore, it would be possible to conclude that static and exogenous electric fields are able of negatively interfering in the cellular repair and, presumably, in DNA repair.

Key words: T47D – mammary ductal carcinoma. Gamma radiation. Static electric field. H2AX histone. DNA repair.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Esquema de ação do campo elétrico	20
FIGURA 2 – Esquema de ação do campo magnético.	21
FIGURA 3 – Razão entre a fração de sobrevivência.....	35
FIGURA 4 – Curva de sobrevivência para células T47D irradiadas com doses entre 2-8 Gy de raios gama	46
FIGURA 5 – Curva de sobrevivência analítica para células T47D em escala log-linear, obtida por ajuste da expressão de Boltzmann aos resultados experimentais mostrados na figura 4...47	47
FIGURA 6 - Dose D_0 da curva de sobrevivência em escala log-linear.....	48
FIGURA 7 – Viabilidade celular das células T47D que foram expostas a 1.250 V/cm de campo elétrico estático por 24 horas (campo 24 h) e do grupo não-exposto (controle).....	49
FIGURA 8 – Viabilidade celular das células T47D expostas a doses de 2 e 4 Gy de radiação gama e associadas a 1.250 V/cm de campo elétrico estático por 24 horas.....	50
FIGURA 9 - Expressão da histona γ -H2AX na linhagem MRC5	51
FIGURA 10 – Fotomicrografia fluorescente de núcleos corados com DAPI (azul) e foci nuclear de γ -H2AX corados com o anticorpo Alexa Fluor 594 nm (vermelho) detectados na linhagem celular MRC5	52
Para o tratamento com 2 Gy, a porcentagem de células irradiadas e expostas a 24 horas de campo elétrico presentes nas fases	53
FIGURA 11 – Citometria de fluxo realizada na linhagem T47D – grupo controle não-irradiado 24 e 72 horas	55
FIGURA 12 - Citometria de fluxo realizada na linhagem T47D – grupo campo não-irradiado 24 e 72 horas.....	56
FIGURA 13 - Citometria de fluxo realizada na linhagem T47D – grupo 1 Gy (24 hs) e 1 Gy + Campo (24 hs)	57
FIGURA 14 - Citometria de fluxo realizada na linhagem T47D – grupo 1 Gy (72 hs) e 1 Gy + Campo (72 hs)	58
FIGURA 15 - Citometria de fluxo realizada na linhagem T47D – grupo 2 Gy (24 hs) e 2 Gy + Campo (24 hs)	59
FIGURA 17 - Citometria de fluxo realizada na linhagem T47D – grupo 4 Gy (24 hs) e 4 Gy + Campo (24 hs)	61

FIGURA 18 - Citometria de fluxo realizada na linhagem T47D – grupo 4 Gy (72 hs) e 4 Gy + Campo (72 hs)	62
FIGURA 19 – Histograma representativo da porcentagem de células T47D presentes em cada fase do ciclo celular	63
FIGURA 20 - Histograma representativo da porcentagem de células T47D presentes em cada fase do ciclo celular	64
FIGURA 21 - Histograma representativo da porcentagem de células T47D presentes em cada fase do ciclo celular	65
FIGURA 22 - Histograma representativo da porcentagem de células T47D presentes em cada fase do ciclo celular	66
FIGURA 23 - Razão entre células da linhagem T47D tratadas com radiação gama e expostas ao campo elétrico estático (γ + CEE) e células apenas irradiadas com radiação gama (γ) presentes nas diferentes fases do ciclo celular.....	67
FIGURA B-1 – Valores de D_0 (Gy) para diferentes doses de partida (D_1) em Gy.	69
FIGURA 24 – Razão entre a fração de sobrevivência.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados obtidos a partir da curva de sobrevivência em células T47D.....	46
Tabela 2 – Porcentagem de células T47D viáveis após tratamentos	49
Tabela 3 – Quantidade de histona H2AX fosforilada na linhagem celular MRC5.	51
Tabela 4 – Proporção média de células T47D presentes em cada fase do ciclo celular.....	54
Tabela 5 – Resultados de maior significância estatística, obtidos a partir da análise de citometria de fluxo.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC – “American Type Culture Collection”

AT – Telangiectasia atáxica

ATM – gene “mutated Ataxia Telangiectasia”

Cdk – quinase dependente de ciclina

CEE - campo elétrico estático

cm - centímetro

DNA – ácido desoxirribonucléico

DSB – “double-strand breaks” – quebra dupla de DNA

FACS – “Fluorescence activated cell sorting”

FEB – frequência extremamente baixa

Gy – unidade de dose de radiação - Gray

LET – transferência linear de energia

MPF – fator promotor de maturação

OER – efeito do oxigênio

ORC-ORI – complexo de reconhecimento de origem

PI – iodeto de propídio

RBE – eficácia biológica relativa

RI – radiação ionizante

RT – radioterapia

SFB – soro fetal bovino

SSB – “single-strand breaks” – quebra simples do DNA

U.A.F. – unidade arbitrária de fluorescência

UV – ultravioleta

V - volts

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Bases da Radioterapia	18
1.2	Agentes Físicos Exógenos.....	20
1.3	Efeito combinado de radiação gama e campo elétrico estático: estudos realizados com um procarioto e um eucarioto inferior	23
1.4	Os eucariotos superiores: aspectos gerais	24
1.5	Histona H2AX.....	31
1.6	Radiobiologia de eucariotos.....	31
1.7	Respostas celulares de PROCARIOTO versus EUCARIOTO após irradiação ..	34
2	OBJETIVOS	36
2.1	Objetivo Geral	37
2.2	Objetivos Específicos.....	37
3	MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1	Linhagens Celulares e Condições de Cultivo	39
3.2	Controle das células pelo Método de Exclusão pelo Azul Tripán	39
3.3	Radiação Ionizante	40
3.4	Exposições ao Campo Elétrico Estático.....	40
3.5	Curva de sobrevivência	40
3.6	Teste de Viabilidade Celular	41
3.7	Imunofluorescência	41
3.8	Análise da Distribuição do Ciclo Celular	42
4	RESULTADOS	44
4.1	Curva de Sobrevivência	45
4.2	Efeito do campo elétrico nas células em cultura.....	48
4.3	Efeito combinado de radiação gama e campo elétrico estático	49
4.4	Formação de foci nuclear de histona γ -H2AX	50
4.5	Análise do Ciclo Celular.....	53
5	DISCUSSÃO	68
5.1	Curva de Sobrevivência e a Estatística de Boltzmann	69
5.2	Efeito isolado do campo elétrico.....	71
5.3	Irradiação associada ao campo elétrico.....	71

5.4	Avaliação de irradiação e campo elétrico em uma linhagem normal de células humanas.....	72
5.5	Efeito da associação de radiação com campo elétrico nas fases do ciclo celular ..	73
5.6	Procarioto versus Eucarioto-inferior versus Eucarioto-superior: viabilidade.....	75
6	CONCLUSÕES.....	77
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
	APÊNDICES	89

1 INTRODUÇÃO

1.1 Bases da Radioterapia

O número de pacientes com câncer tem aumentado em todo o mundo. No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer estima que para o ano de 2008, estimativa válida também para o ano de 2009, ocorrerão 466.730 casos novos de câncer (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Entre as diversas modalidades terapêuticas possíveis, a Radioterapia (RT) é utilizada para uma variedade de tumores locais e/ou metastáticos com finalidade curativa ou paliativa. Aproximadamente 50-70% de todos os pacientes com câncer recebem RT durante o tratamento (MAHRHOFER et al., 2006). Comumente, a RT é prescrita em combinação com cirurgia e/ou quimioterapia, pois estudos demonstraram que estas associações melhoram o controle local do tumor e erradicam micrometástases (KUFE et al., 2003).

Para a realização da radioterapia, os pacientes são submetidos previamente ao planejamento atualmente computadorizado e em três dimensões (3D). A radiação é administrada com o feixe de fótons colimado, isto é, dirigido diretamente para o tumor a ser irradiado, enquanto que o tecido normal recebe a menor dose possível além de proteção de chumbo (NAIR et al., 2001).

As bases da radioterapia moderna se fundamentam no fracionamento e protração da dose, ou seja, são administradas frações de doses diárias ao longo de um tempo. O fracionamento permite que as células nas fases mais sensíveis do ciclo celular (G_2/M) sejam destruídas. Posteriormente as células se redistribuem pelo ciclo celular, na fração seguinte outra quantidade de células que se encontra nas fases mais sensíveis do ciclo morrem e assim sucessivamente ao longo do tratamento (GELDOF et al., 2003). Entre as frações ocorre o reparo da lesão sub-letal. Neste caso, as células do tecido normal apresentam vantagem quanto ao reparo em comparação às tumorais, pois são melhor organizadas, quanto ao controle do ciclo celular e contêm maior quantidade de enzimas anti-oxidantes como peroxidases e catalases. O reparo geralmente ocorre entre 15 minutos a 4 horas após a irradiação.

Outro fator importante é a reoxigenação entre as frações. Estima-se que os tumores humanos têm cerca de 30% de células hipóxicas e a reoxigenação ocorre em 24 horas. O tempo total do tratamento também é importante, pois as células tumorais podem se dividir e repopular o tumor (FARIA et al., 1994; WITHERS e McBRIDE, 1997).

Considerando-se os aspectos físicos, as radiações ionizantes podem ser classificadas como diretamente ou indiretamente ionizantes. As radiações diretamente ionizantes são as que possuem carga como os prótons, e as indiretamente ionizantes aquelas que não possuem carga, como raios-X e raios- γ (radiações eletromagnéticas) e nêutrons. As radiações mais utilizadas na radioterapia são as eletromagnéticas, que produzem efeito biológico ejetando elétrons do meio com o qual interagem. Quando o elétron ejetado promove a lesão celular, é o chamado efeito direto, que corresponde a 30% do efeito biológico das radiações. O elétron ejetado presente no meio também pode interagir com a água (radiólise da água) produzindo radicais livres e estes promovem a lesão celular. É o efeito indireto e corresponde a 70% do efeito biológico das radiações (NIKJOO et al., 1994). Como consequência da interação com as radiações, as células podem apresentar uma variedade de lesões no DNA (ácido desoxirribonucléico), como bases e açúcares danificados, quebras simples (*single-strand breaks* - SSB), quebras duplas (*double-strand breaks* - DSB) e translocações (BELLI et al., 2002; HILL et al., 2004). Biologicamente, entre as alterações radioinduzidas, as quebras duplas do DNA são as mais prejudiciais, podendo promover quebras e rearranjos cromossômicos, deleções, translocações, inversões (mutações estáveis) entre outras lesões que afetam a integridade genômica da célula (MAHRHOFER et al., 2006). A radiação também interage com os lipídios e as proteínas das vias sinalizadoras, além de modular a expressão de genes através de uma variedade de mecanismos incluindo a ativação de fatores de transcrição (McBRIDE e WITHERS, 2004). A ativação radioinduzida destas vias sinalizadoras pode afetar processos como regulação do ciclo celular, reparo do DNA, indução da proliferação e repopulação tecidual, diferenciação ou apoptose.

Atualmente há um considerável interesse em desenvolver estratégias que otimizem a radioterapia de forma a aumentar a morte células tumorais e preservar ao máximo o tecido normal adjacente (LI et al., 2005; NAIR et al., 2001; RAMSAY e BIRRELL, 1995). Entre as novas possibilidades de adjuvância terapêutica estudadas, encontra-se a utilização de agentes físicos exógenos como os campos elétricos e magnéticos (AHBOM et al., 2000; GREENLAND et al., 2000; KOYAMA et al., 2005; WERTHEIMER e LEEPER, 1979). Estes constantes estudos também permitem aprimorar técnicas amplamente utilizadas em diversas áreas médicas.

1.2 Agentes Físicos Exógenos

1.2.1 Forças produzidas pelos campos elétricos e magnéticos

Na presença de um campo elétrico externo, o centro de carga positiva não coincide com o de carga negativa, exercendo assim uma força sob ambas as cargas. Essas cargas se distribuem formando um dipolo elétrico. Muitas moléculas, como as de água e de proteínas formam dipolos elétricos em seus estados naturais (sem campo). Dessa forma, ao colocar-se uma proteína de reparo sob ação desse campo externo não há força resultante, mas aparece um torque que tende a girar a proteína de modo que dipolo se alinhe com o campo (Fig.1).

Campos elétricos intensos podem causar trocas nos canais da membrana, conformação de enzimas ou membranas, alterações na forma das proteínas receptoras e de células, ou a neutralização ao redor de células individuais. A intensidade da força produzida pelo campo elétrico é essencial para determinar se a configuração das proteínas ou estruturas celulares será alterada (REPACHOLI e GREENEBAUM, 1999).

FIGURA 1 – Esquema de ação do campo elétrico em cargas em movimento: Representação pictórica do reconhecimento da dupla quebra (DNA) pelas proteínas de reparo. **A** – Proteínas que apresentam seus momentos de dipolo $\vec{p}$ (representado em **B** com mais detalhes) orientados na direção do sítio danificado (dupla-quebra) pelo campo elétrico estático $\vec{E}_{ds}$. **C** – Um campo elétrico externo E_{ext} , com maior intensidade que E_{ds} , pode reorientar o deslocamento das proteínas de reparo ao longo de sua direção, impedindo que estas alcancem o sítio danificado.

Fonte: ARRUDA-NETO et al. In press.

Em relação ao campo magnético, este é produzido por um ímã ou por cargas elétricas em movimento. Quando uma carga elétrica em movimento está sob ação exclusiva de um campo magnético ela descreve um movimento circular uniforme.

Segundo Repacholi e Greenebaum (1999) os campos magnéticos estáticos exercem forças sobre íons em movimento em soluções, originando a indução de campos elétricos e correntes (indução magnética). Os campos magnéticos uniformes produzem torques sob certas moléculas e em alguns materiais ferromagnéticos (efeito magneto-mecânico). Ou mesmo, os campos magnéticos elétricos podem alterar os níveis energéticos e a orientação da rotação dos elétrons (interações eletrônicas). A figura 2 ilustra a ação de um campo magnético agindo sob as proteínas de reparo.

FIGURA 2 – Esquema de ação do campo magnético em cargas em movimento: Efeito inibidor do deslocamento de moléculas dipolares provocado pela ação de um campo magnético. A – Proteínas que apresentam seus momentos de dipolo $\vec{p}$ (representado em B com mais detalhes) orientados na direção do sítio danificado (dupla-quebra) pelo campo elétrico $\vec{E}_{ds}$. C – Um campo magnético externo (B_{ext}) induz um binário de forças nas proteínas que se deslocam em direção ao sítio danificado, fazendo-as girar em uma mesma posição.

Fonte: ARRUDA-NETO et al. In press.

1.2.2 Campo Magnético

Koyama et al. (2005) demonstraram que a exposição a 5 mT de campo magnético de frequência extremamente baixa (FEB) imediatamente após irradiação com raio-X ocorreu aumento do número de mutações em plasmídeos de *Escherichia coli*. Takashima et al. (2003) sugerem que o bloqueio em G₁ induzido por doses de radiação ultravioleta (UV) seja inibido pela exposição de *Sccharomyces cerevisiae* a um campo magnético FEB de 30 mT, em células proficientes e deficientes de reparo. Outros trabalhos investigaram os efeitos de um campo eletromagnético terapêutico (15 mT de amplitude, 120 pulsos/seg), sozinho e em combinação com outros tipos de radiação, como por exemplo a radiação gama utilizada em RT. Os experimentos foram realizados *in vivo* em camundongos nude xenoimplantados com células MDA-MB231-linhagem celular humana de câncer de mama (Cameron et al., 2005). A terapia com radiação associada à exposição ao campo eletromagnético suprimiu o crescimento dos vasos sangüíneos e a repopulação do tumor após a radiação, resultando em uma menor incidência de metástase tumoral. Diversos outros estudos apontam que vários agentes genotóxicos, como raios gama (WALLECZEK et al., 1999), raios-X (MIYAKOSHI et al., 2000) entre outros, tiveram seu efeito melhorado pela exposição a campos magnéticos de FEB. Estes resultados mostram que há chances do campo magnético FEB afetar o processo de reparo do DNA (TAKASHIMA et al., 2003).

1.2.3 Campo Elétrico Pulsado

Alguns outros estudos (WOUTERS e SMELT, 1997, WOUTERS et al., 1999) sugerem a aplicação de um campo elétrico pulsado como método de descontaminação não-térmica para inativar diversos microrganismos presentes em alimentos e outros produtos. O efeito deste agente exógeno em baixa frequência (50 Hz) também foi investigado no DNA de linfócitos humanos (DELIMARIS et al., 2006). Os resultados indicaram que uma quantidade significativa de danos foi observada após exposição ao campo elétrico pulsado quando comparados com o controle. Após 2 h a 37 °C, uma proporção de células danificadas foi reparada, indicando que o sistema de reparo do DNA parece operar sem maiores complicações.

Estudos realizados com 15 Hz e 7 mT em osteoblastos MC3T3-E1, revelaram que o campo elétrico pulsado tem um efeito estimulatório em estágios precoces da cultura. Os

autores sugerem que este efeito provavelmente está associado ao aumento da diferenciação celular, mas não ao aumento do número de células (DINIZ et al., 2002).

Pesquisadores ainda investigam os efeitos de outros agentes físicos como o campo elétrico alternado. Kirson et al. (2004) estudaram a aplicação deste agente em baixa intensidade (1,0-1,4 V/cm) e frequência intermediária (100–300 kHz). Observou-se a inibição tanto da proliferação de células malignas em cultura (linhagens tumorais humanas e de roedores) quanto do crescimento de tumores em camundongos, sem causar efeito colateral ou dano histopatológico local.

1.2.4 Campo elétrico estático

Atualmente há somente alguns trabalhos sobre os efeitos biológicos do campo elétrico estático (CEE) em sistemas vivos. Mesmo assim são controversos e não demonstram sua ação combinada com agentes danificadores de DNA. Kermanshahi e Sailani (2005) demonstraram o efeito do tratamento com campo elétrico estático em dois importantes patógenos, sugerindo que o CEE sozinho é capaz de inibir o crescimento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Entretanto, este estudo não relata quais os mecanismos de ação deste campo exógeno.

1.3 Efeito combinado de radiação gama e campo elétrico estático: estudos realizados com um procarioto e um eucarioto inferior

Segundo um modelo biofísico proposto por nosso grupo de pesquisa (ARRUDA et al., 2007), a aplicação de um campo elétrico estático à cultura de células irradiadas deveria interferir negativamente no mecanismo de reparo. Neste caso, um campo externo tenderia a alinhar as proteínas ao longo de sua direção impedindo-as de alcançar o sítio danificado (Fig.1). Essas enzimas de reparo localizam pares de base danificados, num universo de 2 a 3 bilhões de pares de base, por orientação elétrica. Com o objetivo de demonstrar o efeito da exposição de células conjuntamente à radiação ionizante e a campos elétricos exógenos (campo elétrico estático), foram realizados estudos com o procarioto *Microcystis panniformis*, uma cianobactéria resistente à radiação e ao calor (9), bem como com o eucarioto *Candida albicans* (levedura).

No estudo com o procarioto, Silva (2006) associou a radiação gama (3 kGy) com um campo elétrico estático de baixa intensidade (20 V/cm) por 2 h. Os dados evidenciaram que o efeito combinado da radiação com o agente físico utilizado aumentou 12 vezes a taxa de morte celular em relação às amostras que foram apenas irradiadas. No caso da levedura, Louvison (2007) irradiou as células com raios gama em doses de 1-4 kGy e submeteu-as a um campo elétrico estático de 180 V/cm por 1h e 30 min. Os resultados revelaram eliminação do ombro de reparo na curva de sobrevivência das células de *C. albicans* expostas à radiação e campo elétrico.

Estes dois conjuntos de dados puderam evidenciar que o campo elétrico estático aumentou a radiosensibilidade destes dois microrganismos.

A próxima etapa destes estudos seria verificar esta interferência do campo elétrico estático associado à radiação nos processos de reparação de células tumorais de mamíferos, conforme proposto neste trabalho.

1.4 Os eucariotos superiores: aspectos gerais

1.4.1 Ciclo celular

O ciclo celular se divide em quatro fases principais: fase M – mitose, o processo de multiplicação celular e três estágios que são componentes da interfase – G₁, o período entre o final da mitose e o início da replicação do DNA; S, o período durante o qual ocorre a síntese de DNA; e G₂, o espaço após a replicação do DNA que antecede o início da prófase mitótica (GRIFFITHS et al., 2001). Em mamíferos, as diferenças na taxa de multiplicação celular são em grande parte decorrentes de diferenças no tempo entre a entrada e saída de G₁. Esta variação é devida a uma fase opcional de repouso G₀ para a qual as células em G₁ podem passar e permanecer por um intervalo variável de tempo, dependendo do tipo de célula e condições ambientais. Contrariamente, as fases S, G₂ e M têm uma duração fixa (SANCAR et al., 2004).

Os eventos macromoleculares complexos do ciclo celular de células eucarióticas são regulados por um pequeno número de quinases de proteínas heterodiméricas, ou seja, as engrenagens que acionam a progressão de uma etapa do ciclo celular para o seguinte são uma série de complexos protéicos compostos de duas subunidades: uma ciclina e uma quinase

dependente de ciclina (Cdk) (NIGG, 1995). Trocas cíclicas nos níveis de ciclina resultam na união das ciclinas e na ativação dos complexos Cdk. Existem quatro classes de ciclinas, sendo que três são requeridas em todas as células eucarióticas: o complexo **ciclina- G₁/S** – que se liga as Cdk no fim de G₁ e prepara a célula para a replicação do DNA, o complexo **ciclina-S** - que se liga as Cdk durante a fase S e são requeridos para a iniciação da replicação do DNA e o complexo **ciclina-M** - que promove os eventos da mitose (LODISH et al., 1999). Em muitas células, a quarta classe de ciclinas, a ciclina-G₁, ajuda a promover a passagem através do *Start* ou do ponto de restrição na fase G₁.

1.4.2 Controle do ciclo celular em células de mamíferos

Durante a fase G₁/S, a célula acumula o complexo Cdk2-ciclina E, enquanto que na fase S o complexo Cdk2-ciclina A apresenta seu pico. Estes complexos Cdk2-ciclina A são os responsáveis pela regulação da entrada na fase S, pela progressão da replicação e a replicação limitante para somente uma vez por ciclo celular (WOO e POON, 2003). A Cdk2-ciclina E é essencial na escolha do momento da iniciação da replicação do DNA em uma variedade de organismos (JACKSON, 1995). Ela tem duas funções na promoção da fase S. Primeiro, a Cdk2-ciclina E participa na liberação do fator de transcrição E2F da proteína Rb. No final de G₁ o complexo Cdk2-ciclina E fosforila Rb, permitindo que E2F controle a expressão do número de genes requeridos para a entrada na fase S. Segundo, a Cdk2-ciclina E fosforila componentes do complexo de pré-replicação para regular a iniciação da replicação do DNA. A Cdk2-ciclina A pode desencadear o início da síntese de DNA pelos complexos de pré-replicação formados na etapa inicial de G₁ e inibir a formação de novos complexos de pré-replicação (YAM et al., 2002).

O término da replicação do DNA permite que células em G₂ tenham duas cópias exatas do genoma inteiro, na qual cada cromossomo replicado consiste de duas cromátides-irmãs que permanecem juntas. Inicia-se então a fase M, na qual os cromossomos duplicados e outras estruturas celulares são distribuídos igualmente para as duas células-filhas. Os eventos da mitose são desencadeados pelos complexos Cdc2-ciclina B, que é ativado durante a fase S. Cdc2 torna-se um substrato para duas proteinoquinases (ALBERTS et al., 2002). A primeira quinase é a proteína Wee1, a qual fosforila um resíduo de tirosina próximo ao sítio catalítico de Cdc2 e bloqueia sua atividade quinásica, prevenindo-a de agir prematuramente como fator promotor de maturação (MPF). A segunda quinase fosforila um resíduo de treonina em outra

região da molécula de Cdc2. Esta fosforilação levará, à ativação do MPF, mas como o resíduo de tirosina é também fosforilado, o complexo ciclina-Cdc2 permanece inativo. É a remoção do fosfato da tirosina inibitório que finalmente ativa o MPF. Esta remoção é catalisada pela proteína Cdc25, a qual é uma fosfatase.

O balanço da atividade de Wee1 e Cdc25 é tal que no início somente uma pequena quantidade de MPF ativo é gerado. Este, por sua vez, parece estimular posteriormente a ativação de MPF provavelmente através do acúmulo da fosfatase Cdc25, inibição da atividade quinásica de Wee1, ou ambos, criando um efeito de retroalimentação positiva. Assim, durante a fase G₂, há um acúmulo gradual de ciclina causando um leve aumento de MPF ativo, que eventualmente sofre uma explosão autocatalítica e, quando ultrapassa um ponto crítico, leva irreversivelmente a célula a entrar em mitose (ALBERTS et al., 2002).

Após os cromossomos terem sido segregados para os pólos do fuso, o fuso deve estar separado, os cromossomos descondensados e o envelope nuclear regenerado. Devido a fosforilação de várias proteínas serem responsáveis pela entrada da célula na mitose, não é esperado que a desfosforilação destas mesmas proteínas seja requerida para retirá-las da mitose. Estas desfosforilações e a saída da mitose podem ser desencadeadas pela inativação do Cdc2-ciclina B, pela ativação das fosfatases ou ambas. Evidências sugerem que a inativação do Cdc2-ciclina B é primeiramente o responsável. A inativação do Cdc2-ciclina B ocorre principalmente pela proteólise dependente de ubiquitina (ALBERTS et al., 2002). A ubiquitilação da ciclina é usualmente desencadeada pelo mesmo complexo Cdc20-APC que promove a destruição da securina na transição metáfase → anáfase. Então a ativação do complexo Cdc20-APC leva não somente para anáfase, mas também para inativação do Cdc2-ciclina B.

1.4.3 Pontos de verificação (checkpoints)

Para minimizar a ocorrência de erros nos eventos do ciclo celular, a passagem de uma célula pelo ciclo é monitorada por pontos de verificação (*checkpoints*). Os mecanismos de controle que operam nesses pontos garantem que os cromossomos fiquem intactos e que cada estágio do ciclo celular se complete antes que se inicie o estágio seguinte (HARTWELL e WEINERT, 1989). Quando cromossomos são danificados, como pode ocorrer após exposição à radiação ou certos agentes químicos, é essencial que eles sejam reparados antes que as

células tentem se duplicar ou segregar (HARTWELL e KASTAN, 1994). O sistema de controle do ciclo celular pode detectar danos e bloquear o ciclo no ponto de verificação (*checkpoints*) do dano no DNA. Especificamente a radiação ionizante induz o bloqueio nas fases G₁, S e G₂ do ciclo celular. A permanência em G₁ impede a cópia de bases danificadas, que fixariam mutações no genoma, antes das células entrarem na fase S (KAUFFMAN e PAULES, 1996). Enquanto que a permanência em G₂ permite que as quebras na dupla fita de DNA sejam reparadas antes da mitose.

Sabe-se que o principal responsável pela iniciação das vias sinalizadoras em células de mamíferos após exposição à radiação ionizante (RI) e outros agentes que induzem quebras duplas no DNA encontram-se no gene ATM (mutated ataxia-telangiectasia), que está mutado em humanos com a doença telangiectasia atáxica – AT (KASTAN e LIM, 2000; SHILOH e KASTAN, 2001). A AT é uma doença recessiva autossômica rara caracterizada pela neurodegeneração progressiva, deficiência imunológica, atrofia gonadal, sensibilidade à radiação, aumento de riscos de câncer entre outros (SHILOH, 1997).

O gene ATM está localizado no locus 11q22-23, corresponde a 150 kb do DNA genômico, tem 66 éxons e produz uma proteína com 350 kDa (ATM quinase) pertencente a família fosfatidilinositol 3'-quinase (SAVITSKY et al., 1995; KHANNA, 2000). A exposição de células a RI desencadeia a atividade da ATM quinase, que em presença de quebra dupla no DNA, ativa os *checkpoints* do ciclo celular que o interrompe em G₁/S, S e G₂/M (GOORDARZI et al., 2003). Após ativação, a ATM se dissocia e torna-se capaz de fosforilar numerosos alvos como p53, MDM2, CHK2, NBS1, RAD9 e BRCA1 (PAWLIK et al., 2004).

Bakkenist e Kastan (2003) mostraram que na ausência do dano, a ATM quinase forma um dímero inativo, distribuído através do núcleo. O domínio FAT de uma das unidades da ATM interage com o domínio da enzima quinase da outra unidade de forma que a ATM não pode interagir nem fosforilar suas proteínas alvo. Após a formação da quebra dupla do DNA pela exposição das células a RI ocorrem modificações intracelulares que levam a dissociação do dímero da ATM com sua conseqüente monomerização. Cada monômero livre pode fosforilar diversas proteínas nucleares, dentre as quais muitas estão acumuladas no local do dano do DNA.

A ATM exerce diversas funções nos *checkpoints* G₁/S, S e G₂/M referidas nas seções seguintes.

PONTO DE VERIFICAÇÃO G_1

O controle no ponto de verificação G_1 / S previne a entrada das células na fase S na presença do dano ao DNA por inibir a iniciação da replicação. Na fase G_1 do ciclo celular, células de mamíferos tornam-se aptas a entrar na fase S num estágio conhecido como ponto de restrição, que precede o verdadeiro início da síntese de DNA por cerca de 2 horas (PARDEE, 2002). Se houver um dano ao DNA, a entrada na fase S é impedida mesmo que as células tenham passado pelo ponto de restrição. Quando o dano é uma quebra da dupla fita causada pela radiação ionizante, a ATM é ativada e fosforila muitas moléculas alvo, como p53 e CHK2. Estas fosforilações resultam na ativação de duas vias de transdução de sinais, uma inicia e outra mantém o bloqueio em G_1 / S (BARTEK e LUKAS, 2001). A reação que inicia o bloqueio em G_1 / S é a fosforilação da CHK2, que por sua vez fosforila a Cdc25A fosfatase, causando sua inativação por exclusão nuclear e degradação proteolítica mediada pela ubiquitina. A perda da Cdc25A ativa resulta na acumulação da forma fosforilada (inativa) da Cdk2, que é incapaz de fosforilar a Cdc45 para iniciar a replicação no local dos complexos ORC-ORI (*complexo de reconhecimento de origem*) pré-formados (FALCK et al., 2001).

Na segunda via, que mantém o bloqueio em G_1 / S , a ATM age fosforilando diretamente a serina 15 da p53 e a serina 20 através da ativação da Chk2 ou Chk1, respectivamente. A fosforilação da p53 inibe sua exportação e degradação nuclear, resultando no aumento dos níveis de p53 (ZHANG e XIONG, 2001). A p53 ativa seus genes alvos, incluindo a proteína p21 (também conhecido como WAF1 ou CIP1), que por sua vez resulta na inibição do complexo Cdk2-ciclina E, necessário para a entrada na fase S. A p21 também se liga ao complexo Cdk4-ciclina D e previne que ela fosforile a proteína Rb (HARPER et al., 1993). A fosforilação da Rb resulta na liberação do fator de transcrição E2F, necessário para a transcrição dos genes da fase S, que permite a progressão do ciclo celular (BARTEK e LUKAS, 2001).

PONTO DE VERIFICAÇÃO FASE S

O *checkpoint* na fase S é ativado pelo dano encontrado durante a fase S ou pelo dano não reparado que escapa do controle de verificação do G_1 / S e isto leva ao bloqueio na replicação

(PAULOVICH e HARTWELL, 1995). Em resposta a quebra dupla do DNA induzido pela radiação ionizante, a ATM desencadeia duas cascatas paralelas que cooperam para inibir a síntese replicativa do DNA. A fosforilação ATM-dependente da CHK2 é a chave para induzir a destruição da fosfatase Cdc25A, a qual deixa a Cdk2-ciclina E promotor da fase S em estado inativo e fosforilado, prevenindo o acúmulo de Cdc45, um fator de replicação essencial na origem de replicação (FALCK et al., 2002). Ao mesmo tempo, a ATM inicia a segunda via pela fosforilação do Nbs1, um evento requerido para ativar o complexo Nbs1-Mre11-Rad50.

A maior característica do *checkpoint* na fase S radioinduzida é um fenômeno chamado de síntese de DNA radioresistente, que ilustra a íntima relação entre seu *checkpoint* e o reparo da quebra dupla. Em células selvagens para o gene ATM a radiação ionizante causa o que parece ser uma suspensão imediata da contínua síntese do DNA (ABRAHAM, 2001). Em contraste, nas células de pacientes com AT, uma doença caracterizada pela extrema sensibilidade a radiação ionizante, a síntese de DNA não é inibida pela radiação e as células parecem ir para a fase S sem nenhum atraso (PAINTER e YOUNG, 1980).

PONTO DE VERIFICAÇÃO G₂

O controle no ponto de verificação G₂ representa a última chance para que as células com danos no DNA bloqueiem sua entrada na mitose para assegurar que as lesões sejam reparadas e que cada célula filha receba uma cópia intacta do genoma (WILSON, 2004). A via de transdução de sinal ATM-CHK2-Cdc25 é ativada para bloquear o ciclo celular em G₂ após o DNA sofrer o dano (XU et al., 2002). CHK1, CHK2 e p53 são fosforilados. Em adição a fosforilação da p53, CHK1 e CHK2 também fosforilam diretamente Cdc25C na serina 216, levando a sua inativação (SAMUEL et al., 2002). A Cdc25 liga-se as proteínas 14-3-3 σ , ficando sequestrada no citoplasma, portanto é incapaz de ativar CHK1. Esta inativação promove um bloqueio em G₂, prevenindo a mitose após o dano ao DNA.

GENE SUPRESSOR TUMORAL – p53

A proteína p53 é essencial para o controle do ponto de checagem, pois ela media os dois principais *checkpoints* em um DNA danificado, ou seja, a p53 atua na transição G₁-S e na transição G₂-M. O gene codificador da p53, conhecido como gene supressor tumoral-TAp53

coordena o reparo do DNA através da progressão do ciclo celular e da apoptose (PAWLIK e KEYOMARSI, 2004). Sendo assim, células com p53 funcional bloqueiam o ciclo celular em determinada fase quando expostas, por exemplo, pela radiação gama, enquanto células com p53 não-funcional não o fazem. Estas mutações no gene TAp53 ocorrem em pelo menos metade de todos os cânceres humanos (LEVINE et al., 1991).

Praticamente todas as mutações da p53 suprimem sua habilidade de ligar-se a seqüências específicas de DNA e de ativar a expressão genética. A mais importante proteína relacionada ao controle do ciclo celular cuja transcrição é induzida pela p53 é a inibidora da cicloquinase, p21, que se liga e inibe os complexos G₁-Cdk-ciclinas. Como resultado, células que apresentam DNA danificado sofrem retardo em G₁ até que o dano seja reparado e que os níveis de p53 e de p21 caiam, e então, as células progridem até a fase S. Na maioria das células, o acúmulo de p53 leva à indução de proteínas que promovem a apoptose. Embora possa ser tomado como uma resposta drástica ao dano do DNA, isso evita a proliferação de células que têm a possibilidade de acumular múltiplas mutações. Quando o controle da p53, no ponto de verificação, não opera apropriadamente, o dano do DNA pode replicar e produzir mutações e nova disposição do DNA, o que contribui para o desenvolvimento de uma célula altamente transformada.

Proteínas que interagem e regulam p53 são também alteradas em muitos tumores humanos. O gene que codifica uma dessas proteínas é o Mdm2. Sob condições normais, a proteína Mdm2 liga-se a um sítio N-terminal de p53, ambos reprimindo a capacidade de p53 em reativar a transcrição do p21 e de outros genes, mediando a degradação da p53. Assim, Mdm2 normalmente inibe a habilidade de p53 reter o ciclo celular ou entrar em apoptose. A fosforilação da p53 por ATM, como acontece depois da radiação gama, conduz ao deslocamento de Mdm2 ligado e, portanto, à estabilidade da p53. Como o gene Mdm2 é ativado transcricionalmente pela p53, a proteína Mdm2 funciona numa alça de retroalimentação auto-reguladora com a p53, evitando o excesso funcional da p53. Os níveis de Mdm2 ativados nas células tumorais causariam um decréscimo na concentração da p53 funcional e aboliriam a capacidade da p53 de deter uma célula em resposta à radiação.

1.5 Histona H2AX

Uma das primeiras respostas celulares às quebras duplas no DNA (DSBs) causadas pela radiação ionizante é a fosforilação da histona H2AX, uma proteína histona pertencente à família H2A (ROGAKOU et al., 1998). A histona H2AX é fosforilada na serina 139 e é recrutada após irradiação, formando *foci* de H2AX nos sítios de lesão. Quando fosforilada passa a ser chamada de γ -H2AX (ROGAKOU et al., 1998). A indução da γ -H2AX após exposição à radiação é mediada por ATM e aparece como *foci* individuais no núcleo das células, na região do DNA que contém DSBs (STIFF et al., 2004). Esta fosforilação é rápida e ampla, sendo que metade da quantidade máxima de γ -H2AX é atingida 1 min após exposição a radiação e a quantidade máxima é atingida após 10 min. Aproximadamente 1% da H2AX torna-se γ -fosforilada por cada gray de radiação ionizante (ROGAKOU et al., 1998), e os *foci* produzidos podem ser visualizados microscopicamente após marcação com anticorpo específico. Embora as quebras duplas produzidas pela radiação ionizante sejam mais eficientes em induzir fosforilações nas histonas, enzimas intermediárias no reparo do dano e quebras duplas produzidas durante a replicação podem também causar a fosforilação da H2AX (BANÁTH et al., 2004). Essa rápida fosforilação da H2AX nos locais danificados precede o aparecimento das enzimas de reparo do DNA envolvidas nas vias de recombinação homóloga-HR (*homologous recombination*) e junção de pontas não homólogas-NHEJ (*non-homologous end-joining*) (KATAOKA et al., 2007).

Portanto, a análise dos *foci* de γ -H2AX constitui um importante marcador para avaliação rápida da frequência de danos e a possibilidade de reparo no DNA induzido por radiação ionizante. No presente estudo, esta circunstância poderia ser utilizada para avaliar possível interferência dos agentes físicos exógenos no mecanismo de reparo de quebras duplas.

1.6 Radiobiologia de eucariotos

A curva de crescimento descreve a relação entre a dose de radiação absorvida e a proporção de células que sobreviveram (HALL, 1994). Para células diferenciadas não-proliferantes, como nervo, músculo ou células de secreção, a morte pode ser definida como a perda de uma função específica. Para células proliferantes, como células-tronco hematopoiéticas ou células em cultura, a morte celular é definida como a perda da integridade

reprodutiva. Uma célula pode estar fisicamente presente e aparentemente intacta, pode ser capaz de produzir proteínas ou sintetizar DNA, passar por uma ou duas mitoses, mas se ela perder a capacidade de se dividir indefinidamente e de produzir um grande número de progênie, ela está por definição em morte clonogênica (STEEL, 2002). Um sobrevivente mantém sua integridade reprodutiva e é capaz de proliferar indefinidamente para produzir uma grande colônia ou clone, ou seja, são definidos como células clonogênicas (STEEL, 2001). Esta definição é geralmente relevante para radiobiologia de animais, plantas e seus tecidos, sendo de grande importância para radioterapia de tumores.

1.6.1 Curva de sobrevivência

As curvas de sobrevivência para células de mamíferos expostas a radiação são usualmente representadas com a dose colocada em escala linear e a fração sobrevivente em escala logarítmica. Para radiações densamente ionizantes, como partículas α ou nêutrons de baixa energia, a dose-resposta é uma linha reta e pode ser caracterizada por um parâmetro, a inclinação da linha. Esta inclinação é expressa em termos da dose requerida para reduzir o número de células clonogênicas a uma fração de $1/e$ ou 0,37, a chamada D_0 (dose-zero). No caso das radiações esparsamente ionizantes como raios X ou γ , a curva de dose-resposta para doses baixas tem um ombro inicial, antes de se tornar exponencial (reta), na escala semilogarítmica. A curva é caracterizada por dois parâmetros: a inclinação D_0 da região exponencial e o número n de extrapolações, o qual é obtido extrapolando o início da porção exponencial da curva de sobrevivência até que ela interceda o eixo y ou “fração sobrevivente”. O número de extrapolação mede a extensão do ombro inicial e esta largura pode ser especificada, alternativamente, como dose D_q , que é a porção da reta extrapolada da curva dose-resposta que intercepta o eixo y onde a fração de sobrevivência é 1. O n varia entre 1 a 20 e a D_q é calculada pela fórmula:

$$Dq = \ln n \times D_0.$$

O ombro encontrado na curva de sobrevivência representa o reparo das lesões subletais. Considera-se que nesta região, a morte ocorra por impacto único num alvo importante, por exemplo, o DNA. As demais lesões seriam reparadas. Portanto, um impacto num alvo vital levaria a célula à morte. Caso contrário, a célula sobrevive, pois os impactos em alvos menos

importantes são reparados completamente. Na região exponencial da curva, considera-se que a morte é devida, principalmente, a múltiplos impactos que interagem (HALL, 1994).

1.6.2 Deposição da energia radiante

Quando as radiações ionizantes depositam energia em materiais biológicos ocorrem ionizações e excitações. Estes eventos tendem a se localizar ao longo da trajetória de partículas ionizantes individuais, em um padrão dependente do tipo de radiação envolvida. Fótons de raios X originam elétrons rápidos, partículas que carregam uma unidade de carga elétrica e têm pequena massa. Nêutrons, por outro lado, originam prótons, partículas que também carregam uma unidade de carga elétrica, mas a partícula tem uma massa aproximadamente 200 vezes maior que a do elétron.

Estas diversas partículas carregadas possuem diferenças em relação à proporção carga/massa, nas velocidades e no resultado da distribuição espacial dos eventos ionizantes que elas irão produzir. A média de separação de eventos primários ao longo da trajetória de uma partícula ionizante diminui com o aumento da carga e da massa. A trajetória de elétrons produzidos pela absorção de fótons de raios-X é bem separada no espaço, descrita como esparsamente ionizante. Por outro lado, partículas α originadas de eventos de ionização individual ocorrem tão perto uma das outras que elas tendem a se sobrepor, originando trajetórias com colunas de ionização bem delineadas, são as densamente ionizantes. Os nêutrons ficam entres estes dois extremos, conseqüentemente são referidos como partículas de densidade de ionização intermediária.

Essa transferência linear de energia (LET) é definida como a taxa de energia liberada por unidade de trajeto percorrido pela radiação. Valores típicos do LET para radiações comumente utilizadas são: 0,3 keV/ μ m para os raios γ do cobalto 60 (^{60}Co), 2 keV/ μ m para raios X de 250kV e 100 a 200 keV/ μ m para partículas pesadas. No entanto, doses equivalentes de radiação com diferentes LET não produzem eficácias biológicas quantitativamente similares. Portanto, é importante mencionar o conceito de eficácia biológica relativa (RBE), que é a razão D_x/D_r , na qual D_x é a dose de raios-X de 250 kV e D_r é a dose de radiação em teste, necessária para produzir o mesmo efeito radiobiológico (PAGANETTI et al., 2002). A RBE aumenta com o LET até um máximo de 100 keV/ μ m, porém com maior aumento do LET ocorre diminuição na RBE. Isto acontece, pois para as

radiações que apresentam LET (ótimo) de 100 keV/μm, a separação média entre os dois eventos ionizantes é semelhante ao diâmetro da dupla hélice do DNA (2 nm) e a quebra dupla é produzida de forma eficaz. Para valores maiores de LET, a quebra dupla é produzida, porém certa quantidade de energia é desperdiçada, pois muitas células recebem mais eventos ionizantes que aqueles necessários para matá-las, isto é, não aumenta a eficácia de produzir quebras duplas.

Para as radiações de alto LET, quando comparadas com as de baixo LET, o RBE aumenta para as doses baixas e também para doses menores por fração (JONES e DALE, 2000). Isto se deve ao fato da curva de dose-resposta para radiações de baixo LET, apresentar um ombro (possibilidade de reparo) e as de alto LET praticamente não apresentarem (ausência de reparo). Portanto, nestas situações o RBE aumenta, indicando a maior eficácia das radiações de alto LET em induzir morte celular. Em relação ao efeito de oxigênio (OER), este é 3 vezes maior para radiações de baixo LET em comparação às de alto LET (HALL, 1994).

1.7 Respostas celulares de PROCARIOTO versus EUCARIOTO após irradiação

A figura 3 a seguir, mostra a razão entre a sobrevivência celular após a associação da radiação com exposição ao campo elétrico estático (γ + CEE) e a sobrevivência celular após irradiação com raios gama (γ). A razão de sobrevivência nos procariotos foi 12 vezes menor para a associação da radiação com exposição ao campo elétrico estático do que somente com radiação, enquanto que nos eucariotos inferiores (fungos), a sobrevivência após exposição à radiação- γ e campo elétrico estático, foi 3 vezes menor quando comparada à exposição apenas à radiação. A equação que representa a razão de sobrevivência é dada por

$$R = \frac{\text{nº de células sobreviventes à radiação + campo } (\gamma + \text{CEE})}{\text{nº de células sobreviventes à radiação } (\gamma)}$$

Os mecanismos envolvidos nestas respostas não são completamente conhecidos, porém a nosso ver, é de extrema relevância avaliar estes efeitos em eucariotos superiores.

Dessa forma, a próxima etapa destes estudos seria verificar se esta interferência do campo elétrico estático associado à radiação ionizante ocorre nos processos de recuperação de células de mamíferos e seus possíveis mecanismos. Acreditamos que esses dados poderão contribuir para a otimização da radioterapia.

FIGURA 3 – Razão entre a fração de sobrevivência após exposição à radiação- γ e ao campo elétrico estático (CEE) e a fração de sobrevivência após irradiação com raios gama (γ) para o procarioto *Microcystis panniformis* (SILVA, 2006) e o eucarioto inferior *Candida albicans* (LOUVISON, 2007). O ponto de interrogação indica o dado correspondente que se pretende obter neste trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar a resposta de células de eucariotos superiores normais e tumorais expostas à associação de radiação gama e campo elétrico estático, com o intuito de verificar se um campo elétrico exógeno interfere no efeito biológico produzido pela radiação ionizante.

2.2 Objetivos Específicos

- A) Realizar curva de sobrevivência em culturas de células da linhagem de carcinoma ductal mamário (T47D) submetidas à radiação γ .
- B) Avaliar a viabilidade destas células após exposição à radiação γ , campo elétrico estático e associação de ambos.
- C) Analisar as modificações na distribuição das células tumorais nas fases do ciclo celular por citometria de fluxo.
- D) Verificar a resposta molecular quanto ao reparo em linhagem celular não-tumoral sob ação combinada de radiação γ e campo elétrico estático.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens Celulares e Condições de Cultivo

Células T47D

A linhagem T47D isolada da efusão pleural de pacientes com carcinoma ductal mamário metastático (ATCC) foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Maria Helena Bellini, Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP. As culturas celulares cresceram em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2 mM de glutamina, 1,5 g/L de carbonato de sódio, 4,5 g/L de glucose, 10 mM de HEPES, 1,0 mM de piruvato de sódio, penicilina-estreptomicina (100 unidades/mL e 100 µg/mL, respectivamente). A cultura celular foi mantida a 37 °C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. O meio foi trocado duas vezes por semana e subcultivado uma vez por semana.

Células MRC5

A linhagem celular MRC5, oriunda de fibroblastos de pulmão fetal humano, foi cultivada com meio de cultura DMEM (“Dulbecco’s modified Eagle Médium”) suplementado com 10% de SFB, 2 mM L-glutamina, 100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. As células foram mantidas em ambiente de atmosfera úmida com 5% de CO₂ à 37 °C. O meio foi trocado a cada 2-3 dias.

3.2 Controle das células pelo Método de Exclusão pelo Azul Tripan

A contagem de células foi realizada após tripsinização, seguida pela neutralização com meio de cultura, centrifugação (1200 rpm/ 4 min) e ressuspensão do *pellet* em meio fresco. Amostras desta suspensão celular foram coletadas, diluídas 1:1 em solução de Azul Tripan e as células viáveis e não-viáveis (coloração azul) presentes foram contadas em câmara de Neubauer.

3.3 Radiação Ionizante

As culturas de células T47D foram irradiadas com doses de 1, 2, 4, 6 e 8 Gy, em unidade de telecobaltoterapia (^{60}Co), modelo Alcian II da marca CGR-Varian, no Setor de Radioterapia da Universidade Federal de São Paulo-UNIFESP. A irradiação foi realizada em um campo de 20 cm x 28 cm, com uma placa de acrílico de 0,5 cm de espessura embaixo das garrafas de cultura, devido ao equilíbrio eletrônico do cobalto e as doses administradas pela parte posterior (Gantry a 180°), uma vez que as células estavam aderidas no fundo das garrafas. A taxa de dose no campo determinado foi em média 1,28 Gy . min⁻¹ à temperatura ambiente.

Para análise da fosforilação da histona H2AX, a linhagem celular MRC5 foi irradiada da mesma forma descrita para as células T47D com 2 Gy de raios γ provenientes da fonte selada de ^{137}Cs modelo IBL-637 com atividade máxima de 3000 Ci no ICB-IV-USP. Para operar com a mesma taxa de dose da unidade de cobalto, 1,28 Gy . min⁻¹, a posição das amostras em relação ao centro da fonte de cério foi reajustada de 19,8 cm para 13,7 cm. Após irradiação, as culturas retornaram à estufa 37 °C.

3.4 Exposições ao Campo Elétrico Estático

O sistema de tratamento com campo elétrico estático (CEE) foi desenvolvido usando uma fonte de alta voltagem que opera entre 0 e 10 kV. Esta fonte foi conectada através de dois eletrodos a um capacitor de placas circulares paralelas de alumínio (25 cm² de diâmetro) com um intervalo de 2 cm entre as placas.

A intensidade do campo elétrico aplicado foi de 1.250 Volts/cm por 24 e 72 horas, com as garrafas de cultura colocadas entre o capacitor. Em todos os casos, a temperatura durante o tratamento foi mantida a 37 °C para excluir efeitos térmicos.

3.5 Curva de sobrevivência

Para a determinação da curva de sobrevivência a linhagem celular T47D foi cultivada conforme descrito anteriormente. As células foram plaqueadas em garrafas-T 25 cm² em

quantidades que variaram entre 6×10^2 células (não irradiadas) até 4×10^3 células (expostas a 8 Gy) em cada garrafa. Após 24h, as células foram irradiadas com raios- γ em doses de 2, 4, 6 e 8 Gy e cultivadas em incubadoras a 37 °C, 5% CO₂ por 12 dias. Colônias individuais (32-62 células/colônia) foram fixadas e coradas por 20 minutos com 1% de cristal violeta em 30% de ácido acético.

Para avaliar a relação entre a dose de radiação e a proporção de células que sobreviveram, calculamos a eficiência de plaqueamento (EP), que indica a porcentagem de células plaqueadas que cresceram em colônias no controle (HALL, 1994). Com este dado obtivemos a fração sobrevivente (FS) para cada dose através da seguinte relação: **colônias contadas/ células plaqueadas x EP/(100)**. Os experimentos foram realizados em duplicata.

3.6 Teste de Viabilidade Celular

Após verificar que houve diminuição na taxa de sobrevivência das células com doses acima de 4 Gy, as análises de viabilidade celular foram realizadas com as doses de 2 e 4 Gy. Aproximadamente 3×10^3 células por poço foram plaqueadas em placas de 96 poços. Essas células foram irradiadas com radiação- γ em doses de 2 e 4 Gy e posteriormente, as placas foram divididas em dois grupos. Um grupo foi exposto ao campo elétrico estático de 1.250 V/cm por 24 horas enquanto o outro foi incubado em uma incubadora convencional. Depois de 24 horas, todas as placas foram mantidas na incubadora convencional por 12 dias. Após este período, células viáveis foram coradas por 20 minutos com 1% de cristal violeta em 30% de ácido acético e solubilizadas em metanol 100%. As placas foram lidas em leitor de microplacas Multiskan Bichromatic Version 2.1 com comprimento de onda de 590 nm. Os resultados obtidos possibilitaram calcular a porcentagem das células viáveis (detalhes no Apêndice A).

3.7 Imunofluorescência

Com o intuito de verificar a resposta molecular de células normais quanto ao reparo, a linhagem celular MRC5 (fibroblasto de pulmão humano normal) foi plaqueada em lamínulas

de vidro e incubadas por 24 horas. Após este período, as culturas foram divididas em 6 grupos com as seguintes características:

- **Grupo 1** - cultura crescendo sob condições normais, isto é, 37 °C em 5% CO₂.
- **Grupo 2** – cultura exposta a 1.250 V/cm de campo elétrico estático por 1 hora (sob condições normais).
- **Grupo 3** – cultura irradiada com 2 Gy de ¹³⁷Cs e subsequentemente cultivada sob condições normais por 30 minutos.
- **Grupo 4** – cultura irradiada com 2 Gy de ¹³⁷Cs e imediatamente exposta à 1.250 V/cm de campo elétrico estático por 30 minutos (sob condições normais).
- **Grupo 5** – cultura irradiada com 2 Gy de ¹³⁷Cs e subsequentemente cultivada sob condições normais por 1 hora.
- **Grupo 6** – cultura irradiada com 2 Gy de ¹³⁷Cs e imediatamente exposta à 1.250 V/cm de campo elétrico estático por 1 h (sob condições normais).

Após receberem os devidos tratamentos, as células foram lavadas com PBS e fixadas em metanol 100% a -20 °C por 10 minutos. As lamínulas foram lavadas três vezes por 5 minutos em PBS e incubadas em BSA (albumina de soro bovino) 1% por 1 hora a temperatura ambiente, para bloquear as ligações inespecíficas dos anticorpos. Posteriormente, as lamínulas foram incubadas *overnight* com o anticorpo *anti-phos-histone H2AX* (Trevigen; diluição 1: 200) e lavadas três vezes em PBS por 10 minutos. Seguidamente as células foram incubadas a temperatura ambiente com o anticorpo secundário *Alexa Fluor 594 nm goat anti-mouse IgG* (Invitrogen) por 1 h e lavadas três vezes em PBS por 10 min. As lamínulas foram cobertas com 1 mg/mL de DAPI (4', 6'-diamidino-2-fenilindol. - Invitrogen) e examinadas no microscópio de fluorescência Zeiss - modelo Axiovert 200 (aumento 1000 X). Para cada ponto experimental, pelo menos 100 núcleos foram capturados em tempo de exposição constante e os núcleos com *foci* de γ -H2AX foram quantificados.

3.8 Análise da Distribuição do Ciclo Celular

Após verificar que a dose D₀ corresponde a 1 Gy e que houve diminuição na taxa de sobrevivência das células T47D com doses acima de 4 Gy, a análise da distribuição do ciclo celular foi realizada administrando-se doses de 1, 2 e 4 Gy de ⁶⁰Co. Com intuito de analisar o ciclo celular após irradiação associada ou não ao campo elétrico estático, as densidades

celulares utilizadas foram 5×10^4 células/ml para tratamento por 24 horas e 1×10^5 células/ml para tratamento por 72 horas. Essas células foram plaqueadas em garrafas T25 cm², cultivadas por 24 horas e irradiadas com doses de 1, 2 e 4 Gy de radiação- γ . Logo após a irradiação, as placas foram divididas em 8 grupos:

- **Grupo 1 (Controle – 24 hs)** - cultura crescendo por 24 horas sob condições normais, isto é, 37 °C em 5% CO₂.
- **Grupo 2 (Campo – 24 hs)** - cultura exposta a 1.250 V/cm de campo elétrico estático por 24 horas (sob condições normais).
- **Grupo 3 (Radiação – 24 hs)** - cultura irradiada com 1, 2 e 4 Gy de raios- γ e subsequentemente cultivada sob condições normais por 24 horas.
- **Grupo 4 (Radiação + Campo - 24 hs)** – cultura irradiada com 1, 2 e 4 Gy de raios- γ e imediatamente exposta à 1.250 V/cm de campo elétrico estático por 24 horas (sob condições normais).
- **Grupo 5 (Controle – 72 hs)** - cultura crescendo por 72 horas sob condições normais, isto é, 37 °C em 5% CO₂.
- **Grupo 6 (Campo -72 hs)** - cultura exposta a 1.250 V/cm de campo elétrico estático por 72 horas (sob condições normais).
- **Grupo 7 (Radiação – 72 hs)** cultura irradiada com 1, 2 e 4 Gy de raios- γ e subsequentemente cultivada sob condições normais por 72 horas.
- **Grupo 8 (Radiação + Campo – 72 hs)** – cultura irradiada com 1, 2 e 4 Gy de raios- γ e imediatamente exposta à 1.250 V/cm de campo elétrico estático por 72 horas (sob condições normais).

Transcorridas 24 e 72 horas após a ação do campo elétrico estático as células foram tripsinizadas e fixadas com etanol 70% + RNase. Alíquotas de 1×10^5 células/ml foram suspensas em 300µl de HFS (Hypotonic Fluorochrome Solution) - (50 µg/mL de iodeto de propídio, 0,1% citrato de sódio, 0,1% de Triton X-100) por pelo menos 1 hora no escuro a 4 °C. A intensidade de fluorescência do iodeto de propídio (molécula intercalante de DNA), que é proporcional ao conteúdo de DNA, foi analisada usando a porcentagem de células distribuídas nas diferentes fases do ciclo celular (G₀ + G₁, S e G₂ + M). Cerca de 5.000 células foram analisadas por amostra e a quantificação da distribuição do ciclo celular foi executada em um citômetro de fluxo FACScalibur-Becton Dickison e analisada pelo programa WinMDI 2.8.

4 RESULTADOS

4.1 Curva de Sobrevivência

O efeito da dose de radiação na capacidade clonogênica é usualmente descrito por uma curva de sobrevivência. Através da administração de diferentes doses de radiação sobre as células, foi possível obter o número de colônias viáveis que se formaram a partir de um número inicial de células plaqueadas.

Na tabela 1 temos os resultados da fração de sobreviventes (S) para a linhagem T47D. A primeira coluna refere-se à dose administrada em Gy. Na segunda coluna estão os pontos experimentais, isto é, a fração de sobrevivência obtida para as doses 2, 4, 6 e 8 Gy. A terceira coluna representa a fração de sobrevivência – $S(D)$ para cada dose estudada, calculada a partir de expressão analítica com base na Estatística de Boltzmann. Na quarta coluna temos a taxa de mortalidade celular para cada unidade de dose (Gy) administrada, dM/dD , calculada a partir da expressão analítica para $S(D)$ – detalhes no parágrafo 5.1 da DISCUSSÃO e no Apêndice B.

Todas as colunas da tabela 1 estão representadas graficamente na figura 4. Observa-se que a curva de sobrevivência obtida para células T47D exibe as características peculiares desse tipo de curva em eucariotos irradiados com raios gama: um ombro de reparo seguido de queda pronunciada da fração sobrevivente.

TABELA 1 – Dados obtidos a partir da curva de sobrevivência em células T47D.

Dose (Gy)	Pontos experimentais	S(D)	dM/dD
0	1	1	0
0,5	-	0,97	0,11
1,0	-	0,89	0,2
1,5	-	0,77	0,27
2,0	0,65	0,63	0,29
2,5	-	0,48	0,28
3,0	-	0,35	0,24
3,5	-	0,24	0,197
4,0	0,14	0,16	0,15
5,0	-	0,055	0,064
6,0	0,025	0,016	0,022
7,0	-	0,0035	0,0057
8,0	0,003	0,0006	0,0023

FIGURA 4 – Curva de sobrevivência para células T47D irradiadas com doses entre 2-8 Gy de raios gama. (■) são os pontos experimentais, (--) representa a curva de Boltzmann, (--) - a taxa de mortalidade celular (dM/dD) e (↔) - o ombro de reparo que é igual a 1 Gy. O ponto de inversão da curva é indicado por D_i e corresponde a 2,08 Gy. O parâmetro β utilizado para esta curva foi 0,34 (vide Apêndice B). A eficiência de plaqueamento foi de 58%.

A partir de um ajuste da expressão de Boltzmann representamos a curva de sobrevivência analítica em escala log-linear mostrado na figura 5. Assim, para doses mais altas (acima de 3 Gy, no caso da Figura 5) essa curva pode ser aproximada por uma reta, circunstância essa que simplifica a obtenção da dose D_0 . A curva analítica mostrada na figura 5 é muito semelhante à curva interpolada diretamente dos dados experimentais (Figura 6), mostrando que a estatística de Boltzmann reproduz satisfatoriamente a situação experimental.

Em Radiobiologia a curva de sobrevivência é usualmente representada em escala log-linear conforme é mostrado na figura 6. Na região linear desta curva (em escala log-linear) a dose D_0 seria meramente dada pela inclinação (coeficiente angular) da reta, conforme ilustrado na figura 6. Esta curva é rotineiramente usada para avaliar a eficácia biológica relativa de radiações, o efeito das condições ambientais como oxigênio, protetores, sensibilizadores entre outros. Este quesito será detalhado na Discussão.

FIGURA 5 – Curva de sobrevivência analítica para células T47D em escala log-linear, obtida por ajuste da expressão de Boltzmann aos resultados experimentais mostrados na figura 4.

FIGURA 6 - Dose D_0 obtida na região linear da curva de sobrevivência em escala log-linear.

4.2 Efeito do campo elétrico nas células em cultura

Para testar o efeito citotóxico do campo elétrico estático, células T47D foram expostas à ação direta do campo exógeno por 24 horas. Os resultados obtidos em absorbância permitiram determinar a viabilidade celular em porcentagem e são mostrados na figura 7. O desvio padrão calculado para o controle foi muito pequeno em decorrência da pouca flutuação verificada na leitura da placa. O resultado mostrou que o grupo controle, células mantidas sob condições normais de cultura, apresentaram 91,01% ($\pm 0,7$) de sobrevivência celular. Enquanto que as células expostas ao campo elétrico por 24 horas tiveram 93,8% ($\pm 5,2$) de sobrevivência.

FIGURA 7 – Viabilidade celular das células T47D que foram expostas a 1.250 V/cm de campo elétrico estático por 24 horas (campo 24 h) e do grupo não-exposto (controle). Células viáveis foram coradas com cristal violeta 12 dias após aplicação do campo e a absorbância lida com comprimento de onda de 590 nm. As barras de erro representam o desvio padrão.

4.3 Efeito combinado de radiação gama e campo elétrico estático

Para verificar a interferência do campo elétrico estático nos processos de reparação das células irradiadas, como foi previamente demonstrado em estudos realizados com procariotos e eucariotos inferiores, a linhagem celular humana T47D foi exposta a doses únicas de 2 e 4 Gy de raios- γ na ausência e presença do campo elétrico estático por 24 horas. Esses dados permitiram avaliar o número de células viáveis após os devidos tratamentos. Os resultados obtidos são apresentados na figura 8 e tabela 2.

TABELA 2 – Porcentagem de células T47D viáveis após tratamentos

Tratamento	(%) células viáveis *
Controle	100 ± 13,9
2 Gy	64,5 ± 8,7
2 Gy + CEE	67,0 ± 8,3
4 Gy	30,2 ± 12,4
4 Gy + CEE	33,8 ± 13,5

*± = desvio padrão (DP)

CEE: campo elétrico estático de 1.250 V/cm

FIGURA 8 – Viabilidade celular das células T47D expostas a doses de 2 e 4 Gy de radiação gama e associadas a 1.250 V/cm de campo elétrico estático por 24 horas. Células viáveis foram coradas com cristal violeta 12 dias após aplicação do campo e a absorbância lida com comprimento de onda de 590 nm. As barras de erro representam o desvio padrão.

4.4 Formação de foci nuclear de histona γ -H2AX

A intensidade da imunofluorescência da histona γ -H2AX é proporcional a frequência de quebras duplas no DNA (DSBs) em cromatina induzidas por radiação e mostra que a via de reparo foi ativada. Neste trabalho, analisamos os níveis de γ -H2AX induzidos por radiação gama em células MRC5. A fotomicrografia na figura 10 representa *foci* nucleares que se formam nas células após irradiação com 2 Gy de raios- γ , observados pela coloração de imunofluorescência para histona γ -H2AX. A partir das fotomicrografias fluorescentes foi possível quantificar a expressão da histona γ -H2AX em cada célula, utilizando-se para tanto o software IMAGEJ 1.38. Os resultados estão representados na figura 9 e tabela 3.

Os resultados foram obtidos pela análise de variância ANOVA e mostram que a quantidade de histonas H2AX fosforiladas no grupo controle ($8,0 \pm 1,1$), medida em unidades arbitrárias de fluorescência, não foi significativa quando comparada ao grupo tratado apenas com campo elétrico estático ($8,4 \pm 0,94$, $p > 0,05$). A expressão de γ -H2AX nas células irradiadas com 2 Gy ($14,7 \pm 2,42$) e 2 Gy + 30 minutos de campo elétrico estático ($13,8 \pm 0,24$) também não foram estatisticamente significante entre si ($p > 0,05$), nem quando comparadas às células irradiadas com 2 Gy e analisadas após 1 hora ($12,9 \pm 1,04$, $p > 0,05$).

Entretanto, a quantidade de γ -H2AX determinada após irradiação com 2 Gy de raios- γ associada a 1 hora de campo elétrico estático ($18,5 \pm 1,7$) foi maior comparativamente às células somente expostas a 2 Gy de raios- γ e analisadas após 1 hora ($12,9 \pm 1,0$, $p < 0,001$).

TABELA 3 – Quantidade de histona H2AX fosforilada na linhagem celular MRC5.

Tratamento	Quantidade de γ -H2AX (u.a.f)
Controle	$8,0 \pm 1,05$
Controle + CEE	$8,4 \pm 0,94$
2 Gy (30 min)	$14,7 \pm 2,42$
2 Gy + CEE (30 min)	$13,8 \pm 0,24$
2 Gy (1 h)	$12,9 \pm 1,04$
2 Gy + CEE (1 h)	$18,5 \pm 1,74$

u.a.f = unidade arbitrária de fluorescência. $\pm$ = desvio padrão (DP)
CEE = campo elétrico estático de 1.250 V/cm

FIGURA 9 - Expressão da histona γ -H2AX na linhagem MRC5. As barras de erro representam o desvio padrão. u.a.f. = unidade arbitrária de fluorescência.

FIGURA 10 – Fotomicrografia fluorescente de núcleos corados com DAPI (azul) e foci nuclear de γ -H2AX corados com o anticorpo Alexa Fluor 594 nm (vermelho) detectados na linhagem celular MRC5. (A-B) Controle não-irradiado sem exposição ao campo elétrico estático; (C-D) Controle não-irradiado e exposto ao campo elétrico estático; (E-F) células irradiadas com 2 Gy e fixadas 30 minutos após irradiação; (G-H) células irradiadas com 2 Gy, exposta ao campo elétrico estático e fixadas após 30 minutos; (I-J) células irradiadas com 2 Gy e fixadas 1 hora após irradiação; (L-M) células irradiadas com 2 Gy, exposta ao campo elétrico estático e fixadas após 1 hora.

4.5 Análise do Ciclo Celular

A análise de citometria de fluxo foi realizada na linhagem celular T47D com o intuito de investigar se a radiação gama associada ao campo elétrico estático era capaz de interferir na distribuição das células nas fases do ciclo celular. As porcentagens de células nas fases G_0/G_1 – população de células quiescentes, S – população de células na fase de síntese de DNA, e G_2/M – população de células em divisão ou proliferação celular foram determinadas.

Nas figuras de números 11 a 18 são mostrados gráficos representativos das distribuições do ciclo celular na linhagem T47D, para vários tratamentos, obtidos pelo programa WinMDI 2.8. Enquanto que nas figuras de números 19 a 22 são apresentados histogramas referentes às porcentagens de células T47D presentes em cada fase do ciclo celular. Estes histogramas foram gerados a partir dos resultados contidos na tabela 4. Nesta tabela, os dados foram organizados em grupos correspondentes aos tratamentos com radiação mais campo elétrico (γ + CEE) e apenas com irradiação (γ), tendo sido calculada a razão entre estes. O exame da razão entre essas duas quantidades (com e sem campo) permite discutir de forma mais compacta os efeitos observados nas fases do ciclo celular (Figura 23).

Embora todas as células irradiadas (com e sem campo) e analisadas após 24 horas tenham exibido aumento na porcentagem de células na fase G_2/M , o tratamento com 1 Gy e 2 Gy associados a 24 horas de campo elétrico induziu mudanças significativas na progressão do ciclo celular (Tabela 5 e Figuras: 20 – A e C, 21 - A e C). Verificamos que a porcentagem de células irradiadas com 1 Gy e expostas a 24 horas de campo elétrico foi menor nas fases G_0/G_1 (10%) e G_2/M (4%) em comparação a essas mesmas fases nas células apenas irradiadas (Tabela 5). Por outro lado, na fase S houve um aumento de aproximadamente 36% na quantidade de células irradiadas com 1 Gy e expostas a 24 horas de campo em relação às células apenas irradiadas (Tabela 5).

Para o tratamento com 2 Gy, a porcentagem de células irradiadas e expostas a 24 horas de campo elétrico presentes nas fases G_0/G_1 e G_2/M foi menor, 7% e 1%, respectivamente, em relação às células apenas irradiadas (Tabela 5). Na fase S, a quantidade de células irradiadas e submetidas ao campo elétrico foi 13% maior que as células apenas irradiadas (Tabela 5).

TABELA 4 – Proporção média de células T47D presentes em cada fase do ciclo celular.

Tratamento	(%)* G ₀ /G ₁	Razão**	(%)* S	Razão**	(%)* G ₂ /M	Razão**
Controle (24 hs)	35,4 ± 3,9	1,04 ± 0,09	17,4 ± 3,07	0,7 ± 0,03	47,2 ± 4,6	1,08 ± 0,15
Campo (24 hs)	36,8 ± 9,0		12,2 ± 3,7		51,0 ± 13,9	
Controle (72 hs)	55,7 ± 5,1	0,95 ± 0,05	11,0 ± 7,0	1,37 ± 0,10	33,3 ± 6,0	0,97 ± 0,06
Campo (72 hs)	52,6 ± 3,2		15,1 ± 3,9		32,2 ± 2,4	
1 Gy (24 hs)	32,1 ± 1,2	0,9 ± 0,01	14,8 ± 4,3	1,36 ± 0,09	53,2 ± 5,6	0,96 ± 0,06
1 Gy + C (24 hs)	28,3 ± 0,6		20,1 ± 7,0		51,5 ± 6,8	
1 Gy (72 hs)	50,8 ± 2,8	1,06 ± 0,03	13,6 ± 0,6	0,93 ± 0,02	35,6 ± 2,2	0,94 ± 0,02
1 Gy + C (72 hs)	54 ± 0,5		12,6 ± 1,8		33,4 ± 2,5	
2 Gy (24 hs)	26,8 ± 5,4	0,93 ± 0,05	17,3 ± 4,7	1,13 ± 0,05	55,9 ± 7,9	0,99 ± 0,08
2 Gy + C (24 hs)	24,8 ± 4,1		19,7 ± 4,7		55,5 ± 6,9	
2 Gy (72 hs)	52,5 ± 8,5	1,03 ± 0,13	19,5 ± 6,3	0,89 ± 0,06	28,0 ± 5,8	1,01 ± 0,07
2 Gy + C (72 hs)	54,3 ± 12,2		17,4 ± 4,0		28,3 ± 6,8	
4 Gy (24 hs)	19,1 ± 1,4	1,01 ± 0,001	15,9 ± 4,7	0,81 ± 0,04	64,9 ± 9,2	1,04 ± 0,10
4 Gy + C (24 hs)	19,4 ± 1,3		12,9 ± 4,3		67,7 ± 4,5	
4 Gy (72 hs)	33,5 ± 2,3	0,94 ± 0,03	24,3 ± 2,3	0,97 ± 0,03	42,2 ± 4,1	1,06 ± 0,06
4 Gy + C (72 hs)	31,5 ± 1,7		23,6 ± 3,4		44,9 ± 5,3	

* Os percentuais indicados foram calculados relativamente aos totais de células presentes apenas nas 3 fases (G₀/G₁, S e G₂/M). Nesse sentido, 100% corresponde à soma das 3 fases e não ao total inicial de células analisadas.

** Razão entre a percentagem de células T47D irradiadas e expostas ao campo elétrico estático (γ + CEE) e a percentagem de células T47D apenas irradiadas (γ). ± : desvio padrão (DP).

TABELA 5 – Resultados de maior significância estatística, obtidos a partir da análise de citometria de fluxo.

	$(\gamma + \text{CEE}) / \gamma$		Tendência
	1 Gy (24 hs)	2 Gy (24 hs)	
G₀/G₁	0,9 ± 0,01	0,93 ± 0,05	↓ (>1)
S	1,36 ± 0,09	1,13 ± 0,05	↑ (>1)
G₂/M	0,96 ± 0,06	0,99 ± 0,08	↓ (>1)

FIGURA 11 – Citometria de fluxo realizada na linhagem T47D – grupo controle não-irradiado 24 e 72 horas. (**A e C**) Gráfico representativo da distribuição do ciclo celular. As fases do ciclo estão representadas nas setas por: G_0/G_1 – população de células quiescentes, S – população de células na fase de síntese de DNA, G_2/M – população de células em divisão ou proliferação celular. A fluorescência relativa de PI (conteúdo de DNA) está representada no eixo-x (FL2-PI). (**B e D**) Distribuição da intensidade de fluorescência expressa em unidades arbitrárias em relação ao volume celular. (**R1**) células presentes apenas em G_0/G_1 , S e G_2/M . (**R2**) células mortas e não reconhecidas pelo programa WinMDI 2.8.

Campo
24 hs

Campo
72 hs

FIGURA 12 - Citometria de fluxo realizada na linhagem T47D – grupo campo não-irradiado 24 e 72 horas. (A e C) Gráfico representativo da distribuição do ciclo celular. As fases do ciclo estão representadas nas setas por: G_0/G_1 – população de células quiescentes, S – população de células na fase de síntese de DNA, G_2/M – população de células em divisão ou proliferação celular. A fluorescência relativa de PI (conteúdo de DNA) está representada no eixo-x (FL2-PI). (B e D) Distribuição da intensidade de fluorescência expressa em unidades arbitrárias em relação ao volume celular. (R1) células presentes apenas em G_0/G_1 , S e G_2/M . (R2) células mortas e não reconhecidas pelo programa WinMDI 2.8.

FIGURA 13 - Citometria de fluxo realizada na linhagem T47D – grupo 1 Gy (24 hs) e 1 Gy + Campo (24 hs). **(A e C)** Gráfico representativo da distribuição do ciclo celular. As fases do ciclo estão representadas nas setas por: G_0/G_1 – população de células quiescentes, S – população de células na fase de síntese de DNA, G_2/M – população de células em divisão ou proliferação celular. A fluorescência relativa de PI (conteúdo de DNA) está representada no eixo-x (FL2-PI). **(B e D)** Distribuição da intensidade de fluorescência expressa em unidades arbitrárias em relação ao volume celular. **(R1)** células presentes apenas em G_0/G_1 , S e G_2/M . **(R2)** células mortas e não reconhecidas pelo programa WinMDI 2.8.

FIGURA 14 - Citometria de fluxo realizada na linhagem T47D – grupo 1 Gy (72 hs) e 1 Gy + Campo (72 hs). **(A e C)** Gráfico representativo da distribuição do ciclo celular. As fases do ciclo estão representadas nas setas por: G_0/G_1 – população de células quiescentes, S – população de células na fase de síntese de DNA, G_2/M – população de células em divisão ou proliferação celular. A fluorescência relativa de PI (conteúdo de DNA) está representada no eixo-x (FL2-PI). **(B e D)** Distribuição da intensidade de fluorescência expressa em unidades arbitrárias em relação ao volume celular. **(R1)** células presentes apenas em G_0/G_1 , S e G_2/M . **(R2)** células mortas e não reconhecidas pelo programa WinMDI 2.8.

FIGURA 15 - Citometria de fluxo realizada na linhagem T47D – grupo 2 Gy (24 hs) e 2 Gy + Campo (24 hs). (A e C) Gráfico representativo da distribuição do ciclo celular. As fases do ciclo estão representadas nas setas por: G_0/G_1 – população de células quiescentes, S – população de células na fase de síntese de DNA, G_2/M – população de células em divisão ou proliferação celular. A fluorescência relativa de PI (conteúdo de DNA) está representada no eixo-x (FL2-PI). (B e D) Distribuição da intensidade de fluorescência expressa em unidades arbitrárias em relação ao volume celular. (R1) células presentes apenas em G_0/G_1 , S e G_2/M . (R2) células mortas e não reconhecidas pelo programa WinMDI 2.8.

FIGURA 16 - Citometria de fluxo realizada na linhagem T47D – grupo 2 Gy (72 hs) e 2 Gy + Campo (72 hs). **(A e C)** Gráfico representativo da distribuição do ciclo celular. As fases do ciclo estão representadas nas setas por: G₀/G₁ – população de células quiescentes, S – população de células na fase de síntese de DNA, G₂/M – população de células em divisão ou proliferação celular. A fluorescência relativa de PI (conteúdo de DNA) está representada no eixo-x (FL2-PI). **(B e D)** Distribuição da intensidade de fluorescência expressa em unidades arbitrárias em relação ao volume celular. **(R1)** células presentes apenas em G₀/G₁, S e G₂/M. **(R2)** células mortas e não reconhecidas pelo programa WinMDI 2.8.

FIGURA 17 - Citometria de fluxo realizada na linhagem T47D – grupo 4 Gy (24 hs) e 4 Gy + Campo (24 hs). **(A e C)** Gráfico representativo da distribuição do ciclo celular. As fases do ciclo estão representadas nas setas por: G_0/G_1 – população de células quiescentes, S – população de células na fase de síntese de DNA, G_2/M – população de células em divisão ou proliferação celular. A fluorescência relativa de PI (conteúdo de DNA) está representada no eixo-x (FL2-PI). **(B e D)** Distribuição da intensidade de fluorescência expressa em unidades arbitrárias em relação ao volume celular. **(R1)** células presentes apenas em G_0/G_1 , S e G_2/M . **(R2)** células mortas e não reconhecidas pelo programa WinMDI 2.8.

FIGURA 18 - Citometria de fluxo realizada na linhagem T47D – grupo 4 Gy (72 hs) e 4 Gy + Campo (72 hs). **(A e C)** Gráfico representativo da distribuição do ciclo celular. As fases do ciclo estão representadas nas setas por: G_0/G_1 – população de células quiescentes, S – população de células na fase de síntese de DNA, G_2/M – população de células em divisão ou proliferação celular. A fluorescência relativa de PI (conteúdo de DNA) está representada no eixo-x (FL2-PI). **(B e D)** Distribuição da intensidade de fluorescência expressa em unidades arbitrárias em relação ao volume celular. **(R1)** células presentes apenas em G_0/G_1 , S e G_2/M . **(R2)** células mortas e não reconhecidas pelo programa WinMDI 2.8.

FIGURA 19 – Histograma representativo da porcentagem de células T47D presentes em cada fase do ciclo celular (G₀/G₁ – população de células quiescentes, S – população de células na fase de síntese de DNA, e G₂/M – população de células em divisão ou proliferação celular). **A)** Controle não-irradiado e sem exposição ao campo elétrico estático, incubado por 24 horas. **B)** Controle não-irradiado e sem exposição ao campo elétrico estático, incubado por 72 horas. **C)** Controle não-irradiado e exposto a 1.250 V/cm de campo elétrico estático por 24 horas. **D)** Controle não-irradiado e exposto a 1.250 V/cm de campo elétrico estático por 72 horas.

FIGURA 20 - Histograma representativo da porcentagem de células T47D presentes em cada fase do ciclo celular (G₀/G₁ – população de células quiescentes, S – população de células na fase de síntese de DNA, G₂/M – população de células em divisão ou proliferação celular). **A)** Células irradiadas com 1 Gy de radiação- γ e analisadas após 24 horas. **B)** Células irradiadas com 1 Gy de radiação- γ e analisadas após 72 horas. **C)** Células irradiadas com 1 Gy de radiação- γ , expostas a 1.250 V/cm de campo elétrico estático e analisadas após 24 horas. **D)** Células irradiadas com 1 Gy de radiação- γ , expostas a 1.250 V/cm de campo elétrico estático e analisadas após 72 horas.

FIGURA 21 - Histograma representativo da porcentagem de células T47D presentes em cada fase do ciclo celular (G₀/G₁ – população de células quiescentes, S – população de células na fase de síntese de DNA, G₂/M – população de células em divisão ou proliferação celular). **A)** Células irradiadas com 2 Gy de radiação- γ e analisadas após 24 horas. **B)** Células irradiadas com 2 Gy de radiação- γ e analisadas após 72 horas. **C)** Células irradiadas com 2 Gy de radiação- γ , expostas a 1.250 V/cm de campo elétrico estático e analisadas após 24 horas. **D)** Células irradiadas com 2 Gy de radiação- γ , expostas a 1.250 V/cm de campo elétrico estático e analisadas após 72 horas.

FIGURA 22 - Histograma representativo da porcentagem de células T47D presentes em cada fase do ciclo celular (G₀/G₁ – população de células quiescentes, S – população de células na fase de síntese de DNA, G₂/M – população de células em divisão ou proliferação celular). **A)** Células irradiadas com 4 Gy de radiação- γ e analisadas após 24 horas. **B)** Células irradiadas com 4 Gy de radiação- γ e analisadas após 72 horas. **C)** Células irradiadas com 4 Gy de radiação- γ , expostas a 1.250 V/cm de campo elétrico estático e analisadas após 24 horas. **D)** Células irradiadas com 4 Gy de radiação- γ , expostas a 1.250 V/cm de campo elétrico estático e analisadas após 72 horas.

FIGURA 23 - Razão entre células da linhagem T47D tratadas com radiação gama e expostas ao campo elétrico estático ($\gamma + \text{CEE}$) e células apenas irradiadas com radiação gama (γ) presentes nas diferentes fases do ciclo celular. **A)** Fase G₀/G₁. **B)** Fase S. **C)** Fase G₂/M.

5 DISCUSSÃO

5.1 Curva de Sobrevivência e a Estatística de Boltzmann

5.1.1 A dose D_0

A fração de sobreviventes S pode ser descrita a partir da Estatística de Boltzmann (Apêndice B, Equação 2), ou seja,

$$S = S_0 \cdot \exp(-\beta^2 \cdot D^2).$$

Essa expressão foi ajustada aos resultados de sobrevivência (Tabela 1 - Figura 4) obtendo-se $\beta = 0,34$; portanto, a expressão analítica que melhor descreve os dados obtidos para a T47D é dada pela equação 3 (Apêndice B)

$$S = S_0 \cdot \exp(-0,1156 \cdot D^2)$$

O conceito formal de dose D_0 é apresentado no Apêndice B.2, onde foi deduzida uma expressão analítica para o cálculo dessa dose (Equação 10 do Apêndice B). Observa-se que os valores de D_0 são muito dependentes da “dose de partida” - D_1 , principalmente para doses mais baixas. Enquanto que para doses mais altas converge assintoticamente para um valor constante em torno de 0,2 Gy, conforme mostrado na figura B-1 (abaixo reproduzida). Portanto, para o intervalo de doses deste trabalho (0 – 8 Gy), as doses D_0 assumem valores entre 2,94 Gy (para $D_1 = 0$) e 0,52 Gy (para $D_1 = 8$ Gy).

FIGURA B-1 – Valores de D_0 (Gy) para diferentes doses de partida (D_1) em Gy.

Na prática radioterápica considera-se como D_0 a dose calculada na região da curva de sobrevivência em que o comportamento seja linear (em escala log-linear), conforme exemplificado na figura 6. Esse procedimento retém algum grau de subjetividade decorrente da escolha da “dose de partida” D_1 . Ainda no exemplo da figura 6, verifica-se que pela escolha de D_1 aproximadamente igual a 4 Gy obteve-se D_0 aproximadamente igual a 1 Gy.

Não encontramos na literatura científica consultada resultado explícito de D_0 para a linhagem T47D utilizada neste estudo. Contudo, El-Awady et al. (2003) obtiveram para a linhagem T47D-B8 (clonada a partir da linhagem celular T47D original) uma dose de inativação igual a 2,21 Gy.

Para elucidar a relação entre a curva de sobrevivência *in vitro* e a relativa sensibilidade do tumor a radiação gama, diversos autores calculam a D_0 para uma variedade de linhagens celulares, utilizando o modelo de alvos múltiplos. Hansen e colaboradores (1999) mostraram que as D_0 de 10 linhagens celulares tumorais irradiadas de 2 a 16 Gy com uma fonte de ^{137}Cs apresentaram valores entre 1,2 e 2,1 Gy. Entre elas, a linhagem celular MDA-MB 231 (carcinoma medular obtido da glândula mamária) apresentou uma D_0 de 1,4 Gy, enquanto que em estudos realizados por Lehnert et al. (1989) obteve-se D_0 igual a 1,67 Gy para a linhagem MCF-7 (adenocarcinoma mamário).

Todas essas D_0 relatadas na literatura foram obtidas pelo critério da prática radioterápica, conforme discutimos acima. Nesses termos, concluímos que nas condições do presente estudo a linhagem T47D apresentou sensibilidade à radiação gama ($D_0 \approx 1$ Gy) compatível àquelas dos eucariotos superiores referidos na literatura.

5.1.2 Taxa de Mortalidade

A taxa de mortalidade celular dM/dD , isto é, a fração de células mortas por unidade de dose (por Gray), foi calculada no Apêndice B (equações 13 e 14) e para $\beta = 0,34$ é dada por:

$$\frac{dM}{dD} = 2 \cdot \beta^2 \cdot D \cdot \exp[-\beta^2 \cdot D^2] = 0,23 \cdot \exp[-0,1156 \cdot D^2]$$

e desenhada na figura 4.

Observamos as seguintes peculiaridades associadas a este último resultado:

(1) A taxa de mortalidade é bem baixa na faixa de doses correspondentes ao ombro de reparo (0 – 1 Gy), indicando que nessa faixa as células T47D são capazes de se reparar.

(2) A partir de 1 Gy a taxa de mortalidade aumenta rapidamente até atingir um máximo em $D_i = 2,08$ Gy. Nesse ponto de máximo a dM/dD é aproximadamente igual a 0,3/Gy, ou seja, 30% das células iniciais foram mortas por Gray. Essa dose $D_i = 2,08$ Gy corresponde ao ponto de inflexão da curva de sobrevivência, que analiticamente é dada por

$$D_i = \frac{1}{\sqrt{2} \cdot \beta}$$

(3) A forte inclinação de dM/dD até o máximo em $D_i = 2,08$ Gy indica a progressiva e rápida perda de capacidade de reparação com o aumento da dose.

(4) A pronunciada queda de dM/dD a partir de D_i NÃO está associada à recuperação da capacidade de reparo, mas sim à redução da população de sobreviventes.

5.2 Efeito isolado do campo elétrico

Os resultados obtidos sem e com aplicação de campo elétrico não permitem, estatisticamente, estabelecer uma diferença entre os dois conjuntos de dados. De fato, o intervalo de variação para o controle ($91,01 \pm 0,7$) é 90,4 – 91,8, enquanto que para tratamento com campo ($93,8 \pm 5,2$) o intervalo é 88,6 – 99,0. Ou seja, o primeiro intervalo está contido no segundo, mesmo se levarmos em conta **dois** desvios padrão no controle ($91,01 \pm 1,4$), cujo intervalo seria igual a 89,61 – 92,41. É importante ter em conta que a probabilidade de uma nova medida fornecer um resultado nesse último intervalo é de 95%.

Portanto, esses dados confirmaram os resultados obtidos por Silva (2006) e Louvison (2007) em que o campo elétrico aplicado isoladamente também não foi citotóxico.

5.3 Irradiação associada ao campo elétrico

A escolha das doses para investigar o efeito do campo elétrico estático (CEE) com radiação γ baseou-se nas peculiaridades da curva de sobrevivência (Figura 4). Observa-se que a dose correspondendo à maior taxa de mortalidade é a D_i , igual a 2,1 Gy aproximadamente.

Assim, realizamos o experimento em 2 Gy e em uma dose bem superior (4 Gy) para testar os limites da técnica.

Os resultados mostrados na tabela 2 indicam que para a dose de 4 Gy a dispersão dos dados foi muito grande, superior a 30%. De fato, para 4 Gy e 4 Gy + CEE obteve-se viabilidades celulares de $(30,2 \pm 12,4)\%$ e $(33,8 \pm 13,5)\%$, respectivamente. Portanto, seriam perceptíveis apenas os efeitos do campo elétrico superiores a 30% para essa dose. Essa circunstância deve-se ao fato de que com 4 Gy a população celular já é muito pequena (veja fig. 4). Assim, efeitos citotóxicos de outros agentes físicos, como o CEE, seriam de difícil mensuração. Portanto, com essa dose os resultados foram inconclusivos.

Por outro lado, para 2 Gy e 2 Gy + CEE obteve-se viabilidades celulares de $(64,5 \pm 8,7)\%$ e $(67,0 \pm 8,3)\%$, respectivamente. As dispersões dos resultados (conforme mostram os desvios padrão) são de 12% aproximadamente. Neste caso, somente seriam perceptíveis efeitos citotóxicos do CEE superiores a 12% da viabilidade celular. Portanto, poderíamos concluir que a citotoxicidade do CEE combinado com radiação γ seria, caso ocorra, inferior a 12%.

Essa observação contrasta com o que foi verificado em estudo com um procarioto (cianobactéria) e um eucarioto inferior (*C. albicans*) – figura 24 à frente. O efeito citotóxico mais elevado quando se associa à radiação ao campo elétrico poderia ser atribuído, no caso desses dois microrganismos, a uma provável interferência negativa do campo elétrico no mecanismo de reparo de DNA (Figura 1). Então, seria muito instrutivo dar resposta à seguinte questão: “Em que medida um campo elétrico interfere no mecanismo de reparo de DNA em um eucarioto superior?”.

5.4 Avaliação de irradiação e campo elétrico em uma linhagem normal de células humanas

Os resultados discutidos no parágrafo anterior ainda poderiam suscitar outra questão complementar: a ineficácia da ação do campo elétrico estaria associada à alta radioresistência das células T47D?

Essa possibilidade apontou para a necessidade de se realizar um ensaio com irradiação e campo elétrico em uma linhagem de células humanas normais. Os resultados estão na tabela 3, de onde podemos salientar os seguintes pontos:

1 – O percentual de histonas H2AX fosforiladas (ou seja, as histonas ativadas que ainda não executaram reparo dos DSBs) é o mesmo, dentro do desvio padrão calculado, para os grupos de controle com e sem aplicação de CEE, indicando que esse agente físico não induz quebras no DNA.

2 – O percentual de histonas H2AX fosforiladas também foi o mesmo, dentro do desvio padrão calculado, nas células irradiadas com 2 Gy e naquelas irradiadas e submetidas à ação do CEE por 30 minutos, indicando que esse tempo é ainda pequeno para observar-se algum efeito adicional produzido pelo CEE.

3 – O percentual de histonas H2AX fosforiladas foi 43% maior (Tabela 3) quando duplicou-se o tempo de aplicação do CEE (1h). Ou seja, apenas com irradiação obteve-se um percentual igual 12,9, e com irradiação mais 1 hora de CEE obteve-se 18,5. Portanto, conclui-se *cum grano salis* que o campo elétrico exógeno aplicado por 1 hora interferiu apreciavelmente no processo de reparo das DSBs.

Quanto a esta última constatação poder-se-ia então admitir que um CEE dificulta o deslocamento de proteínas de reparo em direção aos sítios danificados (conforme ilustrado na Figura 1).

5.5 Efeito da associação de radiação com campo elétrico nas fases do ciclo celular

Conforme mostrado, as células T47D tratadas com radiação ionizante e analisadas após 24 horas apresentaram um acúmulo maior de células na fase G₂/M. Os resultados são representados na tabela 4. Essa constatação corrobora dados já existentes na literatura. De fato, segundo Vares et al. (2004), células T47D irradiadas com ¹³⁷Cs se acumulam na fase G₂/M. De acordo com Pawlik e Keyomarsi (2004), a radiação ionizante pode retardar a taxa de progressão da população de células proliferantes, causando um acúmulo de células na fase G₂ e evitando que elas sofram uma divisão mitótica. Este estudo também relata que os efeitos do bloqueio em G₂ aumentam com a dose de radiação, mas mesmo em baixas doses podem resultar na redistribuição das fases do ciclo celular. Nossos dados também sugerem esta tendência, pois com o aumento da dose nas células tratadas por 24 horas, a porcentagem de células presentes em G₂/M também aumentou. Embora exista uma parcela elevada da população celular em G₂/M, ao tratarmos as células com radiação gama e campo elétrico

vimos que esta associação não foi capaz de alterar a quantidade de células presentes nesta fase.

Da observação dos resultados mostrados na figura 23 constatamos que a maior significância estatística foi obtida para as doses de 1 Gy e 2 Gy com aplicação de campo elétrico por 24 horas. Por significância estatística subentende-se resultados com intervalo de desvios padrão maior ou menor do que 1. Por exemplo, resultados como $0,92 \pm 0,15$ e/ou $1,08 \pm 0,18$ não foram analisados. A partir dessa triagem estatística chegamos aos resultados exibidos na tabela 5. A restrição desta análise a essas doses pode ser explicada pelos seguintes motivos:

1) De fato, essa restrição de dados seria esperada uma vez que a dose de 1 Gy situa-se no ombro de reparo, onde a eficiência de reparação é muito grande (Figura 4 – linha em preto), enquanto que a dose de 2 Gy corresponde à dose em que se verifica um máximo na taxa de mortalidade (Figura 4 – curva em vermelho). Com uma dose de 4 Gy, por exemplo, a quase totalidade da população inicial de células morre. Com isso, torna-se muito difícil a observação de efeitos de interferência de campo elétrico nos mecanismos de reparo.

2) Os resultados da análise do ciclo celular ficam mascarados para tempos tão elevados quanto 72h, pois as células já poderiam estar em confluência nesse período de tempo. Neste caso, as células congestionariam a fase G_0 (Tabela 4).

TABELA 5 – Resultados de maior significância estatística, obtidos a partir da análise de citometria de fluxo.

	$(\gamma + CEE) / \gamma$		Tendência
	1 Gy (24 hs)	2 Gy (24 hs)	
G_0/G_1	$0,9 \pm 0,01$	$0,93 \pm 0,05$	↓ (>1)
S	$1,36 \pm 0,09$	$1,13 \pm 0,05$	↑ (>1)
G_2/M	$0,96 \pm 0,06$	$0,99 \pm 0,08$	↓ (>1)

Dos resultados da tabela 5 verificamos que:

1) **Fase G_0/G_1** – o campo elétrico reduziu moderadamente (cerca de 10%) o número de células nessa fase (razão menor do que 1), para as duas doses utilizadas.

2) **Fase S** – verificou-se um aumento significativo (por exemplo, 36% para 1 Gy).

3) **Fase G_2/M** – a redução observada não foi estatisticamente significante.

Ou seja, o tratamento das células irradiadas com campo elétrico estático provoca um acúmulo de células em S e uma diminuição correspondente da fração em G₁, enquanto que a população em G₂/M, apesar de elevada, manteve-se constante. Portanto, as células entram na fase S, mas o campo elétrico impede a progressão normal das células através da transição S → G₂/M.

A inibição no início da fase de replicação parece ser, segundo Friedberg et al. (1995), a resposta predominante a danos causados por radiação ionizante. Neste caso, poderíamos conjecturar o seguinte efeito: se o campo elétrico interfere negativamente no processo de reparação (conforme exemplificado na Figura 1), então, esse agente físico seria outro fator que acentuaria a inibição na fase de replicação. Com isso, teríamos um acúmulo maior de células na fase S, conforme verificado neste trabalho (Tabela 5), o que poderia levar à expressão de novas proteínas envolvidas nos pontos de checagem do ciclo celular ou mesmo na modulação da expressão de genes, relacionados diretamente à dose de radiação aplicada.

Adicionalmente, sabe-se que o atraso programado da fase S em presença de dano no DNA (checkpoint em S) propicia presumivelmente, um tempo adicional para remoção de dano isento de erro. Utilizando uma vez mais nossa premissa inicial (ou seja, o campo elétrico impediria o processo de reparação), a persistência do dano poderia ampliar esse atraso da fase S levando, em consequência, ao acúmulo de células nessa fase.

5.6 Procarioto versus Eucarioto-inferior versus Eucarioto-superior: viabilidade

Nossos resultados para linhagem T47D, combinados com resultados obtidos para o procarioto *Microcystis panniformis* e o eucarioto *Candida albicans*, mostram que o efeito combinado de CEE com radiação gama na viabilidade celular diminui quando se vai de um procarioto para um eucarioto inferior, e diminui mais quando deste se passa a um eucarioto superior como a T47D, conforme ilustrado na figura 24.

FIGURA 24 – Razão entre a fração de sobrevivência após exposição à radiação- γ e ao campo elétrico estático (CEE) e a fração de sobrevivência após irradiação com raios gama (γ) para o procarioto *Microcystis panniformis* (SILVA, 2006), eucarioto inferior *Candida albicans* (LOUVISON, 2007) e eucarioto superior – linhagem celular humana T47D (carcinoma ductal mamário).

Levando-se em conta que os mecanismos de dano e reparo do DNA foram conservados, uma possível explicação para as diferenças observadas estaria relacionada com características específicas de procariotos e eucariotos. Neste caso, observamos que em todas as células procarióticas, a maioria ou toda a informação genética localiza-se em uma única molécula de DNA circular, de aproximadamente um milímetro de comprimento. Essa molécula apresenta-se dobrada sobre si na porção central da célula. Devido a esse tamanho diminuto um campo elétrico exógeno “ilumina” igualmente todos os componentes do DNA. Já as células eucarióticas possuem um DNA muito maior, que forma estruturas compactas e flexíveis - os cromossomos, constituídos de DNA + histonas. Nas células humanas, por exemplo, o DNA é cerca de 1.000 vezes maior do que numa bactéria típica. Outra diferença é que a membrana que envolve o núcleo das células eucarióticas protege a estrutura do DNA, enquanto que nas células procarióticas não existe essa compartimentalização. Devido a essa característica, o material genético de uma célula eucariótica pode exercer um controle bem maior sobre inúmeros processos, como por exemplo, os mecanismos de recuperação celular, comparativamente às células bacterianas.

6 CONCLUSÕES

RADIOBIOLOGIA DA CÉLULA T47D

- A curva de sobrevivência da linhagem T47D foi muito bem descrita pela estatística de Boltzmann.
- A taxa de mortalidade (dM/dD) derivada da curva de Boltzmann aumenta até atingir sua máxima eficiência ($D_i = 2,08$ Gy), onde 30% das células iniciais são mortas por Gray.
- Um formalismo desenvolvido a partir da estatística de Boltzmann mostrou que a D_0 é função da dose de partida (D_1).
- A linhagem T47D apresentou igual sensibilidade (mesma D_0) à radiação gama quando comparada a dados da literatura.
- A região que corresponde ao ombro de reparo (0-1 Gy) apresenta uma baixa taxa de mortalidade, ou seja, nessa região as células T47D devem ser capazes de reparar.
- O aumento da mortalidade celular (dM/dD) até 2,08 Gy indica saturação do mecanismo de reparo com o aumento da dose.
- A menor taxa de mortalidade celular a partir de D_i está associada à redução da população sobrevivente, e não à recuperação da capacidade de reparo.

EFEITO DO CAMPO ELÉTRICO

- O campo elétrico estático (CEE) de 1.250 V/cm aplicado isoladamente não é citotóxico para as linhagens humanas estudadas.

- A citotoxicidade do CEE associado à radiação γ é da ordem de 12%, de acordo com medidas de viabilidade celular realizadas no leitor de microplacas após coloração com cristal violeta.
- Pela observação da quantidade de histonas H2AX fosforiladas na linhagem normal MRC5, constatamos que o campo elétrico exógeno aplicado por 1 hora interferiu no processo de reparo das DSBs após irradiação com 2 Gy.
- A análise e interpretação do ciclo celular também indicam que o CEE interferiu no processo de reparo do DNA, notadamente pelo maior acúmulo de células observado na fase S.
- A intensidade do efeito combinado de CEE e radiação γ depende das características específicas de procariotos e eucariotos.

HIERARQUIA DOS RESULTADOS

1- A constatação mais **direta** de que o CEE interfere com os mecanismos de reparo do DNA foi obtida com a observação do excesso de histonas H2AX fosforiladas.

2- A interferência do CEE nos mecanismos de reparo do DNA também foi observada, indiretamente, na análise do ciclo celular (acúmulo de células na fase S).

3- Finalmente, a redução da viabilidade celular foi outro indicativo de que o CEE estaria interferindo negativamente com o reparo celular e, presumivelmente, com o reparo do DNA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM R. T. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. **Genes Dev.**, v.15 n.17, p. 2177-2196, 2001.

AHBOM, A.; DAY, N.; FEYHTING, M.; ROMAN, E.; SKINNER, J.; DOCKERTY, J.; LINET, M.; MCBRIDE, M.; MICHAELIS, J.; OLSEN, J. H.; TYNES, T.; VERKASALO, P. K. A pooled analysis of magnetic fields and childhood leukaemia. **Brit. J. Cancer**, v. 83, p. 692-698, 2000.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. 4th ed. New York: Garland Science, 2002.

ALPEN. E. L. **Radiation Biophysics**. New Jersey: Prentice-hall, 1991.

ARRUDA-NETO, J. D. T.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; FRIEDBERG, E. C.; SILVA, E. C.; SCHENBERG, A. C. G.; OLIVEIRA, M. C. C.; HEREMAN, T. C.; MESA, J.; RODRIGUES, T. E. ; SHTEJER, K.; GARCIA, C.; GARCIA, F.; LOUVISON, M.; PAULA, C. R. Electric Field Interference in DNA repair: Model Approach and Case Studies. **Radiat. Res.**, 2008. In press.

BAKKENIST, C. J.; KASTAN M. B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. **Nature**, v. 421, p. 499-506, 2003.

BANÁTH, J.; Mac PHAIL, S.; OLIVE, P. L. Radiation sensitivity, H2AX phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines. **Cancer Res.**, v. 64, p. 7144-7149, 2004.

BARTEK, J.; LUKAS, J. Mammalian G1 and S-phase checkpoints in response to DNA damage. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 13, p. 738-747, 2001.

BELLI, M.; SAPORA, O.; TABOCCHINI, M. A. Molecular Targets in Cellular Response to Ionizing Radiation and Implications in Space Radiation Protection. **J. Radiat. Res.**, v. 43, 2002. Suppl. S13-19.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativas 2008: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2007. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008>>. Acesso em: 13 mar. 2008.

CAMERON, I.L.; SUN, LU-ZHE; SHORT, N.; HARDMAN, W. E.; WILLIAMS, C. D. Therapeutic electromagnetic fields (TEMF) and gamma irradiation on human breast cancer xenograft growth, angiogenesis and metastasis. **Cancer Cell Int.**, v. 5, p. 1-23, 2005.

DELIMARIS, J.; TSILIMIGAKI, S.; MESSINI-NICOLAKI, N.; ZIROS, E.; PIPERAKIS, S. M. Effects of pulsed electric fields on DNA human lymphocytes. **Cell Biol. Toxicol.**, v. 22, p. 409-415, 2006.

DINIZ, P.; SHOMURA, K.; SOEJIMA, K.; ITO, G. Effects of pulsed electromagnetic field (PEMF) stimulation on bone tissue like formation are dependent on the maturation stages of the osteoblasts. **Bioelectromagnetics**, v. 23, p. 398-405, 2002.

EL-AWADY, R. A.; DIKOMEY, E. DAHM-DAPHI, J. Radiosensitivity of human tumour cells is correlated with the induction but not with the repair of DNA double-strand breaks. **Br. J. Cancer**, v. 89, p. 593-601, 2003.

FALCK J.; MAILAND N.; SYLJUASEN R. G.; BARTEK, J.; LUKAS J. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. **Nature**, v. 410, p. 842-847, 2001.

FALCK, J.; PETRINI, J. H. J.; WILLIAMS, B. R.; LUKAS, J.; BARTEK, J. The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways. **Nat. Genet.**, v. 30, p. 290-294, 2002.

FARIA, S. L.; LEME, L. H. S.; OLIVEIRA FILHO, J. A. **Câncer de Mama: Diagnóstico e Tratamento**. São Paulo: MEDSI, 1994.

FRIEDBERG, E.; WALKER, G. C.; SIEDE, W. **DNA Repair and Mutagenesis**. Washington: ASM Press, 1995.

GELDOF, A. A. PLAIZIER, M. A. DUIVENVOORDEN, I., et al. Cell cycle perturbations and radiosensitization effects in a human prostate cancer cell line. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 129, p. 175-182, 2003.

GOORDARZI, A. A.; BLOCK, W. D.; LEES-MILLER, S. P. The role of ATM and ATR in DNA damage-induced cell cycle control. **Prog. Cell Cycle Res.**, v. 5, p. 393-411, 2003.

GREENLAND, S.; SHEPPARD, A. R.; KAUNE, W. T.; POOLE, C.; KELSH, M. A. A pooled analysis of magnetic fields, wire codes, and childhood leukemia. **Epidemiology**, v. 11, p. 624-634, 2000.

GRIFFITHS, A. J. F.; GELBARTS, W. M.; MILLER, J. H.; LEWONTIN, R. C. **Genética Moderna**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. Cap. 15.

HALL, E. J. **Radiobiology for the Radiologist**. 4th ed. Philadelphia: J. B. Lippincott, 1994. Chapter 3.

HANSEN, E.; KNUECHEL, R.; ALTMEPPEN, J.; TAEGER, K. Blood irradiation for intraoperative autotransfusion in cancer surgery: demonstration of efficient elimination of contaminating tumor cells. **Transfusion**, v. 39, p. 608-615, 1999.

HARPER, J. W.; ADAMI, G. R. WEI, N.; KEYOMARSI, K.; ELLEDGE, S. J. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. **Cell**, v. 75, p. 805-816, 1993.

HARTWELL, L. H.; WEINERT, T. A. Checkpoint controls that ensure the order of cell cycle events. **Science**, v. 246, p. 629-634, 1989.

HARTWELL, L. H.; KASTAN, M. B. Cell cycle control and cancer. **Science**, v. 266, p. 1824-1828, 1994.

HILL, M. A.; HERDMAN, M. T.; STEVENS, D. L.; JONES, N. J.; THAEKER J.; GOODHEAD, D. T. Relative Sensitivities of Repair-Deficient Mammalian Cells for Clonogenic Survival after α -Particle Irradiation. **Radiat. Res.**, v. 162, p. 667-676, 2004.

JACKSON, P. K.; CHEVALIER, S.; PHILIPPE, M.; KIRSCHNER, M. W. Early events in DNA replication require cyclin E and are blocked by p21CIP1. **J. Cell Biol.**, v. 130, p. 755-69, 1995.

JONES B.; DALE, R. G. Estimation of optimum dose per fraction for high LET radiations: implications for proton radiotherapy. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v. 48, p. 1549-1557, 2000.

KASTAN, M. B.; LIM, D. S. The many substrates and functions of ATM. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 1, p. 179-186, 2000.

KATAOKA, Y.; MURLEY, J. S.; BARKER, K. L.; GRDINA, D. J. Relationship between Phosphorylated Histone H2AX Formation and Cell Survival in Human Microvascular Endothelial Cells (HMEC) as a Function of Ionizing Radiation Exposure in the Presence or Absence of Thiol-Containing Drugs. **Radiat. Res.**, v. 168, p. 1-16, 2007.

KAUFFMAN, W. K.; PAULES, R. S. DNA damage and cell cycle checkpoints. **FASEB J.**, v. 10, p. 238-247, 1996.

KERMANSHAHI, R. K.; SAILANI, M. R. Effect of static electric field treatment on multiple antibiotic-resistant pathogenic strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, v. 38, p. 394-398, 2005.

KHANNA, K. K. Cancer Risk and the ATM Gene: a Continuing Debate. **J. Nat. Cancer Inst.**, v. 92, p. 795-802, 2000.

KIRSON, E.; GURVICH, Z.; SCHNEIDERMAN, R.; DEKEL, E.; ITZHAKI, A.; WASSERMAN, Y.; SCHATZBERGER, R.; PALT, Y. Disruption of cancer cell replication by alternating electric fields. **Cancer Res.**, v. 64, p. 3288-3295, 2004.

KOYAMA, S.; NAKAHARA, T.; SAKURAI, T.; KOMATSUBARA, Y.; ISOZUMI, Y.; MIYAKOSHI, J. Combined exposure of ELF magnetic fields and X-rays increased mutant yields compared with X-rays alone in pTN89 plasmids. **J. Radiat. Res.**, v. 46, p. 257-262, 2005.

KUFE, D. W.; POLLOCK, R. E.; WEICHSELBAUM, R. R.; BAST, R. C. JR.; GANSLER, T. S.; HOLLAND, J. F.; FREI III, EMIL. **Cancer Medicine**. 6th ed. Canada: Hamilton, 2003. Chapter 17.

LEHNERT, S.; GREENE, D.; BATIST, G. Radiation response of drug-resistant variants of a human breast cancer cell line. **Radiat. Res.**, v. 118, p. 568-580, 1989.

LEVINE, A. J.; MOMAND, J.; FINLAY, C. A. The p53 tumor suppressor gene. **Nature**, v. 351, p. 453-456, 1991.

LI, J.; HUANG, S.; ARMSTRONG, E. A.; FOWLER, J. F.; HARARI, P. M. Angiogenesis and Radiation response modulation after vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR2) blockade. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v. 62, p. 1477-1485, 2005.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. **Molecular Cell Biology**. 4th ed. New York: Freeman, 1999. Chapter 12.

LOUVISON, M. **Efeitos da irradiação gama, e de campos elétricos e magnéticos sobre o crescimento, viabilidade, morfologia e produção de exoenzimas em *Candida albicans***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MAHRHOFER, H.; BÜRGER, S.; OPPITZ, U.; FLENTJE, M.; DJUZENOVA C. S. Radiation induced DNA damage and damage repair in human tumor and fibroblast cell lines assessed by histone H2AX phosphorylation. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v. 64, p. 573-580, 2006.

McBRIDE, W. H.; WITHERS, H. R. Biologic basis of radiation therapy. In: PEREZ, C. A. et al. 4th ed. **Principles and practice of radiation oncology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004.

MIYAKOSHI, J.; YOSHIDA, M.; SHIBUYA, K.; HIRAOKA, M. Exposure to strong magnetic fields at power frequency potentiates X-rays-induced DNA strand breaks. **J. Radiat. Res.**, v. 41, p. 293-302, 2000.

NAIR, C. K. K.; PARIDA, D. K.; NOMURA, T. Radioprotectors in Radiotherapy. **J. Radiat. Res.**, v. 42, p. 21-37, 2001.

NIKJOO, H.; O'NEILL, P.; TERRISSOL, M.; GOODHEAD, D. T. Modelling of radiation-induced DNA damage: the early physical and chemical event. **Int. J. Radiat. Biol.**, v. 66, p. 453-457, 1994.

NIGG, E. A. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. **Bioessays**, v. 17, p. 471-480, 1995.

PAGANETTI, H.; NIEMIERKO, A.; ANCUKIEWICZ, M.; GERWECK, L. E.; GOITEIN, M.; LOEFFLER, J. S.; SUIT, H. D. Relative Biological effectiveness (RBE) values for protons beam therapy. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v. 53, p. 407-421, 2002.

PAINTER, R. B.; YOUNG, B. R. Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: a new explanation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 77, p. 7315-7317, 1980.

PARDEE, A. B. Regulation, restriction, and reminiscences. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 26709-26716, 2002.

PAWLIK, T. M.; KEYOMARSI, K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v. 59, p. 928-942, 2004.

PAULOVICH, A. G.; HARTWELL, L. H. A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in *S. cerevisiae* in response to DNA damage. **Cell**, v. 82, p. 841-847, 1995.

PENG, C. Y.; GRAVES, P. R.; THOMAS R. S.; WU, Z. Q.; SHAW, A. S.; PIWNICA-WORMS, H. Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. **Science**, v. 277, p. 1501-1505, 1997.

RAMSAY, J.; BIRRELL, G. Normal tissue radiosensitivity in breast cancer patients. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v. 31, p. 339-344, 1995.

ROGAKOU, E. P.; PILCH, D. R.; ORR, A. H.; IVANOVA, V. S.; BONNER, W. M. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 5858-5868, 1998.

REPACHOLI, M. H.; GREENEBAUM, B. Interaction of Static and Extremely Low Frequency Electric and Magnetic Fields with Living Sytems: Health Effects and Research Needs. **Bioelectromagnetics**, v. 20, p. 133-160, 1999.

SAMUEL, T.; WEBER, H. O.; FUNK, J. O. Linking DNA damage to cell cycle checkpoints. **Cell Cycle**, v. 1-3, p. 162-168, 2002.

SANCAR, A.; LINDSEY-BOLTZ, L. A.; ÜNSAL-KAÇMAZ, K.; LINN, S. Molecular Mechanism of mammalian DNA repair and DNA damage checkpoints. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 73, p. 39-85, 2004.

SÁNCHEZ-REYES, A. A Simple model of radiation action in cells based on a repair saturation mechanism. **Radiat. Res.**, n. 130, p. 139-147, 1992.

SAVITSKY, K. et al. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. **Science**, v. 268, p. 1749-1753, 1995.

SEARS, F. W. **Introducción a la Termodinámica, teoría cinética de los gases y Mecánica Estadística**. 2 ed. Barcelona: Reverté, 1959.

SHILOH, Y. Ataxia-telangiectasia and the Nijmegen breakage syndrome: related disorders but genes apart. **Annu. Rev. Genet.**, v. 31, p. 635-662, 1997.

SHILOH, Y.; KASTAN, M. B. ATM: Genome stability, neuronal development, and cancer cross paths. **Adv. Cancer Res.**, v. 83, p. 209-254, 2001.

SILVA, E. C. **Controle Populacional de *Microcystis panniformis* (Cyanobacteria) utilizando radiações ionizantes e outros agentes físicos exogenous**. 84 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

STEEL, G. G. The case against apoptosis. **Acta Oncol.**, v. 40, p. 968-975, 2001.

STEEL, G. G. Clonogenic cells and the concept of cell survival. In: STEEL, G. G. (Ed.). **Basic clinical radiobiology**. London: Arnold, 2002.

STIFF, T.; O'DRISCOLL, M.; RIEF, N.; IWABUCHI, K.; LÖBRICH, M.; JEGGO, P. A. ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. **Cancer Res.**, v. 64, p. 2390-2396, 2004.

TAKASHIMA, Y.; IKEHATA, M.; MIYAKOSHI, J.; KOANA, T. Inhibition of UV-induced G1 arrest by exposure to 50 Hz magnetic fields in repair-proficient and -deficient yeast strains. **Int. J. Radiat. Biol.**, v. 79, p. 919-924, 2003.

VARES, G. ; ORY, K. ; LECTARD, B. ; LEVALOIS, C. ; ALTMAYER-MOREL, S. ; CHEVILLARD, S. ; LEBEAU, J. Progesterone prevents radiation-induced apoptosis in breast cancer cells. **Oncogene**, v. 23, p. 4603-4613, 2004.

VENTER, J. C. et al. The sequence of the human genome. **Science**, v. 291, p. 1304-1351, 2001.

XU, B.; KIM, S. T.; LIM, D. S.; KASTAN M. B. Two molecularly distinct G2/M checkpoints are induced by ionizing irradiation. **Mol. Cell. Biol.**, v. 22, p. 1049-1059, 2002.

WALLECZEK, J.; SHIU, E. C.; HAHN, G. M. Increase in radiation-induced HPRT gene mutation frequency after nonthermal exposure to nonionizing 60 Hz electromagnetic fields. **Radiat. Res.**, v. 151, p. 489-497, 1999.

WERTHEIMER, N.; LEEPER, E. Electrical wiring configurations and childhood cancer. **Am. J. Epidemiol.**, v. 109, p. 273-284, 1979.

WILSON, G. D. Radiation and cell cycle, revisited. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 23, p. 209-225, 2004.

WITHERS, H. R.; Mc BRIDE, W. H. Biologic basis of radiation therapy. In: PEREZ, C. A.; BRADY, L. W. **Principles and practice of radiation oncology**. Philadelphia: J. B. Lippincott, 1997.

WOO, R. A.; POON, R. Y. C. Cyclin-Dependent Kinases and S Phase Control in Mammalian Cells. **Cell Cycle**, v. 2, p. 316-324, 2003.

WOUTERS, P. C.; SMELT, J. P. P. M. Inactivation of microorganisms with pulsed electric fields: potential for food preservation. **Food Biotechnol.**, v. 11, p. 193-229, 1997.

WOUTERS, P. C.; DUTREUX, N.; SMELT, J. P. P. M.; LELIEVELD, H. L. M. Effects of pulsed electric fields on inactivation kinetics of *Listeria innocua*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 5364-5371, 1999.

YAM, C. H.; FUNG, T. K.; POON, R. Y. Cyclin A in cell cycle control and cancer. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 59, p. 1317-1326, 2002.

ZHANG, Y. P.; XIONG, Y. A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. **Science**, v. 292, p. 1910-1915, 2001.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Viabilidade Celular

A.1 Valores referentes ao teste de viabilidade celular em células T47D

O cálculo para obtenção da viabilidade celular em porcentagem a partir dos valores em absorvância é dado por:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{(L - B) * 100}{C}$$

onde L é a absorvância obtida da amostra analisada, B é absorvância obtida do meio de cultura sem célula e C , a absorvância do controle (células não-irradiadas e sem exposição ao campo exógeno).

Tabela A.1 – Absorvâncias obtidas para células T47D controle. Experimento: Efeito citotóxico do campo.

	BRANCO	2	3	4	5	6	7	8
A	0,087	0,952	0,821	0,939	0,774	0,986	0,955	0,954
B	0,087	0,823	0,99	0,914	1,018	0,997	1,008	0,817
C	0,087	0,816	0,834	1,018	1,007	0,933	0,976	0,761
D	0,087	0,83	0,88	0,767	0,994	0,868	1,008	0,991
E	0,087	0,789	0,857	0,866	0,955	0,873	0,862	0,938
F	0,087	0,849	0,792	0,878	0,873	0,992	0,829	0,988
G	0,087	0,801	0,772	0,836	0,906	0,98	0,808	0,907
H	0,087	0,859	0,886	0,874	0,919	0,923	0,786	0,846

Tabela A.2 - Viabilidade celular obtida em porcentagem para células T47D controle. Experimento: Efeito citotóxico do campo.

	BRANCO	2	3	4	5	6	7	8
A	0,087	91,62656	90,4185	91,52047	89,89547	91,89189	91,65067	91,64265
B	0,087	90,43956	91,92201	91,30869	92,1267	91,97417	92,05479	90,37611
C	0,087	90,36545	90,55375	92,1267	92,04753	91,47059	91,81562	89,74057
D	0,087	90,51254	91,0031	89,81265	91,9519	90,89005	92,05479	91,9295
E	0,087	90,06849	90,7839	90,87093	91,65067	90,9375	90,83246	91,5122
F	0,087	90,70513	90,10239	90,98446	90,9375	91,93698	90,50218	91,90698
G	0,087	90,2027	89,87194	90,57421	91,23867	91,8463	90,27933	91,24748
H	0,087	90,80338	91,05858	90,94693	91,35189	91,38614	90,03436	90,67524

Média – 91,07 % D.P. - ± 0,71

Tabela A.3 – Absorvâncias obtidas para células T47D expostas a 1.250 V/cm de campo elétrico estático por 24 horas. Experimento: Efeito citotóxico do campo.

	BRANCO	2	3	4	5	6	7	8	9
A	0,096	0,988	0,985	0,927	1	0,925	0,98	0,856	0,878
B	0,095	0,928	0,949	0,977	0,949	0,861	0,95	0,939	0,869
C	0,087	0,911	0,959	0,921	0,994	0,934	0,899	0,894	0,898
D	0,098	0,971	0,908	0,904	0,988	0,917	0,875	1,002	0,844
E	0,082	0,869	0,873	0,994	0,983	0,883	0,888	0,955	0,902
F	0,07	0,939	0,943	0,85	0,941	0,988	0,927	0,918	
G	0,071	0,878	0,872	0,93	0,97	0,874	0,985	0,872	
H	0,085	0,845	0,861	0,981	0,847	0,96	0,939	0,933	

Tabela A.4 – Viabilidade celular obtida para células T47D expostas a 1.250 V/cm de campo elétrico estático por 24 horas. Experimento: Efeito citotóxico do campo.

	BRANCO	2	3	4	5	6	7	8	9
A	0,096	100,9286	100,5931	94,10684	102,2706	93,88318	100,0339	86,16675	88,62706
B	0,095	94,21867	96,56715	99,69845	96,56715	86,72591	96,67898	95,44883	87,62057
C	0,087	92,31752	97,68547	93,43585	101,5996	94,88967	90,97554	90,41638	90,8637
D	0,098	99,02746	91,98203	91,5347	100,9286	92,98852	88,29156	102,4943	84,82476
E	0,082	87,62057	88,0679	101,5996	100,3694	89,18622	89,74538	97,23814	91,31103
F	0,07	95,44883	95,89616	85,49576	95,67249	100,9286	94,10684	93,10035	
G	0,071	88,62706	87,95607	94,44234	98,91563	88,17973	100,5931	87,95607	
H	0,085	84,9366	86,72591	100,1458	85,16026	97,7973	95,44883	94,77783	

Média – 93,80 % D.P. - $\pm 5,24$

Tabela A.5 – Absorbâncias obtidas para células T47D controle. Experimento: Efeito combinado de radiação e campo.

	BRANCO	2	3	4	5	6	7	8	9
A	0,085	0,96475	0,83075	0,75375	0,71375	0,68475	0,93675	0,77875	0,86975
B	0,081	0,93075	0,71575	0,72875	0,75075	0,63775	0,76875	0,65975	0,86075
C	0,076	0,84575	0,71975	0,71075	0,89775	0,68075	0,70075	0,94575	0,64575
D	0,07	0,80175	0,79975	0,98775	0,81875	0,79075	0,64175	0,86675	
E	0,079	0,87675	1,00575	0,90575	0,87175	0,68975	0,61175	0,88075	
F	0,064	0,96675	0,96675	0,83675	0,67175	0,73875	0,93775	0,81575	
G	0,07	0,91175	0,98775	0,78275	0,98775	0,71775	0,92875	0,68375	
H	0,069	0,80975	0,93575	0,61475	0,78175	0,92175	0,85875	0,97575	

Tabela A.6 - Viabilidade celular obtida em porcentagem para células T47D controle. Experimento: Efeito combinado de radiação e campo.

	BRANCO	2	3	4	5	6	7	8	9
A	0,085	118,2998	101,8684	92,42652	87,52163	83,96558	114,8664	95,49207	106,6507
B	0,081	114,1307	87,76687	89,36096	92,05865	78,20234	94,26585	80,90003	105,5471
C	0,076	103,7078	88,25736	87,15376	110,0841	83,47509	85,92754	115,97	79,18332
D	0,07	98,31239	98,06714	121,1201	100,397	96,96354	78,69283	106,2828	
E	0,079	107,5091	123,3273	111,0651	106,8959	84,57869	75,01416	107,9995	
F	0,064	118,5451	118,5451	102,6042	82,37149	90,58718	114,989	100,0291	
G	0,07	111,8008	121,1201	95,98256	121,1201	88,01212	113,8854	83,84296	
H	0,069	99,29336	114,7438	75,38203	95,85994	113,0271	105,3019	119,6487	

Média – 100 % D.P. - $\pm 13,86$

Tabela A.7 – Absorbâncias obtidas para células T47D irradiadas com 2 Gy de radiação gama. Experimento: Efeito combinado de radiação e campo.

	BRANCO	2	3	4	5	6	7	8
A	0,083	0,509	0,654	0,741	0,583	0,613	0,689	0,619
B	0,079	0,516	0,517	0,617	0,51	0,572	0,601	0,603
C	0,078	0,716	0,679	0,492	0,481	0,565	0,552	0,61
D	0,071	0,611	0,628	0,522	0,723	0,635	0,554	0,693
E	0,084	0,589	0,57	0,52	0,67	0,592	0,543	0,691
F	0,071	0,649	0,522	0,675	0,675	0,486	0,608	0,567
G	0,074	0,629	0,516	0,706	0,666	0,524	0,68	0,668
H	0,078	0,635	0,472	0,655	0,606	0,672	0,647	0,526

Tabela A.8 - Viabilidade celular obtida em porcentagem para células T47D irradiadas com 2 Gy de radiação gama. Experimento: Efeito combinado de radiação e campo.

	BRANCO	2	3	4	5	6	7	8
A	0,083	52,94215	70,72238	81,39052	62,0162	65,69487	75,01416	66,4306
B	0,079	53,80051	53,92313	66,18536	53,06478	60,66736	64,2234	64,46865
C	0,078	78,32496	73,78794	50,85758	49,50873	59,809	58,21491	65,327
D	0,071	65,44962	67,5342	54,53624	79,18332	68,39256	58,46016	75,50465
E	0,084	62,75193	60,42211	54,291	72,68434	63,1198	57,11131	75,2594
F	0,071	70,10927	54,53624	73,29745	73,29745	50,12184	65,08176	60,05424
G	0,074	67,65682	53,80051	77,09874	72,19385	54,78149	73,91056	72,43909
H	0,078	68,39256	48,40513	70,845	64,83651	72,92958	69,86402	55,02673

Média – 64,45 % D.P. - $\pm 8,70$

Tabela A.9 – Absorbâncias obtidas para células T47D irradiadas com 2 Gy de radiação gama e expostas a 1.250 V/cm de campo elétrico estático por 24 h. Experimento: Efeito combinado de radiação e campo.

	BRANCO	2	3	4	5	6	7	8	9
A	0,073	0,697	0,552	0,604	0,514	0,633	0,581	0,574	0,657
B	0,067	0,697	0,555	0,565	0,512	0,702	0,552	0,599	0,643
C	0,093	0,606	0,523	0,526	0,639	0,561	0,523	0,693	0,554
D	0,086	0,5	0,664	0,534	0,663	0,531	0,673	0,668	0,608
E	0,065	0,533	0,546	0,72	0,641	0,627	0,7	0,617	0,506
F	0,063	0,669	0,7	0,699	0,609	0,726	0,683	0,515	
G	0,063	0,672	0,659	0,615	0,712	0,602	0,679	0,699	
H	0,063	0,532	0,629	0,633	0,719	0,659	0,638	0,669	

Tabela A.10 - Viabilidade celular obtida em porcentagem para células T47D irradiadas com 2 Gy de radiação gama e expostas a 1.250 V/cm de campo elétrico estático por 24h. Experimento: Efeito combinado de radiação e campo.

	BRANCO	2	3	4	5	6	7	8	9
A	0,073	76,68489	58,90466	65,28102	54,24502	68,83706	62,46071	61,60235	71,78
B	0,067	76,68489	59,27253	60,49875	53,99977	77,298	58,90466	64,66791	70,06329
C	0,093	65,52626	55,34862	55,71648	69,5728	60,00826	55,34862	76,1944	59,14991
D	0,086	52,5283	72,63835	56,69746	72,51573	56,32959	73,74195	73,12884	65,77151
E	0,065	56,57484	58,16893	79,5052	69,81804	68,10133	77,05275	66,87511	53,26404
F	0,063	73,25146	77,05275	76,93013	65,89413	80,24093	74,96818	54,36764	
G	0,063	73,61933	72,02524	66,62986	78,52422	65,03577	74,47769	76,93013	
H	0,063	56,45222	68,34657	68,83706	79,38258	72,02524	69,45017	73,25146	

Média – 67,02% D.P. - $\pm 8,27$

Tabela A.11 - Absorbâncias obtidas para células T47D irradiadas com 4 Gy de radiação gama. Experimento: Efeito combinado de radiação e campo.

	BRANCO	2	3	4	5	6	7	8	9
A	0,076	0,492	0,458	0,414	0,202	0,413	0,477	0,377	0,274
B	0,071	0,462	0,393	0,243	0,428	0,306	0,23	0,318	0,226
C	0,067	0,449	0,345	0,291	0,378	0,28	0,356	0,263	0,386
D	0,069	0,321	0,265	0,347	0,389	0,202	0,247	0,222	0,321
E	0,074	0,271	0,261	0,257	0,292	0,531	0,186	0,179	0,278
F	0,075	0,203	0,221	0,238	0,253	0,417	0,201	0,452	0,21
G	0,066	0,223	0,533	0,217	0,208	0,37	0,478	0,492	
H	0,066	0,184	0,409	0,198	0,199	0,228	0,393	0,307	

Tabela A.12 – Viabilidade celular obtida em porcentagem para células T47D irradiadas com 4 Gy de radiação gama. Experimento: Efeito combinado de radiação e campo.

	BRANCO	2	3	4	5	6	7	8	9
A	0,076	51,68528	47,51612	42,12074	16,12483	41,99812	49,84594	37,58372	24,95363
B	0,071	48,00661	39,54567	21,15234	43,83745	28,87754	19,55825	30,34901	19,06776
C	0,067	46,41252	33,65981	27,03821	37,70634	25,68936	35,00865	23,60478	38,68732
D	0,069	30,71687	23,85003	33,90505	39,05519	16,12483	21,64283	18,57727	30,71687
E	0,074	24,58576	23,35954	22,86905	27,16083	56,46754	14,16287	13,30451	25,44412
F	0,075	16,24745	18,45465	20,53923	22,37856	42,48861	16,0022	46,78039	17,1058
G	0,066	18,69989	56,71279	17,96416	16,86056	36,72536	49,96857	51,68528	
H	0,066	13,91762	41,50763	15,63434	15,75696	19,313	39,54567	29,00016	

Média – 30,24%

D.P. - $\pm 12,42$

Tabela A.13 - Absorbâncias obtidas para células T47D irradiadas com 4 Gy de radiação gama e expostas a 1.250 V/cm de campo elétrico estático por 24 h. Experimento: Efeito combinado de radiação e campo.

	BRANCO	2	3	4	5	6	7	8
A	0,068	0,517	0,317	0,247	0,178	0,409	0,459	0,467
B	0,072	0,409	0,212	0,189	0,448	0,453	0,451	0,496
C	0,062	0,327	0,422	0,181	0,379	0,366	0,505	0,474
D	0,069	0,272	0,342	0,53	0,293	0,357	0,445	0,483
E	0,063	0,241	0,333	0,445	0,236	0,258	0,408	0,357
F	0,067	0,245	0,195	0,414	0,206	0,456	0,286	0,251
G	0,084	0,411	0,53	0,341	0,469	0,419	0,211	0,18
H	0,069	0,404	0,325	0,222	0,244	0,192	0,192	0,234

Tabela A.14 - Viabilidade celular obtida em porcentagem para células T47D irradiadas com 4 Gy de radiação gama e expostas a 1.250 V/cm de campo elétrico estático por 24h. Experimento: Efeito combinado de radiação e campo.

	BRANCO	2	3	4	5	6	7	8
A	0,068	54,89973	30,37528	21,79172	13,33079	41,65653	47,78764	48,76862
B	0,072	41,65653	17,49995	14,67963	46,4388	47,05191	46,80666	52,32466
C	0,062	31,6015	43,25062	13,69866	37,97786	36,38377	53,42826	49,62697
D	0,069	24,85728	33,44084	56,49382	27,43235	35,28017	46,07093	50,73057
E	0,063	21,05599	32,33724	46,07093	20,44288	23,14057	41,53391	35,28017
F	0,067	21,54648	15,41537	42,26964	16,76421	47,41977	26,57399	22,28221
G	0,084	41,90177	56,49382	33,31822	49,01386	42,88275	17,37732	13,57603
H	0,069	41,04342	31,35626	18,72617	21,42386	15,0475	15,0475	20,19764

Média – 33,83%

D.P. - $\pm 13,52$

A.2 Valores referentes à distribuição do ciclo celular

A análise por citometria de fluxo (FACS) obtida pelo programa WinMDI 2.8 forneceu a porcentagem de células com DNA fragmentado, em apoptose e presentes nas três fases do ciclo celular (G_0/G_1 , S e G_2/M).

Tabela A.2.1 - Análise da porcentagem média de células da linhagem T47D nas diferentes fases do ciclo celular, valores obtidos através da citometria de fluxo.

Tratamento	DNA Fragmentado/necrose	Apoptose	G_0/G_1	S	G_2/M
Controle (24hs)	72,34 ± 1,16	1,65 ± 0,27	9,11 ± 1,00	4,48 ± 0,79	12,13 ± 1,17
Controle (72hs)	68,89 ± 3,16	0,65 ± 0,04	17 ± 1,57	3,37 ± 2,13	10,16 ± 1,82
Campo (24hs)	72,71 ± 6,16	1,16 ± 0,36	9,58 ± 2,34	3,17 ± 0,96	13,29 ± 3,61
Campo (72hs)	68,21 ± 1,53	1,09 ± 0,23	16,31 ± 0,99	4,69 ± 1,2	9,98 ± 0,75
1 Gy (24hs)	71,93 ± 0,61	1,41 ± 0,09	8,54 ± 0,32	3,93 ± 1,15	14,16 ± 1,5
1 Gy (72hs)	77,85 ± 0,82	0,98 ± 0,23	10,84 ± 0,55	2,91 ± 0,13	7,6 ± 0,48
1 Gy + C (24hs)	72,75 ± 1,03	1,19 ± 0,16	7,44 ± 0,15	5,28 ± 1,84	13,53 ± 1,79
1 Gy + C (72hs)	70,03 ± 1,49	1,14 ± 0,04	15,61 ± 0,14	3,65 ± 0,52	9,65 ± 0,74
2 Gy (24hs)	75,87 ± 2,73	1,40 ± 0,14	6,04 ± 1,22	3,92 ± 1,06	12,60 ± 1,79
2 Gy (72hs)	95,55 ± 0,84	0,39 ± 0,06	2,16 ± 0,35	0,80 ± 0,26	1,15 ± 0,24
2 Gy + C (24hs)	72,62 ± 0,65	1,21 ± 0,09	6,43 ± 1,05	5,09 ± 1,22	14,38 ± 1,80
2 Gy + C (72hs)	92,16 ± 1,67	0,46 ± 0,02	4,06 ± 0,91	1,30 ± 0,3	2,12 ± 0,51
4 Gy (24hs)	74,28 ± 3,47	1,34 ± 0,20	4,67 ± 0,34	3,89 ± 1,15	15,84 ± 2,25
4 Gy (72hs)	93,89 ± 0,25	0,61 ± 0,06	1,87 ± 0,13	1,36 ± 0,13	2,36 ± 0,23
4 Gy + C (24hs)	79,75 ± 0,60	0,90 ± 0,09	3,72 ± 0,25	2,47 ± 0,83	13 ± 0,86
4 Gy + C (72hs)	96,10 ± 0,22	0,39 ± 0,04	1,12 ± 0,06	0,84 ± 0,12	1,60 ± 0,19

APÊNDICE B – Equações para curva de sobrevivência

B.1 Estatística de Boltzmann

A literatura científica contém inúmeros trabalhos em que modelos radiobiológicos têm sido propostos e testados para a descrição de curvas de sobrevivência (Alpen, 1991; Sánchez-Reyes, 1992; Hall, 1994).

O mais completo e sofisticado desses modelos foi desenvolvido por Sánchez-Reyes (1992), onde a fração de sobrevivência S é descrita por uma expressão a 3 parâmetros (A , B_0 e C) em função da dose D :

$$\ln S(D) = -\alpha D - \beta D^2 + O(C^2 \cdot D^3) \quad (1)$$

em que, $\alpha = A(1 - B_0)$, $\beta = (B_0 A C)/2$ e $O(C^2 \cdot D^3)$ representa termos de ordem superior (detalhes em Sánchez-Reyes, 1992, p.141).

Contudo, no grupo de pesquisa em que foi desenvolvido o presente trabalho, buscou-se uma alternativa mais simples e conceitualmente mais transparente para a descrição de curvas de sobrevivência. A partir de um *ansatz* postulou-se, inicialmente, que todas as curvas de sobrevivência deveriam exibir um comportamento, em função da dose, descrito pela mesma estatística utilizada no estudo da cinética dos gases perfeitos, isto é, a “Estatística de Boltzmann” (Sears, 1959). A justificativa teórica é apresentada em trabalho a ser submetido à publicação (Arruda-Neto et al., 2008). Neste caso teríamos então,

$$S = S_0 \cdot \exp(-\beta^2 \cdot D^2) \quad (2)$$

Partindo-se de $S_0 = 1$ (100% de células viáveis no início, isto é, para dose igual a zero), verificamos que a equação 2 é MONOPARAMÉTRICA em β . Trata-se, portanto de uma descrição muito simples.

Realizamos um ajuste da equação 2 aos dados experimentais obtidos neste trabalho (Figura 4 – veja Discussão), sendo que para $\beta = 0,34$ obteve-se um qui-quadrado (χ^2) próximo de 1.

B.2 A questão relativa à dose D_0

A dose D_0 é definida em Radioterapia como sendo a dose requerida para reduzir o número de células clonogênicas a uma fração igual a $1/e$ das células iniciais, ou seja, de um fator igual a 0,37. Contudo, a definição não estabelece com clareza a partir de que ponto da curva de sobrevivência devemos calcular a D_0 . Menciona-se genericamente que essa dose deve ser obtida na região de comportamento exponencial da curva de sobrevivência, que corresponde a uma reta em representação semilogarítmica.

Nesse sentido, faremos a seguir a dedução de uma **expressão analítica geral** para a D_0 , supondo-se que a dose de partida para o cálculo seja igual a D_1 , e que a curva de sobrevivência seja descrita por uma expressão derivada da “Estatística de Boltzmann” (Equação 2). Então,

$$S = S_0 \exp(-\beta^2 D^2)$$

em que S_0 é o número de células iniciais (correspondendo a $D = 0$) e S é o número de células sobreviventes à dose D .

Neste caso, a fração de sobreviventes será dada por

$$s = \frac{S}{S_0} = \exp(-\beta^2 D^2) \quad (3)$$

Suponhamos que a fração referente à dose D_1 seja igual a s_1 e para a dose D_2 igual a s_2 . Mas, $\ln(s) = -\beta^2 D^2$ (4)

e,
$$\ln(s_1) - \ln(s_2) = -\beta^2 (D_1^2 - D_2^2) \quad (5)$$

ou seja,
$$\ln\left(\frac{s_1}{s_2}\right) = \beta^2 (D_2^2 - D_1^2) \quad (6)$$

Suponhamos agora que $s_2 = 0,37s_1 = (1/e) \cdot s_1$. Neste caso, teremos que $D_0 = D_2 - D_1$. Substituindo-se s_2 na expressão anterior:

$$\ln\left(\frac{s_1}{s_2}\right) = \ln\left(\frac{1}{0,37}\right) = \beta^2 (D_2^2 - D_1^2) \quad (7)$$

mas como $\beta^2 = 0,34^2$ temos que

$$D_2^2 - D_1^2 = \frac{1}{0,34^2} \ln\left(\frac{1}{0,37}\right) = 8,60 \quad (8)$$

$$\text{ou, } D_2^2 = D_1^2 + 8,6 \Rightarrow D_2 = \sqrt{D_1^2 + 8,6} \quad (9)$$

Finalmente, $D_0 = D_2 - D_1$ ou

$$D_0 = \sqrt{D_1^2 + 8,6} - D_1 \quad (10)$$

Portanto, como era de se esperar, a D_0 é função da “dose de partida” D_1 .

Se quisermos calcular a dose necessária para reduzir o número inicial de células de 63%, deveremos considerar como “dose de partida” $D_1 = 0$ que, pela expressão acima (Equação 10), leva a $D_0 = 1/0,34 = 1/\beta = 2,94$ Gy.

Por outro lado, caso consideremos $D_1 = 4$ Gy, correspondendo a uma “dose de partida” na região linear da curva de sobrevivência em escala semilog, obteremos $D_0 = 0,96$ Gy.

Na figura a seguir mostramos a curva correspondente à equação 10.

FIGURA B.1 – Valores de D_0 (Gy) para diferentes doses de partida (D_1) em Gy.

Observa-se que os valores de D_0 são fortemente dependentes de D_1 para doses mais baixas, enquanto que para doses mais altas converge assintoticamente para um valor constante em torno de 0,2 Gy.

B.3 Interpretação do parâmetro β

Consideremos uma dose D_0 que seja igual a β^{-1} ($D_0 = 1/\beta$). Então, substituindo-se na equação 2, para $S_0 = 1$, obtemos

$$S = \exp(-\beta^2 \cdot D^2) = \exp(-\beta^2 \cdot \beta^{-2}) = \exp(-1) = 0,37, \text{ isto é, } 37\% \text{ de sobreviventes.}$$

Neste trabalho com as células T47D, essa dose é igual a

$$D_0 = \frac{1}{\beta} = \frac{1}{0,34} = 2,94 \text{ Gy} \quad (11)$$

De acordo com modelos do tipo alvos múltiplos (Alpen, 1991), a D_0 é a dose que produz em média um dano letal por célula.

B.4 Taxa de Mortalidade celular

A fração de células mortas (não-viáveis) M é dada por

$$M = 1 - S = 1 - \exp(-\beta^2 \cdot D^2) \quad (12)$$

e a taxa de mortalidade celular, isto é, a fração de células mortas por unidade de dose (por Gray), é calculada pela derivada de M em relação a D , ou seja,

$$\frac{dM}{dD} = -\frac{dS}{dD} = 2 \cdot \beta^2 \cdot D \cdot \exp(-\beta^2 \cdot D^2) \quad (13)$$

Substituindo-se $\beta = 0,34$ na equação 11 obtemos,

$$\frac{dM}{dD} = 0,23 \cdot \exp(-0,1156 \cdot D^2) \quad (14)$$

e esta taxa está desenhada na figura 4.