

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA

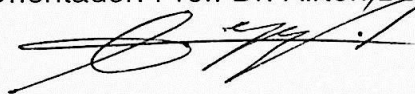
INSTITUTO DE FÍSICA

Serviço de Biblioteca e Informação

Tombo: ~~3957~~ 3957 ex. 1

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO
EXPERIMENTAL PARA MEDIDAS DE
QUEBRAS DE FITA SIMPLES (SSB) E FITA
DUPLA (DSB) EM MOLÉCULAS DE ÁCIDO
DESOXIRRIBONUCLEICO (DNA) IRRADIADAS
POR PRÓTONS DE 10 MeV**

Jorge de Oliveira Echeimberg
Orientador: Prof. Dr. Airton Deppman



Dissertação apresentada ao Instituto de Física da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências, pelo curso de Pós-graduação em Física – Área de concentração: Física.

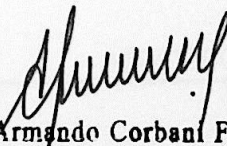
SBI-IFUSP



305M810T3957

Comissão examinadora

Prof. Dr. Airton Deppman (IFUSP)
Profa. Dra. Márcia de Almeida Rizzutto (IFUSP)
Prof. Dr. Hélio Yoriyaz (IPEN)



Prof. Armando Corbani Ferraz
Presidente da Comissão de Pós Graduação
São Paulo
2003

def. 18/12/03

572.86

E18d

M

ex.1

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Echeimberg, Jorge de Oliveira

Desenvolvimento de um método experimental para medidas de quebras de fita simples (SSB) e fita dupla (DSB) em moléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA) irradiadas por prótons de 10 MeV.

São Paulo, 2003

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo.
Instituto de Física. Departamento de Física Experimental

Orientador: Prof. Dr. Airton Deppman

Área de Concentração: Física

Unitermos: 1. Próton; 2. ADN;
3. SSB; 4. Eletroforese;
5. porta-amostras.

USP/IF/SBI-003/2004

*“ O Ser é eterno; pois existem leis para
conservar os tesouros da vida, às quais o
Universo recorre para tirar beleza.”*

Goethe

*Dedico este trabalho à minha querida
esposa Raquel e aos meus filhos, Markus e
Lucas, que sempre me apoiaram nas mais
difíceis jornadas da vida.*

AGRADECIMENTOS

Ao amigo e orientador Prof. Dr. Airton Deppman pelas diretrizes seguras e permanente incentivo.

Ao Prof. Dr. Nemitala Added pelas sugestões e utilização do acelerador linear Pelletron, no Instituto de Física da USP.

À amiga e aluna de pós-graduação Andreia N. Gouveia pela ajuda nos procedimentos experimentais realizados no ICB.

À Prof^ª. Dr^ª. Ana Clara Schenberg e à Prof^ª. Dr^ª. Elisabete José Vicente pela utilização dos recursos do Laboratório de Genética Molecular de Microorganismos, no Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

A todos que direta ou indiretamente, colaboraram na execução deste trabalho.

RESUMO

ECHEIMBERG, J. O. **Desenvolvimento de um método experimental para medidas de quebras de fita simples (SSB) e fita dupla (DSB) em moléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA) irradiadas por feixe de prótons de 10 MeV.** 2003. 107 p. Dissertação de Mestrado – Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Atualmente há grande interesse na aplicação de feixes de prótons em terapias de controle do câncer devido à curva de Bragg do próton exibir seu pico característico. Entretanto, como os experimentos para medir a interação próton-DNA são de difícil realização, pouco se conhece a respeito dos efeitos deste tipo de interação. As dificuldades experimentais são grandemente intensificadas devido ao fato de a energia do próton situar-se na região de 10 MeV. O dimensionamento do aparato experimental foi rigorosamente calculado por meio de simulações computacionais do experimento real utilizando a ferramenta GEANT 3.21. O aparato foi composto de um sistema de porta-amostras e suportes de alumínio. Um método de dosimetria alternativo foi desenvolvido por meio das medidas de traços de prótons em filmes poliméricos (Makrofol-E), que também serviram como vedação às amostras de DNA. A eficiência do Makrofol-E foi obtida como $(0,75 \pm 0,25)\%$. A técnica de eletroforese em gel de agarose foi aprimorada e um programa foi construído especialmente para análise e quantificação das quebras tipo SSB e DSB. A fração de sobrevivência, ϕ , obedece a uma lei de decaimento exponencial com a dose. As constantes de decaimento, γ , para DNA em H₂O e em solução contendo glicerol (7,4 mM) foram obtidas como $(30 \pm 7) \cdot 10^{-4} \text{Gy}^{-1}$ e $(39 \pm 6) \cdot 10^{-4} \text{Gy}^{-1}$, respectivamente.

Palavra-chave: Próton, DNA, SSB, DSB, eletroforese, porta-amostras, quantificação

SUMMARY

ECHEIMBERG, J. O. **Development of an experimental method for measures of single strand breaks (SSB) and double strand breaks (DSB) in molecules of deoxyribonucleic acid (DNA) irradiated by proton beams of 10 MeV.** 2003. 107 pp. Dissertation of Master's degree - Institute of Physics, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Nowadays there is great interest in the application of proton beams in therapies for the control of cancer due to the Bragg curve with its characteristic peak. However, as the experiments to measure the interaction proton-DNA are of difficult accomplishment, the knowledge regarding the effects of this interaction type is not sufficient. The experimental difficulties are largely intensified due to the energy range of the proton at 10 MeV. The project of the experimental apparatus was calculated strictly through computational simulations with the GEANT 3.21 simulation tool. The apparatus was compound by a system of sample compartment and supports, all pieces made on aluminum. An alternative dosimetric method was accomplished through the measurements of proton tracks in polymer films (Makrofol-E), which also serve as blocking to the samples of DNA. The Makrofol-E efficiency found was $(0,75 \pm 0,25)\%$. The electrophoresis technique in agarose gel was improved and a program was especially built for analysis and quantification of the SSB and DSB damages. The survival fraction, ϕ , obeys exponential decay law with dose. The decaiment constants, γ , for aqueous DNA and aqueous DNA plus glycerol (7,4 mM) were $(30 \pm 7) \cdot 10^{-4} \text{Gy}^{-1}$ and $(39 \pm 6) \cdot 10^{-4} \text{Gy}^{-1}$, respectively.

Key word: Proton, DNA, SSB, DSB, electrophoresis, sample compartment, quantification

SUMÁRIO

	p.
RESUMO	
SUMMARY	
I – INTRODUÇÃO.....	01
II – OBJETIVOS.....	04
III – ÁCIDOS NUCLEICOS.....	05
1. Ácido ribonucleico.....	05
2. Ácido desoxirribonucleico.....	07
2.1 Métodos para estudar o DNA.....	10
2.1.1 Eletroforese em gel.....	11
2.2 Os números de ligação L_k , de giro W_k e torção T_w	16
2.3 Detecção de DNA em gel de agarose.....	19
2.3.1 Reprodutibilidade em gel de agarose.....	21
IV – INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO IONIZANTE COM A MATÉRIA.....	23
1. Interação de partículas carregadas com a matéria.....	23
1.1 O potencial de ionização médio, I , e a energia média para criação de um par de íons, W	25
1.2 Processos relevantes de interação.....	27
2. A dose absorvida.....	28
2.1 O poder de freamento do meio (<i>Stopping Power</i>).....	31
2.2 O alcance.....	35
2.3 A curva de Bragg.....	37
3. Interação da radiação com sistemas biológicos.....	38

V – MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
1. Purificação do pBKS.....	43
2. Irradiação do pBKS.....	44
3. Recuperação do pBKS.....	53
4. Simulação dos processos físicos.....	54
5. Análise e quantificação do pBKS.....	57
5.1 Sistema de aquisição de imagens.....	59
6. Técnica dosimétrica alternativa.....	61
VI – ANÁLISE DE DADOS E RESULTADOS.....	63
1. Estudo da variação da densidade óptica intergrada <i>DOI versus</i> o tempo de corrida do DNA em gel de agarose.....	63
2. Estimativa da incerteza relativa na medida da <i>DOI</i>	71
3. Calibração por meio de marcadores de peso molecular.....	76
4. Técnicas de tratamento de imagens.....	78
5. Cálculo do número de quebras do tipo <i>SSB</i>	80
6. Cálculo da dose.....	81
7. Medidas dos traços de prótons em filme de Makrofol-E.....	83
8. Medidas das quebras tipo <i>SSB</i>	89
VII – CONCLUSÃO.....	95
ANEXO.....	98
APÊNDICE.....	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102

Capítulo I: Introdução

Desde a descoberta dos raios-X por Wilhelm Conrad Röntgen, em 1895, a comunidade científica percebeu que esses raios poderiam ter grandes aplicações na medicina. Mais tarde, por volta de 1920, iniciaram-se estudos relativos à aplicação dos raios-X em outras áreas.

Hoje em dia, existe uma variedade de aplicações, não só dos raios-X, mas também de outras formas de radiação como os raios gama, nêutrons, pósitrons, betas, elétrons, íons pesados e, mais recentemente, os prótons.

Prótons são partículas de interesse em astronáutica (Yang, 1999) devido à exposição de seres humanos e equipamentos a esse tipo de radiação durante as viagens espaciais. Na medicina, os prótons são utilizados tanto na terapia de controle do câncer quanto no diagnóstico de patologia por imagens adquiridas em tomografia.

O interesse pela utilização de prótons na medicina é devido a sua curva de Bragg possuir um pico característico. Ao interagir com o meio material o próton perde sua energia a uma taxa constante enquanto penetra no material, mas em uma dada profundidade de penetração ele perde toda sua energia cinética remanescente de uma só vez (pico). Essa característica é de extrema vantagem no tratamento do câncer porque os tecidos sadios adjacentes ao tumor têm maior possibilidade de ser preservados durante a penetração do próton enquanto o pico de deposição de energia da partícula ocorre no tumor. Existem alguns centros de protonterapia no mundo, entre eles o de Loma Linda, nos Estados Unidos, que têm grande interesse nos efeitos biológicos advindos das interações com prótons (Milligan et al., 2002).

A radiobiologia está preocupada em estudar os efeitos oriundos das interações da radiação ionizante com o meio biológico, especificamente com

INTRODUÇÃO

moléculas importantes como o DNA (ácido desoxirribonucleico) (Rossi et al., 1996; Steel, 1996).

Os sistemas biológicos são formados, em grande parte (~80%), por água. Dessa forma, as interações da radiação ionizante com moléculas de água são mais freqüentes. Como resultado dessas interações ocorrem processos de reações químicas complexas e ainda não totalmente compreendidas (Rossi et al., 1996) onde o radical OH é o mais importante devido a sua afinidade com o DNA (Simmons et al., 1999; Friedberg et al., 1995).

Recentemente, vários estudos experimentais e teóricos foram realizados sobre a interação da radiação com moléculas de DNA em solução aquosa. Estes estudos permitem uma maior compreensão dos efeitos da radiação sobre essas moléculas orgânicas, bem como sobre os mecanismos que produzem danos na sua estrutura. Deve-se lembrar, entretanto, que as condições intra-celulares podem ser muito diversas daquelas na solução, e portanto mecanismos diferentes, do ponto de vista de interação podem ser mais ou menos relevantes em cada situação.

O DNA é uma molécula formada por duas fitas de bases nitrogenadas ligadas por pontes de hidrogênio, lembrando um *zíper* torcido. Sendo assim, um radical OH pode interagir com uma fita produzindo uma quebra em uma das fitas, conhecida como quebra de fita simples (*SSB*) ou, dois radicais OH podem produzir uma quebra em uma fita e outra quebra na outra fita, conhecida como quebra de fita dupla (*DSB*). Se essas quebras não forem reparadas pelo mecanismo de reparo do sistema biológico, ocorrerá um dano ao DNA que poderá culminar em um processo de falência do sistema (morte) (Steel, 1996).

A formação de SSB e DSB tem sido o parâmetro escolhido para o estudo radiação-DNA em solução aquosa, pois estes danos são facilmente observáveis através análise de eletroforese em gel de agarose.

Esta técnica pode ser utilizada para quantificar o número de moléculas não quebradas e calcular o número de quebras do tipo SSB. Para uma análise quantitativa mais rigorosa, entretanto, uma série de cuidados e uma rigorosa escolha de parâmetros deve ser adotada.

A forma esperada de uma molécula de DNA é a superenrolada, mas, se ocorrer uma quebra tipo SSB a molécula migra para a forma circular fechada e, se ocorrer uma quebra tipo DSB no DNA superenrolado este migra para forma linear. Se o DNA se encontra na forma linear e mais quebras ocorrerem a molécula simplesmente migra para forma superfragmentada.

O resultado da eletroforese em gel é uma imagem do gel mostrando as bandas de DNA nas formas já citadas.

A quantificação dos danos SSB e DSB é feita com base nas diferentes formas em que o DNA pode aparecer (superenrolado, circular e linear). Para isto, um programa capaz de analisar corretamente a imagem do gel é de grande importância, já que o método de digitalização das imagens de eletroforese pode influenciar significativamente os resultados, assim como o algoritmo de processamento e análise das mesmas. Por isso, um estudo foi realizado com o propósito de otimizar a digitalização e, além disso, um programa para processamento e quantificação do DNA foi criado por nosso grupo.

Capítulo II: Objetivos

O objetivo principal deste trabalho é desenvolver uma técnica experimental que permita o estudo quantitativo da interação entre prótons e moléculas de DNA em solução aquosa. As quebras do tipo SSB e DSB foram escolhidas para este estudo.

Para atingir este objetivo, os seguintes passos intermediários devem ser superados:

- Desenvolvimento de um porta-amostras com dimensões adequadas, a serem obtidas por meio de simulações completas do experimento;
- Aprimoramento da técnica de eletroforese em gel de agarose para permitir uma precisa quantificação das moléculas nas formas superenrolada, circular fechada, linear e superfragmentada;
- Desenvolvimento de um algoritmo computacional que permita a análise do gel de eletroforese;
- Desenvolvimento de uma técnica dosimétrica para prótons que seja adequada às condições experimentais.

Finalmente, após o desenvolvimento da técnica, alguns dados experimentais obtidos foram comparados com os resultados da literatura.

Capítulo III: Ácidos nucleicos

A reprodução e a renovação de materiais estruturais são características essenciais dos organismos vivos. Para que haja reprodução é necessário que a informação genética seja transmitida de um ser vivo para seus descendentes. Essa informação está contida nos núcleos das células, mais precisamente nos ácidos nucleicos. Os ácidos nucleicos são polímeros, isto é, moléculas grandes que consistem de cadeias de unidades mais simples (Atkins et al., 2001). O número de unidades pode variar de 80 no caso do RNA (*ácido ribonucleico*) até 10^8 , no DNA (*ácido desoxirribonucleico*) cromossômico. As partes estruturais e operacionais dos organismos vivos são compostas basicamente por moléculas grandes chamadas proteínas. Os ácidos nucleicos têm um importante papel servindo como molde na biossíntese de proteínas a partir dos aminoácidos (Sienko et al., 1976).

1. Ácido ribonucleico

Os *ácidos ribonucleicos* são polímeros mantidos por ligações de fosfato que formam pontes entre moléculas de açúcar. A figura 3.1 mostra um *nucleotídeo*. O *nucleotídeo* consiste de uma *base nitrogenada*, uma *ose* e um ou mais grupamentos *fosfato*. No caso do RNA a *ose* é uma *ribose* (açúcar), figura 3.2.

A base nitrogenada é um derivado de purina ou pirimidina, figura 3.3. As purinas do RNA são a (A) adenina e a (G) guanina enquanto as pirimidinas são a (U) uracila e a (C) citosina, conforme figura 3.4.

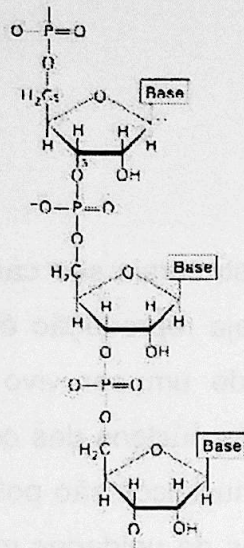


Figura 3.1 – Na molécula de RNA pode-se observar os nucleotídeos, que são as unidades repetidas ao longo da cadeia

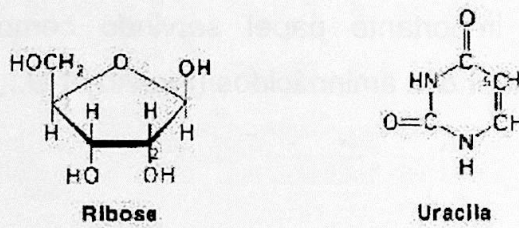


Figura 3.2 – Uma ribose(açúcar) e uma uracila(base)

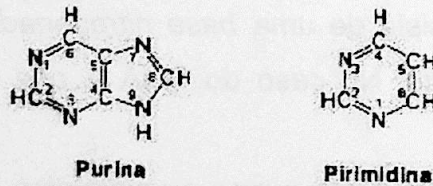


Figura 3.3 – Fórmula molecular de uma purina e de uma pirimidina

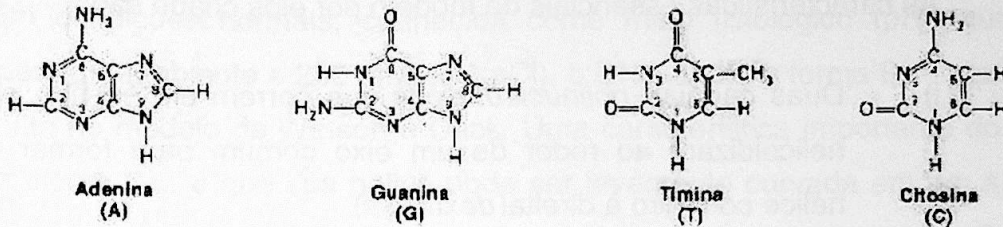


Figura 3.4 – Purinas e pirimidinas do DNA

O RNA é uma molécula que consiste de um único filamento, entretanto, pode formar uma dupla-hélice modificada, na qual os pares de bases são inclinados cerca de 20° para fora do eixo perpendicular ao da hélice, como a estrutura do A-DNA, figura 3.6 (Stryer, 1996).

2. Ácido desoxirribonucleico

Em 1953, James Watson e Francis Crick deduziram a estrutura tridimensional do DNA e o seu mecanismo de replicação. Eles estudaram fotografia de difração de raios-x de fibras de DNA, figura 3.5.

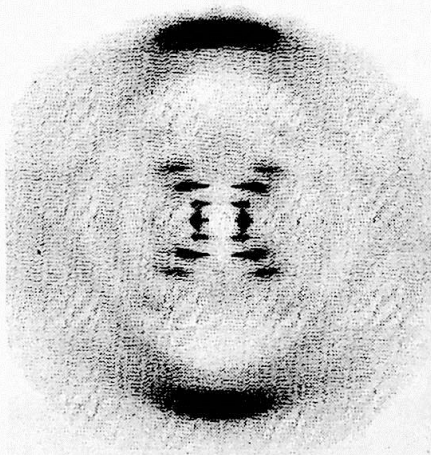


Figura 3.5 – Fotografia de uma difração por raios-X de uma fibra de B-DNA orientada verticalmente. A forma em X do padrão das manchas pretas é indicativa de uma hélice

As características essenciais do modelo por eles criado são:

- i) Duas cadeias *polinucleotídicas* que correm em sentido oposto e se helicoidizam ao redor de um eixo comum para formar uma dupla hélice com giro à direita(*dextrorsa*).
- ii) As bases *purínicas* e *pirimidínicas* estão no interior da hélice, enquanto as unidades fosfato e *desoxirribose* estão na parte externa.
- iii) A adenina pareia-se com a timina, e a guanina com a citosina. Os pares de bases A-T são mantidos por duas pontes de hidrogênio com orientação precisa, e os pares G-C por três destas pontes. A dupla hélice também é estabilizada por interações entre bases empilhadas no mesmo filamento.

O pareamento mostra que as seqüências das duas fitas da dupla hélice obedecem ao *princípio da complementaridade*. Esse princípio é a lei mais importante no campo do DNA, e, provavelmente, a lei mais importante da natureza viva (Frank, 1997).

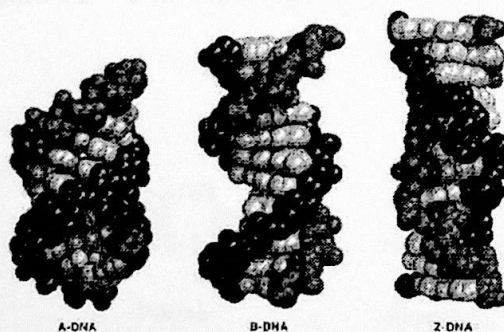


Figura 3.6 – Estrutura das moléculas de DNA A, B e Z.

Em condições normais, conhecida como meio fisiológico (pH neutro, temperatura ambiente e 200 mM de NaCl), o DNA adota a forma B, aquela descrita no modelo de Watson e Crick. Uma característica importante do B-DNA, figura 3.6, é que sua hélice pode ser levemente curvada em um arco ou pode ser superhelicoidizada com pouca alteração em sua estrutura. Essa facilidade tem um importante papel biológico; pois, o B-DNA pode ser levado ao estado circular ou enrolado em torno de proteínas.

Outras formas de DNA são comuns como o DNA-A e o DNA-Z. Outras pouco comuns são DNA-B', DNA-H, triplexos com 3 hélices e quadriplexos com 4 hélices entre outras.

A forma B pode transitar para a forma A se a umidade relativa for menor do que 75% (Stryer, 1996). A hélice do DNA-A é mais curta e larga do que a do DNA-B, e seus pares de bases são planos, mas fazem um ângulo considerável com o eixo da dupla hélice, 19°.

Seqüências de pirimidina e purinas alternadas adotam a forma Z preferencialmente se a seqüência for curta. Essa forma é preferida pelo DNA esticado ao invés da forma superenrolada. Outra característica importante do DNA-Z e que faz jus ao seu nome é que os fosfatos fazem *ziguezague*, isso ocorre porque a unidade que se repete é um dinucleotídeo (GCGCGC...) em vez de um mononucleotídeo. Na estrutura do DNA-Z observa-se apenas um sulco profundo diferentemente das formas A e B que possuem dois sulcos. O significado biológico do DNA-Z ainda está para ser elucidado.

2.1 Métodos para estudar o DNA

Muitos métodos utilizados no estudo de estruturas moleculares são usados no estudo do DNA. Esses métodos podem ser diretos ou indiretos. A análise por raios-x é um exemplo de método direto.

ÁCIDOS NUCLEICOS

Tabela 3.1 – Comparação entre DNA das formas A, B e Z

	<i>Tipo de hélice</i>		
	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>Z</i>
<i>Forma</i>	Mais larga	Intermediária	Mais estreita
<i>Progressão por par de bases</i>	2,3 Å	3,4 Å	3,8 Å
<i>Diâmetro da hélice</i>	25,5 Å	23,7 Å	18,4 Å
<i>Sentido da torção</i>	Dextrorsa	Dextrorsa	Sinistrorsa
<i>Ligação glicosídica</i>	anti	Anti	anti para C, T
<i>Pares de bases por volta da hélice</i>	11	10,4	12
<i>Passo por volta da hélice</i>	25,3 Å	35,4 Å	45,6 Å
<i>Inclinação dos pares de bases em relação ao plano perpendicular ao eixo da hélice</i>	19°	1°	9°
<i>Sulco maior</i>	Estreito e muito profundo	Largo e profundo	Achatado
<i>Sulco menor</i>	Muito largo e raso	Estreito e bem profundo	Muito estreito e profundo

Watson e Crick (Squires, 2003) utilizaram um método indireto, o *fiber diffraction*, para entender a estrutura do DNA.

A Microscopia de Força Atômica (*SFM* ou *AFM*) é uma das técnicas mais utilizadas atualmente no estudo do DNA. Por meio da AFM pode-se medir a

estrutura geométrica de uma simples molécula com resolução de poucos nanômetros – a mesma resolução obtida com Microscopia Eletrônica –, por visualização direta.

Uma das vantagens desse método é a capacidade de fornecer informação completa a respeito da distribuição dos fragmentos.

Muitas outras técnicas são utilizadas com maior ou menor frequência como por exemplo *RNM* (*Ressonância Nuclear Magnética*), *Cristalografia por raios-x*, *Microscopia Crioelétrica*, *Métodos Ópticos*, etc. Todavia, a eletroforese em gel ainda é grandemente utilizada como ferramenta em engenharia genética, biotecnologia e nos estudos da biofísica do DNA (Frank, 1997; Chatterjee et al., 1991).

2.1.1 Eletroforese em gel

A eletroforese em gel foi descoberta empiricamente e introduzida como uma técnica simples de separação de moléculas de DNA em 1970. A diferença entre eletroforese em gel e eletroforese em solução é o meio; o gel é uma rede de polímeros (Frank, 1997). Os géis mais utilizados são a poliacrilamida e a agarose. A poliacrilamida é um meio mais resistente à passagem das moléculas do que a agarose, devido à matriz muito espessa de sua rede polimérica. A matriz serve para dois propósitos: primeiro, ela atenua as forças espalhadoras de difusão e convecção que dificultariam a separação do material; segundo, a matriz interage com o soluto favorecendo a separação como uma *peneira molecular* (Bergethon, 1998). Portanto, deve-se optar pelo gel de poliacrilamida quando se deseja separar fragmentos menores.

Ao interagir com um campo elétrico de intensidade E constante, uma molécula de DNA experimenta uma força elétrica F_e que é proporcional ao comprimento L da molécula. O DNA tem uma densidade linear de cargas

elétricas residuais negativas $-\rho$ ao longo de seu comprimento. Essas cargas ocorrem nas ligações de fosfato que formam pontes entre moléculas de açúcar (Sienko et al., 1976). Da interação dessas cargas com o campo elétrico externo E surge o movimento da molécula em relação ao meio. Ao se deslocar pela matriz do gel, surge uma força viscosa tipo Stokes F_v , oposta à força elétrica que rapidamente conduz a molécula à velocidade do estado estacionário, v , valendo a equação

$$v = \mu.E, \quad (3.1)$$

onde, μ é conhecido como *mobilidade eletroforética*.

Lembrando que a força elétrica atuando na molécula iônica é dada por

$$F_e = -\rho LE, \quad (3.2)$$

onde L é o comprimento da molécula e a força viscosa é dada como

$$F_v = -fv \quad (3.3),$$

onde, f é o coeficiente de atrito viscoso; fazendo o balanço das forças temos

$$v = \frac{\rho LE}{f}, \quad (3.4)$$

e substituindo este resultado na equação (3.1) obtemos

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{\rho L}{f} \quad (3.5).$$

Ainda, do movimento Browniano, obtemos a equação de movimento de *Langevin* para uma partícula (em nosso caso, uma partícula iônica)

$$m \frac{d\vec{v}}{dt} = \vec{F} - f\vec{v} + \vec{F}_a(t), \quad (3.6)$$

onde, v é a velocidade de uma partícula de massa m , F é uma força externa, f é o coeficiente de atrito viscoso e $F_a(t)$ é uma força estocástica que representa o bombardeamento incessante das moléculas do fluido. Por simplificação, supõe-se que a força estocástica é independente da velocidade do íon, isto é, suas variações são muito rápidas em relação as variações na velocidade da partícula e que a força externa seja nula. Supondo ainda que o valor esperado da força estocástica seja nulo

$$\langle F_a(t) \rangle = 0, \quad (3.7)$$

vem que

$$\langle v(t) \rangle = v_0 e^{-\frac{f}{m}t}. \quad (3.8)$$

Einstein demonstrou, em uma dimensão, que o desvio quadrático na posição da partícula é dado por (Salinas, 1997)

$$\langle (\Delta x)^2 \rangle = \frac{k_B T}{m\gamma^2} [2\gamma - 3 + 4e^{-\gamma} - e^{-2\gamma}] \quad (3.9)$$

onde, $\gamma = f/m$, k_B é a constante de Boltzmann e T a temperatura. Para tempos suficientemente longos, ou seja, $\gamma \gg 1$, temos

$$\langle (\Delta x)^2 \rangle \rightarrow \frac{2k_B T}{m\gamma} t = 2Dt, \quad (3.10)$$

sendo que

$$D = \frac{k_B T}{m\gamma} = \frac{k_B T}{f} \quad (3.11)$$

é a constante de difusão. Substituindo f da equação (3.11) em (3.4) obtém-se

$$\mu = \frac{\rho L}{f} = \frac{\rho DL}{k_B T}, \quad (3.12)$$

em outras palavras, a *mobilidade eletroforética* é proporcional a carga elétrica residual do íon, portanto, também é proporcional ao comprimento L da molécula, assim

$$\mu \propto D \cdot L \quad (3.13).$$

Dentro do gel a matriz polimérica só permite movimentos em uma dimensão, todos os outros movimentos são proibidos. Dessa forma, a molécula iônica só pode experimentar movimento Browniano em uma direção, ao longo de seu próprio eixo como se estivesse confinada dentro de um “tubo”. Da equação (3.10) t é um tempo característico necessário para um DNA sair de seu “tubo” (Frank, 1997) e $\langle (\Delta x)^2 \rangle$ é o deslocamento quadrático médio da molécula depois de ter saído de seu “tubo”. Ainda, das equações (3.10) e (3.11) têm-se que $t \propto f \langle (\Delta x)^2 \rangle$,

e como a força viscosa é proporcional ao comprimento L do DNA (eq. 3.3 e 3.5), t é proporcional a

$$t \propto LL^2 = L^3, \quad (3.14)$$

mas para o caso de um polímero enrolado ideal (Frank, 1997)

$$\langle (\Delta x)^2 \rangle \propto L, \quad (3.15)$$

vem que

$$\mu \propto 1/L, \quad (3.16)$$

portanto, a *mobilidade eletroforética* é inversamente proporcional ao comprimento do DNA. Este resultado nos diz que é possível separar fragmentos moleculares de mesma classe topológica (lineares), mas, de tamanhos diferentes, pois, cada um deles se desloca de maneira diferente através da matriz do gel. As formas circular relaxada e superenrolada (fig. 3.7) também se deslocam de maneiras diferentes através da matriz do gel.

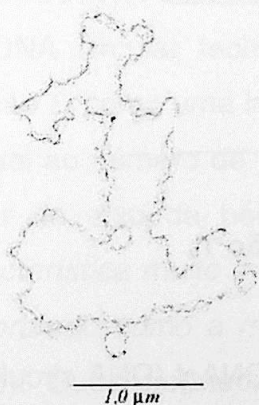


Figura 3.7 – DNA plasmidial do bacteriófago λ na forma superenrolada

As macromoléculas podem assumir geometrias variadas; isso levou Henry a deduzir um fator de correção para a *mobildade eletroforética*, $h(\kappa a)$, chamado *função de Henry* e que depende da forma da partícula por meio de seu raio a e da espessura da camada difusa (contraíons), κ , do eletrólito (Bergenthon, 1998). A camada difusa é formada de contraíons do meio que formam uma nuvem em torno da molécula iônica, a densidade dessa nuvem decai para grandes distâncias da macromolécula. A nuvem é mantida por causa do movimento térmico dos contraíons. Quando o *cátion* inicia seu deslocamento no meio atraído pelo potencial elétrico positivo, a nuvem é atraída pelo potencial negativo e, por sua vez, atrai o *cátion* no sentido oposto ao inicial. Por isso, esse potencial é também chamado de *retardação eletroforética* (Bergenthon, 1998; Frank, 1997). Assim,

$$\mu \propto [h(\kappa a)] \quad (3.17).$$

A tabela 3.2 mostra alguns valores para a função de Henry sendo que o valor 1.0 é atribuído a uma molécula esférica.

Tabela 3.2 – Valores selecionados para a função de Henry

κa	$h(\kappa a)$
0	1,0
1	1,025
10	1,26
100	1,46

2.2 Os números de ligação L_k , giro W_r e torção T_w

Em 1963 foi descoberto em alguns vírus o DNAcf (DNA circular fechado), ver figura 3.8. No mesmo ano, experiências realizadas com o DNA do vírus polioma mostraram que havia diferenças nas velocidades dos 3

componentes, superenrolado(I), linear(II) e circular(III), nessa ordem que surgiram no experimento. Mais tarde verificou-se que não havia relação entre as diferentes velocidades e os pesos moleculares, mas, com o nível de compactação das moléculas (Bauer, 1980; Voet et al., 1995).

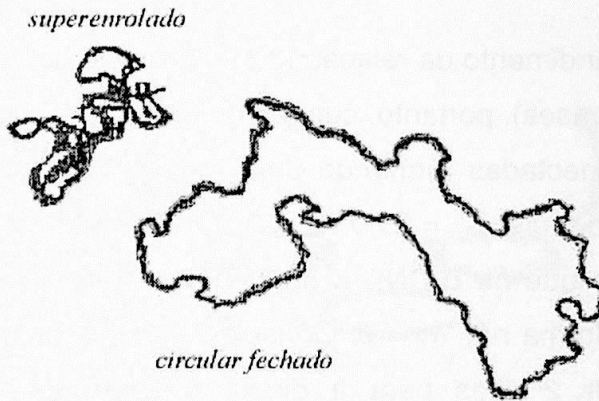


Figura 3.8 – Amostra de uma molécula de DNA circular fechada (à direita) e outra de DNA superenrolado (em cima à esquerda)

Em 1971, Fuller iniciou a aplicação das idéias topológicas (*Teoria da Fita*) ao DNA circular fechado. Dos trabalhos de Fuller surgiu o número de ligação L_k como uma importante propriedade topológica da biomolécula. O L_k é igual ao número de vezes que um filamento de DNA gira para a direita ao redor do eixo da hélice quando o eixo é mantido em um plano. *Uma característica muito importante do L_k é sua invariância para um DNAc não importando como a molécula é torcida ou girada* (Voet et al., 1995; Bauer, 1980). Duas propriedades geométricas importantes são o giro W_r e a torção T_w (Frank, 1997; Vologodskii et al., 1994). O número de giro W_r expressa o

enrolamento helicoidal de uma fita ao redor da outra enquanto o número de torção T_w é uma medida da helicoidização do eixo da dupla hélice formando os nós. Por convenção o T_w é positivo para voltas direitas em torno do eixo do duplêx.

Existe uma relação entre o número de ligação e os números de giro e torção que é dada por:

$$L_k = T_w + W_r. \quad (3.19)$$

Para um melhor entendimento da relação (3.19), imagine um B-DNA linear com 260 pb (pares de bases), portanto, com 25 giros. Suponha agora que as duas pontas sejam conectadas formando uma molécula circular relaxada. Nessa situação $L_k = 25$, pois, $T_w = 25$ e $W_r = 0$. O valor positivo do número de ligação vem do fato que no B-DNA a dupla-hélice é dextrorsa. Como o eixo da molécula não forma nó, $W_r = 0$. Considere mais uma vez o B-DNA linear, desenrole-o por 2 giros para à direita e ligue as duas pontas formando, mais uma vez, uma molécula circular fechada. Nessa nova situação tem-se $L_k = 23$, $T_w \sim 23$ e $W_r \sim 0$. Mas, também é possível obter uma superhélice negativa (dextrorsa) com $L_k = 23$, $T_w = 25$ e $W_r = -2$.

O DNA desenrolado e o superhelicoidizado têm o mesmo número de ligação, isso significa que são topologicamente idênticos, mas, geometricamente diferentes.

A superhelicoidização pode ser medida pela *densidade de superhelicoidização* (σ), que é uma medida independente do comprimento L . É de se observar que a maioria das moléculas de DNA de ocorrência natural têm superhelicoidização negativa $\sim -0,06$. A σ é dada por:

$$\sigma = \frac{(L_k - L_{K_0})}{L_{K_0}}, \quad (3.20)$$

onde, L_{K0} é o número de ligação da molécula circular relaxada, no exemplo acima $L_{K0}=25$. Já para o DNA superhelicoidizado $L_K=23$, portanto, tem-se $\sigma=-0,08$. O sinal negativo significa que, na natureza, esses polímeros surgem de um *desenrolamento* ou *subdesenrolamento*. Uma molécula de DNA superenrolada pode ser transformada em uma molécula circular relaxada por uma quebra em uma de suas fitas (SSB) (Voet, et al., 1995).

Após um experimento em gel com DNA nativo o que se espera são taxas de sedimentação diferentes para as diferentes geometrias do polímero, figura 3.10.

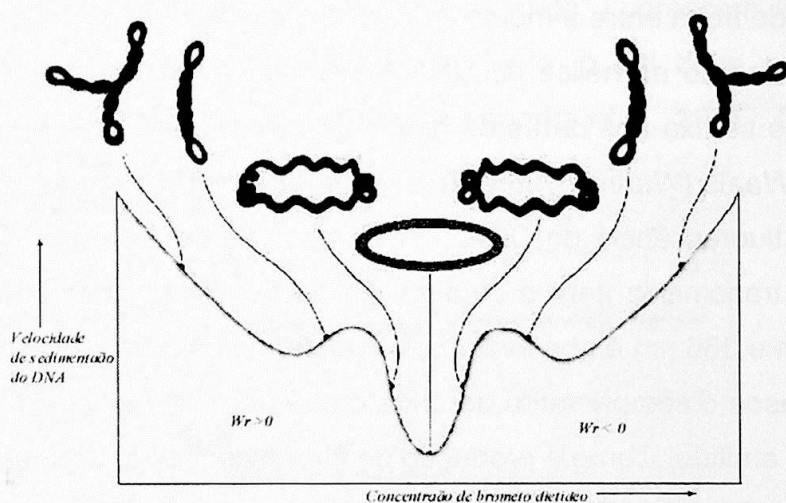


Figura 3.10 – DNA com brometo intercalado entre as bases. O brometo desenrola a macromolécula alterando seu número de giro

2.3 Detecção de DNA em gel de agarose

Os ácidos nucleicos podem ser corados e visualizados quando iluminados por luz ultravioleta (UV) de comprimento de onda igual a 254 nm. Muitos corantes podem ser utilizados, entre eles o brometodietídio é um dos mais eficazes (Maniatis et al., 2001). O brometodietídio foi sintetizado em

1950. Em 1965 Waring realizou um estudo a respeito da formação complexa entre o brometodietídio e os ácidos nucleicos (Waring, 1995). Dos resultados sabe-se que o brometo se liga fortemente ao DNA e mais fracamente ao RNA. Em baixas concentrações de sal, a molécula se liga a intervalos de 4 a 5 nucleotídeos, isto é, a cada 2 pares de bases. Após o preenchimento de todas as posições primárias um processo de ligação secundária pode ocorrer chegando à saturação com uma molécula por nucleotídeo. A intensidade da ligação primária é sensível à concentração de sal, mas não o é para o DNA desnaturado. O processo é reversível em solução mostrando uma reação de troca entre a molécula livre e a ligada.

Após a inserção na hélice do DNA o brometo permanece perpendicular ao seu eixo e se fixa aos pares de bases acima e abaixo por meio da força de Van der Waals (Waring, 1965). Essa estrutura permite um deslocamento do valor da fluorescência do DNA. A radiação UV de 254 nm é absorvida pelo DNA e transmitida para o corante. Radiação de comprimento de onda entre 302 nm e 366 nm é absorvida pela ligação do brometo com o DNA. Em ambos os casos o comprimento de onda de 590 nm na região do vermelho-alaranjado é emitido. Como a produção de fluorescência do brometo ligado é da ordem de 25 vezes maior do que da molécula não ligada, é possível detectar quantidades de ~10ng em concentrações tão baixas quanto 0,5 µg/mL de DNA (Maniatis et al., 2001). Além disso, a quantidade de fluorescência é proporcional a massa de DNA.

Quando o brometo é intercalado ao DNA circular, observa-se que o grau de superhelicidade é reduzido. Isso ocorre porque a tensão mecânica do brometo intercalado desenrola a dupla-hélice de $\sim 26^\circ$ (Voet et al. 1995, Bauer et al. 1980), portanto, a droga altera o valor de W_r que, por sua vez, modifica a velocidade de sedimentação do DNA (ver figura 3.10). Isso significa que a posição das bandas, linear e circular fechada, podem se inverter no gel como consequência da concentração de brometo.

2.3.1 Reprodutibilidade em gel de agarose

A reprodutibilidade dos resultados obtidos por meio de corrida em gel de agarose pode ser comprometida por vários fatores. Experimentos com géis, corados por brometo, mostram que o gel pré-corado é superior em reprodutibilidade ao pós-corado (White et al., 2001).

O problema do fundo (ruído) na imagem do gel (fig.3.11) pode ser minimizado expondo o gel a uma diferença de potencial elétrico. Partículas de pó, imersas em solução com brometo, fluorescem ao interagir com luz U.V (Sutherland et al., 2001). Portanto, o gel deve estar imerso em um campo elétrico por 5 horas (Brahmasandra et al., 2001). Dessa forma,

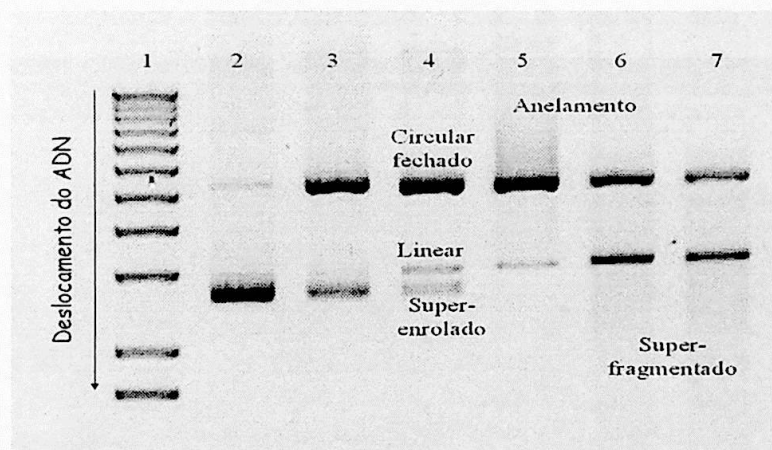


Figura 3.11 – Imagem típica de uma corrida de DNA em gel de agarose. Na figura observa-se 7 canaletas ou canais. Na imagem, as bandas se deslocam pelos canais de cima para baixo. Na canaleta 1, extrema esquerda, foi carregado um marcador de peso molecular (DNA ladder 1kb/plus). Na canaleta 2, uma amostra do DNA pBKS nas formas circular fechado e superenrolado. Nos outros canais vêem-se o pBKS nas 3 formas, circular relaxado, linear e superenrolado. No canal 7, observa-se a quarta forma, superfragmentado. As manchas na região superior da imagem são moléculas de DNA entrelaçadas, anelamento.

as partículas formadoras do fundo podem ser removidas da região do gel antes do carregamento das amostras de DNA.

Os géis de agarose devem ser rapidamente resfriados. A taxa de resfriamento do gel afeta a microestrutura da matriz e a performance do gel resultante (Kusukawa et al., 1999). As bandas do gel resfriado rapidamente têm forma definida e, portanto, são altamente resolvidas. A intensidade das bandas é medida por meio de um pico de fluorescência. A largura do pico é determinada pela distribuição das moléculas na banda. A distribuição é dependente da difusão térmica, largura inicial da banda no carregamento da amostra, do campo elétrico, da concentração do gel, das heterogeneidades da temperatura – causadas por concentrações de cargas elétricas –, das propriedades do detector, etc (Davies et al., 1999). Portanto, a distribuição das moléculas não é necessariamente normal (de Gauss). A figura 3.12 ilustra a imagem de luminância do gel da figura 3.11.

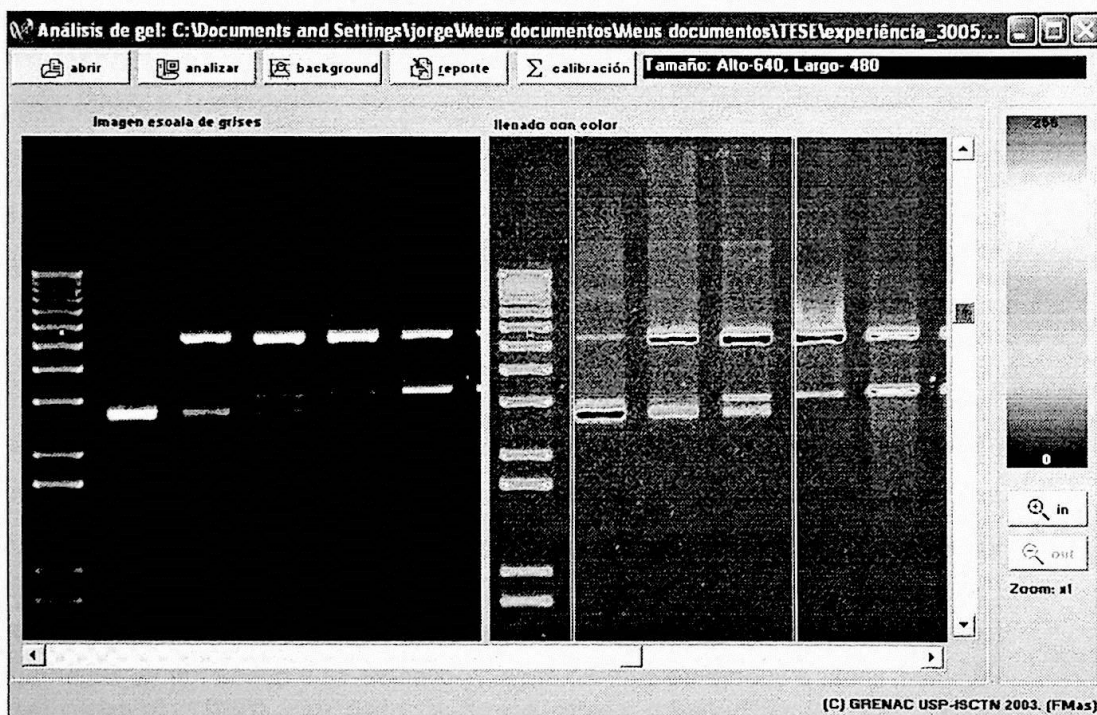


Figura 3.12 – Tela principal do programa GelAnalysis desenvolvido por nosso grupo especialmente para a análise de imagens obtidas por meio de eletroforese em gel. A imagem do lado esquerdo da tela é a mesma que a da fig. 3.11 e a do lado direito é uma transformação para níveis de cores do padrão RGB (vermelho, verde e azul). Por meio da transformação de cores pode-se visualizar melhor os detalhes das bandas de DNA e do fundo no gel

Capítulo IV: Interação da radiação ionizante com a matéria

A radiação pode ser entendida como a propagação de energia sob duas formas, a saber, *radiação ionizante* ou *radiação não ionizante* (por exemplo, o som). As *radiações ionizantes* são capazes de ionizar e ou excitar os átomos do meio que atravessam. São classificadas como:

- i) *Diretamente ionizantes*: são partículas carregadas (elétrons, pósitrons, prótons, partículas alfa, íons pesados, etc) com energia cinética suficiente para ionizar ou excitar átomos ou moléculas.
- ii) *Indiretamente ionizantes*: são partículas não carregadas (fótons, nêutrons, etc) que interagem com partículas carregadas que irão produzir ionização e ou excitação no meio material ou ainda inicializar transformações nucleares (NCRP 108, 1991; Attix, 1986).

As radiações ionizantes são de fundamental importância em *Física Médica*, *Radiobiologia* e *Radioquímica* como será visto mais a diante.

1. Interação de partículas carregadas com a matéria

Em sua trajetória uma partícula carregada sofre a ação dos campos elétricos de elétrons e núcleos dos átomos em seu redor. O número de interações é relativamente grande e a fração da energia perdida em cada interação é pequena em relação à energia cinética da partícula, análogo à perda de energia por forças de atrito. Esse processo *contínuo* é conhecido como *Continuous Slowing-Down*

Approximation (CSDA)(Attix, 1986; NCRP 108, 1991; Rossi et al., 1996, Segrè, 1953).

A probabilidade de uma partícula carregada não interagir ao atravessar um meio material depende da espessura do meio. Uma partícula *alfa* de 5 MeV, por exemplo, pode produzir ~147000 ionizações no ar seco antes de perder toda sua energia cinética (Okuno et al., 1982).

As interações coulombianas com partículas carregadas podem ser caracterizadas classicamente pelo parâmetro de impacto clássico relativo b versus o raio atômico a (Attix, 1986; Cottingham et al., 1986). Em função desses parâmetros podemos classificar as colisões em cinco tipos:

- a) Colisões *suaves* ($b \gg a$): o parâmetro de impacto é muito maior do que o raio atômico, a passagem da partícula carregada pode levar os elétrons do átomo a níveis mais energéticos e até mesmo ionizá-lo arrancando elétrons das camadas mais externas. No caso de um material dielétrico pode ocorrer emissão na faixa de luz visível, azul-claro, conhecida como radiação Cerenkov, desde que a velocidade da partícula carregada seja maior do que a velocidade da luz no material (Segrè, 1953; Jackson, 1983).
- b) Colisões *duras* ($b \sim a$): quando o parâmetro de impacto é da ordem do raio atômico a partícula incidente colide com um elétron atômico arrancando-o do átomo. Nesse tipo de colisão o elétron é considerado livre. A energia é transferida para o elétron que adquire movimento. Esses elétrons energéticos são chamados de raios delta. Se elétrons das camadas mais internas de um átomo são arrancados haverá produção de raios-X característicos ou elétrons Auger.
- c) Colisões coulombianas com o campo elétrico nuclear externo ($b \ll a$): quando o parâmetro de impacto é muito menor do que o raio atômico a interação poderá

se localizar na região próxima ao núcleo atômico. Esse tipo de interação é mais importante quando a radiação incidente é de elétrons de alta energia. Nesses encontros o elétron é espalhado *elasticamente* e não produz raios-x característico e nem excita o núcleo. Nessas interações o elétron pode passar próximo ao núcleo e interagir *elasticamente* com o campo coulombiano nuclear sem produzir raios-x, *bremsstrahlung*, e nem excitação nuclear. De outro modo, o elétron pode interagir *inelasticamente* com o campo elétrico nuclear produzindo raios-x, *bremsstrahlung*, num processo contínuo de perda de energia.

- a) Um outro canal de perda de energia é a aniquilação em vôo de um par elétron-pósitron. Quando essas partículas se encontram elas são aniquiladas e surgem dois fótons que se propagam na mesma direção em sentidos opostos. Cada fóton possui um *quantum* de 0,511 MeV.

- b) Interações nucleares com partículas carregadas pesadas: uma partícula carregada pesada com energia cinética ~ 100 MeV e parâmetro de impacto menor do que o raio nuclear pode interagir inelasticamente com o núcleo. Quando os nucleons são atingidos individualmente eles podem iniciar um processo de *cascata intranuclear* deixando o núcleo mais energético. O núcleo excitado decai emitindo nucleons de baixa energia ou fissionando, esse processo é conhecido como *evaporação* de partículas.

1.1 O potencial de ionização médio I e a energia média para criação de um par de íons W

Como foi discutido na seção anterior, uma partícula carregada perde grande

parte de sua energia cinética ionizando o meio que atravessa. Halpern e Hall mostraram que a redução na perda de energia por ionização depende fortemente das propriedades dielétricas do meio (Sternheimer, 1952). A cada camada eletrônica, $K, L, M...$ é atribuído um potencial de ionização $h\nu_i$ e uma quantidade f_i que é o número de ocupação dividido pelo número atômico Z do átomo ou molécula. O potencial de ionização médio I é definido como a *média geométrica do valor de todos os potenciais de ionização e excitação de um átomo do meio absorvedor*:

$$\ln(I) = \ln(h\nu_m) = \sum_i f_i \ln(h\nu_i), \quad (4.1)$$

onde $h\nu_m$ é o potencial de ionização médio I . Medidas experimentais com prótons de 340 MeV mostraram que para $Z > 26$, I é proporcional a

$$I = 9,4Z(eV), \quad (4.2)$$

para Z menor, o valor do I calculado por meio da expressão 4.1 deve ser corrigido por um fator multiplicativo de $\sim 1,3$ (Sternheimer, 1952).

Um átomo pode ser ionizado por muitas maneiras diferentes, todavia, a colisão com partículas carregadas por meio de interações coulombianas com os elétrons atômicos é a mais importante (Attix, 1986 ; Segré, 1953). No processo de colisão o elétron orbital pode ser arrancado do átomo ou simplesmente levado a níveis mais energéticos, ou seja, o átomo fica excitado. Não é correto simplesmente dividir a energia cinética T_0 da partícula carregada incidente pelo potencial de ionização médio I para obter o número de íons produzidos, pois trata-se de um processo estatístico. A grandeza que melhor expressa a eficiência da produção de íons é W (eq. 4.3), a energia média (em eV) perdida por uma partícula carregada com energia inicial T_0 para produzir um par de íons (Platzman, 1961)

$$W = \frac{T_0}{\langle N_i \rangle}, \quad (4.3)$$

aqui $\langle N_i \rangle$ é o valor esperado do número de pares de íons produzidos por partícula interagindo no meio (normalmente um gás). A tabela 4.1 mostra os valores experimentais da relação W/I para partículas alfa e beta.

Tabela 4.1 – Valores de W_α , W_β (em eV) e W_β/I selecionados para gases, onde W_x é a energia média necessária para produção de um par de íons devido a interação de uma partícula x com o meio e I é o potencial de ionização médio (incertezas são de aproximadamente 1 a 2%)

Gás	W_α	W_β	W_β/I
He	42,7	42,3	1,72
Ne	36,8	36,6	1,70
A	26,4	26,4	1,68
Kr	24,1	24,1	1,72
Xe	21,9	21,9	1,80
H ₂	36,43	36,3	2,35
N ₂	36,39	34,9	2,24
O ₂	32,24	30,8	2,55
NO	-	-	-
Ar	-	33,9	-
CO ₂	34,21	32,8	2,38
CH ₄	-	27,3	2,10
C ₂ H ₆	-	24,5	2,10
C ₂ H ₄	-	26,1	2,48
C ₂ H ₂	-	25,7	2,25

1.2 Processos relevantes de interação

Em sistemas biológicos somente as interações que efetivamente ionizam átomos e ou moléculas são realmente importantes (Rossi et al, 1996; Attix, 1986; Spothem-Maurizot et al., 1990, Yang, 1999; Folkard et al., 1989; Milligan et al., 1992; Simmons et al., 1999).

A absorção da radiação ionizante pela matéria é mediada por processos físicos relativamente bem conhecidos. Uma partícula carregada pode produzir raios-x, entretanto, as partículas eletricamente carregadas e massivas como os prótons têm baixa eficiência na produção de raios-x de

freamento, *bremsstrahlung*. Por isso, as ionizações devidas às interações com prótons são por meio de colisões duras.

2. A Dose absorvida

Um campo de radiação ionizante pode ser descrito de forma estocástica por meio da *energia específica* z (Rossi et al., 1996; NCRP 108, 1991), que é dada por:

$$z = \frac{\varepsilon}{m}, \quad (4.4)$$

onde ε é a *energia cedida* pela radiação ionizante para um volume V de material de massa m . A energia cedida é dada pela seguinte equação:

$$\varepsilon = (E_R^e)_{nc} - (E_R^s)_{nc} + (E_R^e)_c - (E_R^s)_c + \sum Q, \quad (4.5)$$

na equação (4.5) o termo $(E_R^e)_{nc}$ é a energia radiante de partículas não carregadas entrando no volume V ; $(E_R^s)_{nc}$ é a energia radiante de partículas não carregadas saindo de V (exceto aquelas que foram originadas da perda radioativa da energia cinética de partículas carregadas, ainda no volume V); para partículas carregadas $(E_R^e)_c$ e $(E_R^s)_c$ são similares a $(E_R^e)_{nc}$ e $(E_R^s)_{nc}$, respectivamente, e $\sum Q$ é a energia líquida das reações nucleares em V , se existir transformação de massa em energia $\sum Q > 0$, se, ao contrário, ocorrer a transformação de energia em massa, $\sum Q < 0$. Por energia radiante entende-se a energia de partículas (excluindo a massa de repouso) emitida, transformada ou recebida (Attix, 1986). A perda radioativa é definida como a conversão de energia cinética de partículas carregadas em fótons (raios-x de *bremsstrahlung* ou aniquilação de pósitrons em vô). Como exemplo, imagine um próton com energia cinética inicial T_p entrando em um volume V , conforme a figura (4.2). A energia radiante de partículas não

carregadas entrando no volume V é nula, pois, somente o próton entra no volume. Na primeira interação ocorre ionização e um elétron com energia cinética T_1 é espalhado. O próton, agora com energia T_p' , interage em outro ponto dentro do volume V espalhando outro elétron, este com energia T_2 , que sai do volume. Depois da segunda interação, o próton sai do volume V com energia T_p'' . O elétron com energia cinética T_1 também interage nos limites de V e é espalhado com energia T_1' , saindo de V juntamente com um fóton de energia $h\nu$. Como somente o próton entrou no volume V a $(E_R^e)_{nc}$ é igual a zero. Mas, a $(E_R^s)_{nc}$ é igual a $h\nu$ por conta do fóton que foi espalhado e saiu do volume V . A $(E_R^e)_c$ é igual a energia do próton incidente, isto é, T_p . O elétron 1, o elétron 2 e o próton são espalhados e saem do volume V com energias T_1' , T_2 e T_p'' , respectivamente. Portanto, a $(E_R^s)_c$ é igual a soma destas três energias, ou seja:

$$\varepsilon = (0) - (h\nu) + (T_p) - (T_1' + T_2 + T_p'') + (0), \quad (4.6)$$

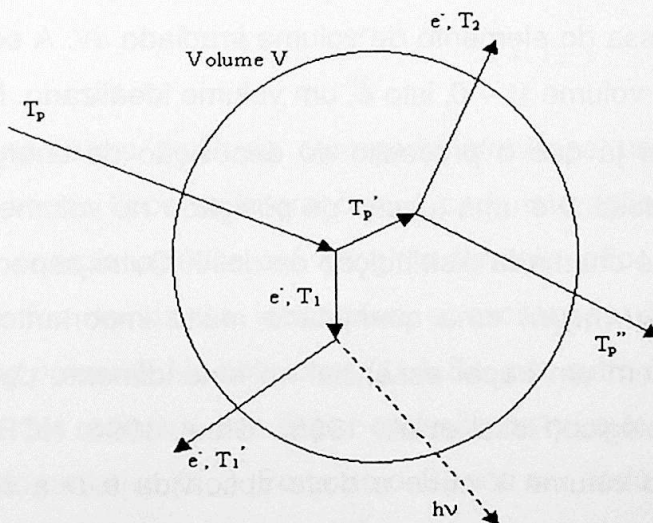


Figura 4.2 – Exemplo de espalhamento de um próton em um volume V para esclarecimento do conceito de energia absorvida ε .

simplificando a equação (4.6) tem-se

$$\varepsilon = T_p - (T_p' + T_1). \quad (4.7)$$

A energia absorvida ε resulta de eventos discretos de deposição aleatória de energia por partículas ionizantes (Rossi et al., 1996; NCRP 108,1991). Sendo assim, a quantidade ε é estocástica e deve ser governada por uma função densidade de probabilidade $f_V(\varepsilon)$ proveniente da equação de Boltzmann, na forma integral, para transporte da radiação e V é o volume contendo a massa m . O valor médio de ε é dado por

$$\langle \varepsilon \rangle = \int_0^{\infty} \varepsilon f_V(\varepsilon) d\varepsilon. \quad (4.8)$$

A dose absorvida pode ser definida como a quantidade não estocástica D dada por:

$$D = \frac{d\langle \varepsilon \rangle}{dm}, \quad (4.9)$$

onde dm é a massa do elemento de volume irradiado dV . A equação (4.9) é definida para um volume $V \rightarrow 0$, isto é, um volume idealizado. Na realidade V tem limite inferior já que o processo de deposição de energia é discreto. Dessa forma, a dose D é uma função da posição r no volume V . A variação de $D(r)$ versus r é chamada distribuição de dose. Outro aspecto é a taxa de dose absorvida $dD(r,t)/dt$, uma quantidade muito importante em sistemas biológicos, pois, tem um papel essencial no entendimento da relação entre dose e efeito biológico (Rossi et al., 1996; Steel, 1996; NCRP 108, 1991). Em um ponto no volume V onde a dose absorvida é D a correspondente quantidade estocástica energia específica z é dada por

$$z = \frac{\varepsilon}{m}, \quad (4.10)$$

e o valor médio da dose $\langle D \rangle$ em V é igual a $\langle z \rangle$. O valor $\langle z \rangle$ é a média da função distribuição de probabilidade $f(z)$ em V . Se V é reduzido, a variância dessa distribuição aumenta e a probabilidade de se obter z igual a zero torna-se significativa, principalmente em baixas doses. Entretanto, em doses relativamente altas $f(z)$ é uma curva bem comportada. Assim, $\langle D \rangle$ é considerada constante igual a D em qualquer ponto do volume V e $\langle z \rangle = D$. Todavia, a definição mais precisa da dose absorvida é dada por (Rossi et al., 1996; NCRP 108, 1991)

$$D = \lim_{\substack{m \rightarrow 0 \\ r \in V}} \bar{z}. \quad (4.11)$$

2.1 O poder de freamento do meio (*Stopping Power*)

O *Stopping Power* (S) do meio é definido como a perda de energia cinética de uma partícula carregada por unidade de comprimento de caminho da partícula, conforme a equação (4.12)

$$S = - \frac{dT}{dx}. \quad (4.12)$$

Quando uma partícula carregada atravessa um meio material podem ocorrer vários tipos de interações. A cada interação a partícula perde parte de sua energia cinética até atingir a termalização. Se a taxa de perda de energia for devida às ionizações e excitações dos átomos do meio o *stopping power* é dito colisional (S_{col}). Se, por outro lado, a taxa de perda de energia for radiativa, isto é, por emissão de raios-x de *bremstrahlung*, o S é chamado radiativo (S_{rad}). Portanto o S pode ser dado por:

$$S = S_{col} + S_{rad}. \quad (4.13)$$

O S_{rad} é mais significativo para partículas carregadas de pequena massa como elétrons ou pósitrons. A razão do S_{rad} pelo S_{col} é dada por

$$\frac{S_{rad}}{S_{col}} \cong \frac{TZ}{n}, \quad (4.14)$$

onde T é a energia cinética da partícula, Z é o número atômico do meio e n é uma constante que vale $(700 \pm 100) \text{MeV}$ para partículas com energia $T > 3 \text{MeV}$ (Attix, 1996).

O *nuclear stopping power* S_{nuc} é a energia cinética transferida por unidade de comprimento de caminho para o núcleo atômico. O S_{nuc} se torna significativo para partículas α e íons pesados em baixas energias (NCRP 108, 1991).

A unidade do S/ρ é dada em MeV/cm ou J/m, na prática utiliza-se o *stopping power de massa* que é dado por:

$$\frac{1}{\rho} S = - \frac{dT}{\rho dx}, \quad (4.15)$$

onde ρ é a densidade do meio absorvedor dada em g/cm^3 . Assim, a unidade de S/ρ é $\text{MeV.cm}^2/\text{g}$ ou $\text{J.m}^2/\text{Kg}$.

Em termos de *seção-de-choque diferencial inelástica* para transferência de energia aos elétrons atômicos, o S_{col}/ρ pode ser dado por:

$$\frac{1}{\rho} S_{col} = N_a (Z/M_A) \int_0^{T_{m\acute{a}x}} T \cdot \frac{d\sigma}{dT} \cdot dT. \quad (4.16)$$

Aqui, $T_{m\acute{a}x}$ é a máxima energia transferida possível. O fator $N_a(Z/M_A)$ representa o número de elétrons por grama de material. N_a é o número de Avogadro, Z é o número atômico do meio e M_A é a massa atômica do átomo

alvo. Considerando os elétrons atômicos como partículas livres e finalmente integrando (4.16), encontra-se

$$\frac{1}{\rho} S_{col}(T) = \frac{4\pi N_a r_e^2 m c^2}{\beta^2} z^2 \frac{Z}{M_A} \left\{ \ln \left[\frac{2m c^2 \beta^2 T}{I^2 (1-\beta^2)} \right] - \frac{C}{Z} - \frac{\delta}{2} + zL_1 + z^2 L_2 \right\}, \quad (4.17)$$

onde r_e é o raio clássico do elétron, β é a velocidade da partícula em unidades de velocidade da luz, I é o potencial de ionização médio (seção 4.1), δ representa a correção para o efeito densidade, C/Z é a correção de camada, e zL_1 e $z^2 L_2$ são correções devido ao efeito *Barkas* e termo de *Bloch*, respectivamente (Bichsel, 1989). Essas correções tornam-se significativas para baixas energias, T (NCRP 108, 1991, p. 135).

O efeito densidade ou polarização é mais significativo em meios densos como líquidos e sólidos e onde a partícula carregada passa distante de um átomo do meio. Nessa situação, a distorção de dipolo dos átomos próximos ao *rasto* da partícula reduz a interação coulombiana de átomos mais distantes desta última. Por causa disso o S_{col} / ρ é reduzido em meios condensados. O fator de correção δ é uma função que depende das propriedades dielétricas do meio, essas propriedades são representadas pelas energias de ligação dos átomos do meio. Sternheimer (1952) ajustou uma função analítica para δ

$$\delta = \begin{cases} 4,606x + C + a(x_1 - x)^m, & \text{se } (x_0 < x < x_1) \\ 4,606x + C, & \text{se } (x > x_1) \end{cases} \quad (4.18)$$

$$(4.18a)$$

onde $x_0 = \log_{10}[\beta/\sqrt{1-\beta^2}]$ e $C = -2 \ln(v_m'/v_p) - 1$. O valor v_p é a frequência de plasma dada por

$$v_p = \sqrt{\frac{ne^2}{\pi m}}, \quad (4.19)$$

sendo que, n é o número de elétrons por centímetro cúbico, m é a massa do elétron e e é a carga elementar. Os termos a , m e C são constantes que dependem do meio.

A fórmula do *stopping power* foi encontrada por Bethe assumindo que a velocidade da partícula incidente é muito grande comparada com as velocidades dos elétrons atômicos (Segrè, 1953). Essa hipótese não é exatamente verdade porque a velocidade da partícula sofre variação na travessia do meio e, além disso, as velocidades das órbitas eletrônicas também variam. Os elétrons da camada K são os mais velozes no átomo, por isso, são os primeiros que deixam de participar do processo de perda de energia da partícula incidente. Os elétrons da camada L são os próximos a deixarem de participar do processo e assim por diante. Portanto, quando a velocidade da partícula incidente decresce o S_{col} / ρ fica subestimado por causa do potencial de ionização médio I , que leva em conta a contribuição do potencial de todas as camadas eletrônicas. Bichsel (1968) estimou o efeito combinado de todas as camadas eletrônicas em um fator de correção aproximado C/Z , equação (4.17), que é o mesmo para todas as partículas carregadas de mesma velocidade β . O comportamento de C/Z pode ser visualizado na figura 4.3.

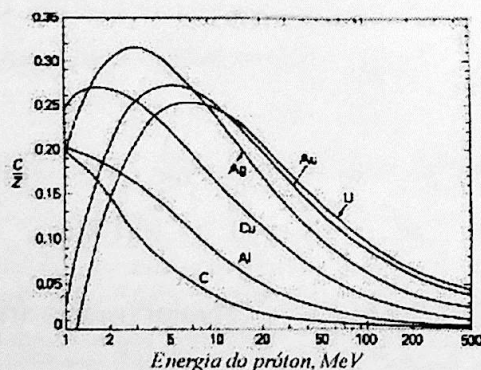


Figura 4.3 – Fatores de correção C/Z semiempíricos como função da energia do próton.

O S_{col}/ρ leva em conta a parcela da energia perdida para ionizar e excitar o meio. Os raios delta resultantes do processo de ionização também podem depositar sua energia cinética no meio (fig. 4.2). Dessa forma, a dose pode ser calculada pela contribuição da energia depositada ao longo do traço da partícula incidente, excluindo o *bremsstrahlung*. Nessa situação é mais adequado utilizar a *transferência linear de energia L(LET)*, que é normalmente dada em $keV/\mu m$ (Knoll, 1989), do que o *stopping power*, então:

$$LET = L = \frac{1}{\rho} S_{col}. \quad (4.20)$$

O *LET* é uma grandeza muito utilizada em radiobiologia e microdosimetria (Attix, 1996; Rossi et al., 1996 ; Simmons et al., 1999; Knoll, 1989, Steel, 1996).

2.2 O alcance

O alcance R de uma partícula carregada de um dado tipo e energia em um meio é o valor esperado do comprimento de caminho p que ela segue até atingir o repouso (desprezando o movimento térmico). Já o alcance projetado $\langle t \rangle$ dessa partícula é o valor esperado da maior distância de penetração t_f da partícula em sua direção inicial (Attix, 1996; Knoll, 1989), ver figura 4.4.

As quantidades R e $\langle t \rangle$ são não estocásticas e suas unidades são dadas em massa por área, isto é, em g/cm^2 . Deve-se levar em conta que os efeitos das interações nucleares internas são geralmente excluídos dessas grandezas.

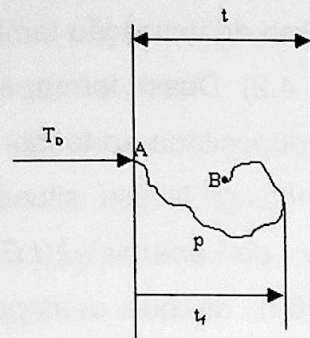


Figura 4.4 – Ilustração do conceito de comprimento de caminho p e maior profundidade de penetração t_f para um elétron com energia cinética inicial T_0 . O elétron incide perpendicularmente à fatia de um material de espessura t no ponto A e para completamente no ponto B

As interações das partículas carregadas, com a matéria podem ser divididas em duas classes:

- a) Colisões muito freqüentes que resultam em pequenas transferências de energia e pouca deflexão angular, ou,
- b) Colisões infreqüentes que resultam em espalhamento angular significativo e transferências de energia, em geral, desprezíveis em relação à energia cinética da partícula carregada.

As colisões da classe a) podem ser descritas por processos contínuos de perda de energia. Assim, uma quantidade similar ao alcance pode ser definida: o R_{CSDA} , alcance por aproximação contínua, dado por

$$R_{CSDA} \equiv \int_0^{T_0} \left(\frac{dT}{\rho dx} \right)^{-1} dT, \quad (4.21)$$

em (4.21) T_0 é a energia cinética inicial da partícula.

2.3 A curva de Bragg

Partículas carregadas pesadas atravessando a matéria e sofrendo somente interações atômicas apresentam uma curva de dose *versus* profundidade de penetração conforme a figura 4.5. A partícula pesada tem sua taxa de perda de energia aproximadamente constante até atingir uma profundidade t , onde deposita toda sua energia cinética remanescente para o meio. A forma da curva é devido ao fato que o alcance da partícula é proporcional ao quadrado da energia cinética remanescente, T^2 , para baixas energias (Attix, 1996). Isso significa que se a partícula perder a metade de sua energia em uma profundidade de penetração x , perderá a outra metade em $x/3$.

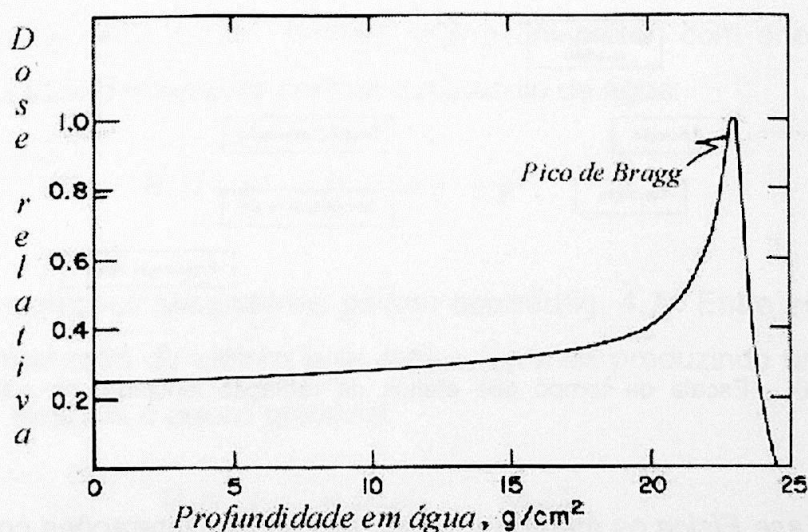


Figura 4.5 – Curva da Dose relativa *versus* profundidade de penetração de um próton de 187 MeV em água. A partícula perde sua energia em uma taxa aproximadamente constante até atingir a profundidade de ~ 20 cm, a partir daí, a taxa cresce até um máximo representado pelo pico, e finalmente a partícula pára em 25cm

3. Interação da radiação com sistemas biológicos

Além dos processos físicos apresentados nas seções anteriores, processos químicos e biológicos ocorrem em sistemas biológicos. Esses processos ocorrem sucessivamente no tempo (Steel, 1996; Rossi et al., 1996), figura 4.6.

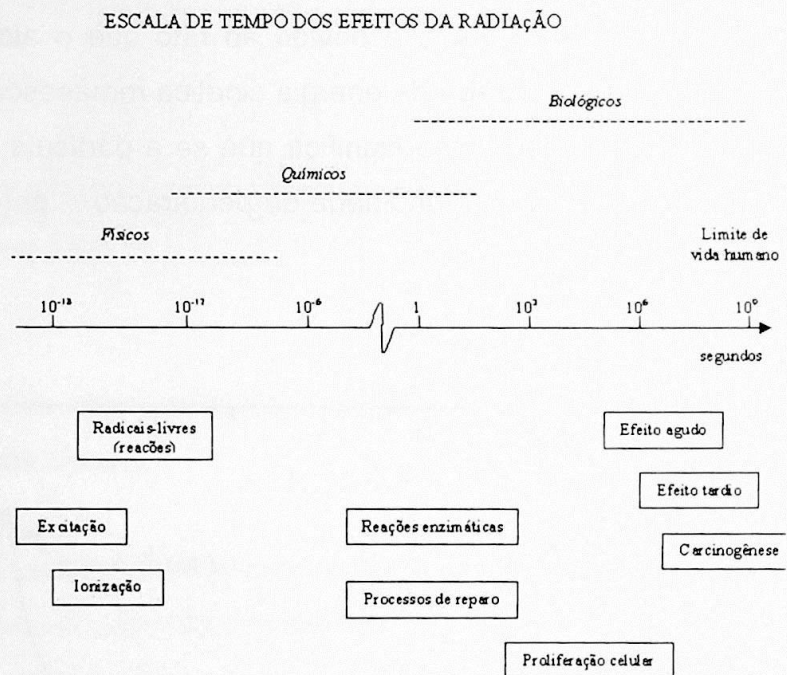


Figura 4.6 – Escala de tempo dos efeitos da radiação ionizante no sistema biológico humano

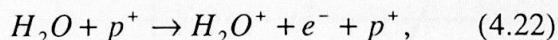
Na *Fase Física* os átomos e moléculas sofrem interações com partículas carregadas levando-os à ionização e ou excitação, ver seção IV.1.

Na *Fase Química* esses átomos e moléculas danificados (radicais livres) reagem rapidamente com outros componentes do meio celular, entre eles o DNA. Uma característica muito importante nessa fase é a competição entre *comedores* de radicais livres (moléculas que inativam os radicais livres) e os radicais livres, que modificam o meio químico.

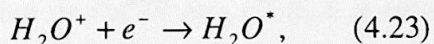
A *Fase Biológica* inclui todos os processos subsequentes iniciando com o reparo enzimático de moléculas importantes como o DNA. Durante o reparo podem ocorrer falhas que eventualmente culminam em morte celular (Steel, 1996; Rossi et al., 1996; Freiberg et al., 1995).

A radiação pode atuar de forma direta ou indireta em alvos moleculares importantes como o DNA. Na *ação direta* a partícula ionizante danifica a molécula diretamente. Já na *ação indireta*, outras moléculas do meio como a de água, são quebradas produzindo íons que por sua vez podem danificar o DNA.

A água é a molécula mais abundante no meio celular, sendo assim a *ação indireta* da radiação adquire particular importância. O processo da radiólise da água é esquematizado na figura 4.7. Dos produtos da radiólise da água o radical OH é o mais importante por ser muito reativo (Spotheim-Maurizot, 1990; Rossi, 1996). Imagine um próton com energia cinética T_p interagindo diretamente com uma molécula de água:

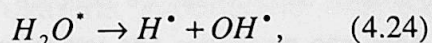


várias reações secundárias podem ocorrer (fig. 4.7). Entre essas reações, a recombinação do elétron livre com o íon mãe produzindo uma molécula de água excitada é pouco provável:



o elétron estará termalizado à 15nm do íon mãe (Hoppe et al., 1993).

A molécula de água excitada então se dissocia, formando dois radicais:



Independentemente do mecanismo da reação pode-se definir o *produto da energia G*, dado por:

$$G = \frac{\text{número de moléculas formadas ou alteradas}}{100 \text{ eV de energia absorvida}} \quad (4.25)$$

O número de radicais OH^\bullet produzidos por 100eV de energia depositada é $G_{OH^\bullet}=5,88$ (Chatterjee et al.,1991). Isso significa que, em média, são necessários 17eV para criar um radical OH^\bullet . No meio celular, ou seja, na presença de *comedores de radicais livres*, a probabilidade de reação do radical com uma molécula de *DNA* fica reduzida se a distância média entre estes últimos for maior do que 30Å . Essas reações geralmente ocorrem nas bases com frequência maior (2,7 vezes) do que nos açúcares (Friedberg et al., 1995) do *DNA* e podem danificá-lo permanentemente.

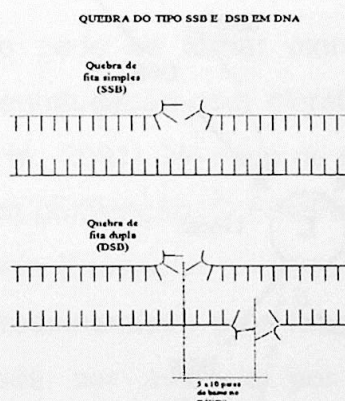


Figura 4.8 – Quebra de fita simples (SSB) e quebra de fita dupla(DSB). Observe que a distância entre as SSB é de 5 a 10 pb, no máximo

Existe uma variedade muito grande de lesões que podem ocorrer no *DNA*, entre elas a *quebra de fita simples (SSB)* e a *quebra de fita dupla (DSB)* são de extrema importância nos processos de mutação e morte celular devido ao reparo incompleto dessas macromoléculas (Steel, 1996). A *DSB* surge como a combinação de duas *SSB* em fitas opostas do *DNA*

(ver figura 4.8), quando a distância entre as quebras ao longo do eixo da molécula seja de 5 a 10 pb (pares de bases), no máximo (Rossi et al., 1996). A energia média necessária à formação de uma DSB é de 60eV (Simmons et al., 1999). Somente ~2% das SSB resultam em DSB (Chaterjee et al., 1991; Steel, 1996; Friedberg et al., 1995).

As SSB e DSB podem modificar a geometria de uma molécula de DNA, produzindo DNA circular fechado e linear a partir do polímero superenrolado (ver seção III.1), conforme a figura 4.9.

ESQUEMA DE TRANSFORMAÇÃO DE ESTADOS DO ADN

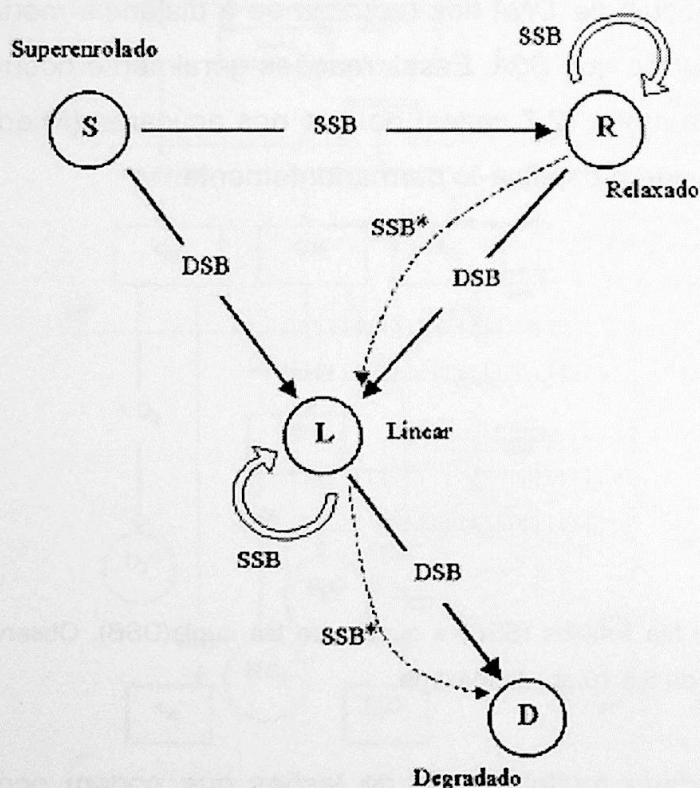


Figura 4.9 – Esquema das reações de transformação de um plasmídeo em diferentes formas. S, C, L e D representam as formas superenrolada, circular relaxada, linear e degradada respectivamente. As conversões S→L e C→L são devidas a primeira DSB. A Segunda SSB leva C e L a uma DSB (flechas tracejadas). Uma Segunda DSB leva à forma degradada D, que é visível no gel de agarose como um borrão

Cápítulo V: Materiais e métodos

O pBluescript[®] II Exo/Mung (pBKS), um DNA plasmidial com 2961 pb, foi fornecido pela Stratagene na concentração de 1µg/µl.

Em geral os plasmídios são fornecidos em pequenas quantidades, da ordem de µg e seu custo é significativo. Sendo assim, a replicação de plasmídios em laboratórios de pesquisa tornou-se prática comum. O processo de produção de réplicas consiste basicamente em inocular moléculas em células vivas. Dentro da célula ocorre a reprodução do plasmídio. O método utilizado para replicar pBKS foi a eletroporação (Dower et al., 1988).

1. Purificação do pBKS

O processo de purificação pode se tornar extremamente trabalhoso e demandar muito tempo – a centrifugação com cloreto de Césio (CICs) pode demorar 72 horas (Maniatis et al., 2001). No caso de minipreparações pode-se utilizar *kits* industrializados para purificação. O FastPlasmidTM Mini é o *kit* para minipreparações distribuído pela Eppendorf e utilizado nos experimentos. O protocolo de purificação é o recomendado pelo fabricante do *kit* (Anexo). A qualidade da purificação pode ser avaliada por meio de imagens de eletroforese em gel do DNA e ou por meio de medidas de absorbância da amostra. A técnica utilizada para medidas de absorbância é a espectrofotometria. A espectrofotometria inclui a absorção de ondas eletromagnéticas na região visível e ultravioleta (180 a 800 nm). A absorção da luz é determinada pela intensidade de dipolo D_i (Hoppe et al., 1983).

Como o espectro de absorção do DNA e RNA é máximo em 260nm, a absorbância para ácidos nucleicos é dada em unidades de DO_{260} ou A_{260} . A lei de *Beer-Lambert* é válida até $DO = 2$ (Hoppe et al., 1993). Uma unidade de DO_{260} para DNA de fita dupla corresponde a uma concentração de 50 $\mu\text{g/ml}$. O método pode fornecer uma estimativa da pureza do ácido nucleico por meio da relação $A_{260}:A_{280}$ que deve estar entre 1,8 e 2,0 para DNA com grau de pureza aceitável (Maniatis et al., 2001). A absorbância em 280 nm indica a presença de proteína na amostra. Mas, para que os resultados sejam confiáveis as amostras a serem analisadas devem estar com baixa intensidade iônica e pH controlado. O equipamento utilizado para medidas de absorbância é o BioPhotometer fornecido pela Eppendorf. Antes de realizar as medidas é necessário avaliar o ruído de fundo. Isso é realizado utilizando uma amostra de água deionizada *Milli-q* e medindo a absorbância, que será subtraída das medidas com amostras de DNA. Alíquotas de solução contendo DNA são colocadas em cubetas especiais e encaixadas no fotômetro para leituras de absorbância e concentração. Para que as medidas sejam reprodutíveis é importante agitar as amostras em um *vortex* (vibrador) por alguns segundos para que a distribuição das moléculas na solução se torne mais homogênea possível. De 2 a 3 medidas em intervalos de tempo muito curto (poucos segundos) podem ser realizadas, geralmente os resultados se repetem indicando pouca flutuação estatística. Logo após o processo de purificação foram obtidas as medidas espectrofotométricas para o plasmídeo pBKS com concentração de 152 $\mu\text{g/ml}$. A razão $A_{260}:A_{280}$ foi igual a 1,89. Isso significa que na solução havia 55 % de ácido nucleico e 45 % de proteína, ou seja, a amostra tem um bom grau de pureza (Maniatis et al., 2001).

2. Irradiação do pBKS

Vários tipos de radiação como, por exemplo, fótons, elétrons, nêutrons, íons pesados e prótons com energia na região de centenas de MeV são utilizados para irradiar amostras de DNA (Spothem-Maurizot et al., 1990; Stamato et al., 1990; Milligan et al., 1992; Yang, 1999; Folkard et al., 1989; Blöcher, 1989; Sternelöw et al., 2001). Amostras de DNA são facilmente susceptíveis à contaminação e conseqüente denaturação (destruição). Por isso, o projeto de um aparato experimental deve ser cuidadoso. A seleção dos materiais utilizados na construção do aparato não pode comprometer o estado físico e químico das moléculas de DNA. Dessa forma, os materiais devem ser

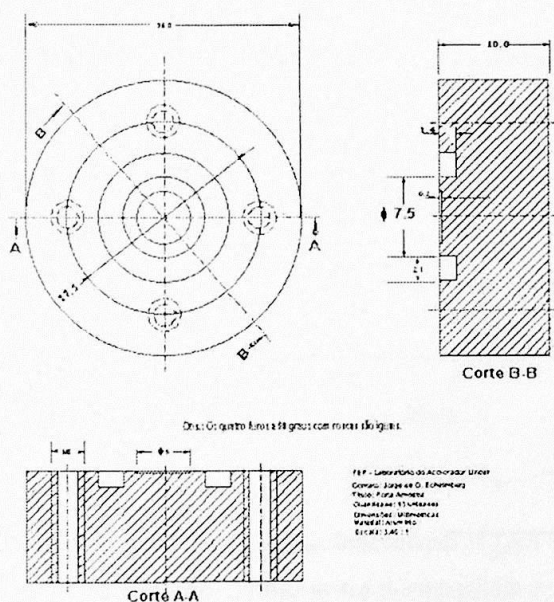


Figura 5.1 – Esquema com vistas dos cortes do porta-amostra de alumínio. As incertezas são todas de 0,05 mm

resistentes ao processo de esterilização onde sofrem tanto interações físicas como, por exemplo, gradientes de temperatura elevado, quanto reações químicas com substâncias variadas. Além disso, os materiais devem ser resistentes aos efeitos da radiação. O material definido para o porta-amostra (fig. 5.1) foi o alumínio (Al) por sua baixa ativação, meia-vida relativamente curta e rápida dissipação de calor para o meio ambiente.

A solução de DNA e água foi depositada na cavidade circular de $(5,00 \pm 0,05)$ mm de diâmetro por $(0,26 \pm 0,05)$ mm de profundidade (fig. 5.2), portanto, é possível acumular um volume máximo de $(5,0 \pm 1,0)$ μl . Para manipular um volume dessa ordem é necessário utilizar pipetas especiais calibradas para volumes em μl . A pipeta utilizada para deposição das alíquotas no porta-amostra pode ser tanto a manual quanto a eletrônica. A pipeta manual e a eletrônica foram fornecidas pela Eppendorf e têm volumes ajustáveis de 0,5 a 10 μl . A incerteza relativa para ambas é obtida por meio da curva de na figura 5.2 (dados no manual do fabricante da pipeta – eppendorf).

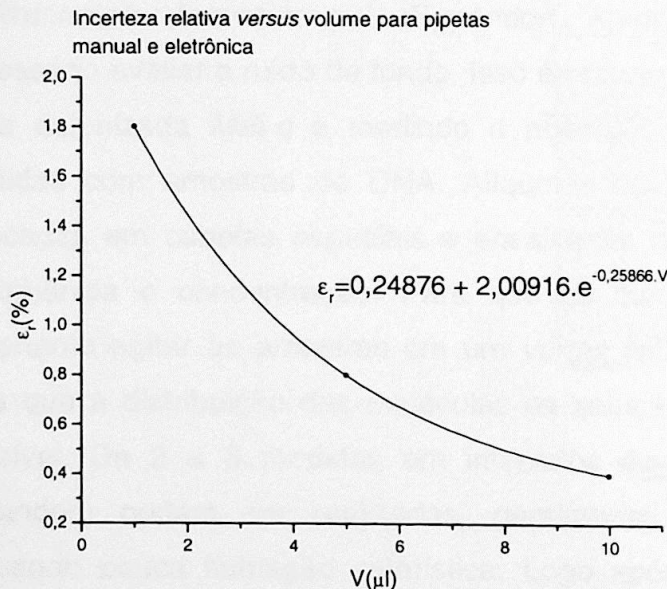


Figura 5.2 – Gráfico da incerteza relativa do volume aliqotado pela pipeta em função do volume

A inacurácia d das pipetas é dada por (fabricante da pipeta – eppendorf)

$$d = \left(\frac{x_m - x_{no\ min\ al}}{x_{no\ min\ al}} \right) 100\%, \quad (5.1)$$

onde, x_m é o valor médio de n medidas repetidas e ponderado por um fator de correção ($\cong 1$) que depende da temperatura e pressão atmosférica, $x_{nominal}$ é o valor nominal da medida indicado na pipeta.

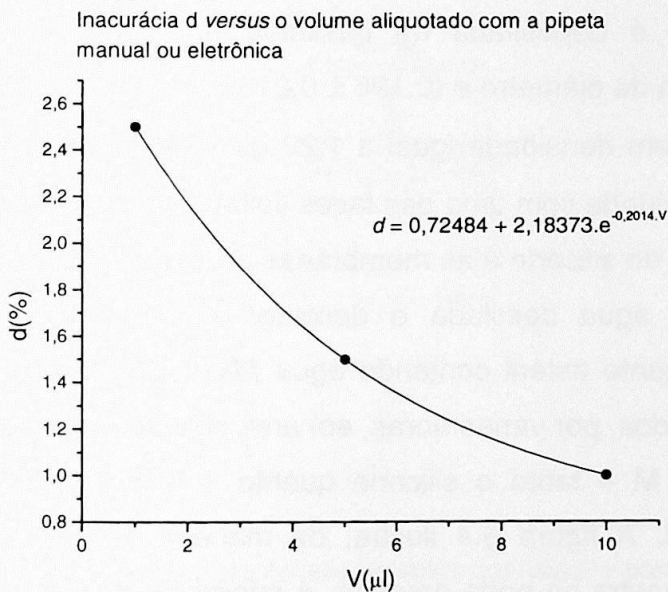


Figura 5.3 – Gráfico da inaccurácia d em função do volume aliquotado, observa-se uma dependência não linear entre a inaccurácia e o volume

Dos gráficos das figuras 5.2 e 5.3 verifica-se que tanto a inaccurácia d quanto a incerteza relativa ε_r têm ambas a mesma ordem de grandeza. Assim, a incerteza relativa ε_v dos volumes aliquotados pode ser expressada por

$$\varepsilon_v = \sqrt{(\varepsilon_r)^2 + (d)^2}, \quad (5.2)$$

portanto, na região de 10 a 0 μl a incerteza relativa do volume, ε_v varia de 0,11 a 3,7 %, respectivamente. O volume da solução depositado em cada porta-amostra foi de $(5,00 \pm 0,09)$ μl . Antes de depositar a amostra na cavidade do porta-amostra (fig.5.1), um anel de silicone foi encaixado no sulco circular de diâmetro interno igual a $(7,50 \pm 0,05)$ mm. O anel funciona como um vedante entre a membrana polimérica e o corpo do porta-amostra. Para evitar absorção do DNA o material do anel foi o silicone que tem alta resistência à absorção de água. Logo que a amostra é depositada na cavidade um filme circular (membrana) de $(7,0 \pm 0,5)$ mm de diâmetro e $(0,196 \pm 0,013)$ mm de espessura de Makrofol-E[®] ($\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_3$), com densidade igual a $1,29 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ fabricado pela Bayer, é colocado sobre a cavidade com uma das faces voltada para a amostra de DNA (fig. 5.4 d)). Os anéis de silicone e as membranas de Makrofol-E foram exaustivamente lavados em água destilada e deixados em repouso, por algumas horas, em um recipiente estéril contendo água *Milli-q*. Depois foram retirados do banho e depositados, por várias horas, em uma solução aquosa de hidróxido de potássio a 0,1 M – tanto o silicone quanto o Makrofol-E têm grande resistência ao etanol. A figura 5.4 ilustra, de maneira pictórica, as etapas para deposição da amostra no porta-amostra. A superfície da cavidade do porta-amostra e a superfície do volume de amostra depositado interagem por meio de uma força adesiva. Se a força adesiva for maior do que a força de coesão entre as moléculas da amostra haverá espalhamento da solução no interior da cavidade. O espalhamento da amostra dificulta a recuperação do volume de solução reduzindo a quantidade recuperada – perdas de até 50% do volume são observadas. Dessa forma, a amostra deve ser depositada lentamente no centro da cavidade de maneira que se mantenha o contato entre a ponteira da pipeta e a solução, até que todo volume seja depositado. Imediatamente após a deposição do volume da amostra no centro da cavidade foi sobreposta a membrana de Makrofol-E, com o auxílio de uma pinça estéril. A membrana foi sobreposta à cavidade de uma só vez, isto é, de maneira que

não necessitasse de ajuste em sua posição. Ajustes na posição da membrana podem espalhar a amostra pela superfície da cavidade.

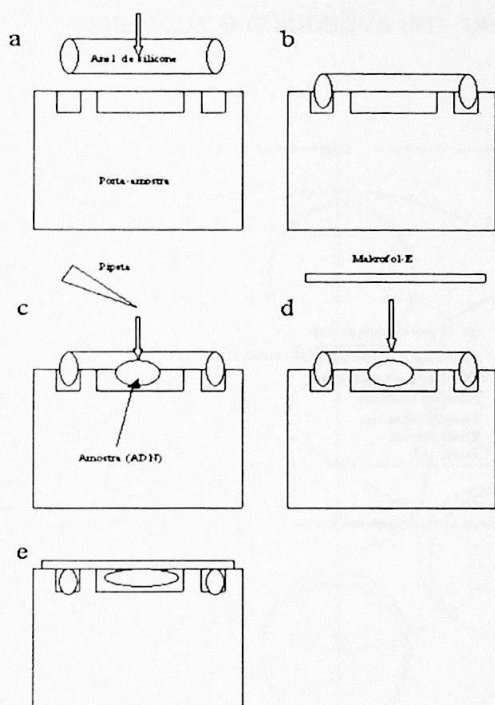


Figura 5.4 – Representação esquemática dos passos para deposição da amostra no porta-amostra. Em a) e b) vê-se o encaixe do anel de silicone, em c) a deposição da amostra na cavidade do porta-amostra pela pipeta, em d) e e) a sobreposição da membrana de Makrofol-E na cavidade do porta-amostra – existe um desnível entre a superfície do anel e do porta-amostra

Da figura 5.4 observa-se um desnível entre a superfície superior do porta-amostra e do anel de silicone. O desnível se torna significativo quando a tampa de alumínio é fixada sobre todo conjunto, por meio de parafusos (fig. 5.5). A tampa tem o propósito de vedar completamente a amostra impedindo a entrada de contaminantes e a saída de água por evaporação. Além disso, a tampa tem a função de colimador para o feixe de prótons, dado que o alcance de prótons de 10 MeV em Al é de 0,63 mm.

IRRADIAÇÃO DO pBKS

A fixação da tampa requer quatro parafusos simetricamente distribuídos. Durante a fixação os parafusos foram rosqueados em pares simétricos em relação ao centro da cavidade do porta-amostras.

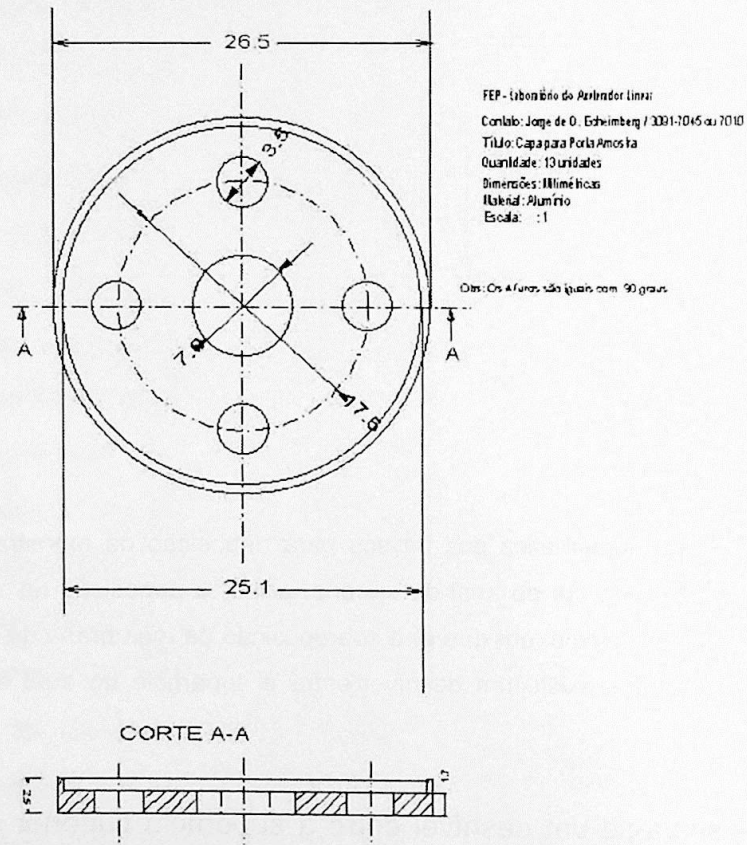


Figura 5.5 – Esquema da tampa de alumínio para fixação do conjunto formado pelo porta-amostra, anel de silicone, amostra e membrana de Makrofol-E . Todas as medidas em milímetros e a incertezas são todas de 0,05 mm

Além das amostras que foram preparadas para irradiação, preparou-se também os controles, que são amostras preparadas nas mesmas condições das outras amostras, entretanto, não são irradiados. Todos os porta-amostras foram preparados e colocados em uma caixa contendo gelo. Todos os passos

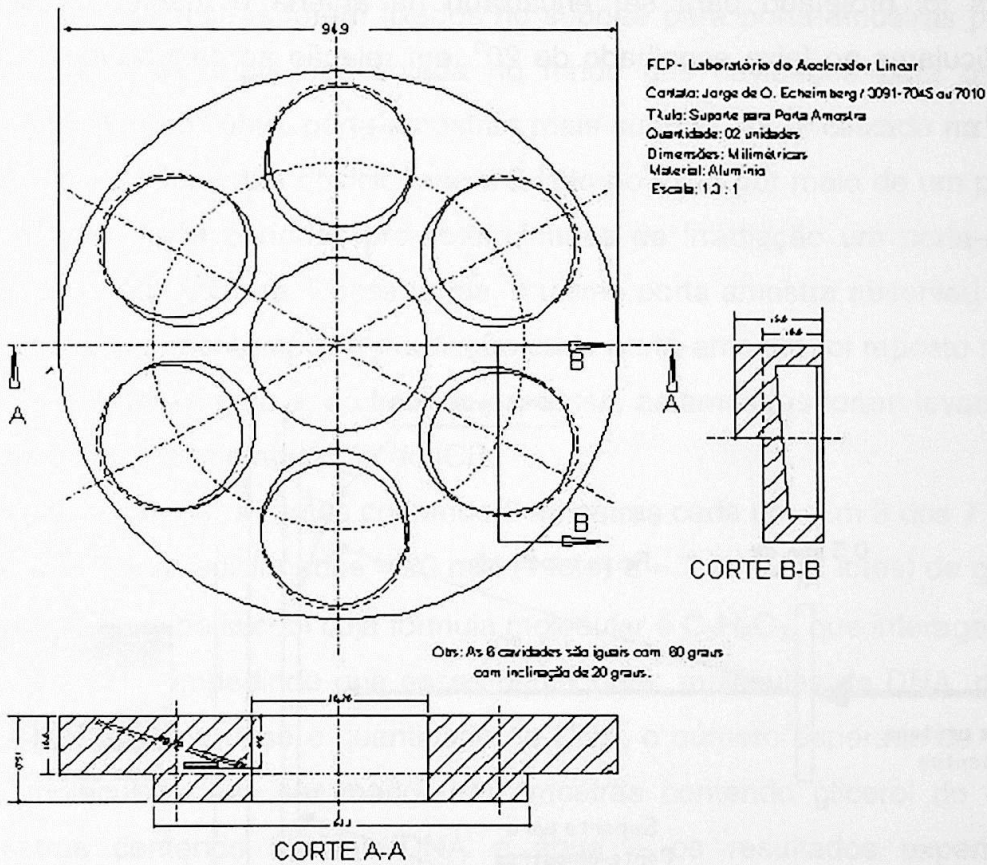


Figura 5.6 – Suporte para porta-amostras. Suporta até 6 porta-amostras. O ângulo de espalhamento das partículas é de 20°. O suporte foi construído em alumínio. As medidas são todas em milímetros e as incertezas são todas de 0,05 mm. Uma fotografia colorida do aparato completo encontra-se no apêndice

descritos foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (ICB).

A caixa térmica contendo as amostras foram levadas ao acelerador de partículas *Pelletron* e cada uma foi instalada no suporte para porta-amostras (fig. 5.6 e apêndice com a fotografia colorida do aparato completo). A motivação para o projeto do suporte para porta-amostras partiu da antena utilizada na saída do acelerador para fixação de alvos. O suporte para porta-amostras foi projetado para ser encaixado na antena e manter os alvos perpendiculares ao feixe espalhado de 20° , em relação ao eixo de incidência (fig. 5.7).

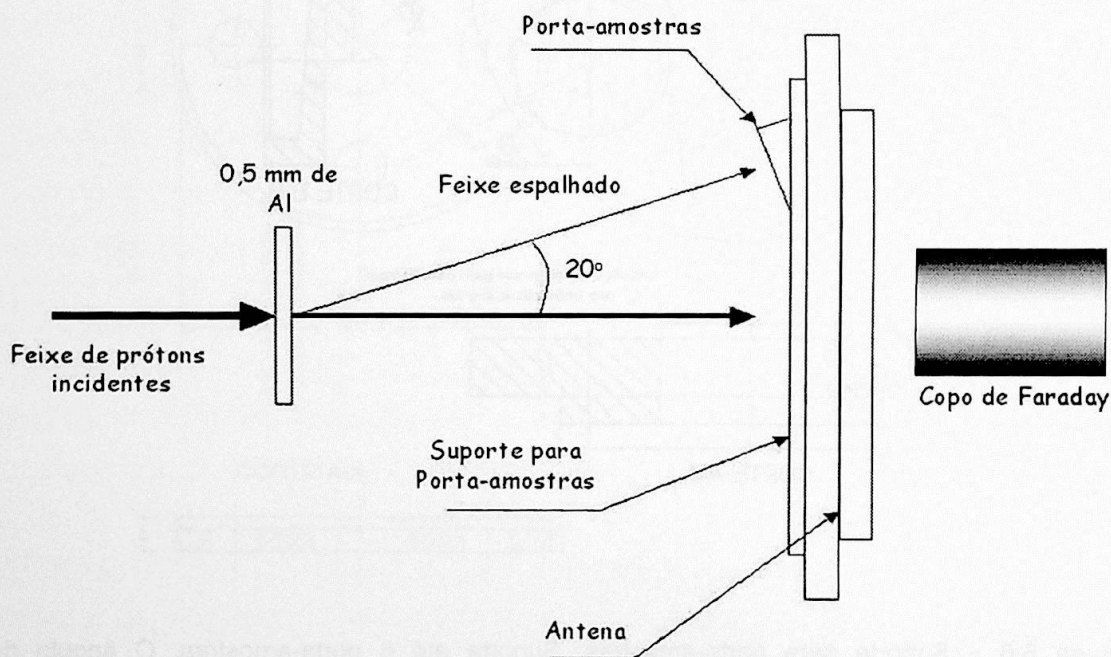


Figura 5.7 – Esquema ilustrativo do aparato experimental utilizado durante as irradiações das amostras de DNA. A antena é o meio de fixação e posicionamento do suporte para porta-amostras. O feixe de prótons mais intenso passa pelo furo do suporte de porta-amostras e pelo copo de Faraday, onde a carga elétrica é coletada e enviada para um sistema integrador

A corrente média do feixe incidente na janela de Al foi de 600 nA, dependendo das condições de ajuste do acelerador. Um contador de cargas elétricas foi acoplado a um computador pessoal e um programa registrava a cada segundo os valores da corrente, em nA, e a carga integrada, em μC , do feixe de prótons.

Os porta-amostras foram fixados no suporte para porta-amostras por meio de fita adesiva dupla-face colada no fundo das cavidades para os porta-amostras e o conjunto, porta-amostras mais suporte, foi encaixado na antena. Todo aparato foi então posicionado e fixado no trilho por meio de um parafuso de fixação. Após períodos pré-determinados de irradiação um porta-amostra era retirado do suporte. Dessa forma, o último porta-amostra absorveu a maior dose. Imediatamente após a irradiação cada porta-amostra foi repostado na caixa térmica contendo gelo e, ao final do processo, as amostras foram levadas para o laboratório de microbiologia do ICB.

Foram irradiados 7 lotes contendo 6 amostras cada um. Em 3 dos 7 lotes de amostras foram adicionados ≈ 20 mM (1 lote) e $\approx 7,4$ mM (2 lotes) de glicerol – o glicerol é um poliálcool cuja fórmula molecular é $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$, que interage com os radicais OH^\cdot impedindo que esses danifiquem moléculas de DNA, portanto, para uma mesma dose e quantidade de DNA, o número esperado de quebras nas moléculas deve ser menor em amostras contendo glicerol do que em amostras contendo apenas DNA e água – os resultados experimentais confirmaram a hipótese.

3. Recuperação do pBKS

A recuperação das amostras irradiadas depende de vários fatores dado que os volumes são relativamente pequenos ($5\mu\text{l}$). Alguns fatores como temperatura ambiente, umidade relativa do ar e tempo para a recuperação devem ser levados em conta.

Todavia, a utilização da pipeta eletrônica em detrimento da manual foi significativa na redução das perdas dos volumes recuperados.

No ICB iniciou-se o processo de recuperação dos volumes irradiados. Próximo aos porta-amostras foram colocados 2 recipientes contendo água. A função dos recipientes com água era manter a umidade relativa do ar em níveis favoráveis, isto é, reduzir a evaporação das amostras durante o processo.

Em seguida, os parafusos de fixação e as tampas foram retirados cuidadosamente. Com o auxílio de uma pinça estéril foi possível retirar as membranas de Makrofol-E tomando cuidado para não espalhar as soluções pelas superfícies das cavidades ou fora delas.

Cada volume recuperado foi armazenado em frasco plástico fornecido pela Eppendorf, e guardados no congelador à temperatura de -20°C .

4. Simulação dos processos físicos

O alcance de um próton de 10 MeV não é maior do que 1,2 mm em água e a largura do pico da curva de Bragg é de $\sim 0,13$ mm. Esses resultados foram obtidos por meio de simulação computacional e foram utilizados para nortear o projeto do porta-amostra.

Para realizar o experimento utilizou-se um feixe de prótons monocromáticos com energia de 10 MeV na amostra de DNA. Os prótons foram acelerados no acelerador de partículas *Pelletron* do Instituto de Física da Universidade de São Paulo (IFUSP). Um feixe de prótons com energia de 14 MeV atinge uma folha de alumínio de 0,5 mm de espessura e, ao colidir com os núcleos de Al, sofre espalhamento elástico devido à interação entre os campos elétricos dos prótons incidentes e do núcleo de Al. A corrente média do feixe incidente de prótons foi de 600 nA. Uma corrente dessa magnitude pode fornecer uma potência média de 6 Watts para uma amostra de 0,005 g de água. A taxa de elevação da temperatura seria de $288^{\circ}\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$, o suficiente para inutilizar a amos-

tra com DNA e até o aparato em fração de segundos. Portanto, o mais adequado foi irradiar as amostras com o feixe de prótons espalhados. A geometria selecionada foi aquela com o ângulo de espalhamento de 20° , no referencial do laboratório (fig. 5.7), justificada pela facilidade do uso da antena existente no Pelletron.

Para realizar a simulação do transporte de prótons foi utilizado o programa GEANT 3.21 desenvolvido nos laboratórios do CERN, em Genebra. O GEANT 3.21 é um sistema que utiliza o método de Monte Carlo para o transporte de radiação na matéria no intervalo de energia de 10 keV a 10 TeV.

Todas as partes do aparato experimental têm forma cilíndrica e foram simuladas com essa geometria (fig. 5.8). Por exemplo, a solução com DNA foi simulada como um cilindro de água conforme a tabela 5.1.

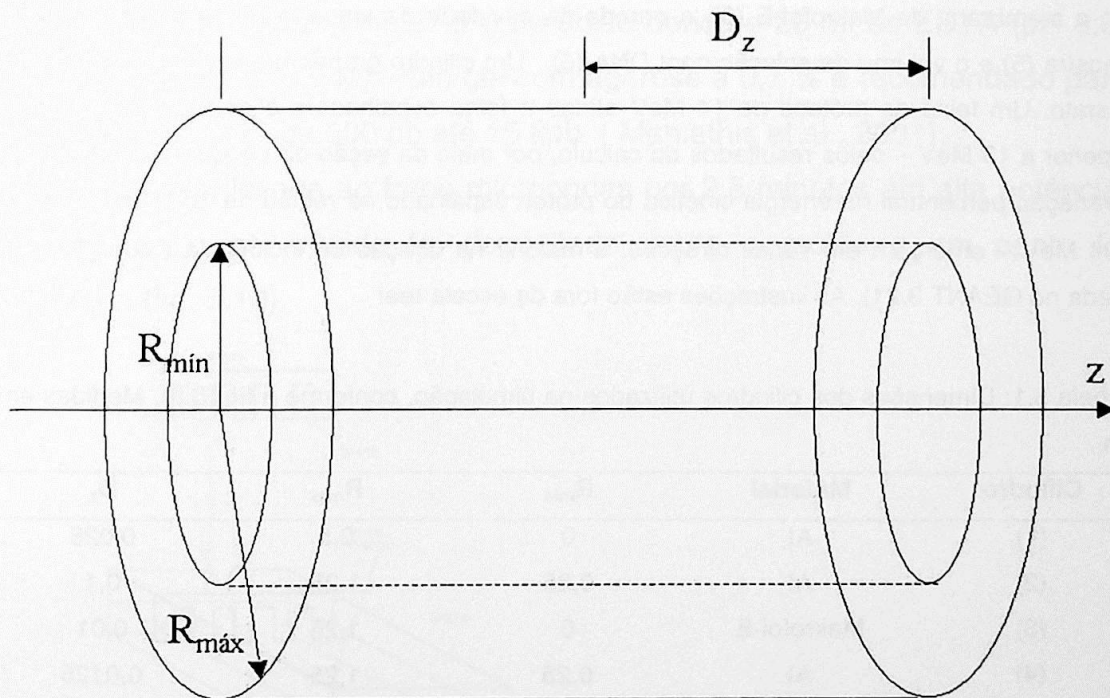


Figura 5.8 – A figura ilustra um cilindro, um sólido geométrico onde o raio mínimo ($R_{\text{mín}}$) pode variar de 0 ao raio máximo ($R_{\text{máx}}$). D_z é a metade do comprimento do cilindro.

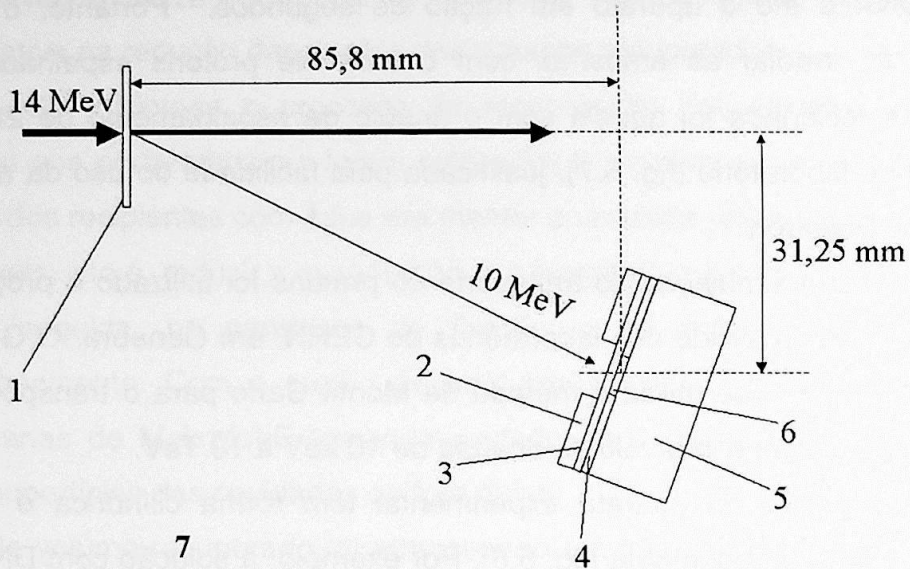


Figura 5.9 – A figura ilustra os cilindros representando a folha espalhadora de Al (1), a tampa (2), a membrana de Makrofol-E (3), a parede da cavidade da amostra (4), o fundo do porta-amostra (5) e o volume da solução com DNA (6). Um cilindro grande de ar (7) contém todo o aparato. Um feixe de prótons de 14 MeV atinge a folha espalhadora e prótons com energia superior a 10 MeV – pelos resultados do cálculo, por meio da seção-de-choque de Rutherford, a variação percentual na energia cinética do próton espalhado na região de 10° a 30° foi de $\pm 0,04$ MeV – emergem em várias direções, a maioria na direção de incidência (configuração criada no GEANT 3.21). As ilustrações estão fora da escala real

Tabela 5.1: Dimensões dos cilindros utilizados na simulação, conforme a fig (5.9). Medidas em cm

Cilindro	Material	R_{\min}	R_{\max}	D_z
(1)	Al	0	0,5	0,025
(2)	Al	0,25	1,25	0,1
(3)	Makrofol-E	0	1,25	0,01
(4)	Al	0,25	1,25	0,0125
(5)	Al	0	1,25	0,5
(6)	H ₂ O	0	0,25	0,0125
(7)	Ar	0	50	50

O GEANT 3.21 possui um banco de dados com tabelas de *stopping power* e alcance pré-calculadas, portanto, para valores de energia da partícula não previstos, o sistema utiliza um algoritmo de interpolação linear. As grandezas obtidas pelo GEANT 3.21 são a energia cinética perdida entre duas interações sucessivas, a distância entre essas interações, as coordenadas espaciais e o quadri-momento da partícula.

5. Análise e quantificação do pBKS

O método escolhido para análise e quantificação das quebras do plasmídeo foi a eletroforese em gel de agarose. Para cada lote de 6 amostras irradiadas foi preparada uma massa de $(0,700 \pm 0,010)$ g de agarose (granulada) medida em balança analítica e diluída em $(100,0 \pm 0,5)$ ml de solução tampão estoque de TBE (54 g de base Tris, 27,5 g de ácido bórico e 20 ml de EDTA (pH 8.0) na concentração de 0,5 M) – um gel com agarose a 0,7 % é recomendado para fragmentos de DNA de 500 pb até 15 kpb (Maniathis et al., 2001).

A solução foi levada ao forno microondas por 2,5 minutos em alta potência. Em seguida o gel líquido foi depositado sobre o molde e um pente foi encaixado (fig. 5.10).

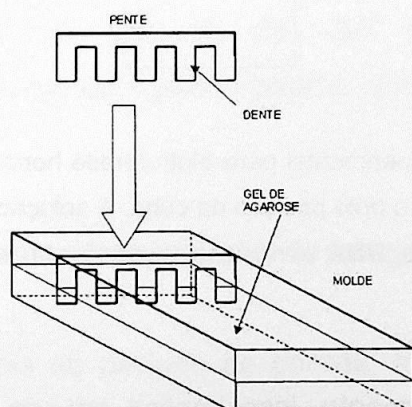


Figura 5.10 – Desenho esquemático do encaixe do pente no molde e no gel de agarose ainda líquido. Quando o gel endurece o pente é retirado e no lugar dos dentes formam-se poços para deposição das amostras

O conjunto foi guardado por algumas horas na geladeira (6°C). Durante o resfriamento do gel, foi preparada e adicionada na cuba de eletroforese, uma solução tampão com um volume de 1200 ml, o suficiente para cobrir o gel de agarose. Então, o gel foi retirado da geladeira e seu pente foi cuidadosamente removido. O gel foi colocado no centro da cuba de forma que os poços formados pelo pente ficaram mais próximos do terminal negativo. A tampa da cuba foi imediatamente fechada para evitar contaminação por partículas em suspensão no ar. Os eletrodos, positivo e negativo, de uma fonte de potência foram conectados nos respectivos terminais da cuba e a fonte foi ligada por alguns minutos com uma d.d.p de 150 V e corrente de 50 mA (fig. 5.11).

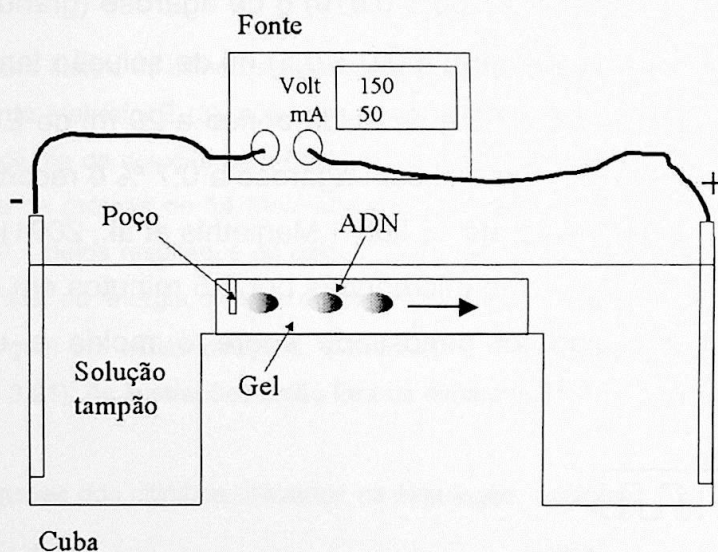


Figura 5.11 – Ilustração esquemática do aparato experimental para eletroforese horizontal em gel de agarose. O DNA migra do pólo negativo para o pólo positivo da cuba. A solução tampão TBE mantém o $\text{pH} \cong 8$ que, além de proteger o DNA, diminui a condutância elétrica e conseqüente geração de calor

A cuba (fig.5.11) tem 25 cm de comprimento, isso implica em um campo elétrico de 5 V.cm^{-1} – é recomendado um campo elétrico entre 5 V.cm^{-1} a 8 V.cm^{-1} para melhor resolução das bandas (Maniatis et al., 2001).

Na cuba foi acrescentado brometo dietídio ($C_{21}H_2OBrN_3$) na concentração final de $0,5 \mu\text{g/ml}$, procedimento padrão.

Em cada gel foram preenchidos 8 poços sendo que um deles foi preenchido com um volume de $(2,00 \pm 0,05) \mu\text{l}$ de marcador de peso molecular (Ladder 1Kb plus) na concentração de $50 \text{ ng}/\mu\text{l}$. Os outros 7 poços, 1 com amostra controle e 6 com amostras irradiadas, foram preenchidos com $(3,00 \pm 0,07) \mu\text{l}$ cada um. Do sexto lote de amostras irradiadas houve perda significativa do volume da amostra, portanto, o volume de $(1,50 \pm 0,04) \mu\text{l}$ foi depositado nos poços daquele gel.

Imediatamente após o carregamento das amostras nos respectivos poços, foram conectados os terminais da fonte de potência nos eletrodos da cuba de eletroforese. Uma d.d.p. de 150 V e uma corrente de 50 mA foram selecionadas e o sistema ligado. Utilizou-se $0,5 \mu\text{l}$ de *stop-mix* (bromofenol azul) por poço para estimar a posição das bandas de DNA durante a corrida no gel. O tempo médio de corrida em cada gel foi de 2 horas.

Considerando o tempo de corrida de 2 horas, uma potência média de $7,5 \text{ W}$ e o volume de solução (1200 ml) na cuba, o sistema sofreu uma elevação média de temperatura de $\sim 11^\circ \text{ C}$. A temperatura ambiente média no local dos experimentos de eletroforese (ICB) foi de 26° C . Assim, a temperatura máxima nos géis foi de $\sim 37^\circ \text{ C}$, portanto, abaixo da temperatura de derretimento da agarose padrão utilizada, que varia de 85° a 95° C .

5.1 Sistema de aquisição de imagens

Depois do período de corrida, a fonte foi desligada e o gel foi retirado da cuba e levado para o sistema de aquisição de imagens. O Eagle Eye[®] II, manufaturado pela *Stratagene*, foi o sistema de aquisição de imagens utilizado nos experimentos. O sistema é equipado com câmera CCD e é capaz de

detectar quantidades de DNA maiores ou iguais a 0,25 ng. O sistema óptico é composto por lentes de aumento e redução para facilitar o posicionamento e a focalização do gel sobre o transiluminador (fig. 5.12).

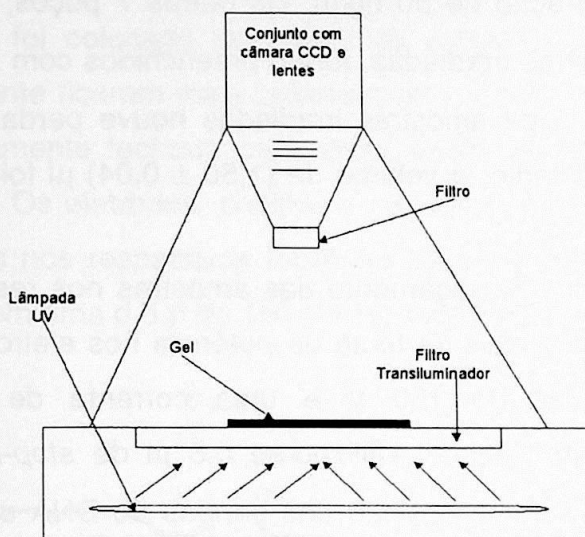


Figura 5.12 – A figura ilustra um arranjo com fonte de luz UV, o gel e a câmera que é utilizada para fotografar a luz transmitida pelo gel na fluorescência. O filtro transluminador seleciona um comprimento de onda de 302 nm

Ruídos na imagem são reduzidos por um filtro óptico passa-banda na região de 600 nm, onde o espectro eletromagnético do DNA lambda corado com brometo é máximo. As imagens digitalizadas foram adquiridas por meio do programa Eagle Sight. A aquisição foi realizada no modo de integração dinâmica com resolução de 16 cores e um período de integração de 40 segundos por imagem. Após o período de integração, as imagens foram gravadas no formato BITMAP. Outros formatos como JPEG, TIFF e GIF foram testados pelo programa GelAnalysis desenvolvido no IFUSP e verificou-se

perda de pixels em relação ao BITMAP, especialmente acentuada para tons claros de cinza.

6. Técnica dosimétrica alternativa

Ao atravessar alguns tipos de plásticos, os prótons depositam sua energia cinética no meio. A dose absorvida pelo meio é proporcional ao número de prótons e a energia média do próton pode ser determinada pelo comprimento de seu rasto, ou traço, no filme (Attix, 1986). O traço pode ser medido e visualizado com o auxílio de um microscópio óptico. Sendo assim, um experimento foi realizado para avaliar a possibilidade de utilização da membrana de Makrofol-E, não só como vedação para o DNA, mas também como dosímetro. O aparato experimental é ilustrado na figura 5.13.

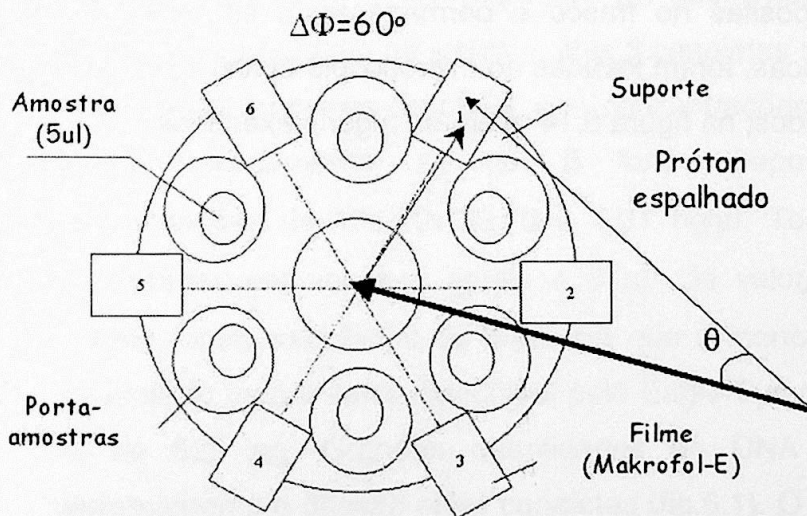


Figura 5.13 – Ilustração da vista frontal do suporte para porta-amostras. Os retângulos numerados de 1 a 6 são folhas de Makrofol-E de mesma área e separadas por 60° uma da outra. A seta vermelha indica a direção radial ao feixe incidente (seta preta mais espessa), a seta preta mais fina simboliza o feixe de prótons espalhados por um ângulo θ incidindo sobre uma folha de Makrofol-E

Para avaliar a eficiência do Makrofol-E e a simetria do feixe de prótons foram preparadas 6 amostras de DNA, que foram irradiadas em 2 etapas e 6 folhas de Makrofol-E (fig. 5.13). A fixação das folhas de Makrofol-E foi por meio de fita adesiva dupla-face. As faces rugosas das folhas ficaram coladas à fita e ao suporte para porta-amostras. Antes da irradiação as folhas foram cuidadosamente limpas com lenços de papel umedecidos em água, evitando ranhuras nas faces lisas.

Após a primeira etapa de irradiação foram retiradas as folhas de números 2 e 5. Esse procedimento foi justificado por falta de informação a respeito do limiar de saturação do Makrofol-E, nas condições do experimento.

Para a revelação dos filmes foi preparada uma solução contendo 15 % de KOH, 40% de Álcool etílico e 45% de água. A solução foi depositada em um frasco de vidro e o conjunto levado para o banho térmico a 70° C em uma cuba com água. Quando a solução entrou em equilíbrio térmico a 70° C, as folhas de Makrofol-E foram depositas no frasco e permaneceram em solução por 8 minutos. Depois de secas, foram levadas ao microscópio óptico e os traços dos prótons foram focalizados; na figura 5.14 vêem-se alguns exemplos.

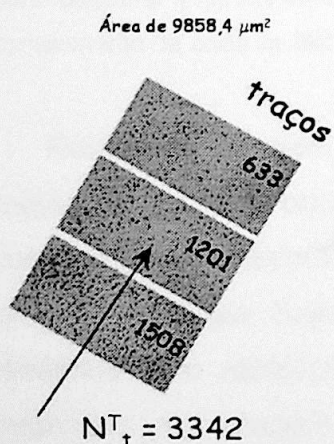


Figura 5.14 – Exemplos de traços de prótons vistos com auxílio de microscópio óptico. As 3 imagens foram obtidas da mesma folha de Makrofol-E. Na direção radial(seta) ao feixe incidente, observa-se um gradiente de traços. Cada retângulo tem área de 9858,4 μm^2

Detalhes da análise de dados dos filmes serão vistos no capítulo VI.

Capítulo VI: Resultados e análise de dados

Antes da utilização do método de quantificação por eletroforese em gel de agarose foi realizado um estudo para determinar a viabilidade do uso de tal método.

6.1 Estudo da variação da densidade óptica integrada (DOI) *versus* tempo de corrida do DNA em gel de agarose

Foram produzidos dois géis com fundos diferentes, gel A e gel B (fig. 6.2). Na primeira canaleta de cada gel foi depositada, na concentração de 50 ng/ μ l em um volume de 2 μ l, uma amostra de *ladder 1Kb plus* manufaturado pela *Invitrogen* (o *ladder* é um marcador de peso molecular) que poderá ser utilizado na calibração do sistema. Nas 3 canaletas seguintes do gel A foram depositadas amostras de pBSK nas concentrações de 175; 83,45 e 14,82 ng/ μ l. Analogamente, no gel B foram depositadas amostras nas concentrações de 136,72; 39,79 e 4,31 ng/ μ l. Todas as amostras foram depositadas em volumes iguais a 3 μ l. Os valores de concentrações e volume foram calculados de tal forma que a menor massa foi de 12,9 ng, próxima do menor valor detectável pelo Eagle Eye (10ng), e a maior massa foi de 525 ng. Grandes quantidades de DNA no gel podem sofrer derramamento e difusão entre canaletas (fig.6.1). O derramamento pode ser explicado por fragmentos de tamanho menor que estão misturados aos maiores. Durante a corrida no gel os fragmentos menores, mais velozes, se acumulam empurrando os maiores, que são afastados da trajetória dos menores. Em determinado instante, os menores irrompem a parede formada pelos maiores atravessando-a.

DOI versus TEMPO DE CORRIDA DO DNA EM GEL

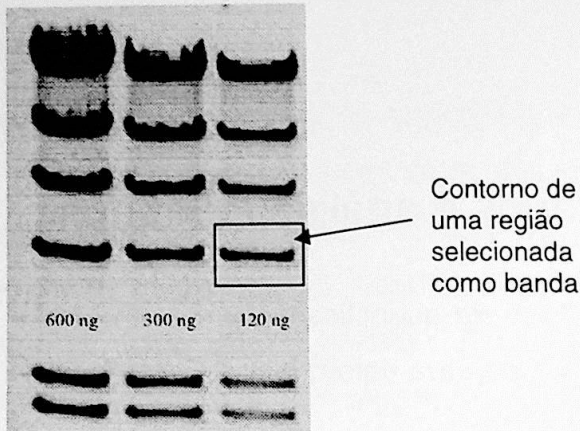
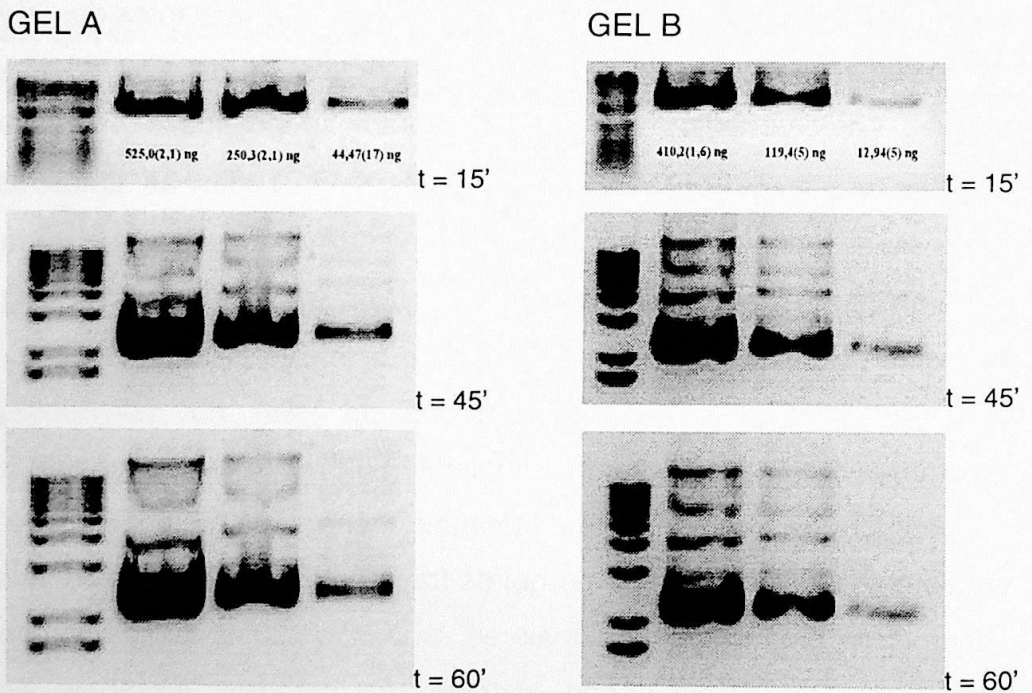


Figura 6.1 – Da esquerda para direita: 600, 300 e 120 ng de DNA λ digerido pela HindIII. Observa-se a ocorrência de intenso derramamento da banda de maior massa (23130 pb)

Os géis A e B foram acomodados na mesma cuba de eletroforese nas mesmas condições físicas e químicas (seção V.5) para produção de todos os géis dos experimentos de eletroforese. Foram adquiridas 12 imagens digitalizadas (seção V.5.1), sendo 6 do gel A e 6 do gel B (fig. 6.2). Cada par adquirido nos instantes $t=15'$, $45'$, $60'$, $90'$, $120'$ e $150'$:



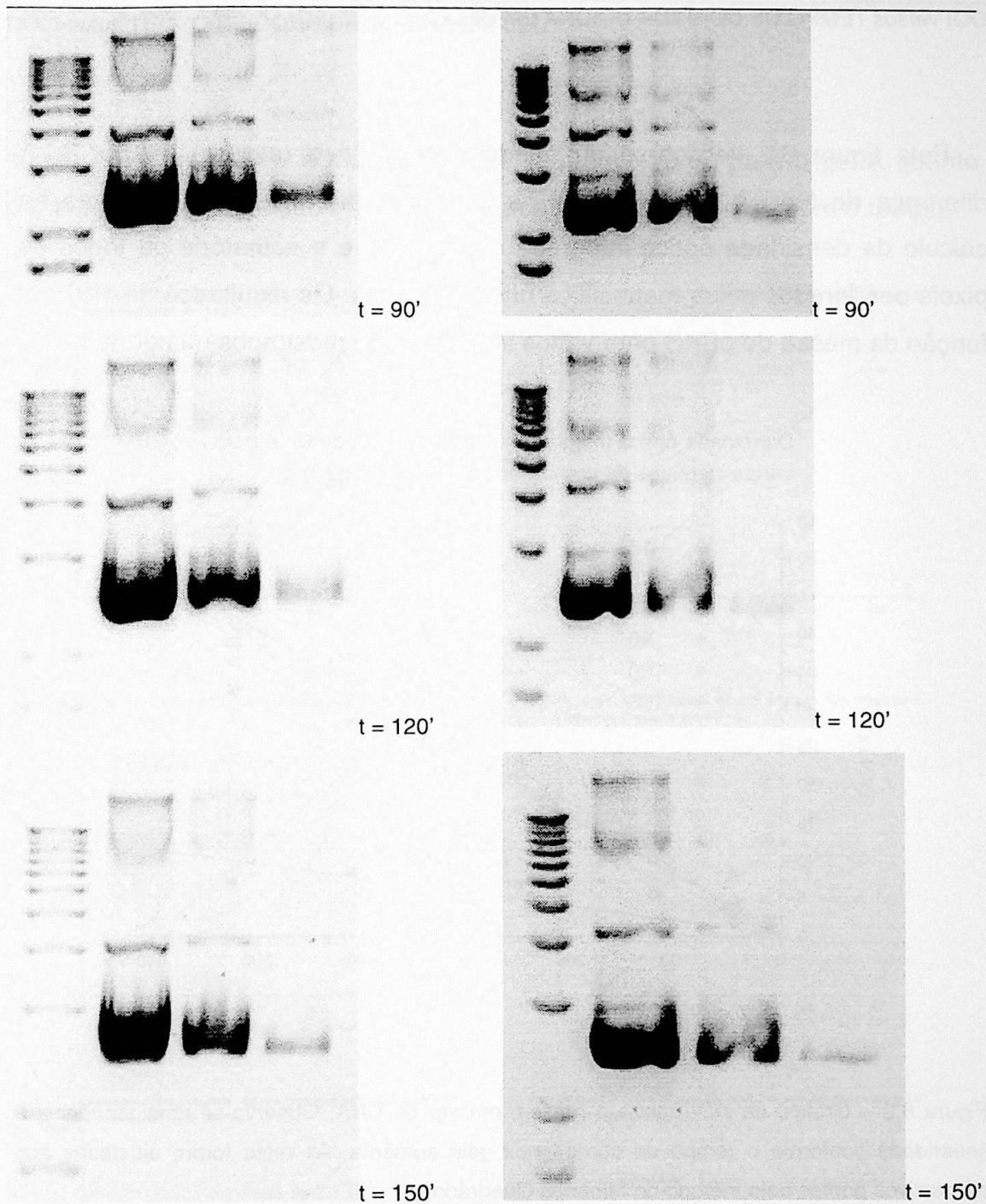


Figura 6.2 – Imagens digitais dos géis A e B adquiridas em vários instantes da corrida do pBKS. As canaletas da esquerda contém ladder 1 kb plus. Todas as imagens no formato de compressão BITMAP

Pela figura 6.2 verifica-se um fundo mais intenso (escuro) no gel B. A diferença de fundos foi importante na avaliação das incertezas relativas no cálculo da densidade óptica integrada (*DOI*), que é a somatória de todos os pixels ponderados pelos respectivos níveis de cinza. Os resultados da *DOI* em função da massa de pBKS para vários instantes são mostrados na figura 6.3.

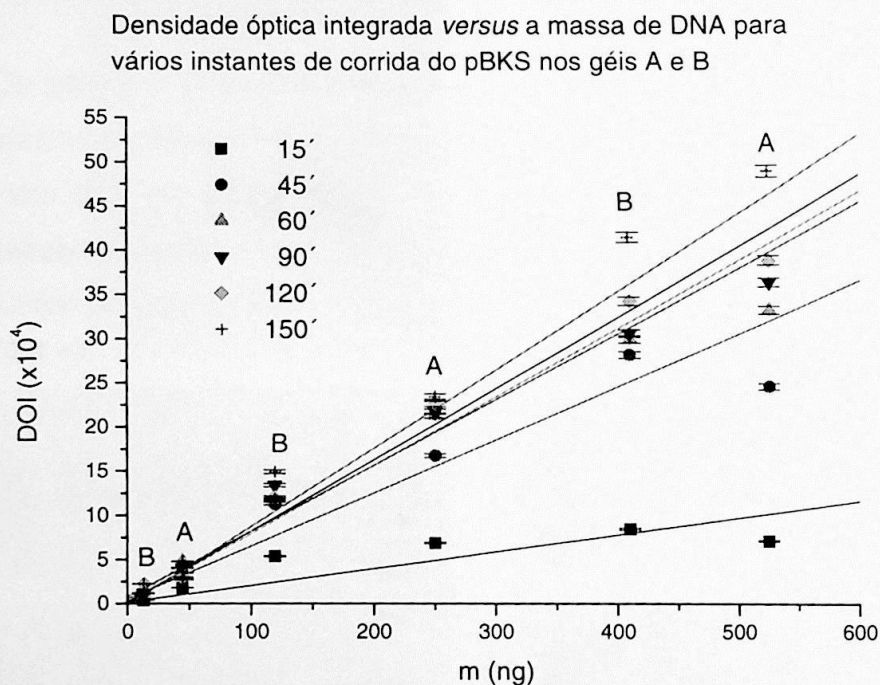
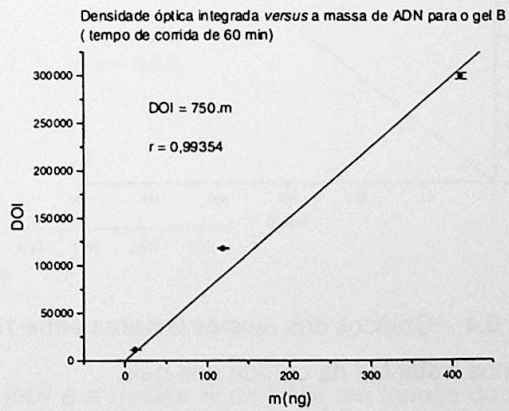
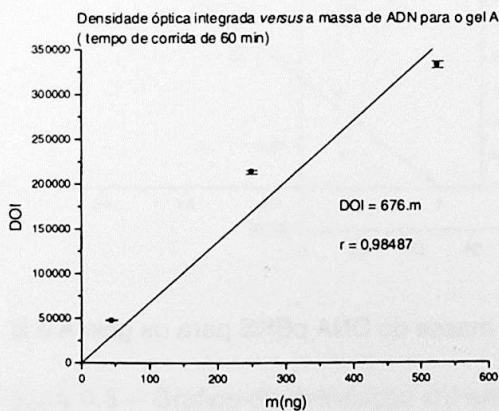
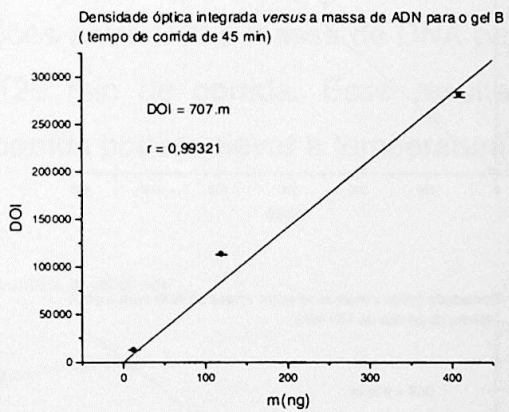
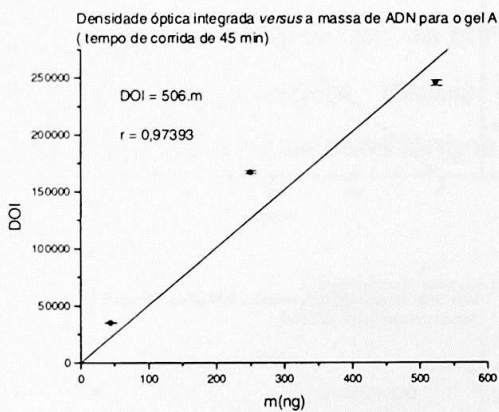
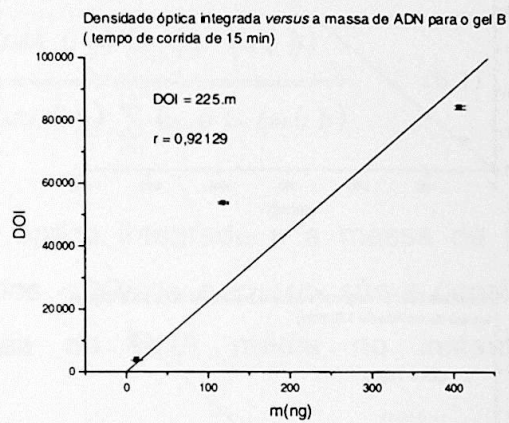
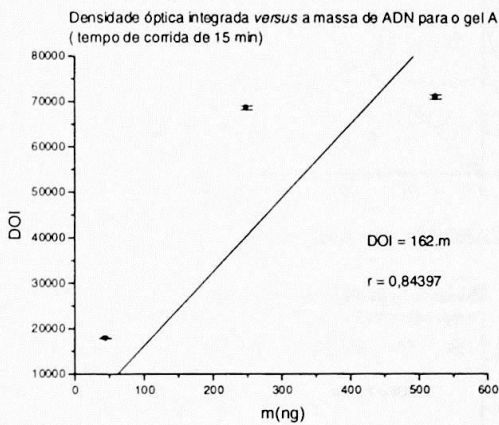


Figura 6.3 – Gráfico da *DOI* contra a massa, em ng, de DNA. Observa-se uma tendência à linearidade conforme o tempo de corrida nos géis aumenta. As retas foram ajustadas aos respectivos pontos pelo método do Mínimos Quadrados

Por meio do gráfico da figura 6.3 pode-se observar uma tendência à linearidade entre a *DOI* e a massa do pBKS conforme o tempo de corrida do gel aumenta. Um estudo da linearidade em função do tempo foi realizado. Para cada imagem da figura 6.2 foi construído um gráfico mostrando o resultado do

DOI versus TEMPO DE CORRIDA DO DNA EM GEL

ajuste linear entre DOI e massa de DNA (fig. 6.4). Tanto para o gel A quanto para o gel B, a correlação entre DOI e massa de DNA aumenta com o tempo



DOI versus TEMPO DE CORRIDA DO DNA EM GEL

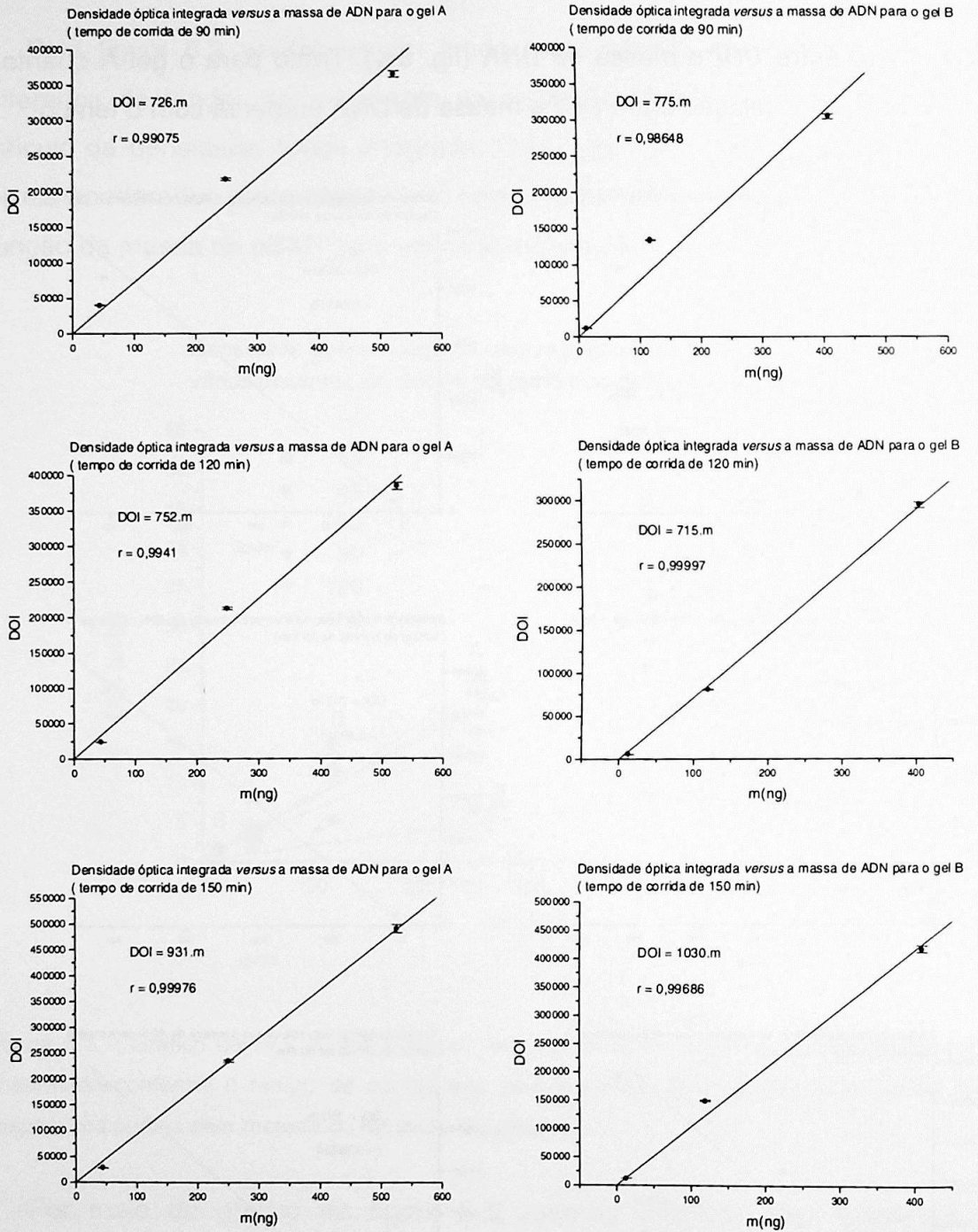


Figura 6.4 – Gráficos dos ajustes lineares entre DOI e massa do DNA pBKS para os géis A e B em vários instantes da corrida nos géis

de corrida nos géis. O comportamento temporal do coeficiente de correlação $r(DOI(t), m(t); t)$ é dado por

$$r(DOI(t), m(t); t) = \frac{\sum_{i=1}^n (DOI_i(t) - \langle DOI(t) \rangle) \cdot (m_i(t) - \langle m(t) \rangle)}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (DOI_i(t) - \langle DOI(t) \rangle)^2 \cdot \sum_{i=1}^n (m_i(t) - \langle m(t) \rangle)^2}}, \quad (6.1)$$

onde, $DOI(t)$ e $m(t)$ são a densidade óptica integrada e a massa de DNA, respectivamente no instante t . Os termos $\langle DOI(t) \rangle$ e $\langle m(t) \rangle$ são a densidade óptica integrada média e a massa de DNA média no instante t , respectivamente.

Os coeficientes de correlação $r(t)$ para os géis A e B são mostrados na figura 6.5. Do gráfico, nota-se que as correlações entre DOI e massa de DNA para os géis A e B convergem, depois de 120 min de corrida. Esse resultado é importante porque períodos longos de corrida podem elevar a temperatura na

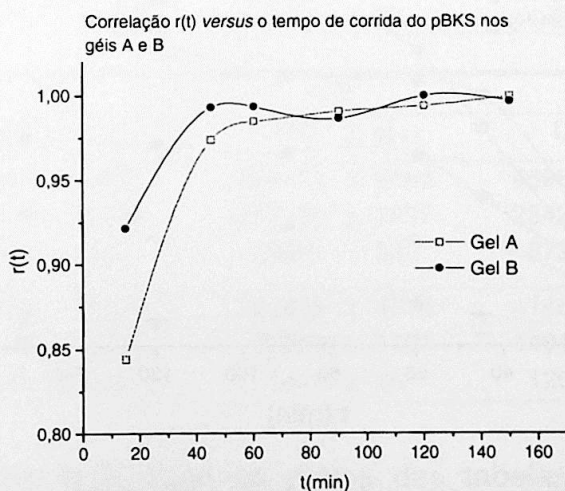


Figura 6.5 – Gráfico da correlação $r(t)$ entre a DOI e a massa m de DNA em função do tempo de corrida nos géis A e B

cuba de eletroforese a valores críticos para ambos, gel e DNA, dependendo da potência elétrica da fonte.

A figura 6.6 mostra os resultados das medidas da *DOI* vários instantes durante a corrida nos géis. Como foi visto no capítulo II a molécula de DNA tem carga residual negativa enquanto o brometo tem carga residual positiva. Portanto, durante a corrida no gel as moléculas migram na mesma direção mas, em sentidos opostos, ocorrendo então uma colisão entre elas. Na passagem do tempo, mais e mais moléculas de brometo colidem e se ligam ao DNA. Em um dado momento ocorre saturação no processo, isto é, uma molécula de brometo fica intercalada no DNA a cada 2 pares de bases, isto é,

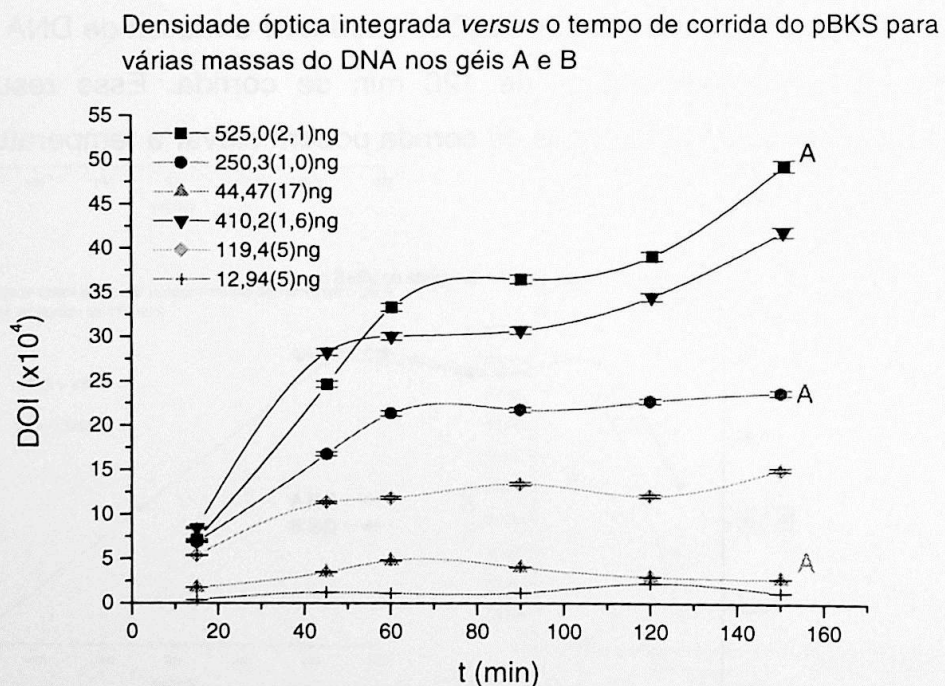


Figura 6.6 – Gráfico da *DOI* contra o tempo de corrida nos géis A e B para várias massas de plasmídeo pBSK. As 3 primeiras massas (525,0(2,1), 250,3(1,0) e 44,47(17) ng) correspondem ao gel A. No gráfico, observa-se uma permutação de *DOI* para quantidades relativamente grandes de DNA com tempos curtos (até 60') de corrida em gel

INCERTEZA RELATIVA NA MEDIDA DA DOI

novas colisões podem ocorrer, entretanto não ocorre ligação. No máximo, haverá trocas entre moléculas ligadas e não ligadas. Os gráficos das figuras 6.3, 6.4 e 6.6 foram construídos por meio dos dados da tabela 6.1.

2. Estimativa da incerteza relativa na medida da DOI

Para estimar a incerteza relativa na medida da *DOI* (tabela 6.1), foram realizadas 5 medidas de cada canal dos géis A e B para cada um dos 6 instantes

Tabela 6.1: Medidas de massa e respectiva DOI de DNA em vários instantes de corrida nos géis A e B

T	m(ng) ± σ_m (ng)	15'	45'	60'
		DOI ± σ_{DOI}	DOI ± σ_{DOI}	DOI ± σ_{DOI}
GEL A	525,0 ± 2,0	71044 ± 973	245546 ± 3364	332403 ± 4554
	250,0 ± 1,0	68641 ± 940	167185 ± 2290	212824 ± 2916
	44,00 ± 0,17	17848 ± 245	35125 ± 481	47999 ± 658
GEL B	410,0 ± 1,6	84380 ± 1156	281730 ± 3860	299447 ± 4102
	119,0 ± 0,5	53688 ± 736	112947 ± 1547	118120 ± 1618
	13,00 ± 0,05	3620 ± 50	12353 ± 169	11228 ± 154

	90'	120'	150'
	DOI ± σ_{DOI}	DOI ± σ_{DOI}	DOI ± σ_{DOI}
GEL A	363640 ± 4982	384412 ± 5266	489606 ± 6708
	217017 ± 2973	212180 ± 2907	234270 ± 3209
	40367 ± 553	23607 ± 323	27380 ± 375
GEL B	305909 ± 4191	294738 ± 4038	414893 ± 5684
	133930 ± 1835	80786 ± 1107	149114 ± 2043
	11613 ± 159	5474 ± 75	12067 ± 165

mencionados (fig. 6.2). Com os dados das tabelas 6.2 e 6.3 foi possível descrever a distribuição de probabilidades das incertezas relativas, ξ_B e ξ_F , da medida da *DOI* devido a variação da área que contém uma banda (fig. 6.1) e,

devido às variações na escolha do limiar de corte do fundo (fig. 6.8) para uma mesma banda, respectivamente.

A *DOI* da banda depende da área que a envolve (fig. 6.8). Por isso, as regiões que envolvem as bandas foram escolhidas de forma que o contorno (retangular) dessas regiões (fig. 6.1) ficaram próximos aos limites visíveis das bandas. *A priori*, é muito difícil encontrar o limite entre o fundo e o sinal, isto é, a fronteira entre essas regiões (Gonzalez et al., 1992).

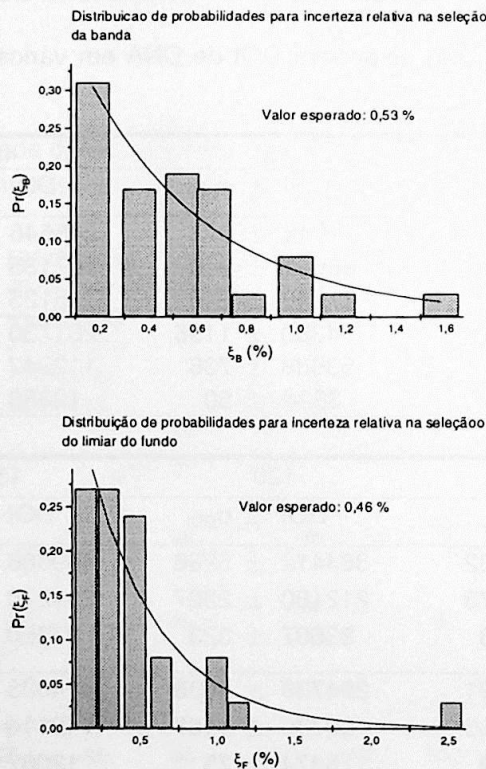


Figura 6.7 – Histogramas das distribuições de probabilidades das incertezas relativas das *DOI* da região da banda e do limiar de corte do fundo. Os histogramas sugerem uma distribuição exponencial

INCERTEZA RELATIVA NA MEDIDA DA DOI

Tabela 6.2: Valores das medidas de *DOI* das bandas de DNA por canal do gel A. Para cada limiar de corte de fundo (fundo1, fundo2...) foram obtidas 5 medidas de *DOI* em 6 instantes (15', 45', ...) de tempo de corrida no gel

GEL A									
t (')	CANAL 1			CANAL 2			CANAL 3		
	fundo 1	fundo 2	fundo 3	fundo 1	fundo 2	fundo 3	fundo 1	fundo 2	fundo 3
15	74107	71529	75736	65166	67940	66503	15963	19340	24025
	74331	71537	75529	65009	68248	66336	15917	19126	23080
	74782	71487	75052	65336	67953	66702	15961	19390	23893
	75101	71570	75197	65199	68183	66766	15963	19168	24156
	73893	71673	76003	65009	67859	66503	15956	19116	23933
45	243834	230431	230513	167838	155986	150814	35204	34361	31463
	244346	228978	232310	165893	154389	150856	34894	34377	31463
	245248	229368	231081	166333	156352	150996	34883	34117	31444
	246987	230541	230156	165974	154862	152732	35126	34117	31418
	245767	229047	230155	166230	155638	151872	35125	34303	31438
60	293300	303972	274181	212132	221756	197200	34291	35845	29695
	293657	297991	274253	215554	218324	196033	34385	35997	29782
	292026	303012	274721	209499	218912	196221	34385	35838	29786
	292904	304138	274792	211803	227043	197105	34337	34693	29459
	293630	301861	274486	210560	217459	193509	34385	35602	29762
90	348445	346000	380765	227953	207766	219594	37698	33797	44041
	350756	343815	381485	230585	210792	220142	37570	34522	44241
	351862	343650	381949	229289	204956	218184	37255	34486	44378
	352670	342174	377659	230044	209115	219594	37647	34504	44128
	350260	345473	383720	227789	209371	220867	37650	34527	42768
120	363979	320314	372772	193493	192527	217659	16143	8786	20572
	362246	320453	376836	190778	192263	224862	15927	8774	21696
	362347	320368	374896	195599	193387	217796	16004	8766	21032
	362946	319930	374896	193262	192123	218090	15905	8701	21684
	366069	320527	372941	192304	192758	218012	15817	8829	21287
150	479540	451154	500583	275847	236754	208979	23201	19054	29984
	482127	449874	506732	272404	233185	210335	23632	18637	30663
	479861	450190	501376	275088	238007	211393	23539	19370	30505
	474513	449345	499137	277190	238016	210629	23571	19060	30191
	480417	447773	502764	274622	233726	210608	23272	19371	30256

INCERTEZA RELATIVA NA MEDIDA DA DOI

Tabela 6.3: Valores das medidas de *DOI* das bandas de DNA por canal do gel B. Para cada limiar de corte de fundo (fundo1, fundo2...) foram obtidas 5 medidas de *DOI* em 6 instantes (15', 45', ...) de tempo de corrida no gel

GEL B									
t (')	CANAL 1			CANAL 2			CANAL 3		
	fundo 1	fundo 2	fundo 3	fundo 1	fundo 2	fundo 3	fundo 1	fundo 2	fundo 3
15	101360	91518	90847	65443	65926	70381	10284	6262	5703
	100990	91294	90896	64727	64745	70727	9651	5910	5451
	103051	91232	91316	67627	64463	69190	8698	5567	5754
	103752	92522	90986	64984	65030	70716	9173	5883	5358
	103167	92076	90815	67063	67047	70776	8976	6106	5031
45	239347	227030	253918	88572	83172	78859	7883	6869	9626
	234351	223392	257176	88993	83331	79039	7883	6869	9548
	236634	220686	258499	87961	83291	78864	7883	6869	9626
	239938	224212	253513	88382	83436	78771	7883	6869	9611
	237672	224176	247737	87961	83151	78762	7883	6869	9626
60	297120	276020	301387	143275	110402	105063	10437	8751	10835
	298427	284773	298481	147540	112218	105722	10439	8751	10787
	292573	285150	309873	143679	110437	105772	10451	8751	10981
	302280	279826	300670	147261	111749	105338	10415	8762	10846
	298148	282958	298446	143332	110997	105389	10441	8751	10829
90	320511	281179	269098	145185	123288	115724	10649	7344	5953
	326998	280126	271351	141462	125691	115731	10880	7357	5951
	318127	278880	269224	147021	123990	113002	11001	7230	5950
	327115	279138	271057	145858	124906	115908	10800	7323	5949
	320677	281682	271579	139991	125061	115324	10660	7365	5946
120	275878	326708	265733	74215	68797	89797	1833	4299	655
	273417	315286	268185	70518	68591	88221	1731	4619	654
	274058	321185	267481	70714	70094	94276	1792	4380	659
	278349	317593	268368	72935	70696	84467	1814	4501	659
	282484	323999	266238	72871	68511	87641	1860	4195	654
150	421682	365774	453953	151416	166230	142236	9119	5256	9904
	432494	365432	447212	154637	158800	137159	9658	5196	10224
	427405	367321	455628	146817	166955	141759	9350	5110	9858
	425706	364859	443985	150069	168676	136946	9625	5203	9676
	418251	367631	452847	157653	163002	138920	9001	5256	9926

Variações no limiar de corte do fundo implicam em variações na *DOI* da banda (fig. 6.8). Para limiares de corte pequenos tem-se maior *DOI* para uma mesma banda. Nessas condições, a covariância entre o limiar de corte do fundo e a *DOI* da banda deveria ser considerada na propagação das incertezas já que, o valor esperado da incerteza relativa na região da banda (ξ_B) é $\cong 0,53\%$ e o valor esperado da incerteza relativa do limiar de corte do fundo (ξ_F) é $\cong 0,46\%$. Sendo assim, a relação

$$\frac{\xi_F}{\xi_B} = 87\%. \quad (6.2)$$

Portanto, a incerteza no limiar de corte do fundo é da ordem da incerteza na seleção da região da banda para uma medida de *DOI* da banda de DNA. Mas, a correlação entre as medidas de *DOI* considerando as variações no

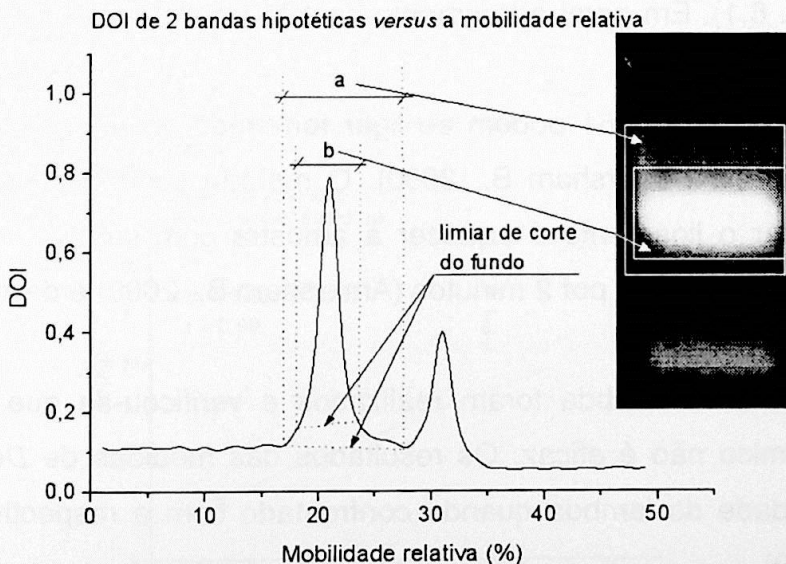


Figura 6.8 – Ilustração-exemplo da seleção do limiar de corte do fundo. Os picos de *DOI* mensuram quantidades hipotéticas de DNA na forma circular fechada (pico mais alto) e superenrolada. A *DOI* do fundo varia na extensão do gel. As distâncias indicadas pelas letras *a* e *b* na figura são proporcionais as áreas de seleção da banda

limiar de corte do fundo e as variações na seleção da região da banda com fundo fixo é pequena. Portanto, o termo de covariância também é pequeno e pode ser desconsiderado. Assim, a incerteza relativa nas medidas de DOI , ξ_{DOI} , é dada por

$$\xi_{DOI} \cong \sqrt{\xi_B^2 + \xi_F^2 + 1/DOI}. \quad (6.3)$$

3. Calibração por meio de marcadores de peso molecular

Os marcadores de peso molecular são utilizados para estimar a mobilidade relativa de algumas macromoléculas em gel. Contudo, pode-se utilizá-los como padrão de calibração para inferir massas desconhecidas no gel. O λ é um marcador que digerido pela enzima Hind III forma fragmentos lineares de tamanhos distintos (fig. 6.1). Em geral o fragmento de 125 pb não aparece na imagem do gel.

Os fragmentos de 23130 e 4361 podem se ligar formando um fragmento não desejado de 27491 pb (Amersham B., 2000). O método sugerido pelos fornecedores para evitar o ligamento é aquecer a amostra com λ em água a temperatura de 60° a 65° C por 2 minutos (Amersham B., 2000) e deixar resfriar em congelador.

Alguns experimentos com λ foram realizados e verificou-se que o método do choque térmico não é eficaz. Os resultados das medidas de DOI mostram a não linearidade do λ quando confrontado com a respectiva massa de DNA (fig. 6.9).

Um outro marcador utilizado nos experimentos foi o ladder 1Kb/Plus apresentado na figura 6.2 – canal esquerdo dos géis. Os fragmentos lineares

estão compreendidos na faixa de 100 pb a 12000 pb. Dos resultados das medidas constatou-se que relação entre massa e *DOI* não é linear (fig. 6.10).

O fragmento de 1650 pb tem *DOI* maior do que, por exemplo, um fragmento de 7000 pb.

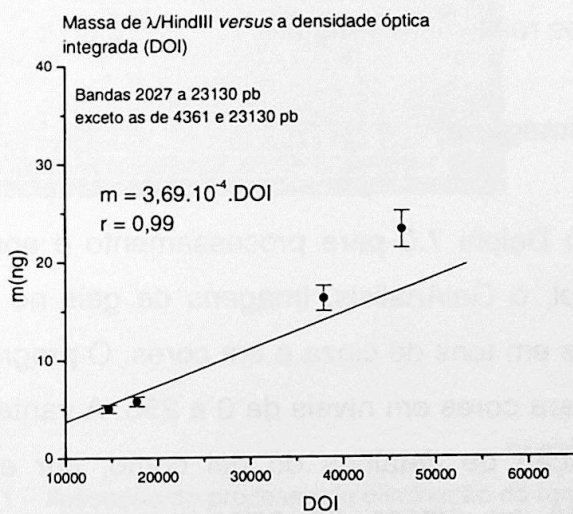
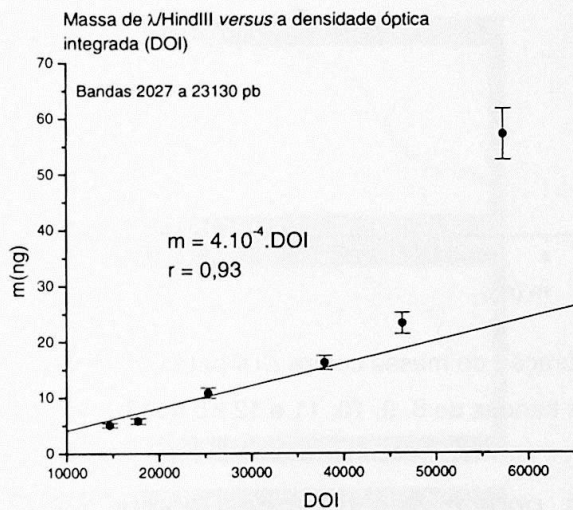


Figura 6.9 – Gráfico das curvas de calibração de massa para 120 ng de λ Hind III. Em cima, observa-se a não linearidade do, por conta do fragmento maior. Em baixo, o ajuste de reta foi realizado sem a presença dos fragmentos de 4361 pb e 23130 pb

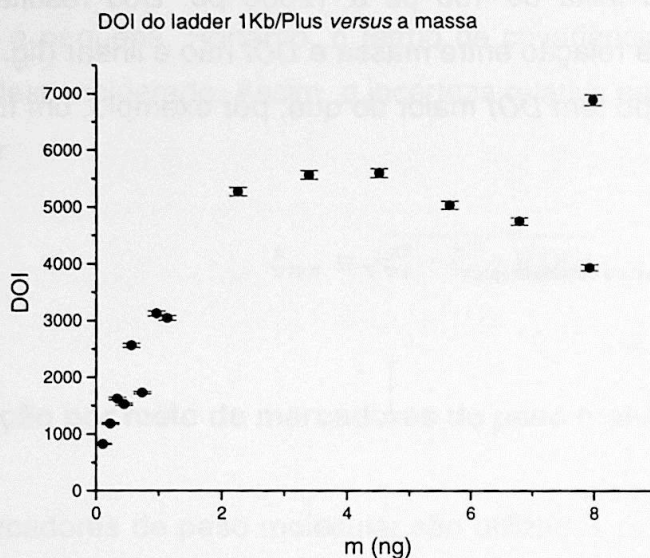
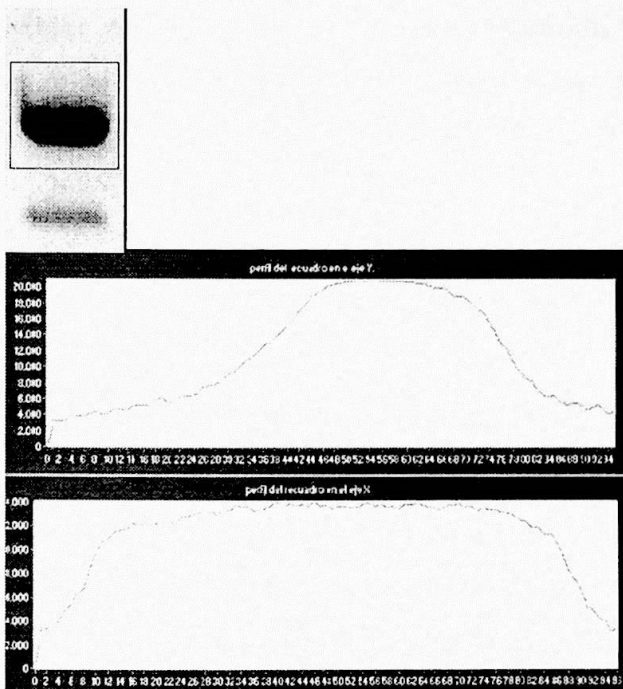


Figura 6.10 – Gráfico da curva de calibração de massa contra *DOI* para uma amostra contendo 100 ng de ladder 1Kb/plus. As *DOI* das bandas de 8, 9, 10, 11 e 12 Kb não foram medidas

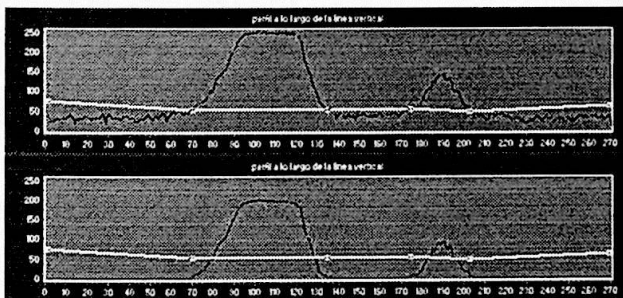
Todavia, esses marcadores podem ser utilizados como referência em medidas de deslocamento de bandas de DNA em géis devido a alta reprodutibilidade das mobilidades relativas (ver figuras 6.1, 6.12, 6.16 e 6.17).

4. Técnicas de tratamento de imagens

Um programa foi escrito em Delphi 7.0 para processamento e análise de imagens de eletroforese em gel, o GelAnalysis. Imagens de géis no formato BITMAP podem ser visualizadas em tons de cinza e em cores. O programa faz a conversão de tons de cinza para cores em níveis de 0 a 255. A vantagem da imagem colorida é a visualização de detalhes do gel como, por exemplo, rupturas, aglomerados de DNA ou *smear*. Ao selecionar uma região de interesse na imagem é possível avaliar o efeito local do fundo por meio dos perfis vertical e horizontal (fig. 6.11).



a) seleção da região de interesse



b) eliminação do fundo

Figura 6.11 – Ilustração do processo de eliminação do fundo de imagens de geís. Uma banda é selecionada e seus respectivos perfis, vertical ou y e horizontal ou x, são mostrados em a). O perfil vertical ao longo do canal é mostrado em b), a linha branca é o limiar de corte do fundo. Ainda em b) vê-se a imagem do canal depois da eliminação do fundo

5. Cálculo do número de quebras SSB no pBKS

As quebras tipo SSB podem ser calculadas por meio da fração de sobrevivência ϕ dada por

$$\phi = \frac{1 + m_c^{(0)} / m_e^{(0)}}{1 + m_c^{(n)} / m_e^{(n)}}, \quad (6.4)$$

onde, $m_c^{(0)}$ e $m_e^{(0)}$ são as massas de DNA circular fechado e superenrolado não irradiados, respectivamente. Os termos $m_c^{(n)}$ e $m_e^{(n)}$ são, nessa ordem, as massas de DNA circular fechado e superenrolado irradiados e o índice $n = 0, 1, 2 \dots k$ representa o número da dose. Quando n é zero a amostra não irradiada tem ϕ máxima igual a 1. Para doses crescentes ϕ dever ser menor do que 1.

Para o cálculo da incerteza em ϕ deve-se levar em conta que em geral, a massa de DNA circular fechado é muito menor do que a massa do superenrolado para um DNA não irradiado (fig.6.12).

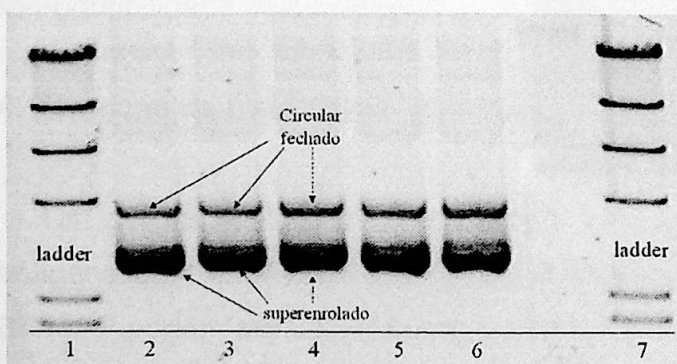


Figura 6.12 – A figura mostra um gel com 5 amostras nos canais de 2 a 6 do pBKS de mesma concentração e mesmo volume, não irradiadas. A incerteza relativa na forma circular fechada é de 11% enquanto que a incerteza relativa na forma superenrolada é de 4%

Já para uma amostra irradiada, o DNA superenrolado tem massa muito maior do que o circular fechado. Portanto, a covariância entre essas massas é pequena. Dessa forma a incerteza σ_ϕ em ϕ é dada por

$$\sigma_\phi \cong \frac{1}{m_e^{(n)} + m_c^{(n)}} \cdot \sqrt{\left(\frac{m_e^{(n)}}{m_e^{(0)}}\right)^2 \left(\sigma_{m_c^{(0)}}^2 + \left(\frac{m_c^{(0)} \sigma_{m_e^{(0)}}}{m_e^{(0)}}\right)^2\right) + \left(\frac{1 + m_c^{(0)}/m_e^{(0)}}{m_e^{(n)} + m_c^{(n)}}\right)^2 \left[\left(m_e^{(n)} \sigma_{m_c^{(n)}}\right)^2 + \left(m_c^{(n)} \sigma_{m_e^{(n)}}\right)^2\right]} \quad (6.5)$$

onde, os σ_m são as incertezas nas medidas de DOI das respectivas massas m_x^y conforme a equação 6.4.

6. Cálculo da dose

Nas medidas que foram realizadas, a amostra é atingida pelo feixe espalhado. O controle da corrente do feixe é feito com um Copo de Faraday colocado na direção do feixe principal (fig.V- 5.7, pág. 52)

Podemos avaliar o número de prótons que atinge a amostra usando a secção de choque de Rutherford. Para verificar se esse procedimento é adequado, foram feitas 2 medidas de números de prótons usando um detector de barreira de superfície (de Si) colocado na posição das amostras de DNA.

Na tabela 6.4 comparamos o valor medido com aquele estimado. Observamos, em cada medida, que a razão entre o valor medido e o valor estimado é de 0,1410(4), que será utilizado como fator de correção, f_c , no cálculo da dose, como descrito adiante. Embora não tenhamos realizado maiores verificações, podemos atribuir este fator a problemas relacionados à coleta de cargas elétricas no copo de Faraday.

CÁLCULO DA DOSE

Tabela 6.4 – Valores medidos e esperados do número de prótons que atingem uma área com diâmetro de 3 mm localizada a 167(1) mm da janela de Al. A energia do próton foi de 14,75 MeV, a corrente incidente do feixe na janela foi de 1 nA e o ângulo de espalhamento de 18,67°

Número de contagens (N_p)		Δt (s)	f_c (medido/esperado)
medido	esperado		
254000(504)	1762560(140)	255	0,1441(3)
190000(436)	1382400(110)	200	0,1378(3)

A partir do número de prótons, N_p , pode-se obter a dose absorvida pela amostra através da relação

$$D = N_p \langle LET \rangle l, \quad (6.6)$$

onde, $\langle LET \rangle$ é o LET médio dos prótons na região da amostra e l é o comprimento (longitudinal) da amostra.

O LET e o alcance do próton em água foram obtidos conforme simulação abaixo (fig. 6.13).

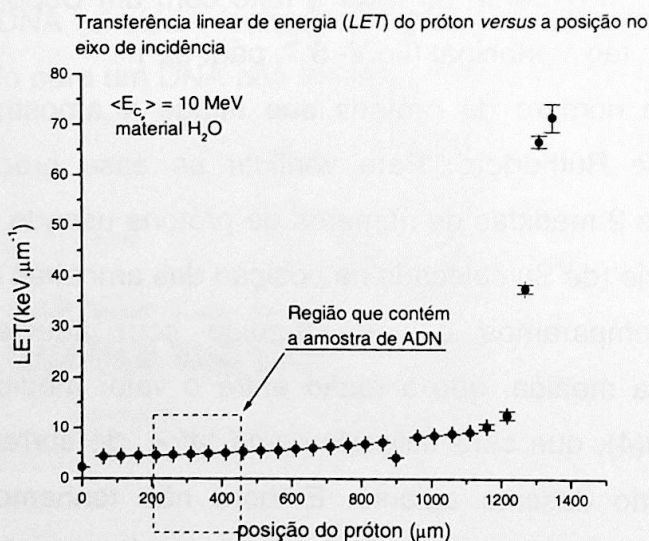


Figura 6.13 – Gráfico da curva de Bragg de um próton de 10 MeV incidindo perpendicularmente em uma base de um tubo de água de 1 cm de diâmetro por 1 cm de comprimento. A face de incidência do tubo está localizada na posição 0 (GEANT 3.21)

Portanto, por meio dos dados da figura 6.13 foi possível encontrar o LET na região da amostra como $(5,01 \pm 0,14)$ keV. μm^{-1} . Dessa forma, a dose absorvida na amostra é dada por

$$D = 1000 \cdot f_c \cdot \left[\left(\frac{d\sigma}{d\Omega} \right)_{R_{\text{int}}} \cdot d\Omega \cdot \eta \cdot C_i \cdot e^{-1} \right] \frac{LET \cdot d}{m}, \quad (6.7)$$

onde, os termos dentro dos colchetes expressam o número de prótons, N_p , que atingiu a amostra, d é a espessura da amostra na direção de incidência do próton em μm , e é a carga elétrica elementar em C, m é a massa da amostra em Kg, η é a densidade superficial de núcleos da janela espalhadora de alumínio por m^2 , C_i é a carga integrada, em Coulomb, f_c é o fator de correção para N_p (tabela 6.4) e 1000 corrige a dose para unidades de Gy.

As contribuições mais significativas para a incerteza na dose provém do LET , da espessura d e da massa m da amostra. Portanto a incerteza na dose σ_D é dada por

$$\sigma_D \cong \frac{1000 f_c N_p}{m} \sqrt{(d\sigma_{LET})^2 + (LET\sigma_d)^2 + (LETd\sigma_m/m)^2}, \quad (6.8)$$

aqui, σ_{LET} , σ_d e σ_m são as incertezas no LET , na espessura d e na massa m da amostra, respectivamente.

7. Medidas dos traços de prótons em filme de Makrofol-E

Para um maior controle do número de prótons que efetivamente atingem a amostra, decidimos estudar a possibilidade de usarmos a folha de Makrofol-E,

MEDIDAS DE TRAÇOS DE PRÓTONS

que veda o porta-amostra, como diretor de prótons. Como viu-se anteriormente (cap.V, pág. 62), os prótons deixam no Makrofol-E um sinal característico, que pode ser observado através de um microscópio óptico.

Fizemos irradiações de 6 folhas de Makrofol-E posicionadas sobre o suporte dos porta-amostras (cap.V, pág.61), que foram irradiadas durante dois intervalos de tempo diferentes.

A tabela 6.5 mostra os resultados das medidas do número de traços de prótons em folhas de Makrofol-E distribuídas ao redor do suporte dos porta-amostras. As folhas M1, M3, M4 e M6 foram expostas à radiação por um período de 606s, enquanto as folhas M2 e M5 foram expostas durante 287 segundos. Foram realizadas, na direção radial ao feixe de prótons incidente, 3 medidas de traços em diferentes posições de cada uma das folhas de Makrofol-E. Uma área de $9858,4 \mu\text{m}^2$ foi definida como padrão para realização de todas as medidas, conforme a tabela 6.5.

Cada uma das folhas de Makrofol-E estavam separadas por uma distância angular, azimutal com relação ao feixe de prótons incidente, $\Delta\Phi$ igual a 60° .

Tabela 6.5 – Medidas do número de traços de prótons em função do ângulo de espalhamento, θ , do próton. Foram utilizadas 6 folhas de Makrofol-E distribuídas na direção azimutal Φ , em relação ao feixe de prótons incidentes (ver cap.V)

	N_i	α°		N_i	α°		N_i	α°
M1	1367(21)	28,2(3)	M2	1056(19)	26,3(3)	M3	1404(22)	22,7(3)
	1051(52)	29,7(3)		874(44)	27,3(3)		1392(67)	23,8(3)
	984(49)	30,3(3)		537(31)	30,0(3)		849(43)	24,7(3)
M4	1475(22)	21,8(3)	M5	938(18)	24,0(3)	M6	1347(21)	25,4(3)
	1299(63)	22,8(3)		621(34)	25,4(3)		1241(60)	
	1272(61)	24,4(3)		658(35)	25,5(3)			

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega} \right)_{R_{III}} =$$

MEDIDAS DE TRAÇOS DE PRÓTONS

Para estimar a eficiência ζ do filme de Makrofol-E, determinaram-se a curva de calibração do número de prótons esperados no filme de Makrofol-E e a curva do número de prótons incidentes no copo de Faraday, ambas pelo período de exposição. Os dados para construção das curvas estão na tabela 6.6.

Tabela 6.6 – Número de prótons esperados no filme de Makrofol-E, N_p , conforme a seção de choque de Rutherford e o número de prótons incidentes no copo de Faraday, N_p^{cf} , e o tempo de exposição Δt

Δt (s)	$N_p^{cf} (x10^{14})$	$N_p (x10^9)$	Δt (s)	$N_p^{cf} (x10^{14})$	$N_p (x10^9)$
143	5,45(3)	4,8(1,0)	414	15,98(10)	14,2(3)
170	5,60(4)	5,0(1)	492	16,12(4)	14,4(3)
284	10,74(8)	9,6(2,0)	618	23,54(9)	21(4)
287	10,70(4)	9,5(1,9)	972	31,25(5)	28(6)
288	10,97(8)	9,8(2,0)	1522	49,28(11)	44(9)
314	10,56(4)	9,4(1,9)	2588	94,37(8)	84(17)
319	11,14(3)	9,9(2,0)	3584	140,19(24)	125(25)

número de prótons esperados no filme de Makrofol-E, N_p , foi calculado do-se a seção-de-choque de Rutherford

$$\left(\frac{1}{4\pi\epsilon_0} \right)^2 \left(\frac{zZe^2}{4T_p} \right)^2 \frac{1}{\sin^4(\theta/2)}$$

MEDIDAS DE TRAÇOS DE PRÓTONS

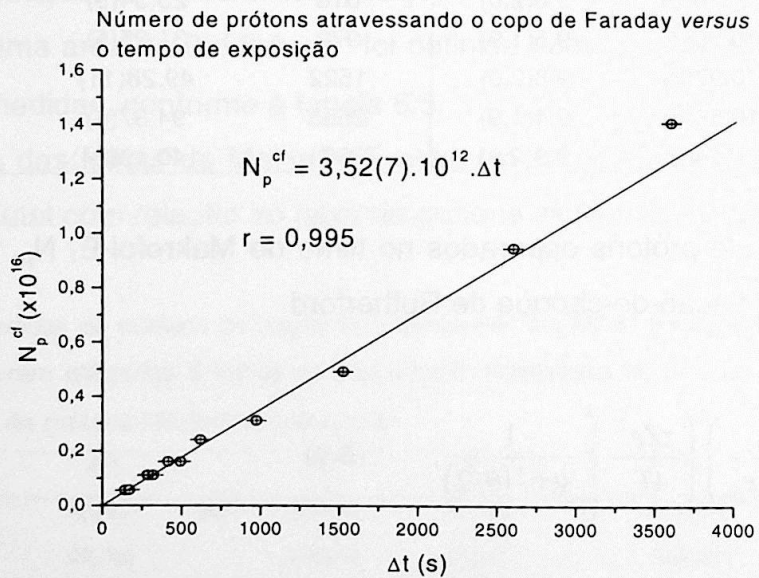
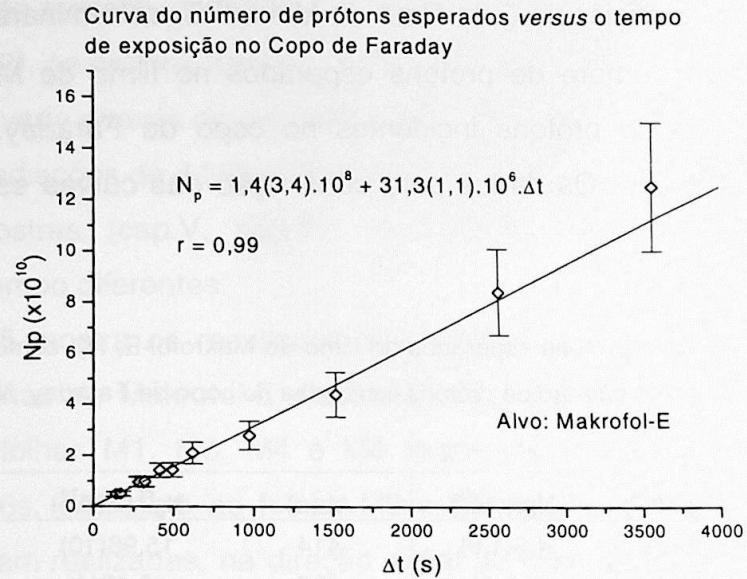


Figura 6.14 – a) Gráfico do número de prótons incidentes esperados na folha de Makrofol-E, conforme a seção-de-choque de Rutherford, *versus* o tempo de exposição do filme b) Gráfico do número de prótons incidentes no copo de Faraday *versus* o período de exposição, que será utilizado na calibração do filme de Makrofol-E

Com a curva ajustada ao dados da figura 6.14 construiu-se a tabela 6.7.

MEDIDAS DE TRAÇOS DE PRÓTONS

Tabela 6.7 – Número de prótons incidentes no Copo de Faraday conforme os resultados da função ajustada da fig. 6.14 a)

Δt (s)	N_p ($\times 10^9$)
200	6,4(3)
255	8,1(3)
287	9,1(3)
606	19,1(7)

Os tempos de exposição da tabela 6.7 são os mesmos utilizados nas medidas com o detetor de barreira de superfície (200 e 255 segundos) e com os filmes de Makrofol-E (287 e 606 segundos).

Com esses resultados foi possível encontrar a razão (R_{cf}^{dbs}) entre o número de contagens com o detetor de barreira de superfície (N_c^{dbs}) e o número de prótons incidentes no copo de Faraday (N_p^{cf}).

O número total de traços (N_t^T) por folha de Makrofol-E foi obtido. Sendo que, o seu valor médio foi de 2342(142) para as folhas expostas à radiação por 287 s e 3684(144) para as folhas expostas à radiação por 606 s. Dessa forma, a razão (R_{cf}^{ME}) entre o número total de traços (N_t^T) e o número de prótons incidentes no copo de Faraday (N_p^{cf}) foi calculada.

A eficiência, ζ , do filme de Makrofol-E pôde ser obtida por meio da razão

$$\zeta = \frac{R_{cf}^{ME}}{R_{cf}^{dbs}}. \quad (6.10)$$

Usando os dados obtidos com o detector de barreira de superfície e com as folhas de makrofol-E, obtemos

$$\zeta = (0,72 \pm 0,25)\%. \quad (6.11)$$

MEDIDAS DE TRAÇOS DE PRÓTONS

Com os dados da tabela 6.5 foi possível analisar o comportamento do número de traços N_t para os ângulos de espalhamento do próton na janela de Al em 2 períodos de exposição diferentes (287 e 606 segundos). As análises foram realizadas por meio de 2 gráficos, conforme a figura 6.15.

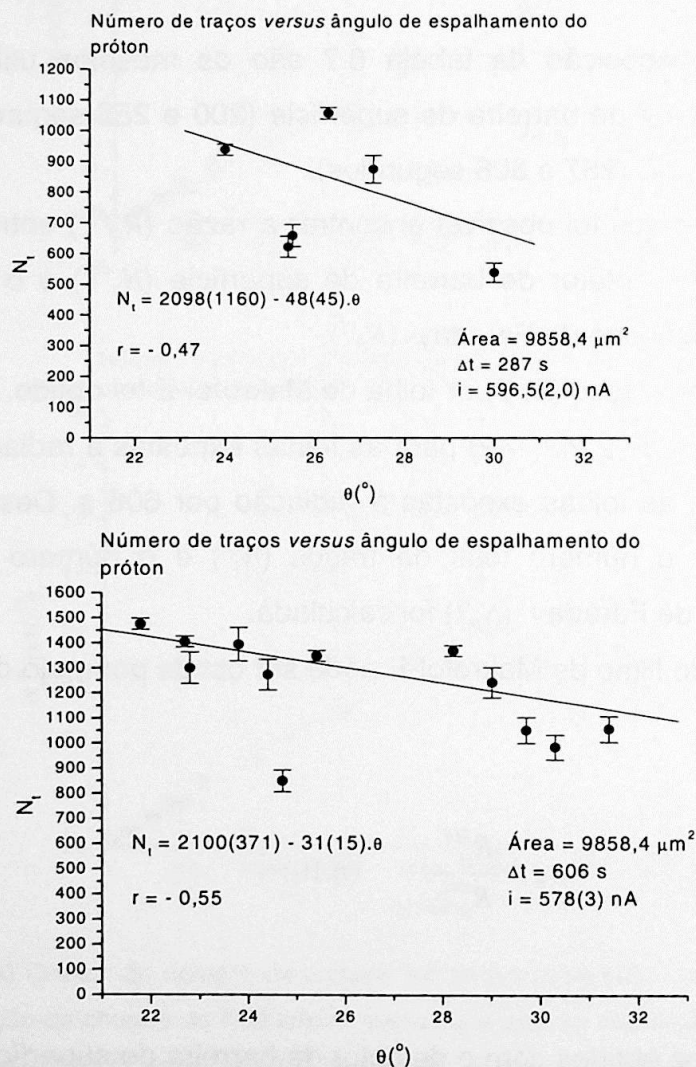


Figura 6.15 – Gráficos do número de traços N_t pelo ângulo de espalhamento θ do próton incidente na janela de Al do acelerador de partículas

Podemos observar, a partir dos resultados mostrados na figura 6.14 e tabela 6.5, que o número total de traços de prótons contados nas folhas de Makrofol-E é praticamente igual em todas as folhas, apresentando apenas uma suave variação devido à variação da seção de choque de Rutherford com ângulo de espalhamento θ . Como a janela do porta-amostras corresponde a cerca de 3° de abertura angular, este resultado indica que a amostra é uniformemente irradiada.

Com este estudo, mostramos que as folhas de Makrofol-E podem ser utilizadas como contador de prótons, embora sua eficiência deva ser melhor determinada com medidas mais precisas.

Mostra-se também que a variação da taxa de prótons incidentes com o ângulo θ não prejudica a precisão das nossas irradiações.

8. Medidas das quebras tipo SSB

É esperado que a fração de sobrevivência ϕ decaia de forma exponencial com o valor da dose absorvida. Cálculos de ϕ com amostras de DNA em água e em soluções contendo glicerol foram realizados para prótons.

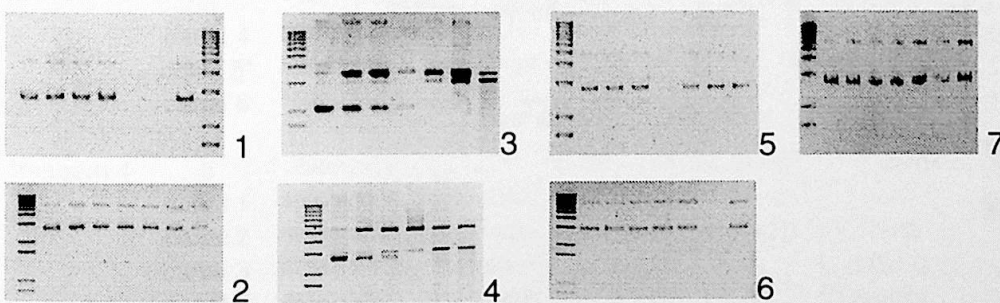


Figura 6.16 – A figura mostra as 7 imagens dos géis com amostras de DNA irradiadas com feixe de prótons. As imagens de números 5, 6 e 7 são de amostras com glicerol

MEDIDAS DAS QUEBRAS TIPO SSB

Como exemplo para o cálculo da fração de sobrevivência, serão utilizadas as imagens dos géis de números 6 e 4, respectivamente.

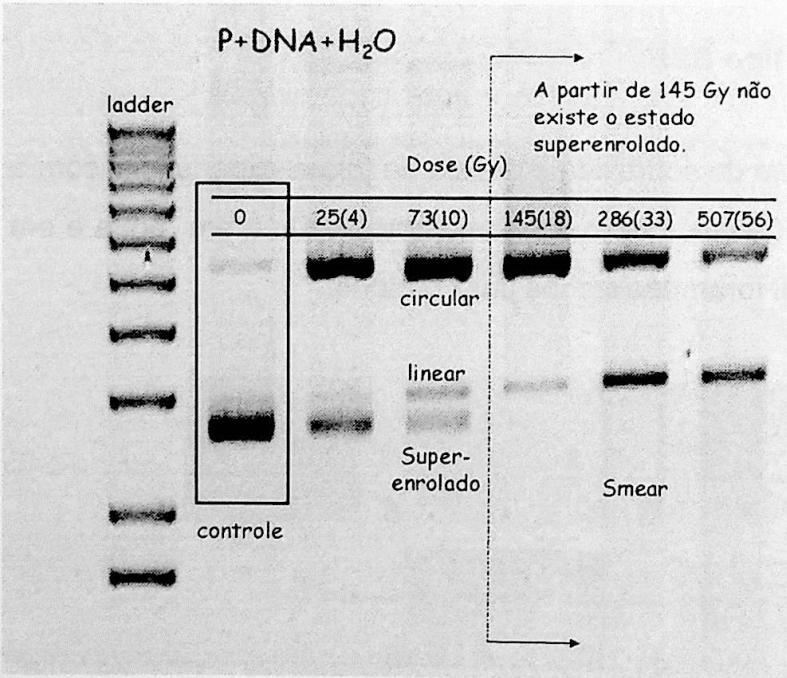
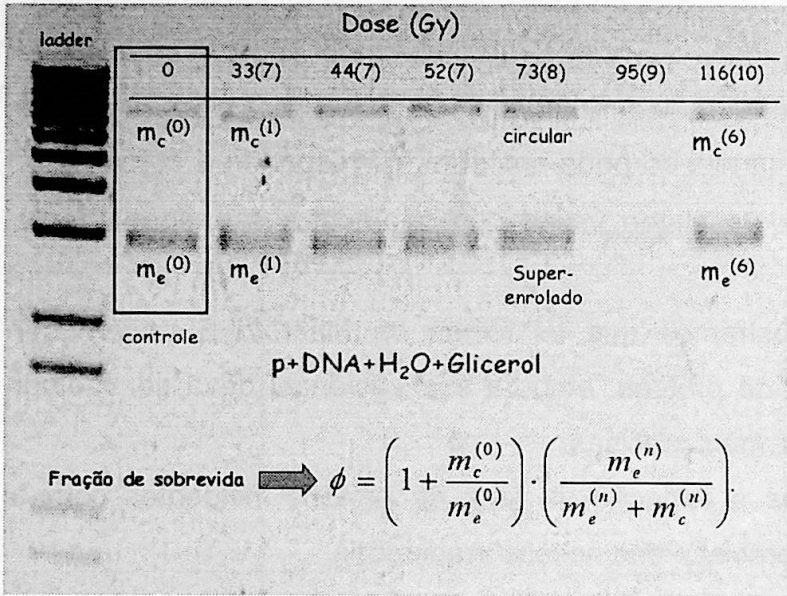


Figura 6.17 – Exemplos de imagens de géis de amostras do pBKS em solução aquosa e com glicerol, irradiadas por feixe de prótons de 10MeV(fig. 6.16/6 e 4). As massas m_x^y das bandas contendo o DNA são proporcionais às respectivas medidas de DOI. Na imagem 4 observa-se que a partir de 145 Gy não existe o estado conformacional superenrolado

MEDIDAS DAS QUEBRAS TIPO SSB

A tabela 6.8 mostra os resultados encontrados para as frações de sobrevida, ϕ , das amostras de DNA relativas as imagens da figura 6.16.

Tabela 6.8 – Doses calculadas, DOI e valores calculados de ϕ para amostras de DNA em solução aquosa pura, para feixes de prótons. Onde, DOI_c , DOI_l e DOI_e são as medidas de densidade óptica integrada dos estados conformacionais circular fechado, linear e superenrolado, respectivamente

PRÓTON		Água				
Imagem		DOI_c	DOI_l	DOI_e	ϕ	D (Gy)
Imagem 1	c	729(78)	0	6978(709)	1,000(20)	0,0
	canal 1	1834(190)	0	8935(907)	0,916(26)	1,10(22)
	canal 2	2304(237)	0	8858(899)	0,876(30)	2,14(30)
	canal 3	1431(149)	0	11165(1132)	0,979(21)	3,2(4)
	canal 4	0	0	0		4,3(4)
	canal 5	0	0	0		5,3(5)
	canal 6	1323(138)	0	9635(977)	0,971(22)	6,4(5)
Imagem 2	c	2285(236)	0	13472(1365)	1,000(30)	0
	canal 1	3191(327)	0	14227(1441)	0,955(32)	10,8(2,2)
	canal 2	2855(293)	0	9679(982)	0,903(35)	21,7(3,1)
	canal 3	2832(291)	0	9948(1009)	0,910(34)	32(4)
	canal 4	2706(278)	0	7965(809)	0,873(37)	43(4)
	canal 5	2607(268)	0	6096(620)	0,819(39)	52(5)
	canal 6	1843(191)	0	3463(354)	0,763(42)	63(5)
Imagem 3	c	4030(412)	2667(274)	40966(4140)	1,000(18)	0
	canal 1	46095(4658)	7542(766)	33952(3432)	0,466(39)	32(6)
	canal 2	55388(5595)	8542(867)	18078(1830)	0,270(29)	43(7)
	canal 3*	5467(557)	0	3482(356)	0,427(38)	52(7)
	canal 4	33480(3384)	6918(703)	0	0	73(8)
	canal 5*	68588(6928)	34953(3533)	0	0	95(9)
	canal 6	15221(1541)	26479(2678)	0	0	116(10)
Imagem 4	c	2905(298)	0	69768(7047)	1,000(8)	0
	canal 1	50059(5058)	4797(489)	23131(2340)	0,329(32)	25(4)
	canal 2	59449(6005)	9899(1004)	11950(1211)	0,174(21)	73(10)
	canal 3	57642(5823)	5641(574)	0	0	145(18)
	canal 4	33167(3353)	29285(2961)	0	0	286(33)
	canal 5	16799(1701)	21243(2149)	0	0	507(56)
	canal 6	0	0	0		931(102)

MEDIDAS DAS QUEBRAS TIPO SSB

Tabela 6.9 – Doses calculadas, DOI e valores calculados de ϕ para amostras de DNA em solução aquosa com glicerol, para feixes de prótons. Onde, DOI_c , DOI_l e DOI_e são as medidas de densidade óptica integrada dos estados conformacionais circular fechado, linear e superenrolado, respectivamente

PRÓTON		glicerol				
		DOI_c	DOI_l	DOI_e	ϕ	D (Gy)
Imagem 5	c	1199(126)	0	6025(613)	1,000(34)	0
	canal 1	795(85)	0	4886(498)	1,031(33)	1,07(22)
	canal 2	773(83)	0	5058(515)	1,040(32)	2,13(30)
	canal 3	0	0	0		3,24(38)
	canal 4	752(81)	0	2947(302)	0,955(37)	4,3(4)
	canal 5	626(68)	0	4082(417)	1,040(33)	5,3(5)
	canal 6	376(43)	0	3378(346)	1,079(31)	6,4(5)
Imagem 6	c	2644(272)	0	9423(956)	1,000(45)	0
	canal 1	2106(217)	0	7715(784)	1,006(45)	10,6(2,1)
	canal 2	2290(236)	0	7164(728)	0,970(46)	21,3(3,0)
	canal 3	2919(300)	0	7298(742)	0,915(48)	25,6(3,1)
	canal 4	2667(274)	0	6466(658)	0,907(48)	31,9(3,4)
	canal 5	0	0	0		40,4(3,8)
	canal 6	1232(129)	0	4669(476)	1,013(45)	53(5)
Imagem 7	c	1051(111)	0	11670(1183)	1,000(17)	0
	canal 1	1942(201)	0	10255(1040)	0,916(24)	33(7)
	canal 2	3554(364)	0	12069(1223)	0,842(30)	44(7)
	canal 3	4454(454)	0	15103(1529)	0,842(30)	52(7)
	canal 4	6407(652)	0	15962(1616)	0,778(33)	73(8)
	canal 5	4081(417)	0	4385(448)	0,565(40)	95(9)
	canal 6	11342(1150)	0	17242(1745)	0,658(38)	116(10)

Por meio dos dados das tabelas 6.8 e 6.9 foram construídos dois gráficos dos logaritmos das frações de sobrevivência contra dose.

Um modelo que descreve a interação radiação-DNA em solução aquosa foi desenvolvido por nosso grupo de pesquisa. O modelo é fundamentado em importantes aspectos da Teoria de Bethe para processos de ionização, assumindo-se que o efeito direto entre radiação e DNA é desprezível em comparação com o, efeito indireto. Para quebras tipo SSB o modelo explica que o número de moléculas superenroladas decresce exponencialmente com a

dose absorvida. Dessa forma, foi realizado um ajuste pelo método dos *Mínimos Quadrados* da expressão $\phi = Ae^{-\gamma D}$ (fig. 6.18).

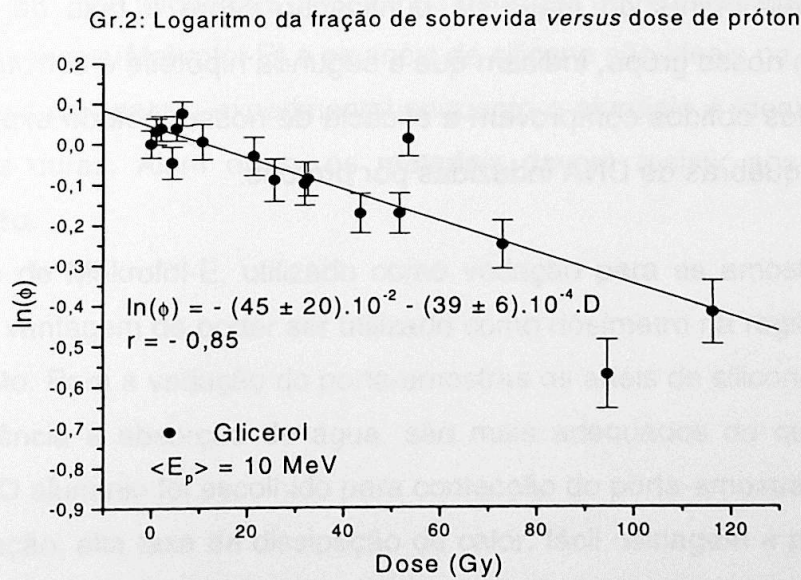
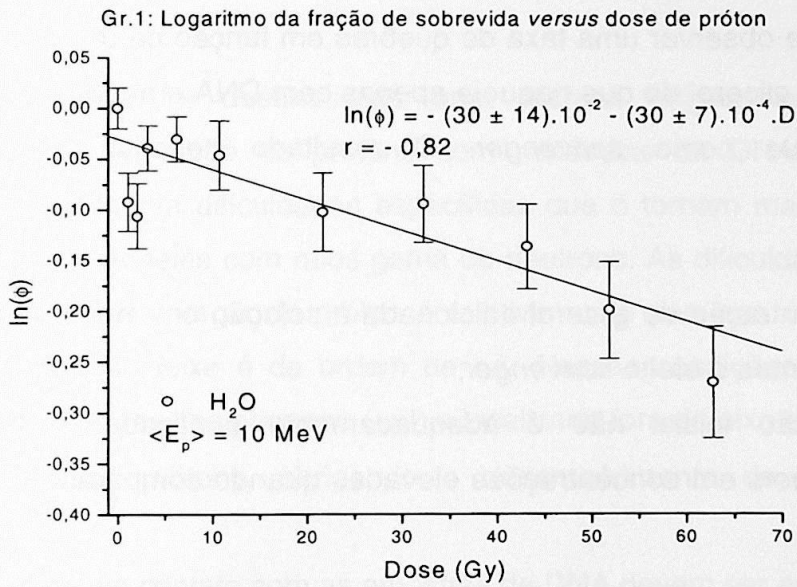


Figura 6.18 – Gráficos do logaritmo das frações de sobrevivência relativos às imagens 1, 2, 3 e 4, que são amostras de DNA em solução aquosa (resultados parciais), e às imagens 5, 6 e 7 de amostras contendo glicerol

Os parâmetros de ajuste γ , das funções de sobrevivência para DNA em solução aquosa e em solução com glicerol, sugerem que a quantidade de glicerol na solução não foi suficiente (7,4 mM) para gerar o efeito *scavenger*.

Esperava-se observar uma taxa de quebras em função da dose menor para a solução com glicerol do que naquela apenas com DNA e água, já que aquela substância atua como *scavenger*. O resultado negativo sugere duas possibilidades:

1. a concentração de glicerol adicionada à solução era muito baixa, e não observamos o efeito *scavenger*,
2. a solução inicial não é adequadamente purificada, possuindo já *scavengers* em concentrações elevadas quando comparadas àquela de glicerol.

Estudos preliminares do efeito da purificação sobre a taxa de quebras, realizadas pelo nosso grupo, indicam que a segunda hipótese é correta.

Os resultados obtidos comprovam a eficácia de nosso método experimental para observar quebras de DNA induzidas por prótons.

Capítulo VII: Conclusão

Neste trabalho foi desenvolvida uma técnica original para o estudo experimental da interação de prótons com moléculas de DNA. Este tipo de experimento apresenta dificuldades específicas que o tornam mais difícil de ser realizado do que aqueles com raios gama ou nêutrons. As dificuldades tornam-se ainda maiores se a energia do próton é relativamente pequena (< 10 MeV) e a corrente mínima do feixe é da ordem de nA. Nessas condições o volume das amostras de DNA deve ser pequeno ($\sim \mu\text{l}$) e localizado fora do eixo de incidência do feixe primário de prótons, obrigando o desenvolvimento de porta-amostras adequado.

Os materiais em contato com as amostras de DNA devem ser escolhidos de tal modo que não haja interações físicas e ou químicas entre estes e as amostras. Os filmes poliméricos (Makrofol-E) e os anéis de silicone são ideais na construção das partes moles do aparato experimental enquanto o alumínio é ideal na construção das partes duras. Além disso, os materiais devem resistir aos processos de esterilização.

O filme de Makrofol-E, utilizado como vedação para as amostras, apresenta também a vantagem de poder ser utilizado como dosímetro na região de doses do experimento. Para a vedação do porta-amostras os anéis de silicone, devido a sua alta resistência à absorção de água, são mais adequados do que os anéis de borracha. O alumínio foi escolhido para confecção do porta-amostras por causa da baixa ativação, alta taxa de dissipação de calor, fácil usinagem e por ser matéria-prima comumente usada na construção de recipientes utilizados em microbiologia.

CONCLUSÃO

À técnica de eletroforese, para que possa ser utilizada com rigor quantitativo, foram acrescentados alguns cuidados adicionais.

Os géis devem passar por um processo de resfriamento rápido em geladeira para que haja homogeneidade no tamanho dos poros da matriz do gel. A fonte que alimenta a cuba eletroforética deve permanecer ligada com d.d.p máxima durante alguns minutos antes da deposição do gel, procedimento que reduz o fundo observado nas imagens dos géis.

O tempo mínimo de corrida em gel de agarose deve ser de 1 hora para que haja a máxima ligação de brometo dietídio nas moléculas de DNA, favorecendo uma resposta linear do sistema de análise.

As imagens dos géis devem ser comprimidas no formato BITMAP, que mostrou menor perda de informação do que outros formatos como o jpeg, tiff, etc. Além disso, as fotografias devem ser obtidas por sistemas que possuam câmeras CCD e filtro transiluminador.

As quantidades mínima e máxima de DNA depositadas nos poços dos géis devem ser calculadas para que haja detecção e resolução das bandas durante a corrida.

Alguns marcadores de peso molecular como o lambda e o Ladder/1kbp-Plus têm problemas de linearidade, portanto não são indicados para calibração de massa e *DOI* (densidade óptica integrada).

O algoritmo utilizado no cálculo da *DOI* foi implementado em um programa, o GelAnalysis. A incerteza na *DOI* depende das incertezas do fundo, da banda de DNA e do número de pixels.

Com a técnica experimental e de análise que foram desenvolvidas neste trabalho, foram feitas medidas de quantidade de moléculas de DNA quebradas após irradiação por próton em diversas doses. O feixe de prótons de 10 MeV foi

CONCLUSÃO

obtido no acelerador Pelletron do IFUSP. As moléculas de DNA utilizadas foram a pBluescript[®] II Exo/Mung (pBKS), fornecidas pela Stratagene.

Para a análise quantitativa da imagem do gel de eletroforese, foi desenvolvido um programa especialmente desenhado para garantir a melhor reprodutibilidade e confiabilidade dos dados. Além disso, ele permite um estudo do “fundo” e a sua subtração, eliminando dessa forma fatores que podem induzir a uma importante alteração.

Não há, na literatura, dados experimentais referentes a interação próton-DNA na região de 10 MeV. Há somente um grupo na Universidade de Loma Linda (EUA) que faz pesquisas com prótons de energia de centenas de MeV. O método experimental daquele grupo é totalmente diferente do desenvolvido neste trabalho. Facilidades como amostras de volume considerável, que proporcionam a reprodução seriada de medidas realizadas em gel de agarose, e a utilização do feixe direto de prótons, que reduz significativamente as incertezas no cálculo da dose, são alguns dos atributos de se trabalhar com energia de centenas de MeV.

Sendo assim, o método experimental original desenvolvido neste trabalho certamente contribuirá nos estudos da interação próton-DNA, que é de grande interesse da Radiobiologia.

Anexo

Protocolo de purificação do pBKS utilizando FastPlasmid Kit

Materiais do *kit*

Componente	100 preps	250 preps
Solução de lise	56 ml	140ml
Solução de RNase	0,7 ml	1,75 ml
Lisozima	60 mg	150 mg
Protetor de lavagem concentrado	18 ml	45 ml
Protetor de eluição (10mM Tris-Cl, 0,1 mM EDTA, pH 8,5)	10 ml	25 ml
Tubo de cultura	100	200
Conjunto coluna de rotação FastPlasmid	100	250
(Coluna de rotação e tubo de resíduos)		
Tubo de coleta	100	250

Além dos materiais do *kit* são necessários:

- Meio líquido para crescimento bacterial com antibiótico apropriado;
- Isopropanol (95-100%) e
- Microcentrífuga (no mínimo 13000 rpm).

Protocolo

1. Resfrie completamente a solução de lise em gelo
Nota: se a solução de lise completa não estava armazenada a 4°C, resfrie-a em gelo por pelo menos 15 minutos.
2. Centrifugue 1,5 ml de cultura de bactéria fresca em um tubo de 2 ml à 13000 rpm até formar um caroço no fundo do tubo.
3. Remova o meio por decantação tomando cuidado para não perturbar o caroço de bactérias

4. Adicione 400 μ l da solução de lise completa que estava resfriada em gelo na região de 0° a 4°C.
5. Misture completamente em um vortex por 30 segundos.
Nota: se o caroço de bactérias não estiver completamente resuspendido continue misturando até aparecer uma solução homogênea.
6. Incube o material lisado por 3 minutos.
Nota: o material lisado deve aparecer claro e não viscoso.
7. Transfira o material lisado para o conjunto coluna de rotação (pipetando).
8. Centrifugue o conjunto coluna de rotação por 30 a 60 segundos em velocidade máxima.
9. Adicione 400 μ l do protetor de lavagem DILUÍDO no conjunto coluna de rotação.
10. Centrifugue o conjunto coluna de rotação por 30 a 60 segundos em velocidade máxima.
11. Remova a coluna de rotação da centrífuga e decante o material filtrado do tubo de resíduos. Coloque o tubo de resíduos de volta no conjunto e retorne-o a centrífuga.
12. Centrifugue na velocidade máxima por 1 minuto até secar o conjunto coluna de rotação.
13. Transfira a coluna de rotação para um tubo de coleta.
14. Adicione 50 μ l do protetor de eluição diretamente no centro da membrana da coluna de rotação e encapsule a coluna de rotação no tubo de resíduos.
15. Centrifugue em velocidade máxima por 30 a 60 segundos.
16. Remova e descarregue a coluna de rotação.
17. O DNA eluído pode ser utilizado imediatamente ou armazenado em - 20°C.

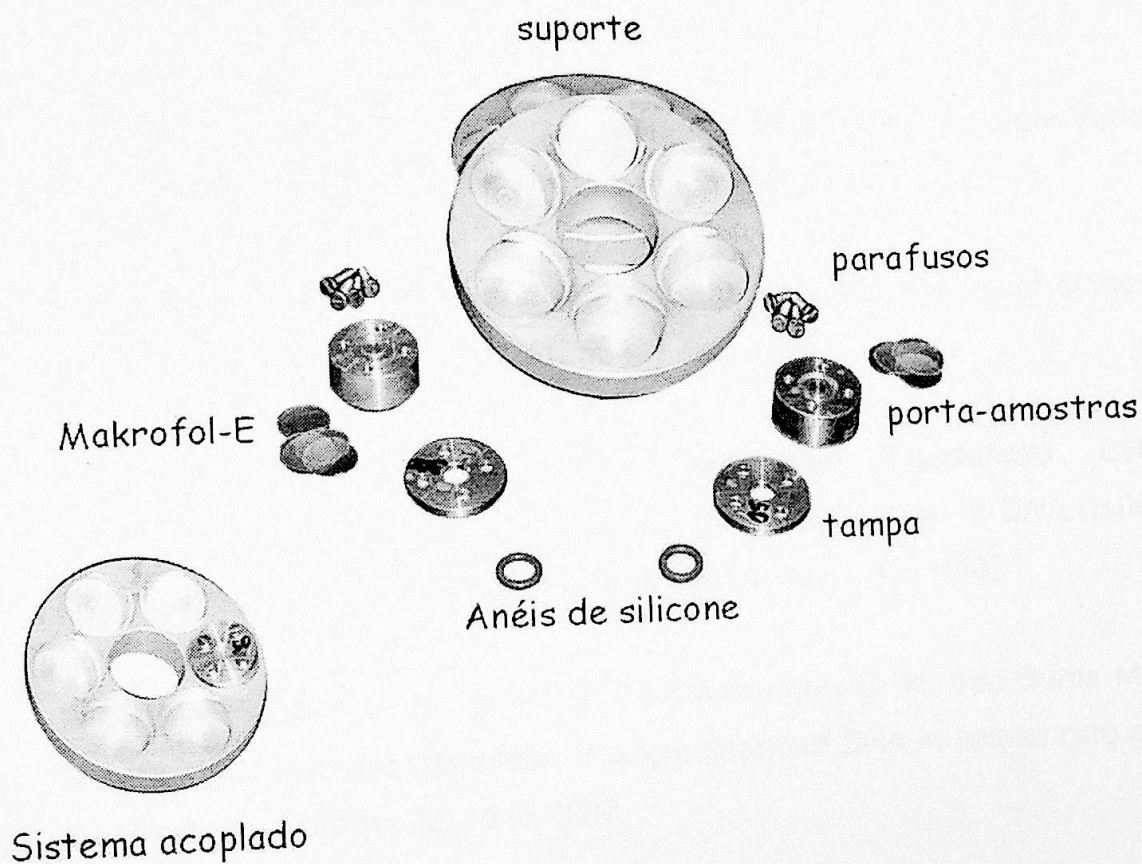
Preparação da solução de lise completa

1. Centrifugue brevemente a solução de RNase e colete todo líquido no fundo do tubo. Resuspenda a lisozima liofilizada utilizando o volume inteiro de solução de RNase.
2. Misture completamente utilizando um vortex. Assegure que todo pó seja dissolvido.
3. Pipete o conteúdo inteiro da mistura lisozima/RNase para um recipiente. Armazene a solução de lise completa à 4°C.

INSTITUTO DE FÍSICA
Serviço de Biblioteca e
Informação
Tombo: 5957 ex.1

Apêndice

Fotografia colorida do aparato experimental projetado para realização do experimento proposto. Os detalhes do aparato e do procedimento experimental encontram-se no Capítulo V.



Referências Bibliográficas

ATKINS, P. e L. Jones. Princípios de Química. Bookman, Porto Alegre, 2001. Cap. 19, p. 879-905.

ATTIX, F. H. Introduction to Radiological Physics and Radiation Dosimetry. John Wiley & Sons, Inc., 1986.

BAUER, W. R., F.H.C. Crick and J. H. White. Supercoiled DNA. Scientific American 243(1): 129 (1980).

BERGETHON, P. R. The Physical Basis of Biochemistry. Springer-Verlag, 1998. Cap. 30 – Electrokinetic Phenomena, p. 470-477.

BICHSEL H. Barkas effect and effective charge in the theory of stopping power. Physical Review A, vol. 41, n. 4, 1 april 1990.

BLÖCHER, D., Michel Einspenner and Jean Zajackowski. CHEF electrophoresis, a sensitive technique for the determination of DNA double-strand breaks. Int. J. Radiat. Biol., 1989, vol. 56, no. 4, 437-448.

BRAHMASANDRA S. N., Burke D. T., Mastrangelo C. H. and Burns M. A. Mobility, diffusion and dispersion of single-stranded DNA in sequencing gels. Electrophoresis 2001, 22, 1046-1062.

CHATTERJEE, A. and W. R. Holley. Energy deposition mechanisms and biochemical aspects of DNA strand breaks by ionizing radiation. International Journal of Quantum Chemistry 39:709, 1991.

COTTINGHAM, W. N. and D. A. Greenwood. An Introduction to Nuclear Physics. Cambridge University Press, 1986, 209 p.

DAVIES, S., Eizenman M., Pasupathy S., Muller W. and Slater G. Models of local behavior of DNA electrophoresis peak parameters. *Electrophoresis* 1999, 20, 1443-1454.

DOWER, W.J., J. F. Miller and C. Ragsdale. 1988. High efficiency transformation of *E. Coli* by high voltage electroporation. *Nuc. Acids Res.* 16:6127-6145.

FOLKARD, M., K. M. Prise, B. Vojnovic, S. Davies, M. J. Roper and B. D. Michael. The irradiation of V79 mammalian cells by protons with energies below 2 MeV – Part I: Experimental arrangement and measurements of cell survival. *Int. J. Radiat. Biol.* 1989, vol. 56, no. 3, 221-237.

FRANK-KAMENETSKII, M. D. Biophysics of the DNA molecule. *Physics Reports* 288 (1997), Elsevier, 13-60.

FRIEDBERG, E. C. et al. DNA Repair and Mutagenesis. ASM Press, Washington, D. C, 1995. pp.19-31. Cap. 1: DNA Damage.

HOPPE, W., Lohmann W., Markl H., Ziegler H. Biophysics. Springer –Verlag, 1983, cap. 3 – Structure Determination of Biomolecules by Physical Methods, p. 42-49; cap. 6 – Radiation Biophysics, p. 289-300.

JACKSON, D. J. Eletrodinâmica Clássica. Editora Guanabara Dois – Rio de Janeiro, 1983. Capítulo 13, p. 478-506.

KNOLL, G. F. Radiation Detection and Measurement. John Wiley & Sons, Inc, 1989, Ch. 2, pp. 30-64.

KUSUKAWA N., Ostrovsky, M. V. and Garner, M. M. Effect of gelation on the gel structure and resolving power of agarose-based DNA sequencing gels. *Electrophoresis* 1999, 20, 1455-1461.

MANIATIS, T. C., Fritsch, E. F., and SAMBROOK, J., 2001, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory) p.: A8.19-A8.30; 1.16-1.19; 1.62-1.64; 5.4-5.12; 5.14-5.17; 5.59-5.60.

MILLIGAN, J. R., Allister D. Arnold, and John F. Ward. The effect of Superhelical Density on the Yield of Single-Strand Breaks in γ -Irradiated Plasmid DNA. Radiation Research 132, 69-73 (1992).

MILLIGAN, J. R., J. A. Aguilera, R. A. Paglinawan, K. J. Nguyen e J. F. Ward. Modification of ionizing radiation clustered damage: estimate of migration distance of holes trough DNA via guanyl radicals under physiological conditions. Int. J. Radiat. Biol. 2002, vol. 78, no. 8, 733-741.

NCRP REPORT No. 108. Conceptual Basis for Calculations of Absorbed-dose Distributions. National Council on Radiation Protection and Measurements, issued March 31, 1991.

OKUNO, E., Caldas, I. L., Chow C. Física para Ciência Biológicas e Biomédicas. Harbra Harper & Row do Brasil - São Paulo, 1982. Cap. 1 ao 7, p. 1-79.

PLATZMAN, R. L. Total Ionization in Gases by High-Energy Particles: An Appraisal of Our Understanding. International Journal of Applied Radiation and Isotopes, 1961, Vol. 10, pp. 116-127. Pergamon Press Ltd. Printed in Northern Ireland.

ROSSI, H. H. and Zaider, M. Microdosimetry and its Applications. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1996. 319 p.

SALINAS, R. A. S., Introdução à Física Estatística. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1997. Cap. 16 – Fenômenos Fora do Equilíbrio, p.: 397-405.

SEGRÈ, E. Experimental Nuclear Physics. John Wiley & Sons, Inc, 1953. Part II – Passage of Radiations through Matter, p. 166-252.

SIENKO, M. J. e R. A. Plane. Química. Companhia Editora Nacional, 7^a. ed, São Paulo – SP, Brasil, 1976. Cap. 23, p. 528-534.

SIMMONS, A. J. and David E. Watt. Radiation Protection Dosimetry A radical Reappraisal. Medical Physics Publishing, Madison, Wisconsin, 1999, pp. 141.

SPOTHEIM-MAURIZOT, M., M. Charlier and R. Sabbatier. DNA radiolysis by fast neutrons. Int. J. Radiat. Biol., 1990, vol. 57, no. 2, 301-313.

SQUIRES, G. L. The discovery of the structure of DNA. Contemporary Physics, volume 44, number 4, July – August 2003, pages 289-305.

STAMATO, T. D. and Nicholas Denko. Asymmetric Field Inversion Gel Electrophoresis: A New Method for Detecting DNA Double-Strand Breaks in Mammalian Cells. Radiation Research 121, 196-205 (1990).

STEEL, G. G. Basic Clinical Radiobiology. Arnold, second edition, 1996. 252 p.

STERNELÖW, B. and E. Höglund. Rejoining of double-stranded DNA-fragments studied in different size-intervals. Int. J. Radiat. Biol. 2002, vol. 78, no. 1, 1-7.

STERNHEIMER, R. M. The Density Effect for the Ionization Loss in Various Materials. *Physical Review*, vol. 88, n. 4, november 15, 1952.

STRATAGENE, Eagle Sight™ 3.0 Image Capture and Analysis Software. Instruction Manual.

STRATAGENE, Eagle Eye® II Still Video System. Instruction Manual.

STRYER, LUBERT. DNA e RNA: Moléculas de Hereditariedade. *Bioquímica*. Quarta edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. Cap. 4, p. 70-88. Cap. 1 a 5, 8, 11 e 12, 14 e 16.

STRYER, LUBERT. Estrutura, Replicação e Reparo do DNA. *Bioquímica*. Quarta edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. Cap. 31, p. 751-779.

SUTHERLAND, J. C., Monteleone, D. C., Trunk, J. G., Bennet, P. V. and Sutherland, B. M. Quantifying DNA damage by gel electrophoresis, eletronic imaging and number-avarage lenth analisys. *Electrophoresis* 2001, 22, 843-854.

VOET, D. And J. G. Voet. *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc. Second edition, 1995. Chapter 28, pp. 848-878.

VOLOGODSKII, A. V. and N. R. Cozzarelli. Conformational and Thermodynamic Properties of Supercoiled DNA. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1994. 23:609-43.

WARING, M. J. Complex Formation between Ethidium Bromide and Nucleic Acids. *J. Mol. Biol.* (1965) 13, 269-282.

WHITE H. W. and Wu M. Factors affecting quantitation of DNA bands in gels using a charge-coupled device imaging system. *Electrophoresis* 2001, 22, 860-863.

YANG, T. C. Proton radiobiology and uncertainties. *Radiation Measurements* 30 (1999) 383-392.