

Geórgia Reis Prado

**ESTUDO DA RESISTÊNCIA de *D. radiodurans*
à ação combinada de RADIAÇÕES IONIZANTES
com CAMPOS ELÉTRICOS ou MAGNÉTICOS
EXÓGENOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: João Dias de Toledo Arruda Neto

Co-orientadora: Soraia Attie Calil Jorge

RESUMO

PRADO, G. R. **Estudo da resistência de *D. radiodurans* à ação combinada de radiações ionizantes com campos elétricos ou magnéticos exógenos.** 2011. 200 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

O princípio básico da radioterapia é o de maximizar o dano no tumor e de minimizá-lo nos tecidos sadios vizinhos. Diversas estratégias têm sido realizadas com o intuito de aumentar a radiosensibilidade celular, entre elas a utilização de campos exógenos (campos elétricos e magnético). Neste trabalho estudamos a resistência de *Deinococcus radiodurans* à ação combinada de radiações convencionais, não convencionais e agentes externos. A *D. radiodurans* é uma bactéria que se destaca pela habilidade extraordinária em suportar efeitos letais e mutagênicos de agentes prejudiciais ao DNA, particularmente a radiação ionizante como gamas e UV, sendo tolerante a este tipo de estresse. Devido a sua elevada radioresistência e rápido crescimento, a *D. radiodurans* tem sido utilizada como simulador de tumores sólidos. Peculiaridades associadas à radioresistência nas fases exponencial e estacionária foram identificadas a partir de curvas de crescimento. Com a obtenção de curvas de sobrevivência foram obtidas informações quanto à radiosensibilidade. Com gamas, a *D. radiodurans* apresentou um ombro de reparo de 2 e 8kGy nas fases exponencial e estacionária, respectivamente. Nas irradiações com gamas e ajuste da suspensão celular manifestou-se radioresistência similar em ambas as fases de crescimento. Em exposições ao campo elétrico após irradiações com gamas, a *D. radiodurans* apresentou em ambas as fases redução do ombro de reparo. O ombro de reparo foi de 1 e 4kGy nas fases exponencial e estacionária, respectivamente. Nas exposições ao campo magnético, obtivemos um ombro de 4kGy na fase exponencial e de 6kGy na fase estacionária. Em irradiações com elétrons o ombro de reparo na fase exponencial foi completamente eliminado e na fase estacionária foi de apenas 1kGy. Este trabalho revelou novas e importantes informações referentes à radioresistência da *D. radiodurans*, além de fornecer subsídios para a melhoria de protocolos de radioterapia em associação com outros agentes físicos exógenos.

Palavras-chave: *D. radiodurans*. Radiação gama. Feixes de elétrons. Campos elétrico e magnético. Radiossensibilidade.

ABSTRACT

PRADO, G. R. **Study of resistance of *D. radiodurans* to the combined action of ionizing radiation with an electric or magnetic fields exogenous.** 2011. 200 p. Ph. D. Thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The key goal in radiotherapy is to maximize damages in a tumor while minimizing them in nearby health tissues. Several strategies have been worked out toward the enhancement of cellular radiosensitivity, as the use of exogenous fields. It is studied in this work the resistance of *Deinococcus radiodurans* to the combined action of conventional and non conventional radiations, with external agents (electric and magnetic fields). *D. radiodurans* is a bacterium having an extraordinary ability to cope with lethal and mutagenic agents harmful to the DNA, particularly ionizing radiations as gammas and UV. Given its high radioresistance and fast growing, *D. radiodurans* has been used as solid tumors simulators. Peculiarities associated with radioresistance at the exponential and stationary phases were delineated from growing curves. By measuring survival curves information on radiosensitivity was obtained. In gamma irradiation *D. radiodurans* exhibited repairing shoulders of 2 and 8 kGy at the exponential and stationary phases, respectively. When gamma irradiations were combined with expositions to the electric field the repairing shoulders were reduced to 1 and 4 kGy at the exponential and stationary phases, respectively. Radioresistance was similar in both growing phases when the number of cells were approximately equalized in these two processes. On the other hand, when gamma irradiations were combined with expositions to the magnetic field the repairing shoulders were reduced to 4 and 6 kGy at the exponential and stationary phases, respectively. In irradiations with electron beams the repairing shoulder at the exponential phase was totally depleted, while at the stationary phase it was only 1 kGy. The findings of this work revealed new and important information on the radioresistance of *D. radiodurans*, while providing hints to the improvement of radiotherapy protocols in association with exogenous physical agents.

Key-words: *D. radiodurans*. Gamma radiation. Electron beams. Electric and magnetic fields. Radiosensitivity.

1 Introdução

1.1 Radiações Ionizantes: Efeitos Biológicos Extra e Intra Celular

A radiação ionizante (RI) é a radiação com energia suficiente para ionizar moléculas. Existem dois tipos de radiação ionizante, ambos produzidos pelo decaimento de elementos radioativos: eletromagnética (X e radiação gama, que fazem parte do espectro eletromagnético que inclui a luz visível e ondas de rádio) e de partículas (partículas α e β) (OKUNO, 2006).

A energia depositada (a dose absorvida pela célula ou tecido) é medida em Gray. A radioresistência/radiosensibilidade de microrganismos é comparada pela da medição da D_{37} (a dose em que 37% das células sobrevivem). Na dose D_{37} , cada célula, em média, sofreu um evento letal (aquelas que sobrevivem são compensadas por outras células com dois ou mais eventos letais). Os íons e radicais livres produzidos com a radiação, passam através da matéria de forma rápida e modificam moléculas. De todos os efeitos dos danos, o genoma tem provavelmente o maior impacto sobre a viabilidade celular. As razões para isso são três. **Primeiro**, o DNA genômico ocupa a maior fração do volume da célula. **Segundo**, o genoma está presente em menor número de cópias que outras moléculas. **Terceiro**, e mais importante, a genoma regula todas as funções celulares, assim a perda de qualquer parcela é catastrófica para um organismo unicelular. A radiação ionizante gera vários tipos de danos ao DNA, como a maior parte do dano resultou da ação de radicais hidroxilas, o espectro de danos é semelhante aos produzidos por danos oxidativos associados ao metabolismo aeróbio (BATTISTA, 2005).

A maioria das lesões é reparada por sistemas de reparo do DNA presente em todas as células, mas as duplas quebras são mais difíceis de reparar e, portanto, o dano é mais letal. As quebras duplas podem resultar em significativa perda de informação genética e, se não forem reparadas, serão impedidas de realizar a replicação do genoma procariótico (MILIAN, 2006).

Desde o descobrimento das RI, há mais de um século, os campos de estudo e aplicações das mesmas têm se desenvolvido enormemente, como é o caso da Radiobiologia. Uma vez conhecida à alta capacidade de penetração da

radiação de baixo poder de ionização, esta começou a ser amplamente utilizada nos diagnósticos médicos. Por outro lado, por causa do efeito deletério que altas doses podem causar sobre os tecidos vivos, as radiações são também utilizadas na Radioterapia e na Medicina Nuclear para tratamento de tumores. Nestes tratamentos, a radiação interage com o tumor, destruindo as células malignas ou impedindo que cresçam e se reproduzam, mas esta ação pode ser exercida também sobre os tecidos sadios afetados durante o tratamento. É interessante notar que tecidos tumorais são mais sensíveis à radiação, já que estes não conseguem reparar os danos produzidos de forma tão eficiente quanto os tecidos normais de forma que terminam sendo destruídos e as células têm seu ciclo replicativo bloqueado (MILIAN, 2006).

A figura 1 mostra as faixas de três diferentes tipos de radiações ionizantes. Os pontos pequenos indicam eventos de deposição de energia (BATTISTA, 2005).

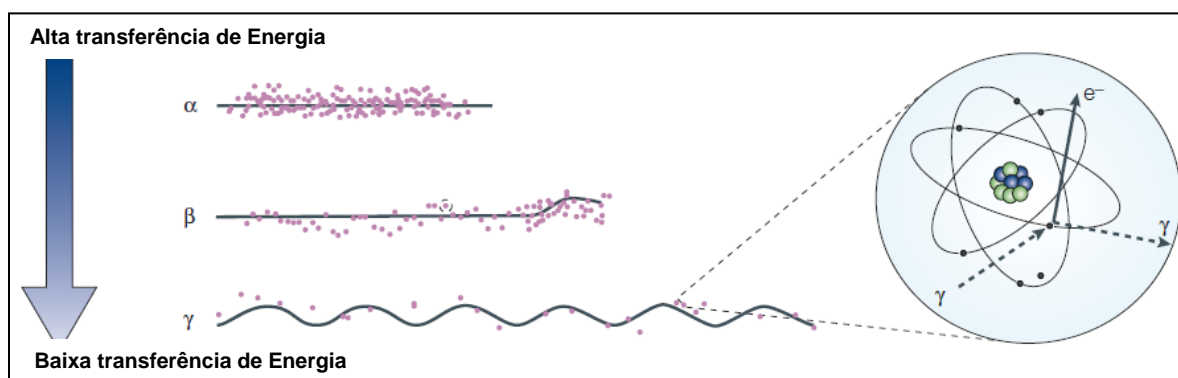


Figura 1: Faixas das radiações α , β e γ .

Fonte: Battista, 1997.

1.2 Radioterapia: Bases Atuais e Necessidades Futuras

Segundo recente relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC)/OMS (WORLD CANCER REPORT, 2008), o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos. O contínuo crescimento populacional, bem como seu envelhecimento, afetará de forma significativa o impacto do câncer no mundo. Esse impacto recairá principalmente sobre os países de médio e baixo desenvolvimento. No Brasil, as estimativas do Ministério da Saúde, para o ano de 2010, serão válidas também para o ano de 2011, e apontam para a ocorrência de 489.270 novos casos de câncer. Em 2010, são esperados 236.240 casos novos para o sexo masculino e 253.030 para sexo feminino. Estima-se que o câncer de pele do tipo não melanoma (114 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (52 mil), mama feminina (49 mil), cólon e reto (28 mil), pulmão (28 mil), estômago (21 mil) e colo do útero (18 mil).

Entre as diversas modalidades terapêuticas possíveis, a Radioterapia (RT) é utilizada para uma grande variedade de tumores locais e/ou metastáticos com finalidade curativa ou paliativa. Aproximadamente 50-70% de todos os pacientes com câncer recebem RT durante o tratamento (MAHRHOFER et al., 2006). Comumente, a RT é prescrita em combinação com cirurgia e/ou quimioterapia, pois estudos demonstraram que estas associações melhoram o controle local do tumor e erradicam micrometástases (KUFÉ et al., 2003).

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

As bases da radioterapia moderna se fundamentam no fracionamento e protração da dose, ou seja, são administradas frações de doses diárias ao longo de um tempo. O fracionamento permite que as células nas fases mais sensíveis do ciclo celular (G2/M) sejam destruídas. Posteriormente as células se redistribuem pelo ciclo celular. Na fração seguinte outras quantidades de

células que se encontra nas fases mais sensíveis do ciclo morrem e assim sucessivamente ao longo do tratamento (GELDOF et al., 2003). Entre as frações ocorre o reparo da lesão sub-letal. Neste caso, as células do tecido normal apresentam vantagem quanto ao reparo em comparação às tumorais, pois são mais bem organizadas, quanto ao controle do ciclo celular e contêm maior quantidade de enzimas anti-oxidantes como peroxidases e catalases. O reparo geralmente ocorre entre 15 minutos a 4 horas após a irradiação.

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

Considerando-se os aspectos físicos, as radiações ionizantes podem ser classificadas como diretamente ou indiretamente ionizantes. As radiações diretamente ionizantes são as que possuem carga como elétrons, prótons, partículas α e β (radiação corpuscular) e as indiretamente ionizantes aquelas que não possuem carga, como UV, raios-X e radiação gama (radiação eletromagnética) e nêutrons. As radiações mais utilizadas na radioterapia são as eletromagnéticas (raios-X e gamas), que produzem efeito biológico ejetando elétrons do meio com o qual interagem. Quando o elétron ejetado promove a lesão celular, é o chamado efeito direto, que corresponde a 30% do efeito biológico das radiações. O elétron ejetado presente no meio também pode interagir com a água (radiólise da água) produzindo radicais livres e estes promovem a lesão celular. É o efeito indireto e corresponde a 70% do efeito biológico das radiações (NIKJOO et al., 1994). Como consequência da interação com as radiações, as células podem apresentar uma variedade de lesões no DNA (ácido desoxirribonucléico), como bases e açúcares danificados, quebras simples (*single-strand breaks* - SSB), quebras duplas (*double-strand breaks* - DSB) e translocações (BELLI et al., 2002; HILL et al., 2004). Biologicamente, entre as alterações radioinduzidas, as quebras duplas do DNA são as mais prejudiciais, podendo promover quebras e rearranjos cromossômicos, deleções, translocações, inversões (mutações estáveis) entre outras lesões que afetam a integridade genômica da célula (MAHRHOFER et

al., 2006). A radiação também interage com os lipídios e as proteínas das vias sinalizadoras, além de modular a expressão de genes através de uma variedade de mecanismos incluindo a ativação de fatores de transcrição (McBRIDE e WITHERS, 2004). A ativação radioinduzida destas vias sinalizadoras pode afetar processos como regulação do ciclo celular, reparo do DNA, indução da proliferação e repopulação tecidual, diferenciação ou apoptose.

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

1.3 Efeitos Biológicos Intracelulares de Campos Elétricos e Magnéticos

Campo elétrico é o campo de força provocado por cargas elétricas ou por um sistema de cargas, que estão sujeitas a uma força elétrica. Uma característica fundamental de campos elétricos é que em qualquer ponto do espaço, eles têm uma orientação definida correspondente ao sentido da força que eles exercem sobre elementos polares.

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

Em Kirson et al. (2004), experimentos realizados com campos elétricos de baixa intensidade e frequência intermediária inibiu o crescimento e a proliferação de células cancerosas, enquanto que, as células e tecidos não cancerosos não foram afetados. Entretanto, para diferentes tipos de células cancerosas, há necessidade de aplicação de campos elétricos de intensidades e frequências específicas.

Muitas moléculas, como as de água e de proteínas formam dipolos elétricos em seus estados naturais (sem campo). Dessa forma, ao colocar-se, por exemplo, uma proteína de reparo sob ação desse campo externo não há força resultante, mas há um torque que tende a girar a proteína de modo que o dipolo se alinhe com o campo (Figura 2) (ARRUDA et al., 2010).

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

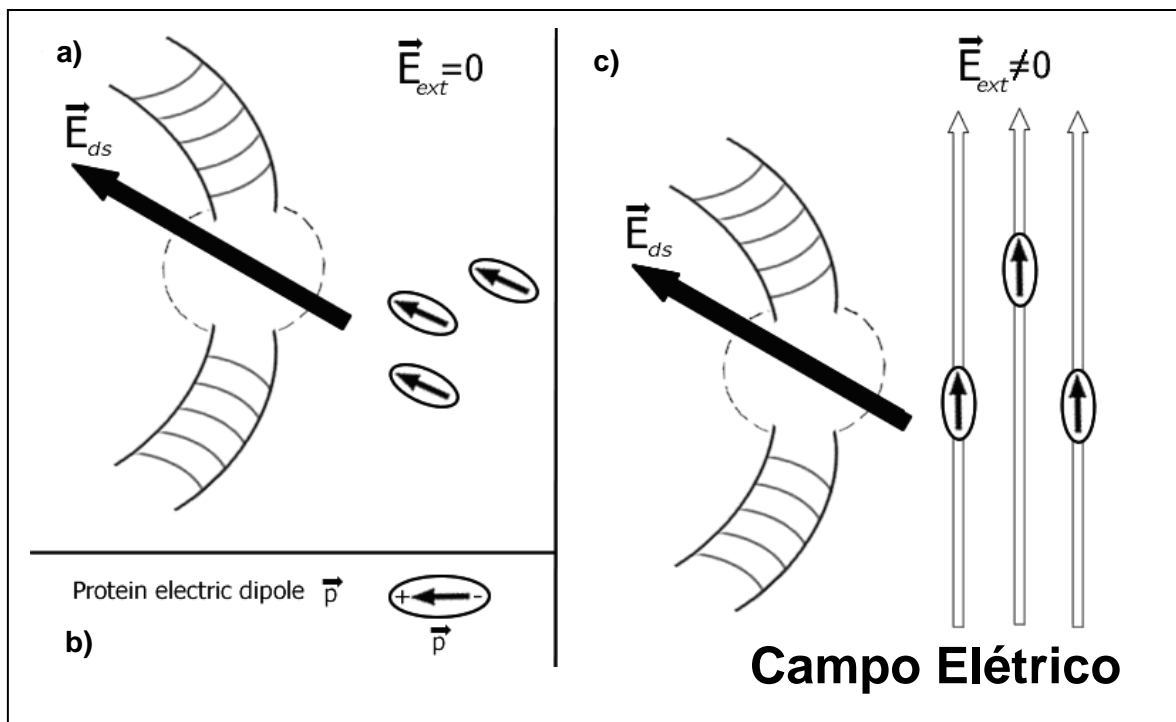


Figura 2: (a) Representação pictórica do processo de reconhecimento de um DSB por proteínas de reparo. Usualmente essas proteínas possuem grandes momentos de dipolo \vec{p} (representado em b com mais detalhes), que se orientam na direção do sítio danificado pela ação de um campo elétrico estático e endógeno (\vec{E}_{ds}), campo esse produzido pelo desbalanço de cargas elétricas na dupla fita danificada. (c) Um campo elétrico externo (\vec{E}_{ext}) mais intenso do que (\vec{E}_{ds}) reorientaria o deslocamento das proteínas de reparo ao longo de sua direção impedindo, assim, a consecução do reparo.

Fonte: Arruda-Neto et al., 2009.

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

Segundo Repacholi e Greenebaum (1999) os campos magnéticos estáticos exercem forças sobre íons em movimento em soluções, originando a indução de campos elétricos e correntes (indução magnética). Os CM uniformes produzem torques sob certas moléculas e em alguns materiais ferromagnéticos (efeito magneto-mecânico). Ou mesmo, os CM podem alterar os níveis energéticos e a orientação da rotação dos elétrons (interações eletrônicas). A figura 3 ilustra a ação de um CM agindo sob as proteínas de reparo.

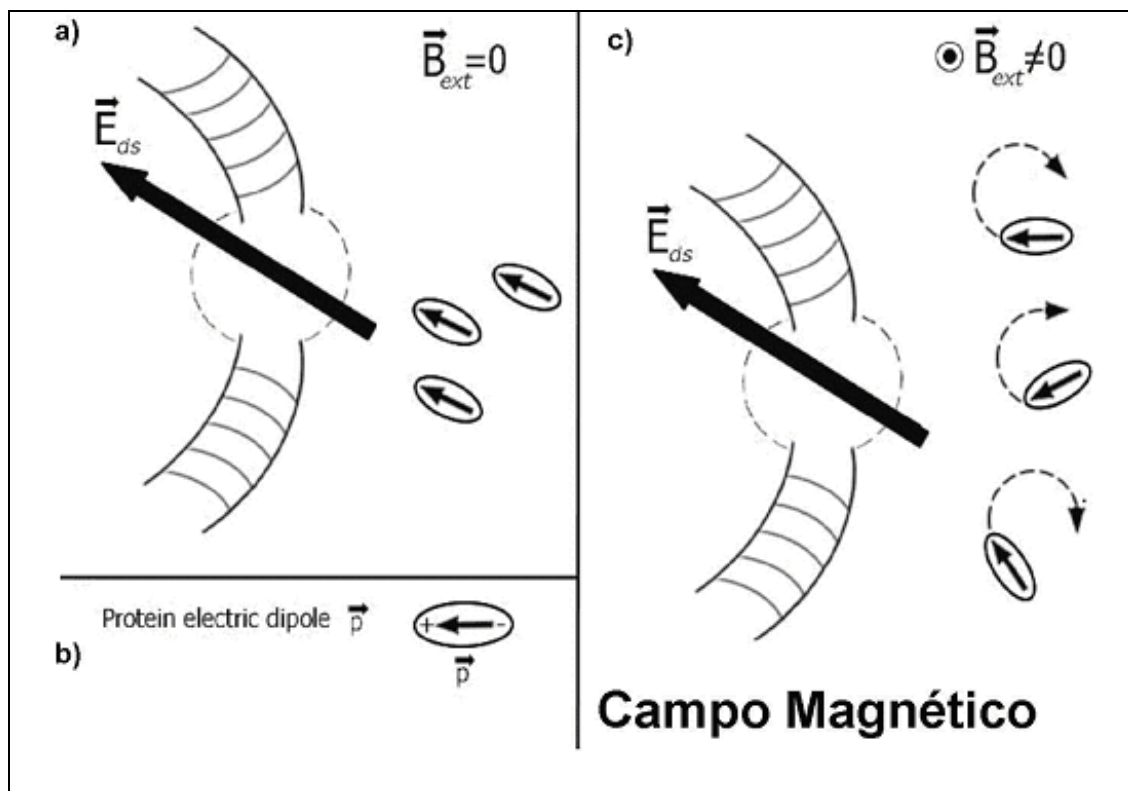


Figura 3: Esquema de ação do campo magnético em cargas em movimento: Efeito inibidor do deslocamento de moléculas dipolares provocado pela ação de um campo magnético. A – Proteínas que apresentam seus momentos de dipolo \vec{p} (representado em B com mais detalhes) orientados na direção do sítio danificado (dupla-quebra) pelo campo elétrico \vec{E}_{ds} . C – Um campo magnético externo (B_{ext}) induz um binário de forças nas proteínas que se deslocam em direção ao sítio danificado, fazendo-as girar centradas em uma mesma posição.

Fonte: Arruda-Neto et al., 2009 e Hobbie et al., 1997.

Koyama et al. (2005) demonstraram que devido à exposição a 5 mT de CM de frequência extremamente baixa (FEB) imediatamente após irradiação com raio-X ocorreu aumento do número de mutações em plasmídeos de *Escherichia coli*. Takashima et al. (2003) sugerem que o bloqueio em G1 induzido por doses de radiação ultravioleta (UV) seja inibido pela exposição de *Saccharomyces cerevisiae* a um campo magnético com FEB de 30 mT, em células proficientes e deficientes em reparo. Outros trabalhos investigaram os efeitos de um campo eletromagnético terapêutico (15 mT de amplitude, 120 pulsos/seg), sozinho e em combinação com outros tipos de radiação, como por exemplo a radiação gama utilizada em RT. Os experimentos foram realizados

in vivo em camundongos nude xenoimplantados com células MDA-MB231-linhagem celular humana de câncer de mama (CAMERON et al., 2005). A terapia com radiação associada à exposição ao campo eletromagnético suprimiu o crescimento dos vasos sanguíneos e a repopulação do tumor após a radiação, resultando em uma menor incidência de metástase tumoral. Diversos outros estudos apontam que vários agentes genotóxicos, como raios gama (WALLECZEK et al., 1999) e raios-X (MIYAKOSHI et al., 2000) entre outros, tiveram seu efeito melhorado pela exposição a CM de FEB. Estes resultados sugerem que há chances do CM de FEB dificultar o processo de reparo do DNA (TAKASHIMA et al., 2003).

1.4 Efeito Combinado de Radiação com Campo Elétrico Estático

Segundo um modelo biofísico proposto por nosso grupo de pesquisa (ARRUDA-NETO et al., 2010), a aplicação de um CEE à cultura de células irradiadas deveria interferir negativamente no mecanismo de reparo. Neste caso, um campo externo tenderia a alinhar as proteínas ao longo de sua direção impedindo-as de alcançar o sítio danificado. Essas enzimas de reparo localizam pares de base danificados, num universo de 2 a 3 bilhões de pares de base, por orientação elétrica. Estudos sobre a viabilidade das células procarióticas e eucarióticas simultaneamente expostas à radiação ionizante e de campo elétrico estático têm gerado resultados interessantes e intrigantes. Este estudo foi realizado com o procarioto *Microcystis panniformis* - uma cianobactéria resistente à radiação e ao calor, com o eucarioto *Cândida albicans* (fungo) e com células humanas (ARRUDA et al., 2009).

Num estudo com procarioto, *Microcystis panniformis*, Silva (2006) associou a radiação gama (3 kGy) com um campo elétrico estático de baixa intensidade (20 V/cm) por 2 h. Os dados evidenciaram que o efeito combinado da radiação com o agente físico utilizado aumentou 12 vezes a taxa de morte celular em relação às amostras que foram apenas irradiadas. No caso do fungo, *Cândida albicans*, Louvison (2007) irradiou as células com raios gama

em doses de 1-4 kGy e submeteu-as a um campo elétrico estático de 180 V/cm por 1 h e 30 min. Os resultados revelaram eliminação do ombro de reparo na curva de sobrevivência das células de *C. albicans* expostas à radiação e a campo elétrico. Estes dois conjuntos de dados puderam evidenciar que o campo elétrico estático aumentou a radiosensibilidade destes dois microrganismos. Em células humanas, a citotoxicidade do CEE associado à radiação gamas é da ordem de 12%, de acordo com medidas de viabilidade e foi constatado que a exposição ao CEE por 1 h com doses de 2 Gy altera a quantidade de histonas H2AX fosforiladas na linhagem normal MRC5, interferindo assim, no processo de reparo das DSBs (figura 4). A análise e interpretação do ciclo celular também indicou que o CEE interferiu no processo de reparo do DNA, notadamente pelo maior acúmulo de células observado na fase S (MORON, 2008).

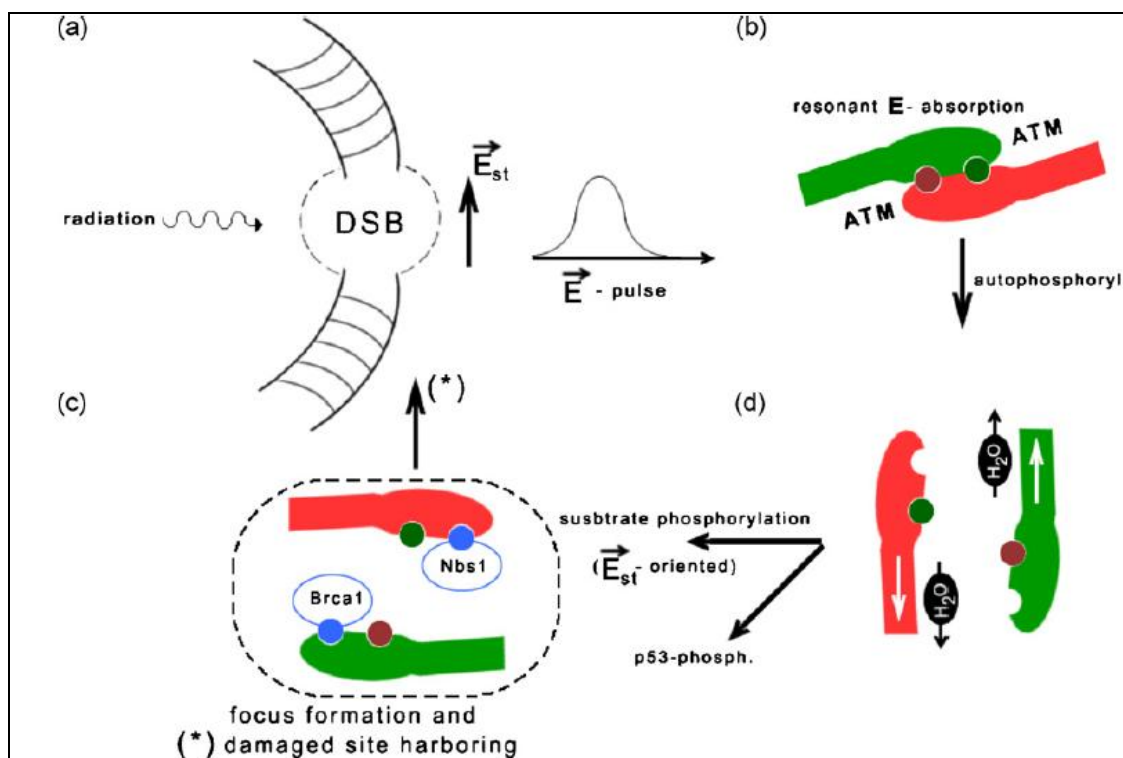


Figura 4: Representação pictórica do desdobramento da ATM (b e c) acionado por um pulso elétrico gerando DSB (a), e danos causados pelo campo elétrico - local danificado e proteínas-alvo (c, d).

Fonte: Arruda-Neto, 2010.

Nestes estudos, ficou comprovado que o campo elétrico aplicado isoladamente não é citotóxico, porém a combinação dos agentes físicos - radiação ionizante e campo elétrico estático - aumenta a morte celular (SILVA, 2006; LOUVISON, 2007; MORON, 2008). Assim realizamos experimentos combinando radiação ionizante e campo elétrico estático.

1.5 Simulações Radioterápicas com Bactérias - *D. radiodurans*: Porque Bactérias como Modelo Biológico?

A sensibilidade dos órgãos do corpo humano está relacionada ao tipo de células que os compõem. A taxa de reprodução das células que formam um órgão não é o único critério para determinar a sensibilidade geral. A importância relativa do órgão para o bem estar do corpo também é importante. A camada externa de células se reproduz rapidamente e também tem um bom suprimento de sangue e oxigênio. As células são mais sensíveis quando estão se reproduzindo e a presença de oxigênio aumenta a sensibilidade à radiação. Células com oxigênio insuficiente tendem a ser inativas, tais como as células localizadas no interior do tumor maligno. Quando o tumor é exposto à radiação, a camada externa de células que estão se dividindo é destruída, fazendo com que o tumor diminua de tamanho. Se o tumor receber uma alta dose para destruí-lo completamente, o paciente também poderá morrer. Assim, é aplicada uma dose baixa no tumor a cada dia, possibilitando que o tecido sadio tenha chance de se recuperar de qualquer dano enquanto, gradualmente, diminui o tumor altamente sensível. Em tratamentos '*in vitro*' foi constatado que células de tumores malignos são mais sensíveis à radiação do que no corpo humano, isto, devido à presença de oxigênio e a falta de irrigação sanguínea (MORON, 2008).

Imamura et al. (2002) utilizou células de *D. radiodurans* como modelo de estudo de reparo, por ser de fácil manipulação, ao contrário de células humanas ("*in vitro*"), possuem crescimento rápido e por serem resistentes a radiação e a tratamento térmico.

1.6 *D. radiodurans*: Características e Peculiaridades

A bactéria do gênero *Deinococcus*, *Deinococcus radiodurans*, é o extremófilo mais conhecido, entre poucos organismos, que podem sobreviver a exposições extremamente elevadas de radiações ionizantes, vácuo, temperatura, dessecação, peróxido de hidrogênio e vários agentes que causam danos ao DNA (ZAHRADKA, 2006). Por exibir uma extraordinária capacidade em resistir aos efeitos letais e mutagênicos de agentes que danificam o DNA, particularmente os efeitos de radiações ionizantes, a *D. radiodurans* tornou-se o organismo radioresistente mais intrigante da literatura (BATTISTA, 1997) e classificado como o mais resistente do mundo. Estes agentes causam quebras ao genoma do seu DNA em centenas de fragmentos, surpreendentemente; esses fragmentos são facilmente reconectados (ZAHRADKA, 2006).

Na tabela 1, apresentamos uma lista com seis espécies de bactérias que são resistentes a radiação ionizante, seus filos e D_{10} . A D_{10} , representada à dose em que 10% das células sobrevivem a um evento letal, neste caso, radiação ionizante, ou seja, dose necessária a levar a morte de 90% da população. A família Deinococcaceae é o filo mais conhecido da lista e estimula estudos a mais de cinco décadas (BATTISTA, 2005).

Tabela 1 - Espécies de Bactérias resistentes à radiação ionizante.

Espécies	D_{10}	Filo
<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	1 000Gy	α -Proteobactéria
<i>Kocuria rósea</i>	2 000Gy	Actinobacteria
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	2 000Gy	γ -Proteobacteria
<i>Kineococcus radiotolerans</i>	2 000Gy	Actinobacteria
<i>Hymenobacter actinosclerus</i>	2 000Gy	Actinobacteria
<i>Chroococcidiopsis spp.</i>	4 000Gy	Cyanobactéria
<i>Rubrobacter xylanophilus</i>	5 500Gy	Actinobacteria
<i>Deinococcus radiodurans</i> R1	10 000Gy	Deinococcus

Fonte: Battista, 2005.

A *D. radiodurans* é o organismo mais tolerante a danos ao DNA já identificado. Pouco é conhecido sobre a base bioquímica para este fenômeno; no entanto, as evidências disponíveis indicam que o reparo eficiente dos danos

ao DNA é, em grande parte, responsável pela radioresistência da *D. radiodurans*. Obviamente, uma explicação desta tolerância aos danos de DNA não pode ser desenvolvido unicamente com base nas estratégias de reparo de DNA dos organismos mais radiosensíveis. A capacidade de sobreviver aos danos do DNA sugere que **(A)** empregam mecanismos de reparo que são fundamentalmente diferentes de outros procariontes, ou que **(B)** elas têm a capacidade de potencializar a eficácia dos convencionais complementos de proteínas de reparo do DNA (BATTISTA, 1997).

Embora a *D. radiodurans* tenha sido estudada ao longo dos últimos 40 anos, o conhecimento é mínimo sobre as estratégias de sobrevivência empregadas por este organismo em tolerar os danos ao DNA, isto quando comparamos aos diversos estudos com os organismos procarióticos e eucarióticos mais estudados [por exemplo, *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)]. A ausência de estudos sobre a *D. radiodurans* dificultou o andamento de novos trabalhos; como consequência, poucos laboratórios fizeram esforços para estudá-la, sufocando assim por muito tempo novos estudos. Porém, o interesse em relação a *D. radiodurans* parece estar crescendo, como é exemplificado pelo número de artigos de revisão publicados nos últimos anos e sobre este organismo e sua capacidade de reparação do DNA. Entre 1956 e 1992, apenas um artigo foi publicado sobre a radiobiologia de *D. radiodurans*, de 1992 a 1997, cinco revisões foram publicadas, e desde então este número vem crescendo (BATTISTA, 1997).

A maioria dos estudos realizados com a *D. radiodurans* teve como foco principal a sua tolerância aos danos no DNA induzidos por radiação gama e luz ultravioleta (UV). Todos apontam a *D. radiodurans* como o organismo mais resistente já identificado, sobrevivendo sem perda de sua viabilidade a doses entre 5 e 7 kGy, enquanto a *E. coli*, por exemplo, não suporta a doses maiores do que 0,5 kGy para irradiações com gama (BATTISTA, 2005).

A curva de sobrevivência a UV da *D. radiodurans* e *E. coli* são comparadas na figura 5. A *E. coli* exibe um declive exponencial de viabilidade, enquanto que a *D. radiodurans* tem ombro de resistência que estende a 500 J/m². A D₃₇ para radiação UV é de aproximadamente 30 J/m² para *E. coli* e entre 550 e 600 J/m² para o crescimento exponencial das culturas de *D.*

radiodurans R1. As doses de radiação UV que a *D. radiodurans* tolera causam uma grande quantidade de danos ao DNA. Para 500 J/m², por exemplo, é estimado uma média de 1 lesão para cada 600 pares de base (BATTISTA, 1997).

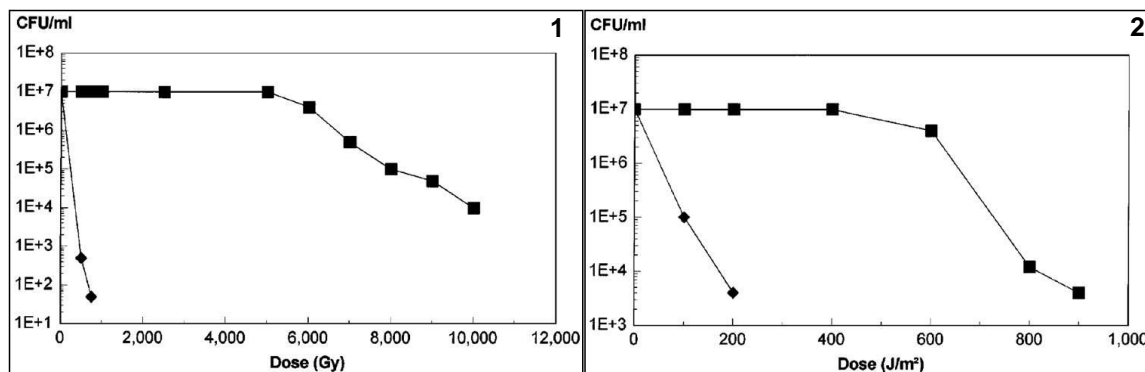


Figura 5: 1- Representação da curva de sobrevivência da *D. radiodurans* (quadrados) e da *E. coli* (diamantes) exposta a radiação gamas. 2 - Representação da curva de sobrevivência da *D. radiodurans* (quadrados) e da *E. coli* (diamantes) exposta a radiação UV.

Fonte: Battista, 1997.

Para doses acima de 7 kGy, a sobrevivência de *D. radiodurans* diminui muito rapidamente. Em termos de danos ao DNA, 6 kGy de irradiação gama pode induzir aproximadamente 200 (DSB) de DNA e acima de 3.000 (SSB), e mais de 1 000 locais de danos de bases por genoma da *D. radiodurans*. O tipo selvagem de *D. radiodurans* é também extremamente resistente a radiação UV, sobrevivendo a doses tão elevadas quanto 1 000 J/m². (BATTISTA, 1997).

A tabela 2 compara o número de quebras duplas no DNA da *E. coli* e *D. radiodurans* R1 com radiação gama em D₃₇, ou seja, a dose em que apenas 37% das células sobrevivem (BATTISTA, 2005).

Tabela 2 - Quebras de dupla fita induzidas em *E. coli* e *D. radiodurans*.

Espécies	Células por Genoma	Quebras duplas de DNA (D ₃₇)	Distância Média entre lesões
<i>Escherichia coli</i> K12	4-5	8-9	530 kpb
<i>Deinococcus radiodurans</i> R1	8-10	275	10 kpb

Fonte: Battista, 2005.

A diferença é impressionante; a *D. radiodurans* tolera 30 vezes mais quebras duplas no DNA do que a *E. coli*. Claramente, a *D. radiodurans* possui mecanismos para evitar os efeitos letais das quebras de fitas duplas, ou seja, mecanismos de reparo muito eficientes, produzido por radiação ionizante, o que a *E. coli* não possui.

A maioria das células resistentes às radiações ionizantes é capaz de acumular cerca de 300 vezes mais manganês (Mn) do que as células mais sensíveis às radiações ionizantes (DALY et al., 2004). Os depósitos de manganês estão espalhados em diferentes regiões do planeta. O Programa de Perfuração no Oceano (ODP) é uma organização internacional que tem conduzido centenas de expedições para pesquisa básica sobre a história do assoalho oceânico em diversas partes do mundo. Recentemente, o ODP conduziu um levantamento de uma grande variedade de sedimentos marítimos (D'HONDT et al., 2004). Curiosamente, microrganismos anaeróbios e hipertermofílicos pertencentes ao gênero *Deinococcus* foram isolados de fontes hidrotermais com profundidades entre 65 m e 129 m (abaixo do assoalho oceânico), onde a temperatura varia de 76 °C a 91 °C (KIMURA et al., 2003). Estes resultados sugerem que uma espécie ancestral resistente a radiação ionizante, compartilhada por espécies do gênero *Deinococcus* e outras espécies anaeróbias hipertermofílicas podem ter existido em sítios ricos em Mn, com altos níveis de radiação (PAULINO-LIMA, 2010).

Estudos sobre a *D. radiodurans* revelaram que esse organismo é altamente eficiente no reparo de DNA danificado. *D. radiodurans* dispõe de várias enzimas diferentes de reparo de DNA. Além da enzima de reparo de DNA, RecA, *D. radiodurans* possui sistemas de DNA independentes de RecA capazes de promover o reparo de rupturas em DNA de fita simples ou dupla, além da excisão e do reparo de bases incorretamente incorporadas. De fato, os processos de reparo são tão eficientes, que o cromossomo pode ser reorganizado até mesmo a partir de um estado fragmentado (MADIGAN, 2004).

Acredita-se também que o arranjo peculiar do DNA nas células de *D. radiodurans* desempenha um papel na resistência à radiação. As células de *D. radiodurans* estão sempre presentes em pares ou tétrades (MADIGAN, 2004).

Vários são os mecanismos celulares que contribuem para a alta resistência à radiação, podendo ser classificados em **(i)** mecanismos passivos, como a produção de carotenóides que funcionam como escudo contra as radiações não ionizantes (ultravioleta), e **(ii)** os mecanismos ativos que incluem a reparação de danos no DNA (GHOSAL et al., 2005). Os mecanismos ativos compreendem pelo menos duas categorias (MAKAROVA et al., 2001; BATTISTA, 2005; MAKAROVA et al., 2007): **(i)** um subconjunto de genes que codificam proteínas com funções ainda desconhecidas que podem aumentar muito a eficiência dos mecanismos de reparação do DNA, e **(ii)** complexos de manganês (Mn) não-enzimáticos presentes em microrganismos radioresistentes que protegem as enzimas contra a oxidação durante a irradiação (DALY et al., 2004), preservando os sistemas de reparação do DNA que acabam funcionando com eficiência muito maior do que em microrganismos radiosensíveis (HE, 2009). Essas duas categorias possuem um denominador comum: a forte correlação positiva entre a resistência à radiação ionizante e a tolerância à dessecação (SGHAIER et al., 2007). Atualmente, a comunidade científica assume que a resistência à radiação é uma consequência da adaptação à dessecação (hipótese da adaptação à dessecação), uma vez que o principal tipo de dano celular provocado por estes dois tipos de estresses é o mesmo, ou seja, quebra de fita dupla no DNA (PAULINO-LIMA, 2010).

Essa hipótese afirma que a resistência à radiação ionizante de *D. radiodurans* é uma consequência da sua adaptação à dessecação. No entanto, não há dados genômicos ou experimentais sugerindo que a tolerância à dessecação é antecedente à resistência à radiação ionizante. Resumidamente, os dados apresentados por Mattimore e Battista (1996), apenas sugerem uma forte correlação positiva entre estes dois fenótipos. De fato, um co-autor da hipótese da adaptação à dessecação mostrou que a inativação de DRB0118, uma proteína constitutivamente expressa, sensibiliza *D. radiodurans* à dessecação, mas não à radiação ionizante (BATTISTA et al., 2001). Além disso, a hipótese da adaptação a dessecação (MATTIMORE e BATTISTA, 1996) não explica a resistência extrema à radiação ionizante observada em vários membros do domínio Archaea (KOPYLOV et al., 1993). A hipótese

alternativa, de que a tolerância de *D. radiodurans* à dessecação pode ser uma consequência da adaptação desse organismo à radiação ionizante (hipótese da adaptação à radiação) é também apoiada por várias linhas de evidências, devendo ser investigada com igual teor (SGHAIER et al., 2007).

1.7 Motivação para um Estudo da Resposta de *D. radiodurans* à Ação Combinada de Vários Agentes Físicos Estressantes

A *Deinococcus radiodurans* constitui um modelo biológico viável estudo de reparo (IMAMURA, 2002). Este estudo pode ser usado para esclarecer os mecanismos de reparo de diversos organismos a partir deste modelo, além de poder ser amplamente utilizado em oncologia.

Como os tumores *in vivo*, a *D. radiodurans* é resistente à ação de radiação, mais especificamente a radiação gama (BATTISTA, 2005). Existe consenso quanto à necessidade de minimizar os efeitos ou lesões aos tecidos sadios adjacentes, um objetivo ainda não atingido. Por outro lado, há evidências de que a associação de radiação com outros agentes físicos exógenos, como campos elétricos e magnéticos, aumenta significativamente a radiosensibilidade celular *in vitro* (ARRUDA-NETO, 2009; ARRUDA-NETO, 2010; SILVA, 2006; LOUVISON, 2007; MORON, 2008). Esses resultados, se verificados *in vivo*, poderiam servir de base para a elaboração de novos protocolos radioterápicos que empregassem baixos níveis de dose.

Contudo, o estudo de tumores *in vivo* apresenta inúmeras dificuldades e incertezas, principalmente devido à necessidade de utilização em grande número de animais, esbarrando sempre em entraves impostos pelos Comitês de Ética.

Portanto, estudaremos a viabilidade da bactéria radioresistente *Deinococcus radiodurans* como modelo de estudo de reparo a ação combinada de radiações ionizantes com campos elétricos e magnéticos.

4 Conclusões

- 1 A *D. radiodurans* apresentou radioresistência similar em ambas as fases de crescimento quando o número de células inicial foi ajustado.
- 2 A associação de radiação gama com exposição a campo elétrico reduziu o ombro de reparo de *D. radiodurans* em ambas as fases, demonstrando que essa combinação de estresses em muito aumenta sua radiosensibilidade. Efeito similar, mas em menor intensidade, também foi observado com exposição a campo magnético e apenas na fase estacionária. A regeneração provocada pelo campo magnético na fase exponencial merece um estudo mais aprofundado e provavelmente inspirará muitas aplicações.
- 3 O estudo de *D. radiodurans* submetida a elétrons foi realizado pela primeira vez. A radiosensibilidade observada foi surpreendentemente muito maior do que em irradiações com gamas. Um modelo biofísico tentativo é proposto.
- 4 Em possíveis aplicações radioterápicas as doses deverão ser "normalizadas" (para Grays e Centigrays). Contudo, as respostas qualitativas aos estresses (redução e perda de ombro de reparo) devem permanecer iguais.
- 5 Estudo dos processos de reparação em *D. radiodurans* quando exposta a radiações muito ionizantes como feixes de prótons e alfas, de grande relevância para a emergente técnica de hádron terapia de câncer.
- 6 Utilização nesses estudos de técnicas moleculares, como por exemplo, a observação direta da síntese dos fragmentos via AFM, preferencialmente.
- 7 Condução de estudos similares com outros microrganismos

radioresistentes como as bactérias *R. xylanophilus* e *R. radiotolerans*.

Referências

REFERÊNCIAS¹

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

ANDERSON, A. W.; NORDAN, H. C.; CAIN, R. F.; PARRISH, G.; DUGGAN, D. Studies on a radio-resistant micrococcus. I. isolation, morphology, cultural characteristics, and resistance to gamma radiation. **Food Technology**, v. 10, p. 575-578, 1956.

ARRUDA-NETO, J. D. T. et al. Static electric fields interfere in the viability of cells exposed to ionizing radiation. **Int. J. Radiat. Biol.**, v. 85, n. 4, p. 314–321, Apr. 2009.

ARRUDA-NETO, J. D. T. et al. Developing new radiotherapy techniques using Linac based gamma radiation sources. Proceedings of the 8th International Topical Meeting on Nuclear Applications and Utilization of Accelerators. **American Nuclear Society**, p. 398-404, 2009.

ARRUDA-NETO, J. D. T. et al., The role played by endogenous and exogenous electric fields in DNA signaling and repair. **DNA Repair**, v. 9, p. 356–357, 2010.

ARRUDA-NETO, J. D. T.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; FRIEDBERG, E. C.; SILVA, E. C.; SCHENBERG, A. C. G.; OLIVEIRA, M. C. C.; HEREMAN, T. C.; MESA, J.; RODRIGUES, T. E. ; SHTEJER, K.; GARCIA, C.; GARCIA, F.; LOUVISON, M.; PAULA, C. R. Electric Field Interference in DNA repair: Model Approach and Case Studies, v. 02, p. 2, **Radiat. Res**, 2010.

BATTISTA, J. R. Against All Odds: The Survival Strategies of *Deinococcus radiodurans* (Review). Annu. **Rev. Microbiol.**, v. 51, p. 203-224, 1997.

BATTISTA, J. R.; EARL, A. M.; PARK, M. J. Why is *Deinococcus radiodurans* so resistant to ionizing radiation? **Trends Microbiol.**, v. 7, p. 362–365, 1999.

BATTISTA, J. R.; PARK, M. J.; MCLEMORE, A. E. Inactivation of two homologues of proteins presumed to be involved in the desiccation tolerance of plants sensitizes *Deinococcus radiodurans* R1 to desiccation. **Cryobiology**, v. 43, n. 2, p. 133-139, 2001.

BATTISTA, J. R.; COX, M. M. *Deinococcus radiodurans* – the consummate survivor. **Nature**, v. 3, p. 882-892, Nov. 2005.

¹ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BELLI, M.; SAPORA, O.; TABOCCHINI, M. A. Molecular Targets in Cellular Response to Ionizing Radiation and Implications in Space Radiation Protection. **J. Radiat. Res.**, v. 43, p. 13-19, 2002.

BIRAL, A. R. **Radiações ionizantes para médicos, físicos e leigos**. São Paulo: Editora Insular, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativas 2010: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2010. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010>> Acesso em: 22 dez. 2010.

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

D'HONDT, S.; JORGENSEN, B. B.; MILLER, D. J.; BATZKE, A.; BLAKE, R.; CRAGG, B. A.; CYPIONKA, H.; DICKENS, G. R.; FERDELMAN, T.; HINRICHS, K. U.; HOLM, N. G.; MITTERER, R.; SPIVACK, A.; WANG, G. Z.; BEKINS, B.; ENGELEN, B.; FORD, K.; GETTEMY, G.; RUTHERFORD, S.; D. SASS, H.; SKILBECK, C. G.; AIELLO, I. W.; GUERIN, G.; HOUSE, C. H.; INAGAKI, F.; MEISTER, P.; NAEHR, T.; NIITSUMA, S.; PARKES, R. J.; SCHIPPERS, A.; SMITH, D. C.; TESKE, A.; WIEGEL, J.; PADILLA, C. N.; ACOSTA, J. L. S. Distributions of microbial activities in deep seafloor sediments. **Science**, v. 306, n. 5705, p. 2216-2221, 2004.

DALY, M. J. LING, O. Y. FUCHS, P. MINTON, K. W. In-vivo damage and RecA-Dependent Repair of plasmid and chromosomal DNA in the radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 12, p. 3508-3517, Jun. 1994.

DALY, M. J. Engineering radiation-resistant bacteria for environmental biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 280-285, 2000.

DALY, M. J. GAIDAMAKOVA, E. K. MATROSOVA, V. Y. VASILENKO, A. ZHAI, M. VENKATESWARAN, A. HESS, M. OMELCHENKO, M. V. KOSTANDARITHES, H. M. MAKAROVA, K. S. WACKETT, L. P. FREDRICKSON, J. K. GHOSAL, D. Accumulation Of Mn(II) In, *Deinococcus radiodurans* facilitates gamma-radiation resistance. **Science**, v. 306, n. 5698, p. 1025-1028, 2004.

DEINHARD, G.; SAAR, J.; KRISCHKE, W.; PORALLA, K. *Bacillus acidoterrestris* sp. nov., a new thermotolerant isolated from different soils. **Systematic Applied Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 47-53, Nov. 1987a.

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

FERREIRA, A. C. et al. Characterization and radiation resistance of new isolates of *Rubrobacter radiotolerans* and *Rubrobacter xylanophilus*. **Extremophiles**, n. 3, p. 235–238, 1999.

FIECHETER, A.; KÄPPELI, O.; MEUSSDOERFFER, F. Batch and Continuous Culture. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. **The Yeasts**. 2nd ed. New York: Academic Press, 1987. v. 2, Cap. 5.

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

GOODHEAD, D. T. Initial events in the cellular effects of ionizing radidtions: clustered damage in DNA. **International Journal of Radiation Biology**, v. 65, n. 1, p. 7-17, 1994

DALY, M. J. How radiation kills cells: Survival of *Deinococcus radiodurans* and *Shewanella oneidensis* under oxidative stress. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 2, p. 361-375, 2005.

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

HALL, E. J. The Physics and Chemistry of Radiation Absorption. In:_____. **Radiobiology for the Radiologist**, 4th ed. New York: J.B. Lippincott Company, 1994. Cap. 1.

HALL, E. J. Cell Survival Curves. In: _____. **Radiobiology for the Radiologist**. 4th ed. New York: J.B. Lippincott Company, 1994. Cap. 3.

HE, Y. High cell density production of *Deinococcus radiodurans* under optimized conditions. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 4, p. 539-546, 2009.

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

HOBBIE, R. K. **Intermediate Physics for Medicine and Biology**. 3rd ed. New York: Springer-Verlag, 1997.

IMAMURA, M.; SAWADA, S.; KASAHARA-IMAMURA, M.; HARIMA, K.; HARADA, K. Synergistic cell-killing effect of a combination of hyperthermia and heavy ion beam irradiation: In expectation of a breakthrough in the treatment of refractory cancers (Review). **Int. J. Mol. Medicine**, n. 9, p. 11-18, 2002.

JAY, I. M. **Moderna Food Microbiology**. 6th ed. New York: International Thomson Publishing, 2001.

KAMIDA, A. et al. Effect of neutron capture therapy on the cell cycle of human squamous cell carcinoma cells. **Int. J. Radiat. Biol.**; v. 84, n. 3, p. 191-199, 2008.

KELLER, L. C.; MAXCY, R. B. Effect of physiological age on radiation resistance of some bacteria that are highly radiation resistant. **Appl. Environ. Microb.**, v. 47, p. 915-918, 1984.

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

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

KIMURA, H.; ASADA, R.; MASTA, A.; NAGANUMA, T. Distribution of microorganisms in the subsurface of the Manus basin hydrothermal vent field in Papua New Guinea. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 644-648, 2003.

KOPYLOV, V. M.; BONCHOSMOLOVSKAYA, E. A.; SVETLICHNYI, V. A.; MIROSHNICHENKO, M. L.; SKOBKIN, V. S. Gamma-irradiation resistance and UV-sensitivity of extremely thermophilic archaebacteria and eubacteria. **Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 63-67, 1993.

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

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

LAMOS, P.; SANTOS, H.; COSTA, M. S. Extremófilos: microrganismos à prova de agressões ambientais extremas. **Biotecnologia Microbiana**, n. 69, p. 2-10, ago. 2001.

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

LOUVISON, M. **Efeitos da irradiação gama, e de campos elétricos e magnéticos sobre o crescimento, viabilidade, morfologia e produção de exoenzimas em *Candida albicans***. 2007. 86 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo,

São Paulo, 2007.

MAKAROVA, K. S.; ARAVIND, L.; WOLF, Y. I.; TATUSOV, R. L.; MINTON, K. W.; KOONIN, E. V.; DALY, M. J. Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 1, p. 44-79, 2001.

MAKAROVA, K. S.; OMELCHENKO, M. V.; GAIDAMAKOVA, E. K.; MATROSOVA, V. Y.; VASILENKO, A.; ZHAI, M.; LAPIDUS, A.; COPELAND, A.; KIM, E.; LAND, M.; MAVROMATIS, K.; PITLUCK, S.; RICHARDSON, P. M.; DETTER, C.; BRETTIN, T.; SAUNDERS, E.; LAI, B.; RAVEL, B.; KEMNER, K. M.; WOLF, Y. I.; SOROKIN, A.; GERASIMOVA, A. V.; GELFAND, M. S.; FREDRICKSON, J. K.; KOONIN, E. V.; DALY, M. J. *Deinococcus geothermalis*: The pool of extreme radiation resistance genes shrinks. **Plos One**, v. 2, n. 9, p. 1-12, 2007.

MADIGAN, B.; MICHAEL, T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. São Paulo: Prentice Hall, 2004.

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

MATTIMORE, V.; BATTISTA, J. R. Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: Functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 3, p. 633-637, 1996.

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

MILIAN, F. M. **Estudo *in vitro* dos efeitos radiobiológicos no DNA plasmidial com radiações ionizantes de baixo LET**. 2006. 158 f. Tese (Doutorado em Física) – Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MILLER, J. H. **A Short Course in Bacterial Genetics. A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992.

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

MORON, M. M. **Efeito da ação combinada de radiação gama e campo elétricoestático em células humanas**. 2008. 98 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

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

NIETO, L.; ARRUDA-NETO J. D. T.; COTTA, M. A.; CARRER, H.; GARCIA, F.; SILVA, R. A. S.; MOREAU, L. D.; RIGHI, H.. Study of DNA fragmentation by gamma radiation and electron beams using Atomic Force Microscopy. **Journal of Biophysics Biology**, 2011. In press.

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

OKUNO, Emico et al. **Física para Ciências Biológicas e Biomédicas**. São Paulo: Harper & Row Brasil, 1982.

OKUNO, Emico et al. **Radiação: Efeitos, Riscos e Benefícios**. São Paulo: Editora Harbra, 1988.

OKUNO, Emico et al. **Física das Radiações**. São Paulo: Editora Oficina de Texto, 2010.

PAULINO-LIMA, I. G. **Investigação das condições de sobrevivência de microrganismos extremófilos em ambientes extraterrestres simulados**. 2010. 256 f. Tese (Doutorado em Ciências Biomédicas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

PELCZAR JÚNIOR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. São Paulo: Makron Books, v. 1, p. 542, 1996.

POTERA, C. What is radiation's true target? **Environmental Health Perspectives**. v. 115, n. 8, p. 402A, 2007.

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

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

ROTHSCHILD, L. J.; MANCINELLI, R. L. Life in extreme environments. **Nature**, v. 409, n. 6823, p. 1092-1101, 2001.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SILVA, E. C. **Controle Populacional de *Microcystis panniformis* (Cyanobacteria) utilizando radiações ionizantes e outros agentes físicos**

exogenous. 2006. 84 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

SGHAIER, H.; NARUMI, I.; SATOH, K.; OHBA, H.; MITOMO, H. Problems with the current deinococcal hypothesis: An alternative theory. **Theory in Biosciences**, v. 126, p. 43-45, 2007.

SUKHI, S. S.; SHASHIDHAR, R.; SANJUKTA, L., KUMAR, A.; BANDEKAR, J. R. Radiation resistance of *Deinococcus radiodurans* R1 with respect to growth phase. Food Technology Division, Bhabha Atomic Research Centre, Trombay, Mumbai, India; and 2Analytical Chemistry Division, Bhabha Atomic Research Centre, Trombay, Mumbai, India. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 297, p. 49–53, 2009.

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

TELLÓ, M.; RAIZER, A.; BUZAID, A. C.; DOMENGE, C.; DIAS, G. A. D.; ALMAGUER, H. D.; OLIVEIRA, L. O.; FARBER, P. L.; OLIVEIRA, R. T.; SILVA, V. D. **O uso da corrente elétrica no tratamento do câncer.** Porto Alegre: Edipucrs, 2004.

TORTORA, G. J. F.; BERDELL, R. C.; CHISTINE, L. **Microbiologia.** 6th ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

TUITE, M. F.; OLIVER, S. G. Culture Systems. In: MATHEWS, T. M.; WEBB, C. **Saccharomyces - Biotechnology Handbooks.** 4th ed. New York: Plenum Press, 1991. Cap. 8.

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

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

WHITE, O. et al. Genoma Sequence of the Radioresistant Bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. **Science**, v. 286, p. 1571, 1999.

PEREZ, C. A.; BRADY, L. W. **Principles and practice of radiation oncology.** Philadelphia: J. B. Lippincott, 1997.

ZAHRADKA, K.; SLADE, D.; BAILONE, A.; SOMMER, S.; AVERBECK, D.; PETRANOVIC, M.; LINDNER, A. B.; RADMAN, M. Reassembly of shattered chromosomes in *Deinococcus radiodurans*. **Nature**, v. 443, p. 569-573, n. 5, Oct. 2006.