



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Vera Maria Araujo de Campos

**Avaliação da eficiência biológica relativa (RBE) de raios X de baixa  
energia**

Rio de Janeiro

2017

Vera Maria Araujo de Campos

**Avaliação biológica relativa (RBE) de raios X de baixa energia**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Veloso de Almeida

Rio de Janeiro

2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

C198 Campos, Vera Maria Araujo de.  
Avaliação biológica relativa (RBE) de raios X de baixa energia / Vera  
Maria Araujo de Campos. – 2017.  
89 f.

Orientador: Carlos Eduardo Veloso de Almeida.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de  
Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Radiação ionizante – Teses. 2. Raios X - Teses. 3. Eficiência Biológica  
Relativa. 4. Reparo do DNA - Teses. I. Almeida, Carlos Eduardo Veloso de. II.  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto  
Alcântara Gomes. III. Título.

..... CDU 616.314

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira  
CRB7/6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta  
tese, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Vera Maria Araujo de Campos

**Avaliação biológica relativa (RBE) de raios X de baixa energia**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 29 de Março de 2017.

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Carlos Eduardo Veloso de Almeida (Orientador)  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra Cláudia Vitória de Moura Gallo  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Tânia Aparecida Correia Furquim  
Fundação do Câncer

---

Prof. Dr. Carlos Eduardo Bonacossa de Almeida  
Comissão Nacional de Energia Nuclear

Rio de Janeiro

2017

## DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha família que sempre me apoiou, me ajudou de todas as formas possíveis, me deu forças para sempre seguir em frente, de cabeça erguida, mantendo a fé e a perseverança. Mas, quando me refiro a minha família não estou apenas me referindo à consanguínea, apesar dela ter a maior participação nisso tudo. Mas também a família que adquiri no decorrer deste doutorado seja no laboratório do LCR, no esporte ou na vida acadêmica.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço de todo coração a toda equipe do Laboratório de Ciências Radiológicas. Inicialmente ao Prof. Dr. Carlos Eduardo V. de Almeida por ter acreditado em mim, e que seria capaz de obter êxito em mais essa etapa da minha formação. Ao Prof. Dr. Adenilson de Souza da Fonseca que desenhou a primeira parte deste trabalho, que me acompanhou, auxiliou e me instruiu tanto na parte experimental quanto fora dela. A equipe que veio agregada ao professor Adenilson, como a Prof. Dra. Flávia de Paoli e os alunos Luiz Philippe Sérgio, Keila Canuto, Luciana Guedes, Luana Barboza, Solange Vicentini, Larissa Alessandra e Eduardo Tavares Lima Trajano, sinto saudades de todos vocês. Dando continuidade a equipe do LCR, não tenho palavras para agradecer a Prof. Dra. Samara Cristina Ferreira Machado, por ter me acolhido em mais um momento de transição da minha vida e por ter assumido e agregado a continuidade deste trabalho. Para mim, você e professor Carlos Eduardo sempre terão a imagem de pai e irmã mais velha para mim. Também gostaria de agradecer ao corpo docente, secretária e alunos do programa de pós-graduação em biociências, por terem me auxiliado de alguma forma, aconselhando, ensinando, compartilhando equipamentos, ou seja, que contribuíram de alguma forma pra o seguimento e conclusão deste trabalho. Obrigada especialmente aos professores(as) doutores(as) Cláudia Gallo, André Mencialha e Verônica M. Morandi da Silva e a sua aluna Laila RF, e ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Bonacossa do IRD. Claro que não podia faltar o meu agradecimento à futura aluna de mestrado Luciana Teixeira por ter me acompanhado nos últimos experimentos, me feito rir e desafinar no laboratório. Nessa reta final, principalmente depois da morte de nosso pai, queria agradecer principalmente a minha irmã Alba Lúcia, cunhado Leonardo Fernandes e minha mãe que têm me levantado, investido e apoiado imensamente e constantemente! Espero retribuir mais do que em triplo por tudo que têm feito por mim. E claro, a Deus por ter me agraciado por todas essas pessoas maravilhosas durante o meu doutorado.

Saber muito não lhe torna inteligente. A inteligência se traduz na forma que você recolhe, julga, maneja e, sobretudo, onde e como aplica esta informação.

*Carl Sagan.*

## RESUMO

CAMPOS, Vera Maria Araujo de. *Avaliação da eficiência biológica relativa (RBE) de raios X de baixa energia*. 2017. 89f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

A radiação ionizante vem sendo empregada na obtenção de imagens para diagnóstico, monitoramento de doenças e na terapia do câncer, contribuindo no aumento da expectativa de vida da população. Entretanto, atualmente, com o maior acesso aos exames que empregam raios X para a obtenção da imagem, a dose coletiva de exposição à radiação ionizante na população tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas, o que é um fator preocupante, uma vez que a radiação ionizante é um agente genotóxico sem determinação de um limiar de dose, para exposições de baixa dose e baixa energia, como as que ocorrem nos exames diagnósticos. Lesões radioinduzidas pela exposição radiográfica diagnóstica, acumuladas no decorrer da vida, podem induzir o processo de carcinogênese. A mama é um dos órgãos humanos mais radiosensíveis e está frequentemente inserido no campo de exposição à radiação diagnóstica, além da diretriz de exames recorrentes de mamografia em mulheres assintomáticas, que possui a intenção de detectar precocemente a ocorrência do câncer de mama. A mamografia possui características específicas da qualidade do feixe de raios X, que o capacitam para a formação da imagem. Porém, a caracterização do feixe mamográfico tem sido relacionado a um padrão de ionização mais denso do meio que foi exposto ao feixe do que a ionização do mesmo meio por outros tipos de feixes radiográficos, até com capacidade energética maior do que o mamográfico. Consequentemente, originou-se o interesse em comparar os efeitos biológicos da exposição a feixes de raios X diagnósticos com níveis diferentes de energia (28 e 150 kVp), com o propósito de verificar se o feixe de menor energia seria capaz de comprometer o equilíbrio dinâmico celular de forma mais efetiva do que o feixe de energia mais elevada. A avaliação dos efeitos biológicos decorrentes da exposição ao feixe de raios X de 28 kVp, tensão aproximada aos utilizados na mamografia, em relação a um de 150 kVp. Os ensaios biológicos foram realizados em diferentes modelos experimentais. Entre os ensaios realizados as características avaliadas foram: a capacidade dos feixes de raios X em induzir lesões ao DNA, mediante da construção de curvas de sobrevivência; capacidade de reparo das lesões radioinduzidas e o cálculo da eficiência biológica relativa (RBE). Em síntese, nossas análises mostram que a exposição ao feixe de raios X de 28 kVp induziram redução moderada da fração de sobrevivência e aumento na indução de lesões no DNA dos modelos experimentais utilizados, em relação aos resultados apresentados pelo feixe de raios X de 150 kVp. Porém, as lesões radioinduzidas por ambos os feixes de raios X foram quase que efetivamente reparadas em um prazo de 24h após a exposição à radiação. A maior eficiência do feixe de raios X de 28 kVp, em relação aos de 150 kVp, parece estar relacionado a formação de quebras duplas no DNA, que são formadas de forma indireta na tentativa de reparo, uma vez que as lesões simples estão dispostas mais próximas umas das outras no feixe de 28 kVp do que as induzidas pelo feixe de 150 kVp.

Palavras-chave: Raios X. DNA. Reparo. Eficiência Biológica Relativa (RBE).

## ABSTRACT

CAMPOS, Vera Maria Araujo de. *Relative biological efficiency (RBE) evaluation of low energy X-rays*. 2017. 89f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Ionizing radiation has been used to obtain images for diagnosis, disease monitoring and cancer therapy, contributing to the life expectancy of the population. However, with the increased access to X-ray imaging the collective dose of exposure to ionizing radiation in the population has increased in the last decades, which is a pre-emptive factor, since the ionizing radiation is a genotoxic agent without the determination of a dose threshold at low dose and energy exposures, such as those occurring in diagnostic exams. Due to this, there is a concern that the radiation-induced lesions caused by diagnostic radiographic exposure accumulated during the course of life may induce the process of carcinogenesis. The breast is one of the most radiosensitive organs in humans, and is frequently inserted in the fields of exposure to diagnostic radiation, as well as the guideline for recurrent mammography exams in asymptomatic women, in order to detect early breast cancer. Mammography has specific parameters in the characterization of the X-ray beam that enable it in the formation of the image, however, this characterization of the beam has been related to an ionization pattern of the medium in a more dense form than by other more energetic X-rays beams. Consequently, interest arose in comparing the biological effects of exposure to diagnostic X-rays beams with different energy levels (28 and 150 kVp), in order to verify if the lower energy beam (28 kVp) would be able to compromise the cellular dynamic equilibrium more effectively than the highest energy beam (150 kVp). The evaluation of the biological effects of exposure to the 28 kVp X-rays beam, approximate to those used in mammography, compared to 150 kVp were performed by several biological assays in different experimental models. The assays performed evaluated the ability of X-ray beams to induce DNA damage by constructing survival curves, radiation-induced lesion repair capacity, and relative biological efficiency (RBE). In summary, our assessments show that exposure to the 28 kVp X-rays beam induced a moderate reduction in the survival fraction and increase in the induction of DNA damage in the experimental models used, in relation to the results presented by the 150 kVp X-ray beam. However, the lesions induced by both X-ray beams were almost effectively repaired within 24 hours after exposure to X-rays. The higher efficiency of the 28 kVp beam, compared to the 150 kVp beam, seems to be related to the formation of double breaks in the DNA, due to the attempt to repair the radiation-induced lesions next to each other, than those induced by the 150 kVp beam.

Keywords: X-rays. DNA. Repair. Relative Biological Efficiency (RBE).

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Principais componentes de um tubo de raios X diagnóstico.....	18
Figura 2 –	Efeito Compton.....	22
Figura 3 –	Efeito Fotoelétrico.....	24
Figura 4 –	Sequência de eventos após exposição de humanos à radiação.....	27
Figura 5 –	Esquema da ação do reparo por excisão de base.....	35
Figura 6 –	Ilustração do procedimento de irradiação das cepas bacterianas .....	41
Figura 7 –	Procedimento de irradiação da cultura de células mamárias .....	44
Figura 8 –	Demonstração das colônias formadas no procedimento de sobrevivência de cultura das células MCF-10A.....	48
Figura 9 –	Análise da eletroforese do plasmídeo irradiado.....	58
Figura 10 –	Microfotografia da classificação visual do ensaio cometa.....	59

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Gráfico da média $\pm$ SEM da sobrevivência bacteriana.....	52
Gráfico 2 –	Gráfico das médias $\pm$ SEM da sobrevivência da cultura celular mamária.....	55
Gráfico 3 –	Gráfico da média $\pm$ SEM do ensaio cometa em relação ao controle.....	60
Gráfico 4 –	Gráfico da média $\pm$ SEM do ensaio cometa em relação aos grupos tratados.....	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Avaliação morfológica da cepa selvagem exposta aos feixes convencionais e mamografia.....	54
Tabela 2 –	Análise morfológica da cepa deficiente em endonuclease VIII exposta aos feixes convencionais e mamografia.....	54
Tabela 3 –	Intensidade das lesões induzidas no DNA cromossomal de MCF-10A expostas ao feixe convencional após 30 minutos e 24h.....	59
Tabela 4 –	Intensidade das lesões induzidas no DNA cromossomal de MCF-10A expostas ao feixe de mamografia após 30 minutos e 24h.....	60
Tabela 5 -	Cálculo da RBE referentes às porcentagens de sobrevivência da cepa selvagem.....	63
Tabela 6 –	Cálculo da RBE referentes as porcentagens de sobrevivência da cepa deficiente em endonuclease VIII.....	63
Tabela 7 –	Cálculo da RBE referentes às porcentagens de sobrevivência descritas para cultura de células mamárias não tumoral.....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB1157	Linhagem bacteriana selvagem
ALARA	<i>As Low As Reasonably Achievable</i>
AP	Sítio abásico (apurínico ou apirimidico)
AR	<i>Adaptative Response</i>
BE	<i>Bystander Effect</i>
BER	Reparo por excisão de base
DMSO	Sulfóxido de dimetilo
DNA	Àcido desoxirribonucleico
DSB	<i>Double Strand Break</i>
E.coli	<i>Escherischia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
G1/S	Transição entre as fases de mitose (G1 para S)
HR	Recombinação Homóloga
HRS	<i>Hyper Radiaion Resistance</i>
HVL	Camada semi-redutora
ICRP	<i>International Commision on Radiobiological Protection</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IRR	<i>Increased Radiation Resistance</i>
JW0704-1	Linhagem bacteriana deficiente em endonuclease VIII
LET	Transferência linear de energia
LPL	modelo Linear Potencialmente Letal
LQ	modelo Linear Quadrádico
MCF10A	Cultura de células mamárias não tumorais
MDS	<i>Multiplly Damage Sites</i>
MR	<i>Mismatch Repair</i>
nei	Gene referente a endonuclease III
NER	Reparo por excisão de nucleotídeos
NHEJ	União de Extremidades Não-Homólogas
nth	Gene referente a endonuclease VIII
PBS	Tampão fosfato-salino

PNQM	Portaria da Qualidade em Mamografia b
pUC19	Especificação de um tipo de plasmídeo
RBE	Eficiência Biológica Relativa
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SSB	<i>Simple Strad Break</i>
TSL	Síntese translesão

## LISTA DE SÍMBOLOS

kVp	<i>Kilovoltage peak</i>
$Q_F$	Fator de qualidade da radiação
$\gamma$	Gama
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
mAs	Miliampere-segundos
Al	Alumínio
Z	Número atômico
keV	Kiloeletronvolts
mGy	Miligray
$W_R$	Fator de ponderação da radiação
$\mu\text{m}$	micrometro
Gy	Gray
rad	Unidade de dose absorvida (0,01 J/Kg)
>	Maior
~	Aproximadamente
T	Timina
C	Citosina
Be	Berílio
Mo	Molibdênio
mm	Milímetro
cm	Centímetro
cGy	Centigray
s	Segundos
W	Tungstênio
g	Gramas
L	Litro
°C	Graus celsius
mL	Militro
min	Minutos

%	Porcentagem
uL	Microlitro
ng	Nanograma
mM	Milimolar
pH	Concentração hidrogeniônica do meio
V	Vtagem
CO <sub>2</sub>	Gás Carbonico
Cu	Cobre
NaOH	Hidróxido de Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
KCl	Cloreto de Potássio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de Sódio Dibásico
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato Monopotássio
rpm	Rotação por minuto
±	Mais ou menos
C	Coulomb
nC	Nanocoulomb
SEM	Erro padrão da média

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
1	<b>OBJETIVOS</b> .....	38
1.1	<b>Geral</b> .....	38
1.2	<b>Específicos</b> .....	38
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	39
2.1	<b>Dosimetria da irradiação das culturas bacterianas</b> .....	39
2.2	<b>Cepas de <i>Escherichia coli</i></b> .....	41
2.2.1	<u>Sobrevivência bacteriana</u> .....	41
2.2.2	<u>Avaliação morfológica bacteriana</u> .....	42
2.3	<b>Eletroforese em DNA plasmidial</b> .....	43
2.4	<b>Dosimetria da irradiação da cultura de células mamárias não tumorais</b> .....	43
2.4.1	<u>Ensaio clonogênico</u> .....	45
2.4.2	<u>Ensaio cometa</u> .....	48
2.5	<b>Cálculo da eficácia biológica relativa (RBE)</b> .....	49
2.6	<b>Análise estatística</b> .....	50
3	<b>RESULTADOS</b> .....	52
3.1	<b>Sobrevivência bacteriana</b> .....	52
3.2	<b>Avaliação morfológica bacteriana</b> .....	53
3.3	<b>Eletroforese em DNA plasmidial</b> .....	54
3.4	<b>Ensaio clonogênico (MCF10A)</b> .....	57
3.5	<b>Ensaio cometa</b> .....	58
3.6	<b>Cálculo RBE</b> .....	62
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	65
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	79
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	80

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos muito se têm investigado sobre a relação entre a exposição da radiação ionizante de baixa dose e baixa energia (raios X) e seus efeitos a saúde. Entretanto, as recentes pesquisas não têm chegado a um consenso sobre o assunto. Apesar da Comissão Internacional de Proteção Radiológica (ICRP) reconhecer os dados experimentais que sugerem haver diferença significativa da eficiência biológica (RBE) entre as qualidades de raios X de baixa tensão (25-30 kVp) e moderada tensão (150-250 kVp), a ICRP ainda recomenda a utilização do fator de qualidade da radiação ( $Q_F$ ) igual a 1. Neste trabalho foi realizado o estudo comparativo entre os feixes de raios X de baixa e média tensão (28 e 150 kVp) com intuito de determinar o valor da RBE do feixe de 28 kVp em relação ao de 150 kVp. Além dos resultados obtidos pelas curvas de sobrevivências que foram a base de dados para o cálculo da RBE, outros ensaios foram realizados com a intenção de expandir a avaliação do efeito radioinduzido pelo feixe de raios X de 28 kVp em relação ao de 150 kVp. A comparação foi realizada através da interpretação de *endpoints* identificados e quantificados por intermédio da análise de sobrevivência celular, alterações morfológicas e quantificação de quebras induzidas ao DNA à diferentes doses pelos feixes supracitados. A análise dos *endpoints* foram realizados em três modelos experimentais, são eles: suspensão bacteriana (*Escherichia coli*), DNA plasmidial pUC19 e linhagem de células mamárias não tumoral (MCF-10A).

## FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### Radiação

A energia emitida e transferida através do espaço é chamada radiação. As radiações são produzidas por processos de ajustes de energia que ocorrem no núcleo ou nas camadas eletrônicas dos átomos ou pela interação de outras radiações (eletromagnética ou corpuscular) com o núcleo ou com o átomo [Tauhata et al., 2003]. Dependendo da quantidade de energia, uma radiação pode ser descrita como não ionizante ou ionizante.

As radiações com alto nível de energia podem alterar o estado físico de um átomo, ou seja, são capazes de remover um elétron orbital do átomo com o qual interage, desta forma, ionizando átomos e moléculas. Já as radiações não ionizantes, que possuem baixo nível de energia, não têm capacidade de remover elétrons da camada eletrônica de um átomo. Parte do espectro ultravioleta, raios X e raios gama ( $\gamma$ ) são exemplos de radiações ionizantes. Enquanto que luz visível, infravermelho, ondas de rádio e TV, são exemplos de radiação não ionizante.

Todas as radiações ionizantes podem ser classificadas em duas categorias: radiação corpuscular e radiação eletromagnética. Partículas subatômicas com energia cinética capazes de causar ionização são denominadas de radiações corpusculares. Existem dois tipos principais de radiação corpuscular: partículas alfa ( $\alpha$ ) e partículas beta ( $\beta$ ).

Raios X e  $\gamma$  são formas de radiação eletromagnética ionizante. Este tipo de radiação recebe a denominação de fótons. Um fóton pode ser retratado como um pequeno “pacote de energia” que viaja com a velocidade da luz ( $c=3 \times 10^8$  m/s), não possui carga, nem massa. Assim como o átomo é a menor quantidade de um elemento, o fóton é a menor quantidade de qualquer tipo de energia eletromagnética [Bushong, 2008].

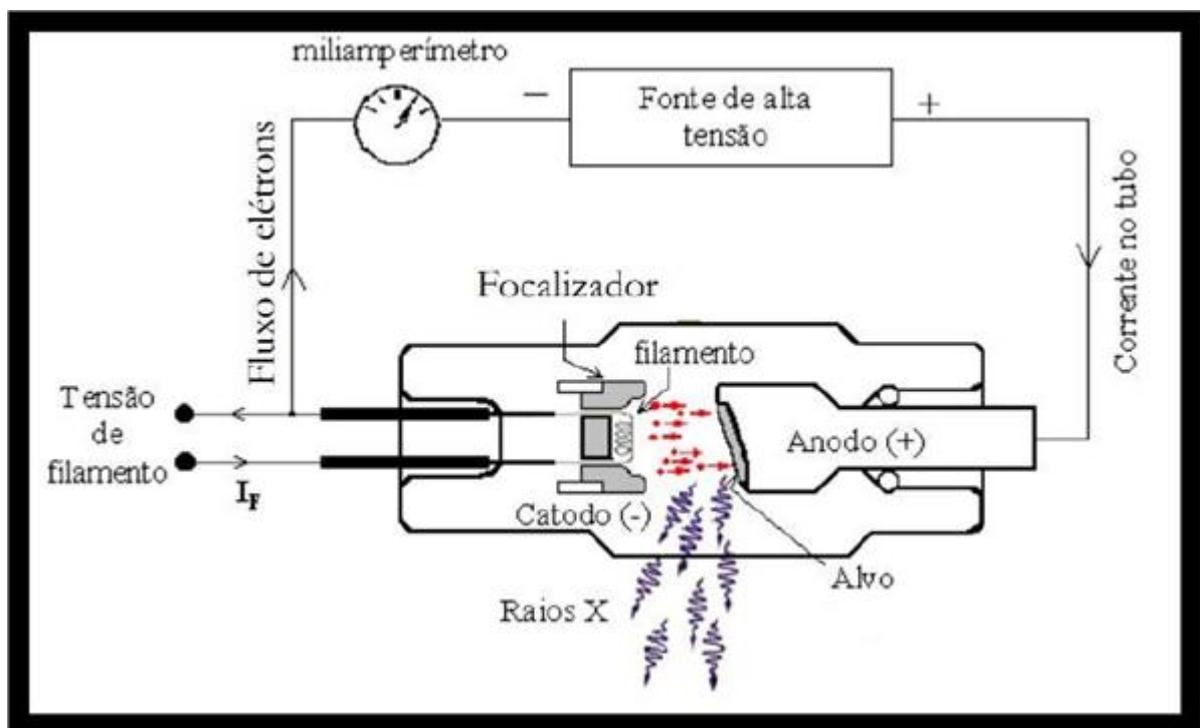
A única diferença entre os raios X e  $\gamma$  é a sua origem. Os raios gama são emitidos do núcleo de um radioisótopo e normalmente associados com as emissões  $\alpha$  e  $\beta$ . Os raios X são produzidos fora do núcleo, nas camadas eletrônicas. Em medicina nuclear, as radiações  $\beta$  e  $\gamma$  são as mais importantes para a obtenção da imagem diagnóstica. Na radiografia, apenas os raios X são importantes. A habilidade de penetração e a baixa taxa de ionização dos raios X os tornam particularmente úteis para as imagens médicas.

## Raios X

Os raios X provenientes de um tubo de raios X são produzidos quando elétrons em alta velocidade colidem com um alvo metálico (ânodo). Quando os elétrons colidem no alvo metálico, parte da sua energia cinética pode ser transformada em energia eletromagnética (raios X). A função do equipamento de raios X é promover um fluxo suficientemente intenso e controlado de elétrons para produzir um feixe de raios X apropriado para gerar uma boa imagem [Bushong, 2008].

Um tubo de raios X é um tubo de vácuo com componentes contidos em uma ampola de vidro ou metal. O feixe de raios X é emitido através de uma janela da ampola que reveste o tubo formando um feixe que pode apresentar energias variadas. O feixe de raios X é caracterizado pela quantidade (número de fótons de raios X no feixe) e pela qualidade (penetrabilidade do feixe). O diagrama esquemático dos principais componentes de um tubo de raio X diagnóstico com anodo giratório estão demonstrados na figura 1.

Figura 1 - Principais componentes de um tubo de raio X diagnóstico



Fonte: <http://lucianosantarita.pro.br/EspectroRX.html>

O feixe de raios X que emerge do tubo de raios X são uniformemente distribuído no espaço. Após a interação com o paciente, o feixe de raios X de formação da imagem não é mais distribuído uniformemente no espaço, mas varia de acordo com as características dos

tecidos que ele atravessou. Logo, os raios X que formam a imagem são aqueles que emergem do paciente e interagem com o receptor da imagem.

Os benefícios derivados da aplicação de raios X na medicina são indiscutíveis, porém, tais aplicações devem ser feitas com prudência e com cuidado para reduzir à exposição desnecessária dos pacientes e trabalhadores expostos à radiação ionizante. Na década de 90, o Conselho Nacional de Proteção Radiológica e Medidas dos EUA (*National Council on Radiation Protection and Measurements*) declarou que a média anual da exposição à radiação da população aumentou significativamente, com o aumento de aplicações médicas da radiação. Atualmente, o controle da exposição à radiação em radiodiagnóstico tem se voltado não só para o profissional, mas também para a proteção do paciente. Estudos atuais sugerem que mesmo baixas doses de raios X utilizadas nos procedimentos de rotina diagnóstica podem resultar em uma baixa incidência de efeitos nocivos latentes [Dincer e Sezgin, 2014].

#### Propiedades de um feixe de raios X de radiodiagnóstico

Conforme a resolução PNQM portaria Nº 2898 de 2013 do Ministério da Saúde as exposições médicas de pacientes devem ser otimizadas ao valor mínimo necessário para obtenção do objetivo radiológico (diagnóstico e terapêutico), compatível com os padrões aceitáveis de qualidade de imagem. As propriedades que afetam a quantidade/qualidade são:

- a) produto corrente-tempo: a quantidade dos raios X é diretamente proporcional ao produto da corrente-tempo (mAs). Quando esse produto é duplicado, o número de elétrons que atinge o alvo do tubo de raios X também duplica e, portanto, tem-se a emissão do dobro do número de raios X;
- b) tensão de pico: uma alteração na tensão de pico afeta a amplitude e a posição do espectro de emissão de raios X. Quando a variação de pico é aumentada, a distribuição relativa das energias dos raios X emitidos se desloca para a direita, para uma faixa de energia média mais alta. A energia máxima da emissão dos raios X sempre permanece numericamente igual à tensão de pico;
- c) distância: a intensidade do feixe de raios X varia com o inverso do quadrado da distância ao alvo do tubo de raios X. Essa relação é conhecida como lei do inverso do quadrado da distância;

- d) filtração: Equipamentos de raios X têm filtros metálicos posicionados no feixe útil, geralmente com 1-5 mm de alumínio (Al). O propósito desses filtros é reduzir o número de fótons de raios X de baixa energia.

A adição de um filtro em um feixe de raios X atenua os fótons de qualquer energia, mas atenua um número maior de raios X de energia baixa do que de energia alta. Isso desloca o espectro de emissão do feixe para o lado de energia alta, resultando em um feixe de raios X mais energético, mais penetrante e de melhor qualidade. O alumínio ( $Z=13$ ) normalmente é escolhido como filtro por ser eficiente na remoção de raios X de baixa energia, através do efeito fotoelétrico, e por ser de baixo custo, além de ser encontrado e moldado facilmente. Quanto maior a espessura da filtração, maior é a qualidade do feixe, embora a quantidade seja reduzida.

Quando alteramos a energia de um feixe de raios X estamos alterando sua qualidade. Ou seja, quando a energia de um feixe de raios X aumenta, a sua capacidade de penetração também é aumentada. A penetrabilidade de um feixe de raios X é chamada de qualidade do feixe. A distância e o produto corrente-tempo não afetam a qualidade da radiação, embora afetem a quantidade de radiação [Bushong, 2008]. Em radiodiagnóstico, a qualidade do feixe de raios X é medida pela camada semirredutora (HVL). A HVL de um feixe de raios X é a espessura do material absorvedor necessária para reduzir a intensidade dos raios X à metade da original. Portanto, a HVL é uma característica do feixe útil de raios X.

### Mamografia

O câncer de mama é a segunda principal causa de morte por câncer em mulheres. No ano de 2016 ocorreram 57.960 novos casos de câncer de mama no Brasil, sendo superado apenas pelo câncer de pele. No ano de 2013, 14.206 mulheres morreram devido ao câncer de mama. [INCA, 2017]. A cada ano, aproximadamente 210.000 novos casos de câncer de mama são notificados nos Estados Unidos. Uma em cada oito mulheres desenvolverá câncer de mama durante a vida [Bushong, 2008].

A mamografia diagnóstica é realizada em pacientes com sintomas ou fatores de risco elevados. Duas ou três projeções da mama podem ser necessárias. A mamografia de rastreamento ou monitoramento é realizada na mulher assintomática com utilização de protocolo de duas projeções, a médio lateral oblíqua e a craniocaudal, para detectar um câncer insuspeito. O objetivo da mamografia magnificada é investigar lesões pequenas suspeitas ou

microcalcificações encontradas no mamograma padrão, e, em geral, dobra-se a dose para o paciente.

A detecção precoce do câncer de mama leva a um tratamento mais eficaz e com menor índice de mortalidade. A mamografia, um exame de imagem das mamas por raios X, tem demonstrado ser um método preciso e simples para a detecção do câncer de mama. O exame radiográfico de tecidos moles (como as mamas) requer técnicas radiográficas diversificadas em relação daquelas utilizadas na radiografia convencional. Essas variações na técnica devem-se às diferenças substanciais na anatomia examinada. Na radiografia convencional o contraste do objeto é grande por causa das diferenças de densidade de massa e de número atômico entre ossos, músculos, tecido adiposo e pulmões, o que não ocorre nas mamas.

Na radiografia de tecidos moles, apenas músculos e estruturas adiposas são examinadas. Esses tecidos têm número atômico e densidades de massa similares o que dificulta a realização do contraste na imagem radiográfica. Consequentemente, a técnica radiográfica para tecidos com densidade de massa similares é diversificada em relação a técnica padrão para favorecer e realçar o contraste entre os tecidos que compõem o órgão, decorrentes da absorção da radiação. O realce da diferença na absorção desses tecidos é mediada através do uso de baixa tensão de pico (25-30 kVp), alto mAs ( $\geq 600$  mAs), com energia média do fóton de 15-20 keV [Mills et al., 2015]. A dose glândular média de exposição do exame de mamografia é baixa, em torno de 3-5 mGy para gerar as imagens de rastreamento [IAEA, 2010]. Todavia, a dose entregue depende da configuração e *design* do equipamento que está sendo utilizado, além do tamanho e composição tecidual da mama que está sendo examinada [Bushong, 2008].

Em razão da densidade de massa e o número atômico dos tecidos que compõem a mama serem muito parecidos, a técnica radiográfica convencional (70-100 kVp) é inútil. Na faixa de 70-100 kVp o espalhamento Compton predomina nos tecidos da mama; portanto, a absorção diferencial nos tecidos é mínima. Uma baixa tensão de pico (25-30 kVp) deve ser utilizada para maximizar o efeito fotoelétrico e, assim, realçar a absorção diferencial. Com a redução da tensão de pico, a penetrabilidade do feixe de raios X é reduzida, o que demanda um aumento na mAs. Acarretando em um prejudicial aumento na dose para o paciente. O limite máximo de 600 mAs foi padronizado para prevenir doses de radiação excessivas para os pacientes. A transferência linear de energia (LET) de raios X de diagnóstico convencional é aproximadamente 3 keV/ $\mu\text{m}$  [Bushong, 2008].

## Interação dos raios X com a matéria

A interação dos raios X com a matéria ocorre através das cinco maneiras seguintes:

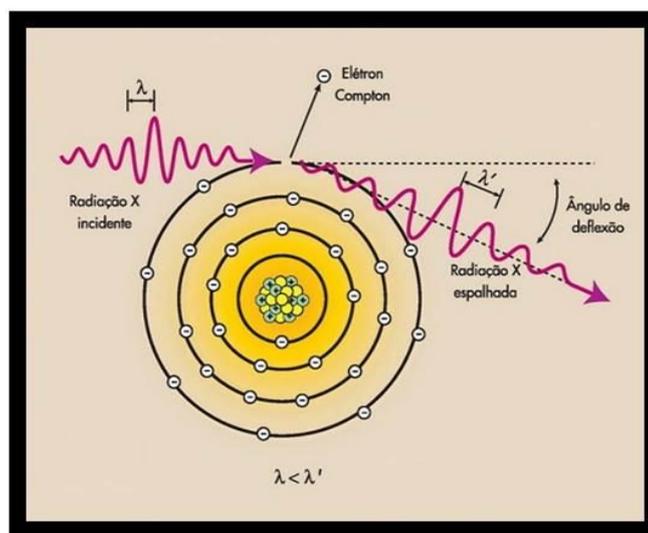
- por espalhamento coerente;
- efeito Compton;
- efeito fotoelétrico;
- por produção de pares;
- por desintegração.

Porém, apenas os efeitos Compton e fotoelétrico são importantes na produção de imagens por raios X. As condições que governam essas duas interações controlam a absorção diferencial, que determina o grau de contraste de uma radiografia.

### Efeito Compton

Em toda a gama de diagnóstico com raios X podem ocorrer interações com elétrons de camadas externas, que não só espalham os raios X, como também reduzem sua energia e ionizam os átomos. Esse tipo de interação é denominado efeito Compton ou espalhamento Compton (Figura 2).

Figura 2 - O efeito Compton ocorre entre o raios X com energia moderada e elétrons de camadas externas



Legenda: Isso leva à ionização dos átomos alvos, alteração na direção e redução da energia dos raios X  
Fonte: Bushong, 2008.

No efeito Compton, a radiação X incidente interage com um elétron de uma camada externa e o ejeta, deixando o átomo ionizado. O elétron ejetado é chamado de elétron Compton ou elétron secundário. A radiação X segue em uma direção diferente e com menos energia. A energia da radiação espalhada por efeito Compton é igual a diferença entre a energia da radiação incidente e a energia do elétron ejetado. A energia do elétron ejetado é igual à sua energia de ligação mais a energia cinética com a qual ele escapa do átomo.

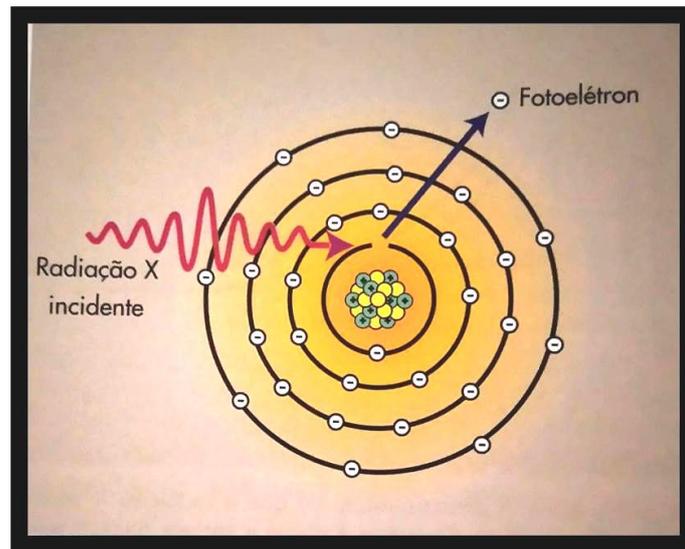
Durante uma interação Compton, a maior parte da energia é dividida entre a radiação espalhada e o elétron Compton. Normalmente, a radiação X espalhada retém a maior parte da energia. Tanto a radiação X quanto o elétron Compton podem ter energia suficiente para sofrer interações ionizantes adicionais antes de perder toda a energia. Em última análise, a radiação X espalhada é absorvida fotoeletricamente. O elétron Compton perde toda a sua energia cinética através de ionização e excitação, e é capturado por uma vacância de uma camada eletrônica previamente criada por algum outro evento ionizante. É igualmente provável aos raios X sofrerem a interação Compton com um átomo de tecido mole ou átomo de osso.

Particularmente, nos exames de radiodiagnóstico de fluoroscopia, as interações do tipo Compton podem gerar sérios danos ao paciente pela sua elevada exposição à radiação. A interação do tipo Compton é a responsável pela maior parte da exposição ocupacional dos técnicos e tecnólogos à radiação.

### Efeito Fotoelétrico

Raios X diagnósticos também são submetidos às interações ionizantes com elétrons de camadas mais internas. A radiação X não é espalhada, mas totalmente absorvida. Esse efeito é denominado efeito fotoelétrico (Figura 3).

Figura 3 - O efeito fotoelétrico ocorre quando a radiação X incidente é totalmente absorvida durante a ionização de um elétron de camada mais interna



Legenda: O fóton incidente desaparece, e o elétron da camada K, agora chamado de fotoelétron, é ejetado do átomo.

Fonte: Bushong, 2008.

Os elétrons removidos do átomo, chamado fotoelétron, escapam com energia cinética igual à diferença entre a energia da radiação X incidente e a energia de ligação do elétron. A ejeção de um fotoelétron de camada mais interna pela radiação X incidente resulta em vacância na camada. Esse estado não natural é corrigido imediatamente quando um elétron de uma camada mais externa, geralmente da camada superior mais próxima, preenche a vacância. Essa transição eletrônica é acompanhada pela emissão de radiação X, cuja energia é igual à diferença entre as energias de ligação das camadas envolvidas. Os raios X característicos consistem em radiação secundária e se comportam da mesma forma da radiação espalhada.

A probabilidade de que uma radiação X venha a sofrer uma interação fotoelétrica é uma função tanto da energia da radiação quanto do número atômico do átomo com o qual ela interage. Uma interação fotoelétrica não pode ocorrer a menos que a radiação X incidente tenha energia igual ou maior que a energia de ligação do elétron.

### **Grandezas básicas da interação da radiação com a matéria**

No estudo dos efeitos da interação da radiação com a matéria orgânica é necessário à compreensão de três grandezas básicas dos fatores físicos:

- a) transferência linear de energia (LET);
- b) fator de qualidade ( $Q_F$ );
- c) a eficiência biológica relativa (RBE).

Essas grandezas entre si, fornecem informações sobre o efeito de uma exposição à radiação em um sistema biológico.

### Transferência linear de energia (LET)

Todas as radiações diretamente ionizantes transferem a maior parte da sua energia por processos de colisões envolvendo ionização e excitação. Esses eventos primários ocorrem aleatoriamente ao longo da trajetória das partículas carregadas. Entretanto, ionizações são difíceis de medir. Logo, foi definido o conceito de transferência linear de energia (LET), que se refere à densidade linear de todas as formas de energia transferidas, incluindo excitações e ionizações.

Portanto, a LET é uma medida da densidade na qual a energia é transferida da radiação ionizante para um tecido durante seu trajeto. Ela é um método de expressar a qualidade da radiação ( $Q_F$ ) e determinar o valor do fator de ponderação da radiação ( $W_R$ ), o qual é usado em radioproteção. LET é expressa em unidades de quiloelétron-volts de energia transferida por micrometro de tecido ( $\text{keV}/\mu\text{m}$ ). A habilidade da radiação ionizante de produzir uma resposta biológica aumenta com o aumento da LET.

Para fins regulatórios, todos os tipos de raios X e raios  $\gamma$  são considerados radiações de baixa LET. Isso reflete no caso do valor do fator de ponderação ( $W_R$ ) da radiação para uma dose efetiva ser atualmente atribuído a 1 para fóton e elétron, independente de sua energia. Dando a todas as exposições por fótons o mesmo peso é uma maneira de praticidade em proteção radiológica, no que diz respeito às limitações de exposições e medições que são realizadas para demonstrar conformidade destas limitações. Isto não implica que as estimativas de risco sejam as mesmas para todas as energias dos fótons [Kellerer, 2002].

As estimativas de risco para efeitos tardios em humanos são baseadas largamente por dados obtidos de sobreviventes das bombas atômicas de Hiroshima e Nagasaki, que foram expostos a raios  $\gamma$ . Devido essas estimativas de risco serem derivadas da observação de doses realmente elevadas, como 1 Gray ou mais, há pouca razão em assumir uma diferença substancial em relação aos raios X. Entretanto, poderia haver uma diferença a baixas doses.

### Eficiência Biológica Relativa (RBE)

A RBE é usada na radiobiologia para caracterizar as diferentes eficácias biológicas das radiações. Os valores de RBE são dados pela razão das doses absorvidas de dois tipos de radiação produzindo o mesmo efeito biológico, em condições idênticas de radiação.

$$\text{RBE} = \frac{\text{Dose de radiação padrão necessária para se produzir determinado efeito}}{\text{Dose de radiação teste necessária para se produzir o mesmo efeito}} \quad (1)$$

Dose de radiação teste necessária para se produzir o mesmo efeito

Por convenção, a radiação padrão são os raios X na faixa de 150-250 kVp [Gomolka et al., 2005].

O valor da RBE de uma radiação específica depende das condições de exposição, incluindo o efeito biológico investigado, o modelo experimental utilizado, da dose e taxa de dose e do esquema de fracionamento de dose, caso tenha sido realizado um fracionamento. Entretanto, para um dado tipo e energia de radiação existirá um alcance para os valores de RBE [ICRP, 2007]. A RBE dos raios X diagnósticos é 1.

Como a eficácia biológica da radiação depende da distribuição espacial da deposição de energia no meio irradiado e da densidade de ionização por unidade de comprimento do trajeto percorrido pela partícula ionizante, mesmo os fótons sendo considerados radiação de baixo-LET (esparsamente ionizante), existe uma preocupação com o aumento de sua eficácia biológica devido ao aumento da densidade de ionização dos elétrons secundários liberados [Verhaegen e Reniers, 2004].

Não existe atualmente um estudo epidemiológico que evidencie uma maior eficácia dos raios X comparada aos raios  $\gamma$ . Pelo contrário, o risco estimado para coorte médico de exposição a raios X tendem a ser, no todo, um pouco mais baixo do que o risco estimado aos sobreviventes da bomba atômica [Little, 2000], entretanto, esta questão ainda esta indeterminada [Kellerer, 2002].

A discussão da eficácia biológica dos raios X a diferentes energias (tensão) foi recentemente reavivada quando foi sugerido que raios X utilizados em mamografia (25-30 kVp) podem ter maior capacidade de aumentar as taxas de câncer de mama do que os raios X de tensão moderada (200 kVp), com referência a estudos relacionados a RBE de células expostas a feixes de 25-30 kVp [Frankenberg-Schwager et al., 2002; Gomolka et al., 2005; Beyreuther et al., 2009].

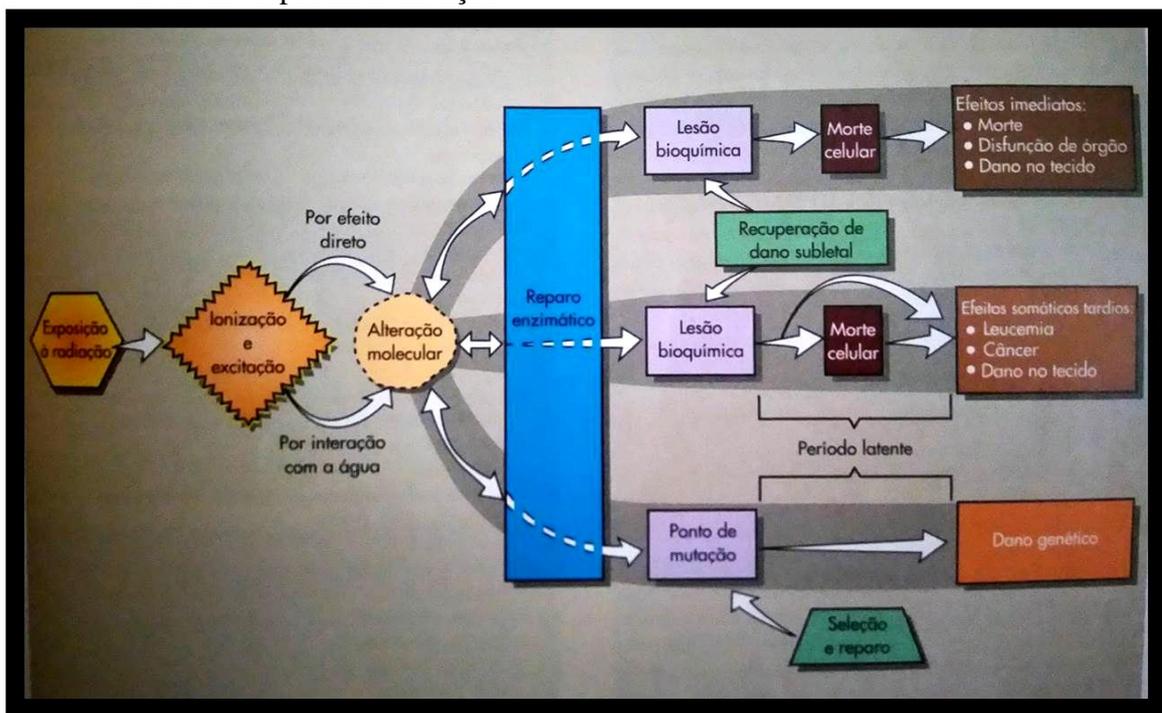
## Radiobiologia

Sabe-se atualmente que os raios X são capazes de causar danos, principalmente a altas doses. Quando suficientemente intensos, os raios X podem causar queimaduras de pele, cataratas, câncer, leucemia e outros efeitos nocivos. O que não se sabe ao certo é o grau do efeito, caso ocorra, após a exposição à radiação X em níveis de diagnóstico.

Os benefícios decorrentes da aplicação de raios X em diagnóstico são enormes. O intuito dessa prática consiste em produzir imagens de raios X de alta qualidade com a mínima exposição à radiação. Isto resulta no benefício máximo com risco mínimo para o paciente e para os trabalhadores. Esta prática é conhecida como ALARA – “*as low as reasonably achievable*”, ou seja, tão baixo quanto razoavelmente praticáveis [Bushong, 2008].

Os efeitos dos raios X em humanos resultam de interações em nível atômico. Essas interações atômicas assumem a forma de ionizações ou excitação de elétrons orbitais e resultam na deposição de energia no tecido. A energia depositada pode produzir alterações moleculares cujas consequências podem ser mensuráveis se a molécula envolvida é crítica. A figura 4 resume a sequência de eventos entre a exposição à radiação e os danos resultantes nos seres humanos. Sendo que, em cada estágio da sequência é possível reparar o dano da radiação e restabelecer o funcionamento correto.

Figura 4 - A sequência de eventos após a exposição de humanos à radiação, que podem levar a várias respostas à radiação



Legenda: Em quase todos os passos, mecanismos para recuperação e reparo estão disponíveis  
 Fonte: Bushong, 2008.

Quando um átomo é ionizado, as propriedades das suas ligações químicas se modificam. Se o átomo é um constituinte de uma grande molécula, a ionização pode resultar na quebra da molécula ou na realocação do átomo dentro da molécula. A molécula anormal pode passar a funcionar inapropriadamente ou deixar de funcionar, o que pode resultar em sérios desajustes funcionais ou na morte da célula. O processo de quebra da molécula ou realocação do átomo ionizado dentro da molécula é um processo reversível. Átomos ionizados podem se tornar neutros novamente atraindo um elétron livre. Moléculas danificadas podem ser reparadas por uma enzima de reparo.

Células e tecidos podem ser recuperados de danos provocados pela radiação e regenerar. Isso dependendo da dose. Se a resposta à radiação ocorre após alguns minutos ou dias depois da exposição à radiação, a resposta é classificada como efeito determinístico da radiação. Por sua vez, se o dano humano não é observado durante meses ou anos, ele é denominado efeito estocástico da radiação. Embora a maioria das respostas humanas à radiação seja observada para grandes doses, assume-se, por razões de cautela, que mesmo pequenas doses de radiação ionizante são prejudiciais. O estudo dos efeitos das radiações ionizantes em tecidos biológicos denomina-se radiobiologia.

Embora milhares de rad (muitos Grays) sejam necessários para produzir alterações em moléculas *in vitro*, acredita-se que a ionização produzida em um único sítio de uma molécula-alvo crítica pode interromper a proliferação celular. E a sensibilidade da célula à radiação é determinada, de alguma forma, pelo seu nível de diferenciação e pela sua função [Hall, 2006].

Existem muitos fatores que determinam a resposta biológica à exposição radiológica. Estes fatores incluem muitas variáveis associadas com a fonte de radiação e do sistema que é irradiado. Fatores relacionados com a radiação incluem a dose, tipo de energia da radiação, tal como a taxa de radiação e condições sob as quais a dose é administrada. Se a exposição à radiação for muito elevada, o efeito biológico predominante é a morte celular, que resulta em alterações degenerativas do tecido exposto.

Em 1906, dois cientistas franceses, Bergonie e Tribondeau propuseram uma teoria onde relacionaram a radiosensibilidade a uma função do estado metabólico do tecido irradiado. Essa descoberta passou a ser conhecida como Lei de *Bergonie e Tribondeau* e tem sido verificada desde então. Basicamente, a lei estabelece que a radiosensibilidade de tecidos vivos depende da maturação e do metabolismo a eles associados. Células que possuem uma maior taxa de proliferação e menor diferenciação, em geral, apresentam uma maior radiosensibilidade.

### Classificação dos efeitos biológicos

Efeitos biológicos decorrentes da exposição à radiação podem ser classificados em estocásticos ou determinísticos. O efeito estocástico é aquele em que a probabilidade do efeito, em vez da sua severidade, aumenta com a dose. Câncer e alterações genéticas induzidas pela radiação são estocásticos na natureza. Os efeitos estocásticos não têm uma dose limite, pois a lesão de poucas ou até mesmo uma única célula pode resultar no desenvolvimento da doença. Por essa razão, mesmo exposições insignificantes podem conduzir a algum, apesar de pequeno, aumento do risco. O pressuposto é que o risco aumenta com a dose e não há limite abaixo do qual este risco deixe de existir. A preocupação referente ao aumento do índice de câncer na população está relacionada ao efeito estocástico e as recorrentes exposições à radiação ionizante mediante os exames radiodiagnósticos (raios X e medicina nuclear) [Hall, 2006].

Quando a exposição à radiação é muito elevada o efeito predominante é a morte celular, que resultará em alterações degenerativas no sistema exposto. Neste caso, a gravidade da lesão aumenta com a dose, em vez da probabilidade do aparecimento do efeito biológico. A ocorrência do efeito determinístico está relacionado a exposições inadequadas e acidentes radiológicos. Ao contrário do efeito estocástico, o efeito determinístico possui uma dose limite, ou seja, se a exposição à radiação ultrapassar a dose limite o efeito ocorrerá. Dependendo do local e da dose administrada, haverá um período distinto para a ocorrência do efeito. Cataratas, eritema, fibrose e lesão hematopoiética são alguns dos efeitos determinísticos que podem advir da exposição a altas doses de radiação, como na terapêutica oncológica ou em grandes acidentes com radiação. É pouco provável que estes efeitos possam surgir pela exposição à radiação devido a processos de diagnósticos ou intervencionismo de rotina.

As alterações biológicas resultantes da radiação tornam-se aparentes somente após algum período de tempo (latência), que pode variar desde minutos a semanas ou até mesmo anos, dependendo do sistema biológico e da dose inicial [Bushong, 2008].

As alterações biológicas induzidas pela exposição à radiação também podem ser classificadas em interações diretas ou indiretas. A alteração molecular é provocada diretamente se uma macromolécula, como o DNA, RNA ou proteína, for ionizada ou excitada por uma partícula ou fóton ionizante, que passa através ou próximo a ela. Efeitos indiretos resultam de interações entre a radiação e o meio, o que cria espécies quimicamente reativas (como, espécies reativas de oxigênio - ROS), que por sua vez interagem com a molécula alvo.

Como 70-80% da massa dos humanos é composta por água, a grande maioria das lesões induzidas por radiação é realizada através da ação indireta da hidrólise da água. Os íons decorrentes da hidrólise da água são muito instáveis e dissociam-se para formar outras espécies reativas, como os radicais livres. Os radicais livres difundem-se na célula, lesando-a. As células possuem mecanismos de reparo capazes de reparar as lesões induzidas pelos radicais livres, fazendo com que a célula retorne ao seu estado integro inicial. No entanto, se a lesão for muito grave, ou os mecanismos de reparo estiverem saturados ou falharem, a célula não conseguirá retornar ao seu estado inicial.

O objetivo da pesquisa em radiobiologia é a descrição precisa dos efeitos da radiação em humanos visando a utilização da radiação de forma mais segura em diagnóstico e de forma mais efetiva em radioterapia. A maioria das pesquisas em radiobiologia busca descrever relações entre dose-resposta, de modo a prever os efeitos biológicos de doses programadas e a monitorar respostas a exposições acidentais. Uma relação dose-resposta é uma função matemática que descreve a relação entre a dose de radiação e a resposta observada [Hall, 2006].

### **Sobrevivência celular**

O dano celular radioinduzido pode levar a consequências que têm seus caminhos permeados por um complexo processo biológico. A visão radiobiológica da relação causa e efeito muda para níveis cada vez mais complexos à medida que as reações bioquímicas envolvidas no processo de resposta apresentam níveis mais profundos de perturbação.

No início das pesquisas em Radiobiologia, os estudos sobre o dano ao DNA foram conduzidos por dois caminhos distintos. No primeiro, optou-se pela extração do DNA e irradiação da molécula pura, buscando efeitos diretos. No segundo, irradiando a molécula em seu meio natural, buscando efeitos indiretos pela geração de espécies reativas no meio [Sonntag, 1987].

Na radioterapia a diferença de radiosensibilidade entre as células normais e tumorais aparecem com vantagem para as células normais, que são mais resistentes à radiação, pelo fato das células normais apresentarem menor taxa de replicação celular. Um dos motivos das células normais apresentarem menor taxa de proliferação é devido a ação dos sistemas de reparo, que irá retardar a proliferação celular para reparar os danos radioinduzidos, o que não ocorre nas células tumorais. Devido a alta taxa de proliferação e sistema de reparo deficientes,

as células tumorais dificilmente serão capazes de resistir as lesões induzidas pela exposição à radiação e morrerão. A definição de morte celular é um conceito central em Radiobiologia. A questão da morte celular está relacionada, normalmente, à perda da capacidade reprodutiva ou funcional celular [Kerr et al., 1972].

Uma maneira eficiente de se estudar os danos radioinduzidos é por meio da construção de curvas de sobrevivência. As curvas de sobrevivência são assim denominadas por apresentarem graficamente o percentual de sobrevivência de uma determinada quantidade de indivíduos após exposição a um agente deletério. Normalmente os estudos são realizados *in vitro*, utilizando colônias bacterianas, fungos e alguns organismos mais complexos [Weidhaas et al. 2006]. A resposta biológica registrada por uma curva de sobrevivência em células de mamíferos apresenta diferenças em função da LET e na forma da curva, que, para radiações de alta LET, é quase exponencial [O'Rourke et al., 2009]. Para radiações de baixa LET, a forma da curva é tal que apresenta leve declínio inicial, seguido de um “ombro”, e tende a seguir reta para altas doses [Hall, 2006].

Há vários métodos matemáticos para se ajustar a forma da curva de sobrevivência nas suas diversas variações, entretanto, todos consideram a natureza randômica da interação. Os modelos de sobrevivência celular baseiam-se em resultados clonogênicos, não havendo distinção entre os diferentes modos ou caminhos que levam à morte celular. Nos primeiros estudos, com vistas à radioterapia, a perda da capacidade clonogênica é o fator mais significativo entre as consequências da exposição à radiação ionizante.

Existem diversos modelos de análise de sobrevivência celular, porém, apenas alguns, os de maior interesse em relação a este estudo, serão descritos de forma sumária, a seguir:

a) Modelo linear quadrático: este modelo assume que há dois componentes redutores do número de células em uma amostra irradiada [O'Rourke et al., 2009]:

- um denominado  $\alpha$ , que é uma constante e descreve a inclinação inicial da curva de sobrevivência;
- outro  $\beta$ , que é outra constante que descreve o componente quadrático da função morte celular.

A equação a seguir ilustra a formulação do modelo:

$$S(D) = e^{-\alpha D - \beta D^2 - D/D_0} \quad (2)$$

em que  $S(D)$  é a fração de células que sobreviveram à dose  $D$ .

A razão  $\alpha/\beta$  indica a dose na qual os componentes linear ( $\alpha$ ) e quadrático ( $\beta$ ) contribuem igualmente para morte celular.

b) O modelo de dano letal, potencialmente letal (LPL): é semelhante ao linear-quadrático (LQ) e considera o fato de que a radiação ionizante provoca dois tipos de lesão:

- reparável (potencialmente letal) e
- não reparável (letal).

A porção letal está intimamente ligada à parte linear do modelo linear quadrático, citado anteriormente, e a outra, potencialmente letal, à parte não-linear. O modelo LPL faz previsões com respeito às consequências de taxas de dose e os parâmetros gerados são utilizados para simular curvas de sobrevivência para células animais e humanas com diferença na taxa de dose [Curtis, 1986].

c) O modelo de saturação de reparo: foi proposto por Goodhead e colaboradores em 1985, e propõe que a forma da curva de sobrevivência depende somente da taxa de reparo celular.

Assim, as curvas de sobrevivência são resultado de uma longa história de reparos bem e mal sucedidos. Considera também que, se a capacidade da célula de oferecer combate ao dano radioinduzido sofrer saturação, a taxa de reparo não aumentará em função do aumento da taxa de dano.

### **Sobrevivência celular a baixas doses de radiação**

Considerando o amplo cenário radiobiológico a baixas doses de radiação ionizante faz-se necessária uma introdução ao comportamento celular na região de baixas doses, abaixo de 0,1 Gy [Lambin et al., 1993; Marples e Joiner, 1993].

As relações dose-efeito são preditas considerando as seguintes características em comum [Lehnert, 2008]:

- a) consideram como células danificadas somente as células que estejam no caminho da radiação, excluindo efeitos de sinalização;
- b) o dano é proporcional à dose absorvida por cada célula e ao número de células expostas;
- c) todas as células têm a mesma sensibilidade a radiação incidente.

Este esquema originário parece provocar algumas contradições à medida que novos resultados surgem. Alguns fenômenos têm sido estudados em detalhe e apontam para estranhas inconsistências, como a hipersensibilidade à baixa dose de radiação (*HRS – Hyper radiation Sensitivity* – [Marples e Collins, 2008]), aumento da resistência à radiação (*IRR –*

*Increased Radiation Resistance* – [Shmakova et al., 2002]), resposta adaptativa (*AR* – *Adaptive Response*) e efeito *bystander* (*BE* – *Bystander Effect* – [Adelstein, 2003]).

O fenômeno de reposta adaptativa (*AR*) tem sido muito estudado e revisto [Kadhim et al., 2004] e, inicialmente, foi descrito em função da detecção de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos irradiados. São observadas, com frequência, as elevações dos níveis de resistência aos efeitos deletérios de altas doses da radiação ionizante depois da exposição a baixas doses. Esta resposta adaptativa é, provavelmente, uma característica evolucionária e pode estar ligada ao aumento da taxa de reparo do DNA [Azzam et al., 1994], redução de transformação neoplásicas radioinduzidas [Redpath e Antoniono, 1998] além de interferir no período de latência tumoral em modelo animal (roedores) [Mitchel et al., 1999]. Também a *AR* tem sido referenciada na literatura como mecanismo independente da LET, sendo ativada tanto por radiações de alta como baixa LET [Marples e Skov, 1996].

### **Tipos de lesões induzidas pela radiação**

Radiação causa um amplo conjunto de lesões no DNA, como: as quebras simples da cadeia fosfodiéster (*SSB*), quebras duplas (*DSB*) que podem ser originadas a partir de quebras simples em sítios opostos ou transpostos próximos, dano de base, ligação cruzada entre DNA-proteína e/ou proteína-proteína (envolvendo proteínas nucleares, como histonas e outro tipo de proteína). O número de lesões no DNA induzido pela radiação é grande, mas o número de morte celular induzido pela radiação é extremamente pequeno dependendo da dose. A proporção de lesões induzidas no DNA da célula por uma dose de 1-2 Gy é, aproximadamente, de: >1000 bases danificadas; ~1000 quebras de fita simples (*SSB*); ~40 quebras de fita dupla (*DSB*) [IAEA, 2010].

As *DSB* desempenham um papel crítico na morte celular, e existem estudos experimentais demonstrando que a indução inicial de quebras duplas está correlacionada com a radiosensibilidade e sobrevivência a baixas doses. Além de, também estarem correlacionadas, com a ausência e/ou reparos incorretos após exposição de doses elevadas. Evidências crescentes sugerem a importância de lesões do tipo *DSB* em exposições de alta LET.

O conhecimento da disposição do trajeto da radiação tem sido utilizado para explicar a ampla variação e ampla distribuição de lesões no DNA. A importância dos eventos de deposição de energia do tipo *clusters* (ionização e excitação) no final do trajeto de elétrons

secundários resultam em lesões múltiplas próximas uma das outras (MDS), dentro de um intervalo de 20 nm, foi reconhecido como importante para a morte celular e em relação a capacidade das células repararem tais lesões [IAEA, 2010].

Nenhuma célula ou organismo parece ter qualquer mecanismo de reparo específico contra danos ao DNA induzidos pela radiação ionizante. Mas, para corrigir estas lesões a célula emprega a função de reparo destinado à proteção contra as espécies reativas de oxigênio (ROS) endógenas, modeladas pelo metabolismo celular, e pelas lesões induzidas ao DNA por raios ultravioletas (UV) provenientes do Sol [Lindahl et al., 1997; Harrison e Malyarchuk, 2002; Cadet et al., 2012]. Os danos por ROS gerados pela exposição à radiação ionizante são substancialmente superiores aos gerados pelo sistema endógeno.

### **Mecanismos de reparo de lesões radioinduzidas**

A lesão no DNA precisa ser reparada para a manutenção da integridade da informação genética. Para isso um conjunto notável de sistemas enzimáticos em todas as células conserta erros residuais no DNA recém-sintetizado, bem como qualquer dano que possa ocorrer após a síntese por lesão química e/ou física.

Existem nas células múltiplos mecanismos enzimáticos de reparo do DNA que agem em diferentes tipos de lesões. Para DSB existem duas vias de reparo primárias: união de extremidades não-homologas (NHEJ) e recombinação homologa (HR). O reparo pela via NHEJ reúne dois termos aleatórios de uma quebra. Logo, há frequente perda de sequência de DNA durante esse processo. Esta via de reparo ocorre ao longo do ciclo celular, porém, prevalece entre o transcurso das fases G1/S. O processo é propenso a erros porque não se baseia na sequência homologa.

O reparo de DSB pela recombinação homologa (HR) realiza o reparo da região danificada seguindo a sequência homologa da fita que não foi danificada, portanto, apenas pode ocorrer no final da fase S ou G2 do ciclo celular. Existem outros tipos de mecanismos de reparo do DNA como: reparo por excisão de bases (BER), *Mismatch repair* (MR) e excisão de nucleotídeo (NER) que correspondem ao reparo de lesões, como, alquilação, base oxidada entre outros já supracitados.

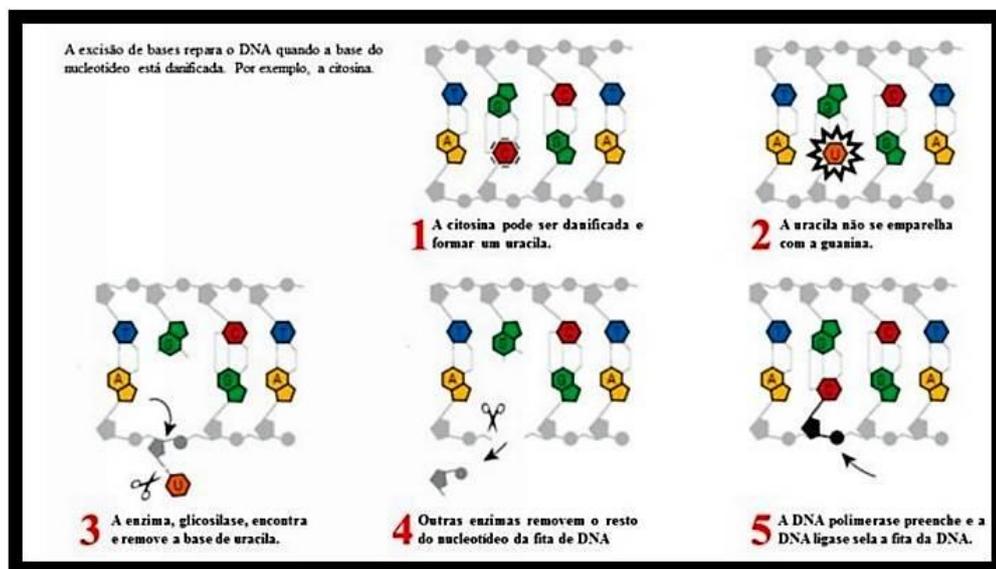
A importância biológica do reparo do DNA é indicada pela grande variedade de mecanismos de reparo, mesmo em um organismo simples como *Escherichia coli*. Esses sistemas incluem enzimas que simplesmente revertem as modificações químicas de base nos

nucleotídeos, bem como sistemas multienzimáticos mais complicados que dependem da redundância inerente da informação em DNA de fita dupla para restaurar a molécula danificada.

As bases danificadas que não podem ser reparadas diretamente pelas polimerases I e III (reparo no processo de polimerização de novas fitas de DNA) podem ser removidas e substituídas em um processo conhecido como reparo por excisão de bases (BER). Essa via, como o nome sugere, inicia com a remoção da base danificada.

As células contêm uma série de DNA-glicosilases, onde cada uma cliva a ligação glicosídica de um tipo correspondente de nucleotídeo alterado, deixando um resíduo de desoxirribose sem nenhuma base ligada a ele, sítios apurínicos ou apirimídicos (sítios AP ou abásicos). O resíduo do sítio abásico é removido pela ação de uma exonuclease celular, e a lacuna é preenchida e unida por uma DNA-polimerase e uma DNA-ligase, respectivamente, como ilustrado na figura 5.

Figura 5 - Ilustração dos passos do reparo por excisão de base de uma citosina danificada



Fonte: ([https://www.researchgate.net/figure/283708496\\_por-Johan-Jarnestad-The-Royal-Swedish](https://www.researchgate.net/figure/283708496_por-Johan-Jarnestad-The-Royal-Swedish)).

Bases oxidadas são reconhecidas por uma classe de enzimas chamadas DNA-glicosilases que removem a base danificada e cliva a fita do DNA, por intermédio de uma DNA-liase associada [Blasdell et al., 2001]. Em *E. coli* há duas DNA-glicosilases conhecidas que reconhecem pirimidinas oxidadas: endonuclease III (gene *nth*) e endonuclease VIII (gene *nei*) [Jiang et al., 1997].

As mutações de ponto consistem na substituição de um nucleotídeo por outro na molécula de DNA. Quando a mutação de ponto envolver a troca de uma purina (adenina e guanina) por outra purina ou de uma pirimidina (citosina e timina) por outra pirimidina, a mutação de ponto é chamada de transição [Pimentel et al.,2013]. A mutação pontual de transição de T→C é denominada timina glicol. A timina glicol é reparada pelo BER por encargo da endonuclease III, que efetuará a excisão da timina danificada (C), como mencionado anteriormente, sendo substituída por uma timina íntegra.

A endonuclease VIII foi descoberta mediante estudos que demonstraram que cepas de *E. coli* mutantes para a endonuclease III (gene *nth*) não demonstraram um aumento na sensibilidade ao dano oxidativo. Desta forma, havia na *E. coli* outra endonuclease capaz de identificar e remover a timina glicol da fita de DNA. Esta DNA-glicosilase foi denominada de endonuclease VIII, que exibe uma redundância funcional em relação à endonuclease III. Logo, a cepa mutante para a endonuclease III não seria sensibilizada pelo dano oxidativo, uma vez que a sua perda era compensada pela endonuclease VIII [Nickoloff e Hoekstra, 1998].

A via BER foi bem caracterizada para procariontes e os genes que codificam as DNA-glicosilases já foram clonados, além das cepas mutantes já terem sido caracterizadas por indução de morte por determinados agentes que danificam o DNA [Harrison e Malyarchucuk, 2002]. As enzimas do BER relacionadas ao reparo de danos oxidativos foram conservadas evolutivamente no seu formato básico das bactérias aos humanos [Jiang et al., 1997; Blasdell et al., 2001]. Portanto, essas características fazem com que as cepas de *E. coli* sejam um bom modelo experimental para interpretação de efeitos induzidos por lesões oxidativas.

### Carcinogênese

A carcinogênese se dá por alterações no DNA como resposta à ação de diversos agentes físicos, químicos e biológicos [Bertram, 2000].

Apenas uma pequena fração do índice de câncer está associado com a hereditariedade, a maioria das formas de câncer são causadas por fatores ambientais que são capazes de promover alterações genéticas e epigenéticas. O papel dos fatores ambientais na carcinogênese foi demonstrado por dados epidemiológicos e estudos experimentais com cobaias. A acumulação de alterações genéticas decorridas da exposição a agentes

carcinogênicos durante a vida pode resultar em malignidade se a apoptose é inibida e o sistema imune não consegue eliminar as células transformadas [Dincer e Sezgin, 2014].

Tem sido determinado que a resposta á radiação ionizante a nível celular ocorre via coordenação do controle dos pontos de verificação do ciclo celular, indução de reparo do DNA e apoptose [Franco et al., 2009] e que seria mais pertinente o evento inicial da carcinogênese da radiação estar relacionado à inativação de genes supressores de tumor, pela perda da heterogenicidade, em vez da ativação de proto-oncogenes [Little, 2000]. Entretanto, a apoptose desempenha a maior função em prevenir a sobrevivência de células modificadas geneticamente que pode integrar o risco de câncer.

Foi apresentado que a baixas doses de radiação ionizante várias centenas de genes envolvidos no reparo cromossomal são modulados [Blankenbecler, 2010; Heller, 2003]. Portanto, lesão genética formada por baixas doses de radiação ionizante são geralmente eficientemente reparadas, mas altas doses de radiação ionizante geralmente desencadeia apoptose. Logo, resumidamente, carcinogênese induzida pela radiação seria o resultado de doses moderadas recorrentes e reparo do DNA incompleto ou incorreto. Por outro lado, os tecidos possuem sensibilidades diferentes a radiação ionizante. Em geral, a sensibilidade do tecido a radiação ionizante é diretamente proporcional á taxa de proliferação celular e inversamente proporcional ao grau de diferenciação. Os órgãos mais sensíveis em adultos são o cólon, medula óssea, pulmões, estômago e seios [ICRP, 2007].

A literatura sugere que danos mal reparados ao DNA, particularmente danos que geraram a quebras de fita dupla (DSB) no DNA, podem causar transformação celular, incluindo carcinogênese [Friedberg, 2006]. Isso não quer dizer que uma única célula transformada irá desenvolver câncer, mas também não haverá a ocorrência de câncer sem células transformadas ou instáveis. Portanto, investigar o destino da DSB ou de qualquer dano ao DNA que pode levar a formação de DSB é crítico. O sistema de resposta ao dano no DNA é um sistema de defesa intracelular, em termos gerais, consistindo de numerosas proteínas funcionando como sensores, mediadores, transdutores e efetores, que são capazes de reparar o dano ou induzir a morte celular pela morte mitótica, senescência ou apoptose [Sokolov e Neumann, 2016].

## 1. OBJETIVO

### 1.1 Objetivo geral

Determinar a eficiência biológica relativa (RBE) do feixe de raios X de 28 kVp em relação ao feixe de raios X de 150 kVp.

### 1.2 Objetivos específicos

Calcular a RBE mediante os dados obtidos pelas curvas de sobrevivência dos modelos experimentais bacteriano (cepas AB1157 e JW0704-1) e cultura de células mamária não tumorais (MCF-10A).

Avaliação morfológica bacteriana, eletroforese em DNA plasmidial e ensaio cometa foram realizados nos modelos experimentais bacteriano (cepas AB1157 e JW0704-1), em DNA plasmidial (pUC19) e nas culturas de células mamárias (MCF-10A), respectivamente. Estes ensaios foram realizados com o intuito de abranger a interpretação do efeito biológico radioinduzido pelos feixes de raios X diagnósticos e aumentar o contingente de informações na avaliação dos efeitos biológicos por ambos os feixes utilizados durante o estudo.

Apesar das curvas de sobrevivência obterem dados suficientes para realização do cálculo da RBE, os demais ensaios realizados permitiram uma avaliação mais aprofundada e detalhada dos fatores que podem ter ocorrido e desenvolvido o resultado obtido nas curvas de sobrevivência, favorecendo o desenvolvimento do estudo.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Dosimetria da irradiação das culturas bacterianas

A dosimetria dos tubos de raios X utilizados na exposição dos modelos experimentais aos feixes de raios X diagnósticos de qualidade distinta foi realizada através da determinação da camada semi-redutora (HVL). A HVL foi determinada experimentalmente por um arranjo composto por:

- a) o tubo de raios X;
- b) detector de radiação;
- c) filtros de alumínio com espessuras graduadas;
- d) câmara dedal;
- e) eletrômetro.

A leitura do kerma no ar foi realizada por uma câmara dedal da PTW (Freiburg/ALE), nº de série 1601, e um electrômetro EL-028, também da PTW, realizando medições de 30 em 30 s, com polarização HV de 300 V, medidas em nC.

Inicialmente, foi realizado uma medida da intensidade do feixe de raios X sem o uso de filtros, entre o tubo de raios X e o detector de radiação. Após essa medida padrão, novas medidas foram sendo realizadas, porém, com acréscimos graduais de filtração. A espessura da filtração que reduziu a intensidade do raios X a metade, de seu valor inicial, determinou a HVL. Mediante o dado da HVL foram realizados os cálculos para determinar os parâmetros necessários para adequar os feixes de raios X, o mais próximo possível, as qualidades desejadas, dentro das limitações apresentadas pelos equipamentos.

A irradiação das amostras bacterianas foram realizadas em dois equipamentos distintos, um para cada qualidade e tensão de feixe radiográfico. O feixe de mamografia, como descrito no item sobre mamografia, possui um feixe de baixa tensão (25-30 kVp) e elevada mAs ( $\geq 600$  mAs). Conforme a portaria 453, os equipamentos de mamografia também deve possuir, no mínimo, uma filtração total de 2,5 mm Al ou 0,03 mm de Molibdênio (Mo) e janela de Berílio (Be).

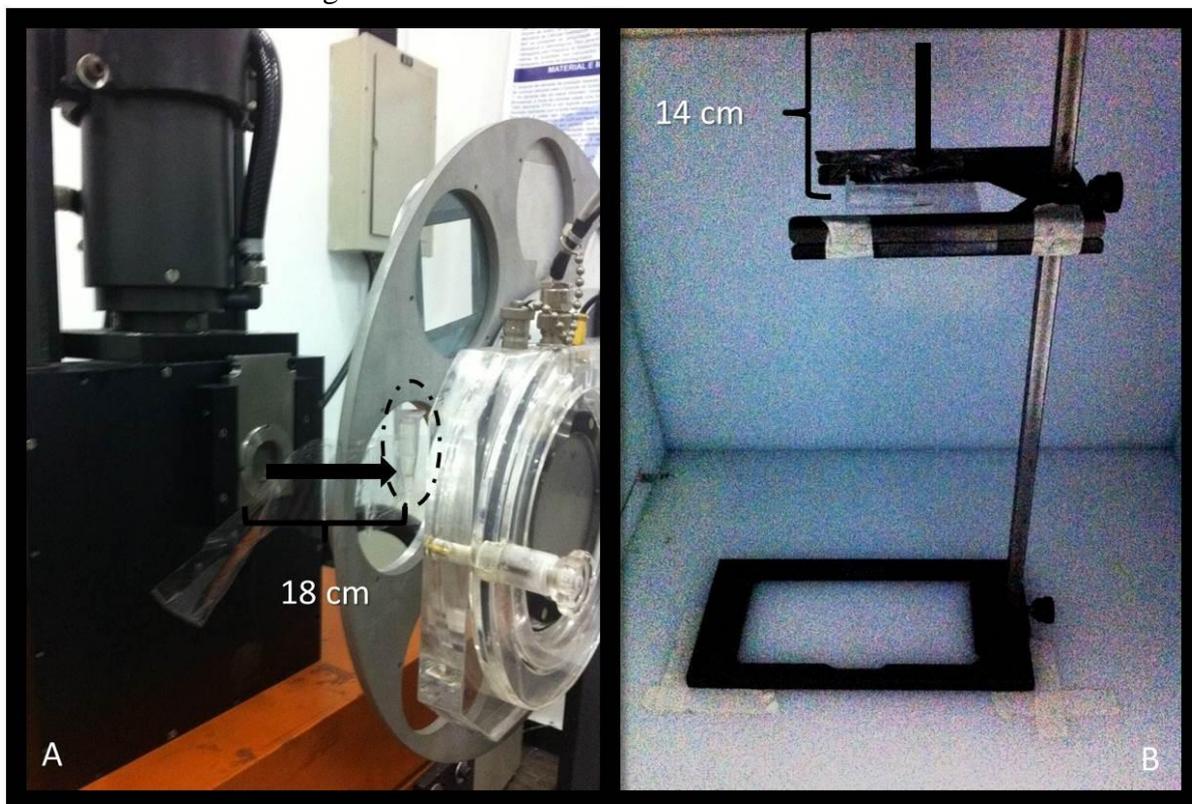
O tubo de raios X utilizado para se obter um feixe com qualidade similar ao de mamografia foi mediante a utilização do tubo de raios X utilizado pelo setor de metrologia do Laboratório de Ciências Radiológicas (LCR-UERJ), que consistia no tubo Side Window X-ray (Phillips Healthcare), com ânodo de molibdênio (Mo), utilizou-se uma filtração total de

0,03 mm Mo + 0,03 mm Be. HVL de 0,33 mm Al e distância foco-superfície de 18 cm. As suspensões bacterianas foram irradiadas por um feixe horizontal com angulação de 20° e taxa de kerma no ar de 2,30 cGy/s.

A radioterapia superficial é uma modalidade radioterápica, realizada através de raios-X de baixa e média energia (50 a 150 kVp e 10-20 mA), com intuito de tratar lesões malignas e benígnas superficiais com excelente reprodutibilidade e precisão. O feixe de raios X de referência (150 kVp) foi adequado pelo tubo de raios X proveniente do equipamento de pesquisa biológica da Rad Source Technologies, modelo RS-2000 (USA), que possui as características de um tubo utilizado na radioterapia superficial. O irradiador da Rad Source Technologies foi configurado em modo manual (150 kV e 25 mA) para irradiar os modelos experimentais bacterianos ao feixe de referência. O ânodo do irradiador é de tungstênio (W) e a filtração total utilizada foi de 0.8 mm Be (equipamento) + 3,5 mm de Al. Camada semiredutora (HVL) igual a 5,38 mm Al e distância foco-superfície (até microtubo que contém a suspensão bacteriana) de 14 cm. As suspensões foram irradiadas mediante um feixe vertical com ângulo de 30° e a taxa de kerma no ar medida foi de 16,06 cGy/s.

Os microtubos com a suspensão bacteriana ficaram fixos em fita adesiva, para ficarem suspensas, e assim evitar a interferência do espalhamento da radiação pela superfície a qual o microtubo ficaria apoiado, como demonstrado na figura 6. As doses a qual as bactérias foram expostas, por ambos os feixes de raios X, foram de 1, 5, 20, 45, 60 e 85 Gy. Os tempos de exposição das doses foram calculadas pela fórmula do inverso do quadrado da distância [Pires et al., 2011].

Figura 6 - Irradiação das cepas bacterianas (AB1157 e JW0704-1) aos feixes que simulavam os feixes radiográficos



Legenda: (A)mamografia e (B)convencional.

## 2.2 Cepas de *Escherichia coli*

As cepas de *E. coli* utilizadas foram a AB1157 (tipo selvagem) e JW0704-1 (deficiente em endonuclease VIII) provenientes do Recursos Genéticos na Universidade de Yale (CGSC), *Coli Genética Stock Center* (New Haven, Connecticut/USA). O modelo bacteriano foi escolhido pela sua facilidade de custo e manuseio, quase destituídas de risco patogênico, relativamente conhecidas sob o ponto de vista genético, além de ser um organismo menos complexo (do que as células eucarióticas), o que poderia possibilitar uma interpretação mais simples dos efeitos gerados pela exposição aos feixes radiográficos.

### 2.2.1 Sobrevivência bacteriana

Alíquota (100  $\mu$ L) do estoque em glicerol (armazenado a  $-20$  °C) foi colocado em *erlenmeyer* estéril contendo 5 mL de meio Mueller-Hinton (37g Nutrient Broth, em 1 L de água destilada) estéril e mantido a  $37$  °C, sob agitação, por um período de 15 a 18 horas

(cultura *over night*). Desta cultura, será obtida a cultura para os experimentos (na fase exponencial de crescimento).

A cultura em fase de crescimento exponencial será adquirida pela transferência de 200 mL da fase adaptativa para um *elenmeyer* contendo 20 mL de meio Mueller-Hinton. Essa nova cultura será mantida a 37 °C até que a fase exponencial de crescimento da cultura seja atingida (em torno de 2 horas, dependendo da cepa bacteriana).

Em seguida, a cultura será centrifugada (700x g, 15 min), lavadas duas vezes em solução salina (NaCl a 0,9%) e novamente suspensas em solução salina. Em seguida, alíquotas de suspensão bacteriana (100µL, n=6, para cada dose) foram expostas à radiação ionizante, à temperatura ambiente. As alíquotas que não foram expostas à radiação, foram usadas como controle.

Após o tratamento, as alíquotas foram diluídas em solução salina (titulação  $10^{-5}$ ) e espalhadas em placas de Petri estéril, contendo meio ágar rico e solidificado (37 g Nutrient Broth+ 37g Agar Agar, em 1 L de água destilada) também estéril. As colônias formadas após a incubação, *overnight* a 37°C, foram contadas e as frações de sobrevivência calculadas [Fonseca et al., 2010]. As experiências foram realizadas em triplicata e os resultados representados pela média de três ensaios independentes.

## 2.2.2 Avaliação morfológica bacteriana

Para a avaliação morfológica o procedimento de irradiação das cepas selvagem (AB1157) e deficiente em endonuclease VIII (JW0704-1) foi realizado sob o mesmo protocolo de irradiação a qual foram submetidas as alíquotas da sobrevivência bacteriana.

Após a irradiação das suspensões bacterianas alíquotas (10µL), sem diluição, foram espalhadas em lâminas de microscopia, fixadas e coradas pelo método de Gram [Cappuccino e Sherman, 1999]. Após as lâminas serem coradas, as células foram visualizadas por microscopia de luz (Axion Scop A.1, Hal 100, Zeiss). Micrografias de diferentes campos da lâmina foram capturados (Sony 12M vídeo a cores, utilizando o software Axiovision), com aumento de 100 vezes (objetiva A-plan 100x/1,25; condensador 0.90) e lâmpada halógena de 100W (80% de iluminação máxima). O mínimo de 300 células foram analisadas, pelo software Imagen Proplus 6.0 (versão para Windows XP) previamente padronizado nas condições de 1µm sendo correspondente a 0,099 pixels. As variáveis avaliadas foram área, perímetro e porcentagem de crescimento, para cada dose.

### 2.3 Eletroforese em DNA plasmidial

A eletroforese é uma técnica laboratorial simples que utiliza a corrente elétrica para promover a separação de moléculas carregadas, como proteínas e ácidos nucléicos. A migração das partículas ocorre por diferença de carga elétrica e por peso molecular, de forma que moléculas menores migram mais rapidamente que as maiores. Com o propósito de avaliar a capacidade de indução de quebras simples e duplas na fita do DNA, mediante a exposição aos feixes de raios X de 28 e 150 kVp, e a ação da endonuclease VIII sob as lesões radioinduzidas, foi realizado o ensaio de eletroforese em DNA plasmidial. Para isso, alíquotas do plasmídeo pUC19 foram expostas as mesmas doses, metodologia de irradiação e feixes de raios X utilizadas nas cepas bacterianas nos ensaios de sobrevivência e avaliação morfológica.

Para poupar os tubos de raios X, o dobro do volume do DNA plasmidial foi exposto a radiação, para cada dose determinada (200ng, aproximadamente). Imediatamente após a exposição à irradiação, metade do volume irradiado recebeu o tampão da enzima e a enzima endonuclease VIII, sendo em seguida incubadas por 30 minutos, a 37°C. A outra metade foi sendo preparada para a eletroforese. Para controle positivo, referente a forma linear do plasmídeo, o plasmídeo pUC19 foi linearizado pela ação da enzima de restrição Bam H1, utilizada como recomendado pelo fabricante. Em seguida, cada amostra recebeu o tampão de carregamento da eletroforese (0,25% de xileno-cianol, 0,25% de azul de bromofenol e glicerol a 25% de água). Após a aplicação do tampão de carregamento, as amostras foram aplicadas em gel de agarose de 0,8%. O gel correu em uma câmara de eletroforese horizontal em tampão Tris-EDTA-acetato (40mM Tris, 20mM ácido acético, 1mM EDTA, pH 8,0, 7V/cm). Os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 ug/mL), e as formas dos plasmídeo foram visualizadas sob a fluorescência utilizando um sistema de trans-luminação ultravioleta. O ensaio foi repetido pelo menos três vezes. Os géis foram digitalizados e as formas dos plasmídeos foram quantificadas utilizando o programa de computador Imagem J para Windows [Fonseca et al., 2010].

### 2.4 Dosimetria da irradiação da cultura de células mamária não tumorais (MCF10A)

Para realizar a irradiação das culturas de células mamárias não tumorais (MCF10A) foi necessário realizar uma nova dosimetria do equipamento Rad Source Technologies, pois a metodologia de exposição seria totalmente distinta da utilizada para a suspensão bacteriana.

Uma vez que o tubo de raios X de 28 kVp utilizada para a exposição à radiação ionizante das culturas bacterianas foi desativado, o irradiador da Rad Source foi utilizado para realizar a exposição de ambos os feixes de raios X (28 e 150 kVp), ilustrado na figura 7.

A linhagem celular utilizada foi a MCF-10A, que foi gentilmente cedida pela professora Cláudia Vitória de Moura Gallo, professora adjunta do Departamento de Bioquímica do IBRAG, UERJ. A linhagem MCF10A (ATCC CRL-10317<sup>TM</sup>) é uma cultura de células epiteliais humana aderentes não tumorigênicas, imortalizadas. Foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal de cavalo, penicilina (100U/mL), streptomina (100µg/mL), EGF (200µg/mL), hidrocortisona (5µg/mL) e insulina (5 µg/mL). As células foram mantidas a 37 °C em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> para crescimento até o momento da exposição aos feixes de raios X, e período de incubação necessário após a irradiação. Os experimentos foram realizados em monocamada, com 70-80% de confluência.

Figura 7 - Ilustração da irradiação da garrafa (frasco) de 25 cm<sup>2</sup> de cultura de células mamárias aderidas ao substrato da mesma



A dosimetria dos feixes de raios X foi realizada através da determinação da camada semi-redutora (HVL). A dosimetria do feixe de 150 kVp foi através da câmara de ionização do tipo dedal (PTW, TM30010), nº de série 0350, e coeficiente de calibração  $4,779 \times 10^7$  Gy/C. Os parâmetros de leitura foram realizadas a 150 kV, 10mA e 180s (cada exposição), todas realizadas na quinta prateleira do equipamento (com campos de 6-7/16''-16,4 cm, distância fonte-prateleira 9-1/8''-23,2 cm, e fator esperado ~385cGy/min) com filtração de 0,3 mm Cu

+ 2,5 mm Al. Foram realizadas no mínimo 5 leituras. O HVL determinado foi de 0,69 mm de Cu.

Já para a dosimetria do feixe de raios X de 28 kVp foi através da câmara de ionização de placas paralelas (padrão mamografia radical, 10XM), nº NRCW 28, e coeficiente de calibração  $4,822 \times 10^6$  mGy/nC. Os parâmetros de leitura foram 28 kV, 2mA e 180s, na quinta prateleira do equipamento, com filtração de 0,45 mm Al. O HVL determinado foi de 0,372 mm Al.

Logo, os parâmetros utilizados na irradiação com feixe de raios X de 150 kVp ocorreram mediante a filtração de 0,3 mm Cu + 2,5 mm Al. A energia foi de 150 kV e 2,1 mA. As exposições foram realizadas na 4ª prateleira do equipamento, as doses utilizadas foram 0 (controle); 0,01; 0,1; 2 e 6Gy, com a taxa de dose igual a 3,4 mGy/s.

A irradiação das amostras de células mamárias foram realizadas em garrafas (frasco) de cultura celular estéreis de 25 cm<sup>2</sup>, com as células aderidas ao substrato e com confluência de aproximadamente 80%. Antes das garrafas serem expostas ao feixe, foi retirado o meio DMEN e adicionado 9 mL de PBS estéril.

As diferenças em relação a irradiação com feixe de raios X de 28 kVp foram os parâmetros de energia (28 kVp), miliamperagem (4 mA), distância (5ª prateleira), filtração (0,45 mm Al) e taxa de dose (3,5 mGy/s). As doses utilizadas também foram 0 (controle); 0,01; 0,1; 2 e 6Gy.

Não foi possível utilizar uma miliampereagem muito elevada no feixe de 28 kVp, devido a baixa energia utilizada no protocolo de irradiação. Essa iniciativa foi determinada como essencial para preservação do irradiador. As irradiações provenientes do feixe de 28 kVp foram realizadas na 5ª prateleira do equipamento com o intuito de aproximar o máximo possível a taxa de dose entre os feixes de raios X (28 e 150 kVp), na tentativa de a taxa de dose não ser uma variável no estudo.

#### 2.4.1 Ensaio clonogênico

Experimentos *in vitro* mostram que as células humanas podem se recuperar de danos provocados pela radiação. Se a dose de radiação não for suficiente para matar a célula antes da sua próxima divisão (morte na interfase), então, após um período de tempo suficiente, a célula pode se recuperar do dano subletal da radiação do qual ela foi vítima e retomar a sua proliferação [Franken et al., 2006]. Baseado nessa teoria, os experimentos de ensaio

clonogênico foram realizados, no intuito de avaliar a capacidade recuperação da linhagem celular MCF-10A aos feixes de qualidade radiodiagnóstica e se estes seriam capazes de interferir em sua capacidade de proliferação, após determinado período de tempo (9-12 dias).

Entretanto, a tripsinização das células não foram realizadas logo após à exposição a radiação, como proposto pelo protocolo convencional. Optamos por realizar a tripsinização das células apenas 24h após à exposição a radiação, com o proposito de permitir um período de reparo de danos potencialmente letais induzidas nas células, decorrentes da irradiação, antes de as submeter a mais um agente nocivo (tripsina), já que a recuperação intracelular se deve a mecanismos de reparo inerente a bioquímica da célula. Logo, a fração de sobrevivência das culturas de células mamárias montadas 24h após irradiação costumam ser maiores do que nos ensaios montados imediatamente após irradiação.

No nível de organismo como um todo, a recuperação do dano da radiação é obtida pela repopulação realizada pelas células sobreviventes. Logo, se uma quantidade de células normais são aderidas em um poço (placa) e incubada por um período de tempo, as células sobreviventes ao tratamento irão se dividir muitas vezes e produzirão uma colônia visível, consistindo de muitas células. Ou seja, essas células foram capazes de realizar o processo de clonagem celular. Colônias visíveis que apresentaram acima de 50 células, foram consideradas detentoras da capacidade de proliferação e foram consideradas para o cálculo de sobrevivência, sendo assim possível comparar o efeito dos feixes convencional e mamografia sobre a cultura celular.

A partir do momento que as garrafas de 25 cm<sup>2</sup> atingiam a confluência adequada ( $\approx$  80%), estas foram submetidas a irradiação. Antes de realizar a irradiação, o meio DMEN foi retirado. Após a retirada do meio DMEN, foi adicionado 9mL de PBS 1X autoclavado (60 mMNaCl; 0,2 mMKCl; 0,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4). Após a irradiação, o PBS era retirado e adicionado 2 mL de DMEN novo. As garrafas retornavam a estufa (5% CO<sub>2</sub>, 37°C e em torno de 80% de umidade) até completar 24h da exposição à radiação.

No dia seguinte, o meio DMEN era retirado, as garrafas eram lavadas com 5 mL de PBS autoclavado e adicionava-se 0,5 a 1 mL de tripsina, deixando a tripsina agir por volta de 8 min, na estufa. A tripsina era inativada com 1 mL de meio DMEN e todo o volume da suspensão celular da garrafa era passada para um tubo falcon de 15 mL estéril. Os tubos foram centrifugados a temperatura ambiente (a 1500 rpm, por 5 min). O sobrenadante era descartado, com cuidado para não descartar parte do pelet formado na centrifugação. A seguir, o pelet é ressuspendido em 5 mL do meio DMEN e uma pequena alíquota da amostra (10  $\mu$ L) é utilizada para realizar a contagem celular.

Em um microtubo com 90  $\mu\text{L}$  de azul de tripan é adicionado a alíquota da resuspensão celular. Posteriormente, 2 alíquotas de 10 $\mu\text{L}$  são utilizadas para ser distribuída em cada compartimento da câmara de Neubauer. A contagem das células é feita em microscópio (objetiva 10x). As células coradas pelo azul de tripan não são consideradas na contagem, porque são células consideradas avariadas/mortas. A contagem dos quatro quadrantes, de cada compartimento, da câmara de Neubauer é realizada e a média é calculada.

O cálculo do número de células foi realizado da seguinte maneira:

a) média (valor adquirido da contagem na câmara de Neubauer)  $\times 10^4 \times 10$  (pois a alíquota proveniente do falcon foi diluída por 10x);

b) resultado da média, valor calculado  $\times 10^5$  cél/mL. Levando em consideração de que cada garrafa possui em torno de 5.000 cél/cm<sup>2</sup>, uma garrafa com 25 cm<sup>2</sup>, terá em torno de 125.000 cél/cm<sup>2</sup>, que pode ser representado por  $1,25 \times 10^5$  cél/cm<sup>2</sup>.

Logo, a regra de três para se determinar o volume desejado para adquirir o número de células adequado foi:

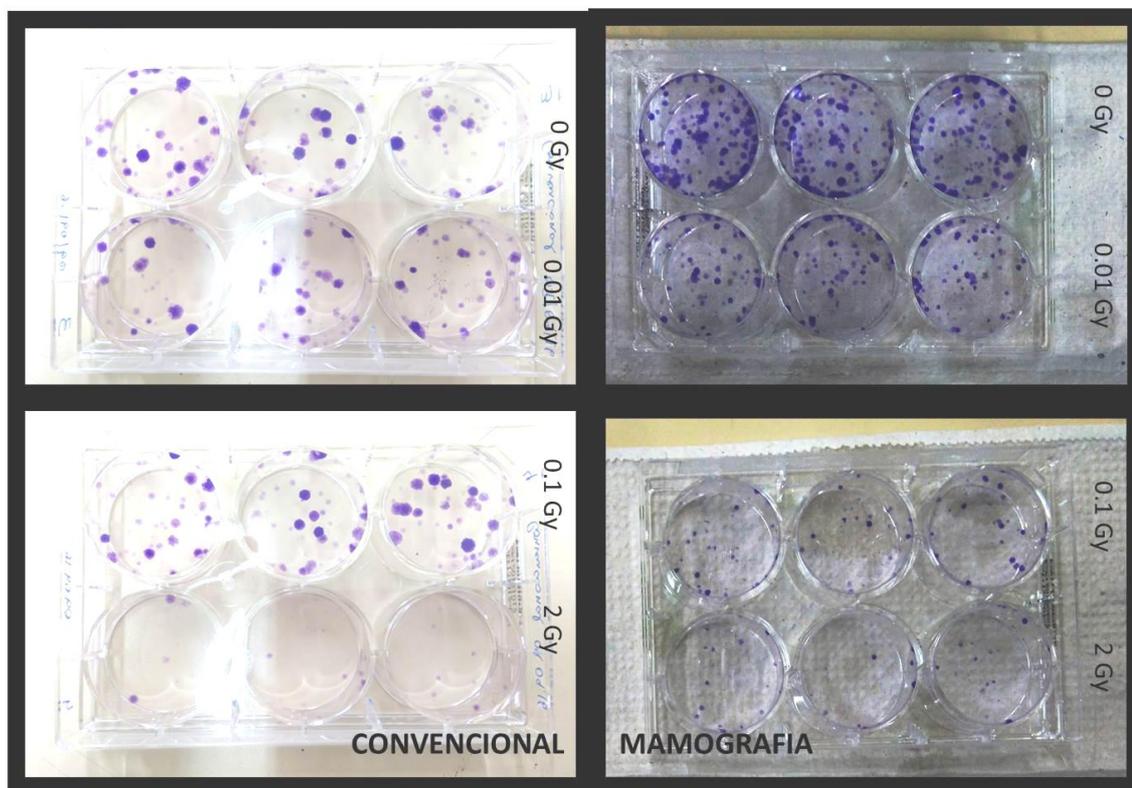
$$\begin{array}{r} 1\text{mL} \text{ ---- média} \times 10^5 \text{ cél/mL} \\ X \text{ ---- } 0,1 \text{ mL ou } 100\mu\text{L} \end{array}$$

Depois era realizada diluição seriada (ou de titulação) a partir da solução de contagem. O procedimento de titulação foi realizado para aumentar o volume de suspensão em relação ao número de células, diluir aproporção de células por mL. Facilitando, dessa forma, alcançar o número de células desejado para a experimentação, que era de apenas 100 células. Esse procedimento também reduzia a chance de erro de pipetação, pois de outra forma o volume seria muito pequeno. Cada microtubo da diluição continha 900  $\mu\text{L}$  de meio DMEN e 100 $\mu\text{L}$  da suspensão celular que era adicionada, até alcançar a  $10^2$ .

Após a determinação do volume que seria utilizado, as placas de poços eram montadas. Cada poço continha 3mL meio DMEN + o volume determinado para 100 células. Em seguida a montagem da placa, ela era tampada e incubada na estufa por 9-12 dias. Após o período de incubação, as placas eram fixadas e coradas (cristal violeta).

As colônias foram contadas (a olho nu) e apenas colônias com mais de 50 células foram consideradas na contagem. Sucessivamente, as frações de eficiência e sobrevivência foram calculadas e plotadas em gráfico (média  $\pm$  erro padrão). Figura 8 apresenta um dos resultados obtivos com o feixe de qualidade convencional.

Figura 8 - Ilustração de resultado obtido do ensaio clonogênico nas placas de 6 poços das doses 0; 0,01; 0,1 e 2 Gy dos feixes com qualidade convencional e mamografia



#### 2.4.2 Ensaio cometa

Seguindo o mesmo propósito mencionado no tópico do ensaio clonogênico, este ensaio experimental foi realizado, porém com período de tempo muito menor. A qual a principal característica a ser analisada é a quantificação de lesões radioinduzidas poucas horas após a irradiação e sua capacidade de recuperação em relação as doses administradas por ambos os feixes. Os períodos de tempo para análise foram de 30 min e 24h após o tratamento.

As garrafas de cultura referentes a este ensaio foram submetidas a irradiação sob o mesmo protocolo do ensaio clonogênico, porém, neste ensaio não foi utilizado a dose de 6 Gy, apenas controle (sem exposição a radiação), 0,01; 0,1 e 2 Gy. Após o período de incubação, as células foram tripsinizadas e ressuspensas em 10  $\mu$ L de PBS 1X (60 mM NaCl; 0,2 mM KCl; 0,1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0,1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4) e misturada delicadamente à 120  $\mu$ L de agarose (0,5% low melting point-LMP, em PBS 1X, 37°C).

Em seguida, essa mistura era imediatamente aplicada sobre uma lâmina coberta com uma fina camada de agarose normal 1,5%. Colocou-se uma lamínula para auxiliar na

distribuição da mistura e esperou-se solidificação da agarose. Após esse período, a lamínula foi removida, e as lâminas acondicionadas em um recipiente contendo solução de lise gelada (2,5 M NaCl; 10 mM Tris; 100 mM EDTA; 10% DMSO; 1% lauril sarcosinato de sódio; 1% triton X-100; pH 10) *overnight*, a 4°C.

Em seguida, as lâminas foram retiradas da solução de lise e colocadas horizontalmente sobre a cuba de eletroforese próximo ao anodo. As lâminas foram cobertas com tampão alcalino (0,3 M NaOH; 1 mM EDTA; pH 13) por 20 minutos antes da eletroforese. A eletroforese transcorreu por 20 minutos sob 25V e 300mA. Após a eletroforese, o DNA foi corado por prata de acordo com Nadin e colaboradores (2001).

Um total de 100 células foram analisadas por lâmina e classificadas visualmente através de microscopia, de acordo com a intensidade da cauda dentro de cinco categorias (0, 1, 2, 3 e 4), onde a classe zero corresponde ao DNA não danificado, a classe 4 corresponde ao altamente danificado e as classes 1 pouco dano, 2 e 3 muito dano. Para quantificar as lesões produzidas (determinada através de unidades arbitrárias), deve-se multiplicar o número de células encontrado em cada classe pelo número da classe da lesão correspondente. Portanto, o somatório das classes dos 100 cometas pode variar de 0 (não lesado) a 400 (todos lesados ao máximo). Todos os experimentos foram feitos em duplicata e repetidos pelo menos três vezes.

## 2.5 Cálculo da eficácia biológica relativa (RBE)

Através do uso de modelos experimentais, como os realizados nos ensaios de sobrevivência celular, é possível determinar os efeitos letais da radiação. Uma extensão matemática da teoria do alvo resulta em dois modelos de sobrevivência celular (alvo único/colisão única e alvo múltiplo/colisão única), porém nenhum deles se enquadraram nos resultados obtidos pela experimentação realizada nos ensaios de sobrevivência bacteriana ou celular mamária (MCF-10A). Logo, através do uso do software Origin calculou-se a função que melhor se ajustava aos pontos encontrados experimentalmente em ambas as curvas de sobrevivência (bacteriana e MCF-10A).

Para isso, as curvas adquiridas experimentalmente foram plotadas no Origin e através da construção dos gráficos foi determinado o melhor modelo de função que se adequava a distribuição dos dados. O modelo de função que melhor se adaptou foi:

$$y=\exp(a+b*x+c*x^2) \quad (3)$$

Onde, a, b e c são as constantes da equação calculadas pelo Origin.

O modelo de função adotado é um modelo de função aproximado ao modelo linear-quadrático. Porém, no modelo linear-quadrático convencional a constante *a* seria nula, o que não ocorre neste estudo. Cada constante é diferente para cada curva de sobrevivência. Já que foram determinadas pelos dados experimentais de cada uma das três curvas. As constantes estão relacionadas nos quadros a seguir:

Constantes da equação referente ao modelo experimental bacteriano AB1157 (selvagem)

Constantes da equação	Qualidade do feixe radiográfico	
	Convencional	Mamografia
a	-0,01475	0,01959
b	-0,00348	-0,00929
c	-1,70E-06	5,01E-05

Constantes da equação referente ao modelo experimental bacteriano JW0704-1 (deficiente)

Constantes da equação	Qualidade do feixe radiográfico	
	Convencional	Mamografia
a	0,0287	0,02371
b	0,00404	-0,00274
c	-6,61E-05	-6,15E-05

Constantes da equação referente ao modelo experimental celular mamário (MCF-10A)

Constantes da equação	Qualidade do feixe radiográfico	
	Convencional	Mamografia
a	0,18367	0,1111
b	-0,16873	-0,00578
c	-0,03853	-0,0701

Após a determinação das constantes, foi calculado, em planilha do Excel, a eficiência biológica relativa (RBE), utilizando a equação e coeficientes relacionados anteriormente. Mediante os cálculos desta planilha foram estabelecidas as doses necessárias para se alcançar determinada sobrevivência e, conseqüentemente, a realização do cálculo da RBE do feixe de qualidade mamográfica em relação ao feixe convencional.

## 2.6 Análise estatística

Os dados foram apresentados pela média e erro padrão da média (média  $\pm$  SEM) das frações de sobrevivência (bacteriana e celular mamária), porcentagem da forma plasmidial do ensaio da ação *in vitro* da enzima endonuclease VIII no plasmídeo pUC19, dos parâmetros

área, perímetro e percentagem de crescimento da avaliação morfológica bacteriana e ensaio cometa.

Todas as amostras passaram pelo teste Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade dos dados. Os únicos dados que passaram pelo teste foram os obtidos pela ação da enzima endonuclease VIII no plasmídeo pUC19 e os obtidos pelo ensaio clonogênico. Logo, estes dados foram submetidos aos testes de variância ANOVA (*one tail*) seguido do teste de múltipla comparação de Bonferroni.

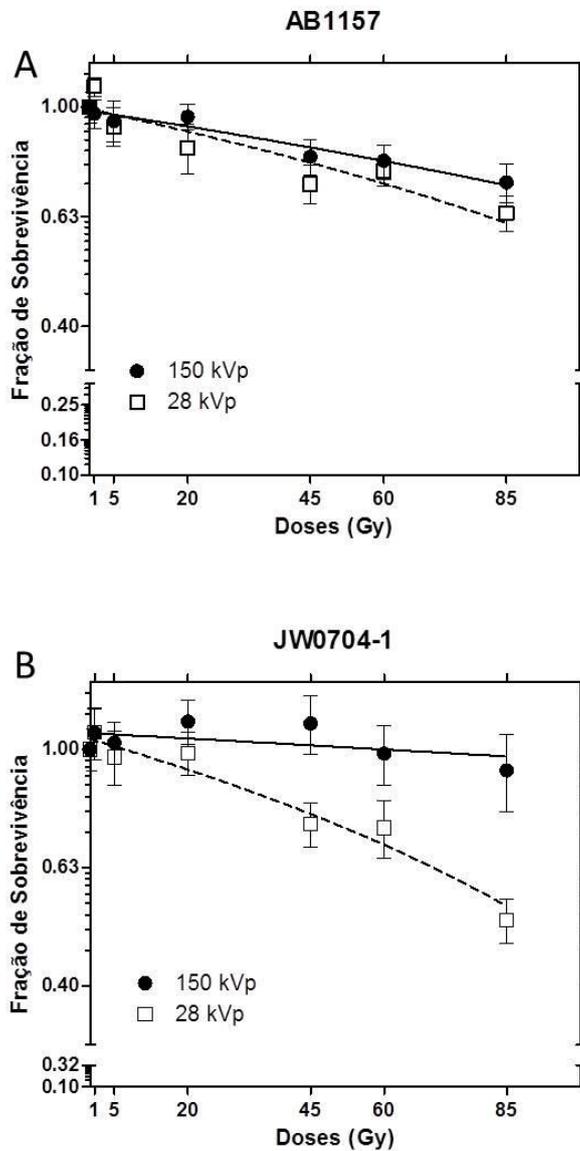
Os dados que não passaram no teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) foram submetidos ao teste de variância Kruskal-Wallis seguido do teste de múltipla comparação de Dunn's. Já os dados obtidos pelo ensaio cometa, que foram inferior a um  $n=5$ , imposto para realizar o teste de normalidade, foi realizado o teste t, entre o grupo controle (sem exposição à radiação) e tratado. O software InStat GraphPad foi utilizado para realizar as análises estatísticas (GraphPad InStat para Windows XP, Software GraphPad, San Diego, Califórnia / EUA).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Sobrevivência bacteriana

O resultado obtido da análise da sobrevivência bacteriana das cepas AB1157 (selvagem) e JW0704-1 (deficiente em endonuclease VIII) expostas a ambos os feixes de raios X, convencional e mamografia, está ilustrado na figura 9.

Gráfico 1 - Gráfico da média  $\pm$  erro padrão da sobrevivência



Legenda: (A) cepas selvagem e (B) deficiente em endonuclease VIII aos feixes de raio X de 28 e 150 kVp. Não houve diferença significativa entre as frações de sobrevivências da cepa bacteriana expostas aos diferentes feixes.

Ao observar os gráficos acima, nota-se uma pequena diferença na fração de sobrevivência da mesma cepa bacteriana exposta aos feixes de raios X de 150 e 28 kVp, sendo o feixe de 28 kVp mais efetivo em induzir um número maior de lesões letais (mortalidade) do que o feixe de 150 kVp, em ambas as cepas (AB1157 e JW0704-1). Não houve diferença significativa entre as frações de sobrevivência da mesma cepa expostas a mesma dose entre os feixes de raios X de qualidades distintas.

Quando comparamos o comportamento das curvas de sobrevivência obtidas entre as cepas bacterianas (AB1157 e JW0704-1), nota-se que na cepa deficiente em endonuclease VIII (JW0704-1) a ação deletéria da exposição ao feixe de 28 kVp é mais intensa do que na cepa selvagem (AB1157). Lembrando que era essa a intenção quando selecionamos uma cepa deficiente em lesões oxidativas, ou seja, intensificar o efeito da exposição à radiação ionizante, uma vez que cepas bacterianas são muito radioresistentes. Entretanto, a intensificação do efeito ocorreu apenas no feixe de estudo (28 kVp) e não em ambos os feixes.

### **3.2 Avaliação morfológica bacteriana**

A morte decorrente da exposição à radiação ionizante pode ocorrer por vários mecanismos, desde a inativação de sistemas vitais para a célula até sua incapacidade de reprodução. Porém, as células bacterianas possuem uma via de translesão ao dano, que proporcionam a replicação do DNA, mesmo que nem todas as lesões tenham sido reparadas. Desta forma, a finalidade avaliação morfológica bacteriana foi verificar se a baixa taxa de mortalidade obtida pelas curvas de sobrevivência poderiam ser decorrentes desta via de translesão, que possibilitaria a sobrevivência celular, apesar de todas as lesões induzidas ao DNA da bactéria, pela exposição aos raios X, não terem sido devidamente reparados. Para realizar a avaliação foram escolhidos os parâmetros área, perímetro e porcentagem do aumento da área (em relação ao triplo da média do controle). Os dados coletados estão descritos nas tabelas I e II.

Tabela 1 - Análise morfológica da cepa AB1157 (selvagem) exposta aos feixes de raios X de 150 e 28 kVp

Kerma (Gy)	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Perímetro ( $\mu\text{m}$ )	Porcentagem (%)
	150 / 28 kVp		150 / 28 kVp
0	1.8±0.03*/ 1.8±0.03*	5.9±0.07*/ 5.9±0.07*	0.5/ 0.5
1	1.2±0.02*/ 1.3±0.02*	4.1±0.05*/ 4.2±0.05*	0.0/ 0.2
5	1.1±0.02*/ 2.2±0.03*	3.8±0.04*/ 6.5±0.09*	0.0/ 4.3
20	1.4±0.03*/ 2.2±0.03*	4.4±0.07*/ 6.4±0.07*	0.6/ 1.9
45	1.4±0.03*/ 1.3±0.02*	4.3±0.07*/ 4.2±0.05*	0.3/ 0.0
60	1.3±0.02*/ 1.3±0.02*	4.1±0.04*/ 4.2±0.05*	0.0/ 0.0
85	1.5±0.03*/ 1.2±0.02*	4.5±0.06*/ 4.1±0.05*	0.9/ 0.0

Os dados estão apresentados pela média ± erro padrão da média \*p< 0.01 comparado ao controle.

Tabela 2 - Análise morfológica da cepa JW0704-1 (deficiente em endonuclease VIII) exposta aos feixes de raios X de 150 e 28 kVp

Kerma (Gy)	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Perímetro ( $\mu\text{m}$ )	Porcentagem (%)
	150 / 28 kVp.		150 / 28 kVp
0	1.8±0.03/ 1.8±0.03	5.6±0.08/ 5.6±0.08	2.7/ 2.7
1	1.8±0.04/ 1.7±0.03	5.7±0.10/ 5.4±0.09	1.4/ 0.7
5	1.8±0.04/ 1.8±0.02	5.7±0.11/ 5.5±0.07	1.7/ 0.0
20	1.7±0.03/ 1.9±0.04	5.5±0.08/ 5.7±0.11	1.3/ 4.3
45	1.8±0.04/ 1.8±0.03	5.7±0.11/ 5.5±0.08	2.9/ 2.7
60	1.6±0.03*/ 1.9±0.04	5.2±0.09*/ 5.7±0.10	1.2/ 2.6
85	1.7±0.03/ 1.9±0.04	5.5±0.09/ 5.9±0.11	2.7/ 4.0

Os dados estão apresentados pela média ± erro padrão da média \*p< 0.01 comparado ao controle.

Quando comparamos os atributos área e perímetro das amostras tratadas em relação ao controle na cepa selvagem (AB1157) nota-se uma redução significativa em todas as doses (p< 0.01). Porém, na cepa deficiente em endonuclease VIII a alteração dos atributos área e perímetro não parecem ter sofrido muitas alterações, exceto a dose 60 Gy do feixe de 150 kVp (p< 0.01), que apresentou diferença significativa em relação ao controle.

### 3.3 Eletroforese em DNA plasmidial

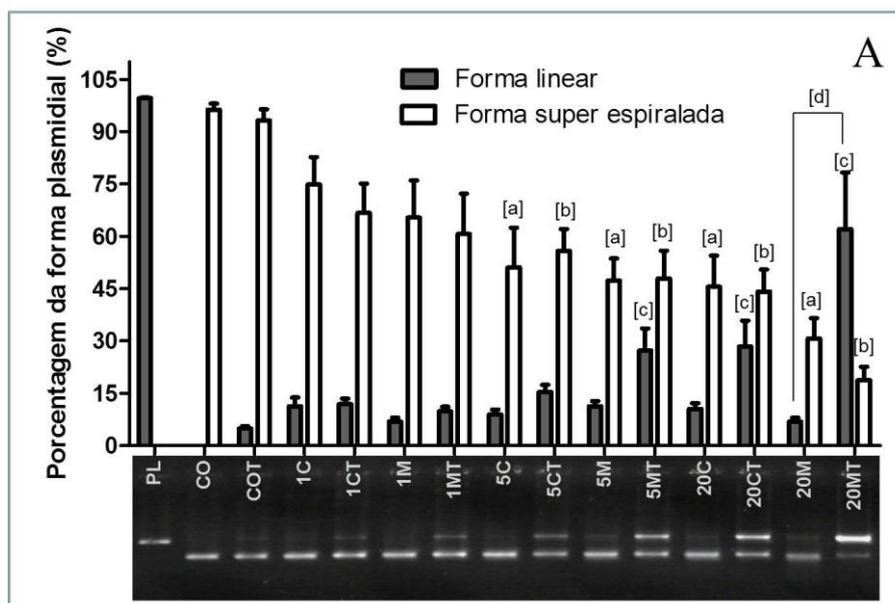
Mediante o resultado obtido pelo ensaio de sobrevivência bacteriana, foi demonstrado que o feixe de 28 kVp foi mais prejudicial na cepa deficiente em endonuclease VIII (JW0704-1) do que na selvagem (AB1157). Porém, a cepa deficiente em endonuclease VIII (JW0704-1) não demonstrou alteração morfológica, o que ocorreu com a cepa selvagem (AB1157). Com o

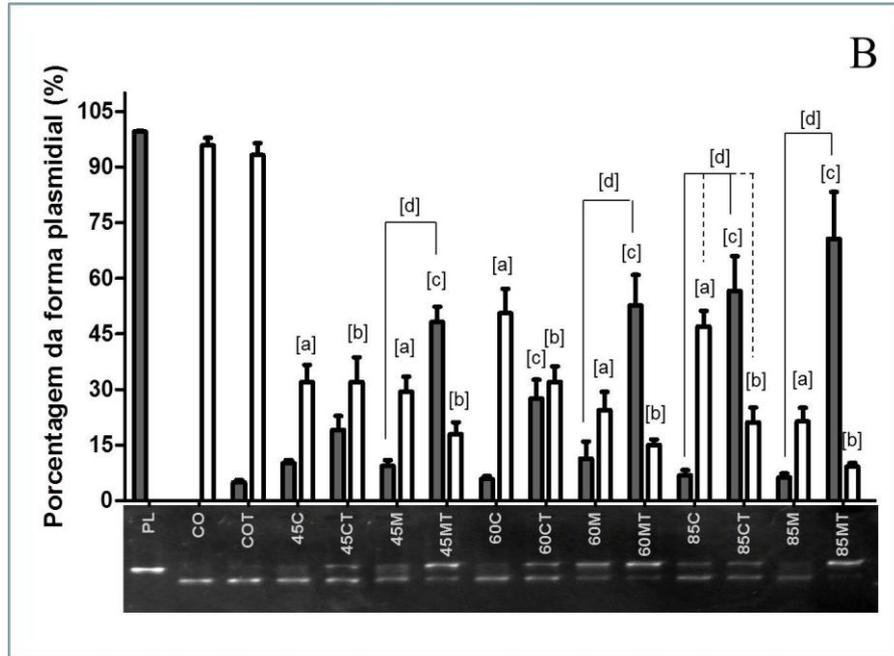
intuito de tentar reconhecer o nível de lesões radioinduzidas por ambos os feixes de raios X e a ação da endonuclease VIII no reparo das lesões induzidas foram realizados ensaios *in vitro* com DNA extracelular (plasmídeo pUC19).

O plasmídeo exposto a ambos os feixes de raios X, nas mesmas condições a qual foram expostas as cepas bacterianas, uma alíquota da amostra irradiada foi tratada com endonuclease VIII e uma outra parte não foi tratada com a enzima de reparo. Sendo em seguida, juntas, submetidas a eletroforese em meio de agarose. Mediante a comparação da linearização do plasmídeo (controle positivo) e os diferentes tratamentos a qual o plasmídeo foi submetido (radiação e radiação + enzima de reparo) foi avaliado o efeito da exposição à radiação e a ação da endonuclease VIII, através da quantificação de quebras duplas por meio da degradação da conformação original íntegra do plasmídeo. O resultado obtido está demonstrado no gráfico 2.

No gráfico A percebe-se uma redução da forma super espiralada, em ambos os feixes, a medida que se aumenta a dose administrada (Gy) na amostra de plasmídeo. Conseqüentemente, também há um aumento da forma linear a medida que a dose administrada aumenta. No gráfico B, isso não fica tão aparente quanto no gráfico A. Decorrente da degradação do plasmídeo a medida que a dose vai aumentando. A partir dos 45 Gy a análise do percentual das formas do plasmídeo fica comprometida em decorrência da alta fragmentação do mesmo, formando um rastro no gel.

Gráfico 2 - Análise das alíquotas de plasmídeo irradiadas pelos feixes radiográficos de 150 e 28 kVp, tratadas ou não com endonuclease VIII





Legenda: As identificações são as seguintes: controle sem tratamento com endonuclease VIII (CO); controle tratado com endonuclease VIII (COT); amostras irradiadas com o feixe de 150 kVp (C) ao lado do valor da dose em Gray e (M) para os expostos ao feixe de 28 kVp. As alíquotas irradiadas tratadas com a endonuclease VIII tem um T na sua nomenclatura. PL é a referência do plasmídeo linear. [a]  $p < 0.05$  da forma super espiralada das amostras irradiadas e o controle, ambos sem tratamento com a endonuclease VIII; [b]  $p < 0.05$  da forma super espiralada das amostras irradiadas em relação ao controle, ambos com tratamento da endonuclease VIII; [c]  $p < 0.05$  da forma linear das amostras irradiadas em relação ao controle, ambos tratados com a endonuclease VIII e [d]  $p < 0.05$  entre as amostras irradiadas com mesma dose e feixe porém uma tratada com a endonuclease VIII e a outra não.

A partir dos 5 Gy, no gráfico A, já é detectada diferença significativa entre a porcentagem da forma super espiralada do controle em relação aos irradiados [a], tanto no feixe de 150 kVp quanto no de 28 kVp, que não foram tratados com a endonuclease VIII após a exposição à radiação. A diferença também ocorre na relação da forma super espiralada entre o controle e as alíquotas irradiadas, ambos tratados com a enzima endonuclease VIII [b].

A comparação da forma linear apenas foi realizada entre o controle e as amostras irradiadas, ambos tratados com a endonuclease VIII, pois no controle sem o tratamento com a enzima de reparo não há formação da forma linear. A diferença significativa da forma linear [c] inicia na dose de 5 Gy, mas apenas ocorre no feixe de 28 kVp. A diferença significativa da forma linear no feixe de 150 kVp apenas ocorrerá a partir dos 20 Gy. A diferença significativa da forma super espiralada, tratada com a enzima de reparo, ocorrerá a partir de 5 Gy, para ambos os feixes.

Quando comparamos a proporção das formas super espiralada e linear do plasmídeo irradiado com a mesma dose e mesma qualidade do feixe, tendo uma alíquota de plasmídeo irradiado sido tratada com a endonuclease VIII após a irradiação e a outra não [d], há

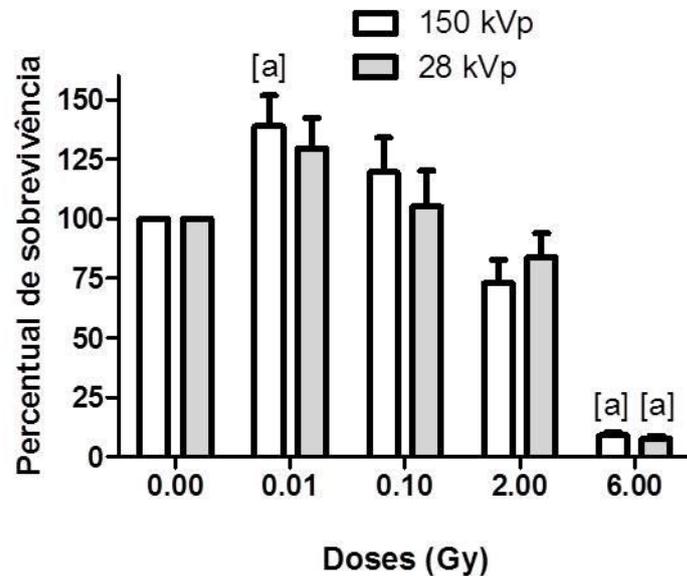
diferença significativa da porcentagem da forma super espiralada apenas na dose de 85 Gy do feixe de 150 kVp (linha tracejada), gráfico 2B. Entretanto, na porcentagem da forma linear ocorre diferença significativa desde a dose de 20 Gy do feixe de 28 kVp [d], e apenas entre as alíquotas de 85 Gy do feixe de 150 kVp (linha cheia), gráficos 2A e 2B.

### 3.4 Ensaio clonogênico (MCF10A)

Devido o modelo experimental bacteriano possuir uma resistência muito grande à radiação ionizante e os experimentos anteriores terem sido realizados com doses muito elevadas (1 a 85 Gy), em relação as doses utilizadas nos exames radiográficos, optou-se pelo uso de cultura de células mamárias humanas não tumorogênica (MCF10A) para realizar novas análises entre os feixes de 150 kVp e 28 kVp, agora, com exposições de doses dentro do intervalo utilizados na realização de exames diagnósticos por imagem. Para este ensaio também foram incluídas doses altas (2 e 6 Gy, consideradas terapêuticas). O resultado obtido encontra-se no gráfico 3.

O gráfico 3 apresentou resultados muito similares quando comparamos o feixe de 150 kVp ao de 28 kVp. Quando analisamos estatisticamente o percentual de sobrevivência entre as mesmas doses dos diferentes feixes de raios X não houve diferença significativa entre os percentuais de sobrevivência. Inesperadamente, os percentuais de sobrevivência das doses intermediárias (0,01 e 0,1 Gy) apresentaram um aumento na sobrevivência quando comparados ao controle, principalmente a dose de 0,01 Gy do feixe de 150 kVp, que apresentou diferença significativa [a]. A partir da dose de 2 Gy, ambos os feixes de raios X apresentaram redução no percentual de sobrevivência, sendo a média do feixe de 150 kVp igual a 73,08% e o de 28 kVp 83,92%. Na dose de 6 Gy ambos os feixes de raios X apresentaram diferença significativa, em relação ao controle, na redução do percentual de sobrevivência.

Figura 9 - Fração de sobrevivência da cultura de células MCF10A expostas aos feixes radiográficos de 150 e 28 kVp. [a]  $p < 0.05$  irradiado em relação ao controle

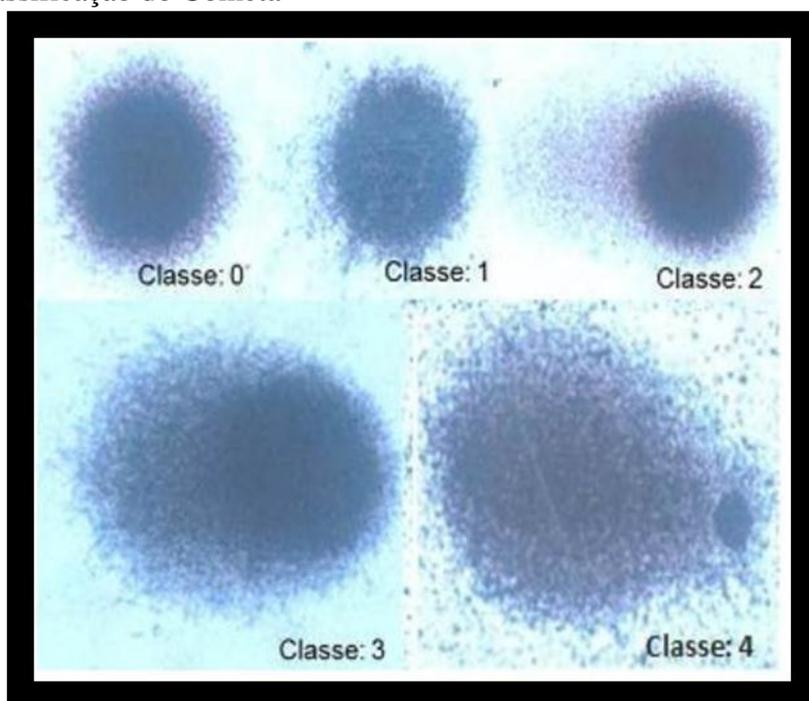


### 3.5 Ensaio cometa

O ensaio cometa é uma técnica de eletroforese em microgel que permite a análise e a visualização individual do núcleo de cada célula. É utilizada como uma ferramenta importante para detectar danos no DNA e avaliar a cinética de reparo de células individuais expostas a agentes genotóxicos, como a radiação ionizante. Os danos mais facilmente detectados no DNA por essa técnica são quebras simples e duplas (SSB e DSB, respectivamente), danos álcali-lábeis, crosslinks e quebras resultantes de reparo por excisão [Stankevics et al., 2013], que são alguns dos efeitos radioinduzidos de interesse deste estudo.

Esse ensaio foi realizado, na versão alcalina, de acordo com o método descrito por Tice e colaboradores (2000). Lembrando que, um total de 100 células foram analisadas por lâmina, e classificadas visualmente através de microscopia, de acordo com a intensidade da cauda dentro de cinco categorias (0, 1, 2, 3 e 4), demonstradas na figura 8. Onde a classe zero corresponde ao DNA não danificado, a classe 4 corresponde ao altamente danificado e as classes 1 pouco dano, 2 e 3 muito dano. O resultado deste ensaio está apresentado nas tabela III e IV e gráficos 4 e 5, a seguir.

Figura 10 - Classificação do Cometa



Legenda: Desenho esquemático da classificação visual dos cometas por categoria de dano. Classe 0 - célula não danificada; classe 1 - célula com pouco dano; classes - 2 e 3 células com muito dano; classe 4 - célula extremamente danificada.

Tabela 3 - Intensidade das lesões radioinduzidas no DNA cromossomal de células da linhagem MCF10A exposta ao feixe de radiodiagnóstico de 150 kVp após 30 min e 24h da irradiação

**Ensaio Cometa - MCF-10A / 30 min**

**150kV, 2.1 mA, Filtração: 0,3mm Cu + 2,5mm Al, taxa de dose: 3.4 mGy/s**

**Classes:**

Dose (Gy)	0	1	2	3	4	Total de dano ao DNA (U.A)	Normalizado com o controle
<b>0</b>	97.5	1.5	1.3	0	0	<b>4.2</b>	<b>1.0±0.0</b>
<b>0,01</b>	92.8	3.3	3.3	0.3	0.2	<b>11.7</b>	<b>2.2±1.3</b>
<b>0,1</b>	91.5	4.5	3.3	0.5	0.2	<b>13.3</b>	<b>3.7±1.8</b>
<b>2</b>	85.2	3.8	4.2	5.1	1.7	<b>34.3</b>	<b>8.0±1.5</b>

**Ensaio Cometa - MCF-10A / 24 h**

**150kV, 2.1 mA, Filtração: 0,3mm Cu + 2,5mm Al, taxa de dose: 3.4 mGy/s**

**Classes:**

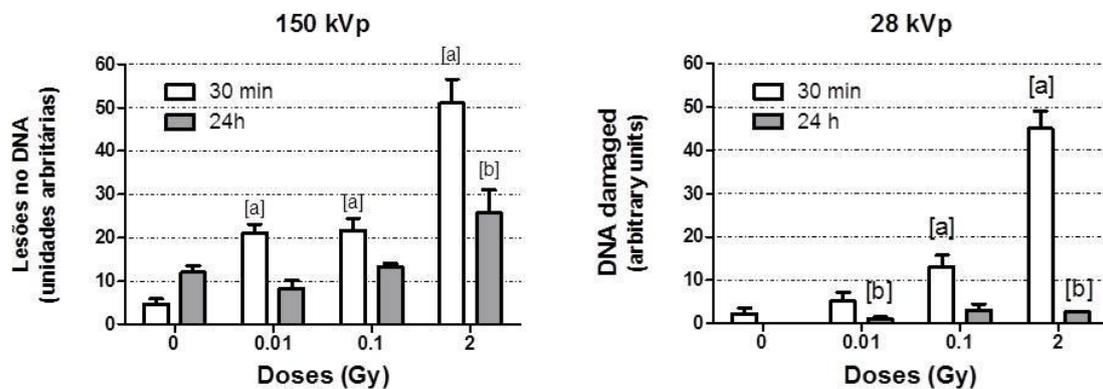
Dose (Gy)	0	1	2	3	4	Total de dano ao DNA (U.A)	Normalizado com o controle
<b>0</b>	95.6	3.6	0.6	0.0	0.0	<b>5.0</b>	<b>1.0±0.0</b>
<b>0,01</b>	95.8	2.3	1.2	0.3	0.0	<b>5.6</b>	<b>1.2±0.42</b>
<b>0,1</b>	95.6	3.6	0.6	0.3	0.0	<b>6.0</b>	<b>1.4±0.82</b>
<b>2</b>	94.0	4.0	1.2	0.5	0.3	<b>9.16</b>	<b>1.7±0.24</b>

Tabela 4 - Intensidade das lesões radioinduzidas no DNA cromossomal de células da linhagem MCF10A exposta ao feixe de radiodiagnóstico de 28 kVp após 30 min e 24h da irradiação

Ensaio Cometa - MCF-10A / 30 min							
28 kV, 4 mA, Filtração: 0,45mm Al, taxa de dose: 3.5 mGy/s							
Classes:							
Dose (Gy)	0	1	2	3	4	Total de dano ao DNA (U.A)	Normalizado com o controle
0	98.4	0.8	0.5	0.4	0.0	2.9	1.0±0.0
0,01	96.6	1.4	1.1	1.1	0.4	8.5	2.9±1.4
0,1	89.1	5.3	3.1	1.6	0.3	17.4	5.9±2.2
2	84.5	3.0	4.5	4.9	1.5	32.6	12.2±2.8

Ensaio Cometa - MCF-10A / 24 h							
28 kV, 4 mA, Filtração: 0,45mm Al, taxa de dose: 3.5 mGy/s							
Classes:							
Dose (Gy)	0	1	2	3	4	Total de dano ao DNA (U.A)	Normalizado com o controle
0	96.7	2.0	1.0	0.3	0.0	5.0	1.0±0.0
0,01	97.0	1.3	1.7	0.0	0.0	4.7	1.1±0.1
0,1	95.7	3.3	1.0	0.0	0.0	5.3	1.4±0.8
2	94.3	4.3	0.7	0.7	0.0	7.7	1.9±0.8

Gráfico 3 - Intensidade da lesão radioinduzida ao DNA pelos feixes de 150 e 28 kVp, 30 minutos e 24 horas após a exposição aos feixes de raios X



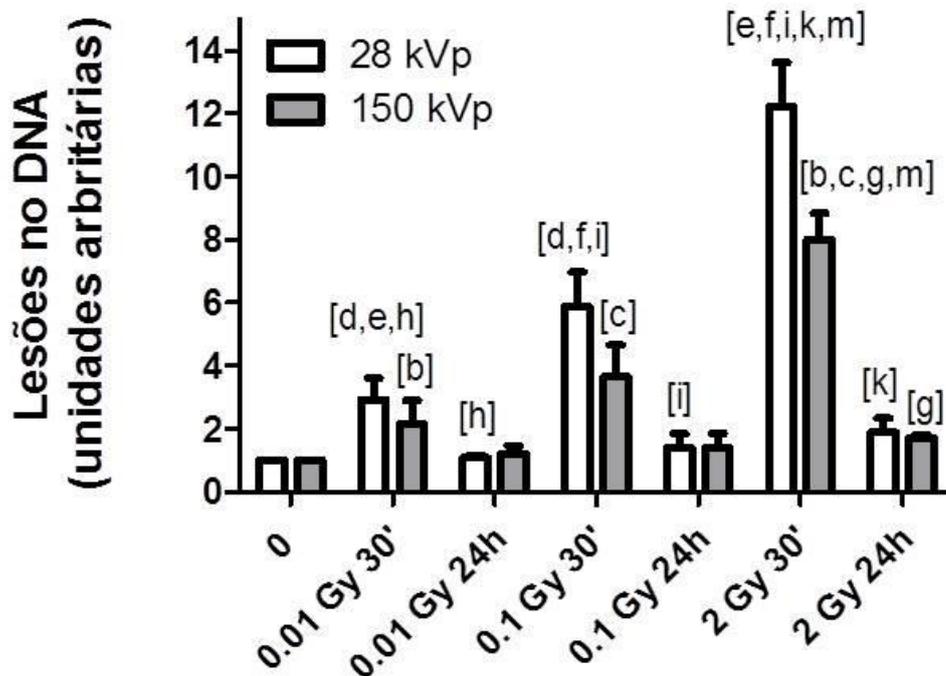
Legenda: Dados representados em média ± erro padrão da média. [a] =  $p < 0.01$ , quando comparados em relação ao controle.

Quando comparamos os resultados obtidos pela exposição à radiação, mesma qualidade do feixe e em ambos os períodos após a exposição (gráfico 4), apenas as doses de 0,1 ( $p < 0.05$ ) e 2 Gy ( $p < 0.001$ ) após 30 minutos de exposição e 2 Gy ( $p < 0.01$ ) após 24 horas de exposição do feixe de 150 kVp apresentaram diferença significativa em relação aos seus respectivos controles. Já no feixe de 28 kVp, a diferença se apresentou em todas as doses após 30 minutos da exposição, mas em nenhuma após 24 horas. Observa-se que o número de lesões detectadas no feixe de 28 kVp, por dose administrada, após 30 minutos de exposição, foi ligeiramente mais expressivo do que as obtidas pelo feixe de 150 kVp.

Na avaliação entre as diferentes doses administradas, mas com mesmo feixe e no mesmo período de tempo após a exposição à radiação, foi detectada diferença significativa entre as doses 0,01 e 2 Gy [b] e 0,1 e 2 Gy [c] do feixe de 150 kVp após 30 minutos de exposição, como demonstrado no gráfico 5. Após o período de 24 horas, não ocorreu diferença significativa entre as doses do feixe de 150 kVp.

Ainda, interpretando o gráfico 5, o feixe de 28 kVp apresentou diferença significativa entre as doses 0,01 e 0,1 Gy [d], 0,01 e 2 Gy [e] e 0,1 e 2 Gy [f], com 30 minutos após a exposição. E, assim como no feixe de 150 kVp, após 24 horas, nenhum tratamento apresentou diferença significativa. Outra comparação realizada foi através da avaliação do mesmo feixe (150 ou 28 kVp) em determinada dose (0,01 ou 0,1 ou 2 Gy), porém, com períodos de tempo distintos após a exposição (30 minutos e 24 horas). Neste contexto, o feixe de 150 kVp atingiu diferença significativa apenas na dose de 2 Gy [g], enquanto no feixe de 28 kVp houve diferenças significativa em todas as doses administradas, 0,01 [h], 0,1 [i] e 2 Gy [k]. Por último, avaliou-se a resposta obtida de determinada dose entre os diferentes feixes (150 e 28 kVp) após determinado período da exposição (30 minutos e 24 horas); onde apenas a dose de 2 Gy do feixe de 150 kVp com 30 minutos após a exposição [m] apresentou diferença significativa.

Gráfico 4 - Análise comparativa da intensidade dos danos no DNA das células MCF10A entre os feixes de raios X (150 kVp e 28 kVp), as doses (0, 0.01, 0.1 e 2 Gy) e os períodos de tempo após a exposição (30' e 24h)



Legenda: Onde cada par das letras (b, c, d, e, f, g, h, i, k, m) indicam uma diferença significativa detectada no experimento ( $p < 0.05$ ). Onde, [b] 0.01 e 2 Gy 150 kVp 30'; [c] 0.1 e 2 Gy 150 kVp 30'; [d] 0.01 e 0.1 28 kVp 30'; [e] 0.01 e 2 Gy 28 kVp 30'; [f] 0.1 e 2 Gy 28 kVp 30'; [g] 2/30' e 2/24h (Gy/t) 150 kVp; [h] 0.01/30' e 0.01/24h 28 kVp; [i] 0.1/30' e 0.1/24h 28 kVp; [k] 2/30' e 2/24h 28 kVp; [m] 2/150 kVp e 2/28 kVp (Gy/feixe) 30' após a exposição. Dados representados por média  $\pm$  erro padrão da média.

### 3.6 Cálculo RBE

Uma vez que a eficiência biológica da radiação depende da distribuição espacial da deposição de energia e da densidade de ionização por unidade de comprimento do percurso da partícula/fóton ionizante; a eficiência biológica relativa (RBE) é utilizada na radiobiologia para caracterizar as diferentes eficácias biológicas das radiações. O seu cálculo, como mencionado na introdução, é resultado da razão das doses absorvidas de dois tipos de radiação (no caso, do feixe de 28 kVp em relação ao feixe de 150 kVp) produzindo o mesmo efeito biológico, em condições idênticas de radiação. Por intermédio dessa temática realizou-se o cálculo da RBE dos resultados obtidos das curvas de sobrevivências bacterianas e de células mamárias, que estão demonstrados nas tabelas abaixo:

Tabela 5 - Cálculo da RBE referentes as porcentagens de sobrevivência descritas para cepa AB1157 (selvagem) expostas aos feixes de 150 e 28 kVp

<b>% de sobrevivência</b>	<b>28 kVp (Gy)</b>	<b>150 kVp (Gy)</b>	<b>RBE</b>
90	15	26	1,76
80	31	58	1,85
70	60	94	1,57
60	120	134	1,12

Tabela 6 - Cálculo da RBE referentes as porcentagens de sobrevivência descritas para cepa JW0704-1 (deficientes em endonuclease VIII) expostas aos feixes de 150 e 28 kVp

<b>% de sobrevivência</b>	<b>28 kVp (Gy)</b>	<b>150 kVp (Gy)</b>	<b>RBE</b>
90	29	85	2,98
80	45	99	2,22
70	59	113	1,90
60	74	126	1,71

Tabela 7 - Cálculo da RBE referentes as porcentagens de sobrevivência descritas para cultura de célula mamária não tumoral (MCF-10A) expostas aos feixes de 150 e 28 kVp

<b>% de sobrevivência</b>	<b>28 kVp (Gy)</b>	<b>150 kVp (Gy)</b>	<b>RBE</b>
90	1,7	1,3	0,766
80	2,1	1,7	0,804
70	2,5	2,1	0,843
60	2,9	2,6	0,881
50	3,3	3,1	0,913
40	3,8	3,6	0,947
30	4,3	4,2	0,977
20	4,9	5,0	1,012
10	5,8	6,1	1,053
3	7,1	7,8	1,097

A intenção era realizar o cálculo de RBE de 90-3% da fração de sobrevivência de todos os modelos experimentais. Porém, no cálculo da RBE da cepa selvagem (AB1157) ocorreu um ponto de inflexão durante o cálculo da RBE, utilizando o modelo de função adotado. Logo, a medida que aumentava a dose, em vez da sobrevivência reduzir, ela também aumentava, ou seja, os incrementos da dose tornaram-se menos efetivos. Devido a isso, optou-se realizar os cálculos da RBE no modelo experimental bacteriano apenas até atingir o ponto de inflexão.

O cálculo da RBE da cultura bacteriana apresentou um comportamento contrário ao apresentado pela cultura de células mamárias. Na cultura bacteriana, quando diminui a fração

de sobrevivência diminui a RBE. Todavia, na cultura de células mamárias, diminui a fração de sobrevivência a RBE aumenta o seu valor. Na cultura bacteriana, a dose necessária para atingir o mesmo efeito (fração de sobrevivência) com o feixe de 150 kVp é bem superior a dose necessária pelo feixe de 28 kVp. Quando o valor da fração de sobrevivência diminui na análise da cultura bacteriana a RBE também diminui, tanto na cepa selvagem quanto na cepa deficiente em endonuclease VIII. Na cultura de células mamárias, a dose necessária do feixe de 150 kVp começa sendo menor do que a de 28 kVp para atingir o mesmo efeito. Depois as doses ficam equivalentes entre os feixes, até que a dose do feixe de 150 kVp torna-se um pouco superior ao feixe de 28 kVp, mas isto ocorre no final do intervalo de fração de sobrevivência calculado.

#### 4. DISCUSSÃO

A radiação ionizante é considerada um agente genotóxico capaz de induzir morte celular e instabilidade genética. Entretanto, a radiosensibilidade entre os tipos celulares são variáveis, o que dificulta a compreensão dos efeitos deletérios inerentes a sua exposição. Além de que, as alterações biológicas decorrentes da instabilidade genética podem tornar-se aparentes somente após longos períodos de latência, decorrentes de um efeito estocástico, dependendo do sistema biológico atingido, da dose de exposição e a recorrência da exposição a radiação ionizante [Kamiya et al., 2015; Chen et al., 2010; ICRP 2007].

Com o avanço da tecnologia, e conseqüentemente avanço dos equipamentos e dispositivos que fazem uso da radiação ionizante na área da saúde, a demanda de exames realizados na população aumentou consideravelmente no decorrer da última década [Blankenbecler, 2010] e cresce continuamente a cada dia entre pacientes de todas as idades. Portanto, por conta dessa demanda, aumentou-se o interesse em compreender os efeitos da radiação em diferentes níveis de dose, especialmente em baixas doses [Mifune, 1992], já que baixas doses são os níveis aos quais a maioria dos exames de rastreio e diagnóstico são realizados. Cada vez mais evidências científicas sugerem que baixas doses ( $< 0,1$  Gy) podem desencadear efeitos diferentes dos induzidos por altas doses ( $> 1$  Gy) [Beels et al., 2010; Lehnert et al., 2006; Feinendegen 2005; Shmakova et al., 2002].

Muito do que se sabe hoje, sobre os efeitos decorrentes da exposição á radiação em organismos vivos se deve aos estudos realizados nos sobreviventes das bombas de Hiroshima e Nagasaki, além dos acidentes nucleares. [Heyes and Mill, 2004; Mifune et al., 1992; Pochin, 1976] Ainda existem estudos onde foram construídas curvas de dose-resposta, porém, como a quantificação dos efeitos de tais exposições são difíceis de detectar a baixas doses, normalmente as curvas de sobrevivência são compostas por doses acima de 1 Gy e/ou por feixes com elevada LET. [Beels et al., 2010, Gomolka et al., 2005; Goggelmann et al., 2003; Frankenberg et al., 2002; Azzam et al., 1994], o que não retrata os parâmetros utilizados nos exames médicos. Apesar da solicitação médica do exame apenas ocorrer mediante a concessão de que o custo da exposição a radiação será menor do que o benefício da realização do exame, ao longo da vida, um paciente pode realizar dezenas de exames e, conseqüentemente, ser exposto a uma dezena de exposições. O que não se sabe ao certo é o quanto esse contingente de exposição, ao longo da vida do paciente, pode aumentar a probabilidade de uma consequência prejudicial a sua saúde [Blankenbecler, 2010].

A deposição da energia proveniente da radiação ao meio é feita de forma aleatória. Moléculas danificadas pela irradiação serão perdidas, mas isso não será um problema de longo período, caso essas moléculas sejam renováveis, uma vez que elas serão repostas, e o funcionamento da célula retornará ao seu estado homeostático. Entretanto, a molécula de DNA em função do papel central que exerce na célula e de sua renovação limitada, se não for reparada adequadamente pode causar consequências prejudiciais; como promover a instabilidade genômica ou letalidade celular. Devido a isso, várias evidências experimentais têm apontando o DNA como o principal alvo de danos radioinduzidos [Joiner et al., 2009].

Dentro desse questionamento, este estudo tentou formular diversos ensaios, onde utilizando feixes de raios X expôs diferentes modelos experimentais, a qual cada um deles possuía características pontuais para determinada avaliação. O plasmídeo foi escolhido devido a possibilidade de avaliação de lesões oxidativas induzidas diretamente ao DNA; agindo na conformação do plasmídeo, o que viabilizaria a detecção e quantificação da ação da radiação ionizante sobre o plasmídeo avaliado por eletroforese. Esse resultado foi comparado com a exposição de culturas bacterianas, onde as lesões induzidas pela exposição à radiação não ocorreram de forma direta ao material genético. Logo, tentou-se associar os resultados obtidos na eletroforese (lesões de efeito direto ao DNA, plasmídeo), com os índices de sobrevivências das cepas bacterianas. Ambos os sistemas expostos as mesmas doses e feixes de raios X.

Além da avaliação do efeito da exposição à radiação ionizante perante a avaliação da curva de sobrevivência das culturas bacterianas e das modificações da conformidade do plasmídeo. Também foi proposto avaliar a influência do sistema de reparo na transgressão das lesões decorrentes da exposição à radiação, tanto no plasmídeo como nas cepas bacterianas. Para tal, parte das alíquotas irradiadas do plasmídeo foram posteriormente tratadas com uma enzima de reparo, a endonuclease VIII. Já nas cepas bacterianas, além da cepa selvagem, uma cepa deficiente em endonuclease VIII também foi irradiada, que é a mesma enzima do sistema de reparo ao qual foi utilizado no plasmídeo.

Como mencionado anteriormente, a endonuclease VIII é uma enzima de reparo incluída no processo multienzimático de reparo por excisão de bases. Onde a endonuclease VIII é capaz de reconhecer pirimidinas oxidadas. Após o reconhecimento da base oxidada, a endonuclease VIII removerá a base danificada e clivará a fita do DNA, formando um sítio AP ou abásico [Blasdell et al. 2001; Jiang et al., 1997]. Desta forma, as alíquotas de plasmídeo irradiadas e posteriormente tratadas com a endonuclease VIII irão reconhecer as bases pirimidínicas oxidadas e irão clivá-la da fita do DNA, formando um sítio abásico. Caso a formação desses sítios abásicos sejam próximos de uma quebra simples de fita (SSB) ou de

outro sítio abásico na fita oposta, isso acarretará na formação de uma quebra dupla da fita (DSB) de DNA e desencadeará a alteração da conformação do plasmídeo da forma super espiralada para uma conformação maior, ou seja, o plasmídeo irá correr menos no gel, pois o seu tamanho aumentará em relação a malha do gel de agarose, regredindo o seu avanço no mesmo. .

Mediante a avaliação do resultado obtido na eletroforese do plasmídeo, quando aumentamos a dose de exposição de radiação, tanto no feixe de 28 kVp quanto no de 150 kVp, há um aumento da proporção da conformação linear e conseqüente redução da conformação super espiralada do plasmídeo, o que está relacionado com o aumento da formação de DSB no plasmídeo, uma vez que a dose de radiação foi aumentando gradativamente, assim como as lesões oxidativas geradas pelas exposições à radiação. As lesões oxidativas decorrentes da exposição à radiação ionizante podem ser amplas, entretanto, dependendo da dose a qual o organismo seja exposto, a proporção de morte celular pode ser pequeno. Todavia, as DSB desempenham um papel crítico na morte celular [IAEA, 2010].

Quando realizamos a comparação entre a redução da porcentagem plasmidial da forma super espiralada das amostras irradiadas com a mesma dose, porém, uma pelo feixe de 28 kVp e a outra pelo feixe de 150 kVp, sem posterior tratamento com a endonuclease VIII, observa-se uma redução maior da forma super espiralada nas amostras expostas pelo feixe de 28 kVp do que pelas amostras expostas ao feixe de 150 kVp, até a dose de 60Gy. A partir da dose de 60 Gy percebe-se uma redução da quantidade de plasmídeo retido no gel de agarose, decorrente da fragmentação do mesmo a doses extremamente elevadas de radiação. Entretanto, esse fato não comprometeu a avaliação e interpretação dos resultados obtidos.

A maior eficiência do feixe de 28 kVp em induzir lesões do tipo DSB no plasmídeo pode estar relacionado com o feixe de menor tensão realizar a maior parte das suas interações energéticas com o meio pelo efeito fotoelétrico; ou seja, a energia fornecida pelos fótons são, em sua maior parte, absorvida pelo meio e a sua dispersão não tem grande dimensão, ficando retida em uma área menor extensão, uma interação próxima a outra. Já no feixe de 150 kVp, a energia fornecida pela exposição a radiação ionizante deve ter, inicialmente, uma dispersão maior da energia, como ocorre no efeito Compton. A energia dos fótons seria dispersa em uma área de maior extensão pela formação dos elétrons secundários, diluindo, de certa forma, a prospecção do efeito da radiação. Em um segundo momento, o efeito do feixe de 150 kVp teria sua completa absorção, mediante o efeito fotoelétrico [Kellerer and Chen, 2003; Kellerer, 2002] Dessa forma, um feixe de menor tensão (28 kVp), como os utilizados nos exames de mamografia, que viabilizam maior absorção da radiação pelo meio, para efetivar

a construção da imagem, talvez sejam capazes de induzir uma proporção maior de interações próximas uma das outras, podendo gerar lesões radioinduzidas graves, apesar da maioria delas não serem críticas [Mills et al., 2015; Lehnert et al., 2006]

O feixe de 28 kVp se mostrou mais propenso em induzir a linearização do plasmídeo do que o feixe de 150 kVp, quando comparamos as amostras irradiadas em relação ao controle. Essa propensão parece intensificar quando as amostras irradiadas foram posteriormente tratadas com a enzima de reparo, endonuclease VIII. Enquanto no feixe de 28 kVp foi constatado diferença significativa a partir da dose de 5 Gy, da proporção da forma linear do plasmídeo das amostras irradiadas e posteriormente tratadas com a enzima de reparo em relação ao controle tratado com a mesma enzima, no feixe de 150 kVp, essa mesma correlação, apenas apresentou diferença significativa a partir da dose de 20 Gy. Resultado semelhante foi obtido por Depuydt e colaboradores (2013) que detectou formação de focos  $\gamma$ H2AX ( $\approx$ DSB) em linfócitos do sangue periférico com uma dose mínima de 0,01 Gy quando exposto ao feixe de 30 kVp, enquanto que com raios- $\gamma$  ( $^{60}\text{C}$ ) apenas foi possível detectar mediante a exposição de 0,05 Gy.

Outro fator importante a ser destacado nessa comparação, entre as alíquotas de plasmídeo irradiadas e posteriormente tratadas com a enzima de reparo é que mesmo no controle, que também foi tratado com a endonuclease VIII, houve detecção de bases alteradas pela enzima de reparo; ou seja, quando comparamos as alíquotas do plasmídeo irradiadas e posteriormente tratadas com endonuclease VIII em relação ao controle que também foi tratado com a enzima de reparo foi retirado um contingente de lesões que não são consequentes da exposição aos feixes de raios X, ressaltando o efeito da exposição da radiação ionizante nas alíquotas dos plasmídeos irradiados e posteriormente tratados com a enzima de reparo.

Por fim, observa-se um aumento gradativo da forma linear do plasmídeo irradiado e posteriormente tratado com endonuclease VIII em relação as alíquotas irradiadas com a mesma dose e feixe de raios X sem posterior tratamento com a enzima de reparo. O aumento é significativo a partir da dose de 20 Gy no feixe de 28 kVp, sendo que a diferença apenas é significativa na dose de 85 Gy no feixe de 150 kVp. Esse resultado corrobora com os demais resultados obtidos na eletroforese, onde o feixe de 28 kVp, em todas as correlações realizadas neste ensaio, se apresentou mais eficaz em induzir a linearização do plasmídeo do que o feixe de 150 kVp.

Os resultados da eletroforese permitem a interpretação de que, possivelmente, no feixe de 28 kVp as lesões induzidas ao DNA pelo feixe de raios X são mais próximas uma das

outras, do que as induzidas pelo feixe de 150 kVp. Essa proximidade entre as lesões proporciona a formação de DSB de forma indireta. Ou seja, quando a endonuclease VIII reconhece uma pirimidina oxidada, que se encontra próximo de uma SBS ou de outra pirimidina oxidada que já foi removida da fita do DNA (consistindo em um sítio abásico); quando houver a clivagem da pirimidina oxidada (recentemente reconhecida pela endonuclease VIII) na fita do DNA ocorrerá a formação de um novo sítio abásico e da formação de uma DSB de forma indireta [Prise e Pullar, 1999].

O conhecimento da disposição e do alcance da interação da radiação com o meio parece ter uma condição especial para explicar a ampla variação e distribuição de lesões no DNA. Os eventos de disposição de energia denominados do tipo *cluster* resultam em lesões múltiplas próximas uma das outras (*Multiply Damage Sites*, MDS) [Blasdell and Wallace, 2001; Blasdell et al., 2001; Goodhead, 1994; Prakash et al., 2012], dentro de um intervalo de 20 nm [Goodhead, 1989]. As MDS são lesões difíceis de serem reparadas pela célula e estão relacionadas com indução da morte celular [IAEA, 2010].

Logo, a eletroforese permitiu avaliar o potencial genotóxico direto da exposição do material genético aos feixes de raios X, ou seja, sua capacidade de gerar quebras na molécula de DNA e a ação de uma das enzimas de reparo de lesões oxidativas sobre tal exposição. As lesões do tipo DSB são as mais difíceis de serem reparadas pelo sistema de reparo celular, pois há uma grande possibilidade de ocorrer falha durante o processo de reparo ou de ele nem mesmo ocorrer, dando origem a aberrações cromossômicas e/ou mutações, além de contribuir para a indução da instabilidade genômica ou letalidade celular [Friedberg, 2006; Lindahl et al., 1997; Goodhead, 1994].

Para atingir níveis de mortalidade consideráveis na curva de sobrevivência das cepas bacterianas, a irradiação teve que alcançar doses extremamente elevadas, devido a alta resistência que a *E. coli* possui em relação à radiação ionizante. Como isso, quando o plasmídeo foi exposto as doses mais elevadas (60 Gy–85 Gy), houve uma desfragmentação muito elevada do plasmídeo (*smear*), que comprometeu um pouco a avaliação da quantificação das conformações do mesmo após a eletroforese, devido a perda de material durante o processo. Entretanto, isso não impossibilitou a relação dos resultados obtidos entre os ensaios.

A avaliação das curvas de sobrevivência obtidas pela exposição das culturas bacterianas aos feixes de raios X de 28 e 150 kVp demonstrou que a cepa selvagem (AB1157) não apresentou uma diferença muito grande entre os índices de sobrevivência quando comparamos o efeito de mortalidade entre os feixes de raios X, sendo os maiores índice de

mortalidade obtidos pelo feixe de 28 kVp do que pelo feixe de 150 kVp. Porém, quando comparamos os índices de sobrevivência decorrentes da exposição aos feixes de raios X na cepa deficiente em endonuclease VIII (JW0704-1) foi possível verificar uma considerável diferença no efeito de mortalidade entre os feixes de raios X.

Na cepa JW0704-1 houve uma diferença mais eficaz nos índices de mortalidade quando comparamos o efeito da exposição do feixe de 28 kVp em relação ao feixe de 150 kVp. O que demonstra que os efeitos induzidos pelos feixes de raios X às cepas bacterianas estão relacionadas com o reparo de lesões oxidativas, e que a endonuclease VIII está associada com o reparo dessas lesões. Entretanto, os índices de sobrevivência do feixe de 150 kVp parecem ter obtido um resultado superior na cepa deficiente em relação aos índices de sobrevivência obtidos pela cepa selvagem (AB1157).

O resultado obtido pela cepa AB1157 condiz com o resultado apresentado na avaliação da eletroforese do plasmídeo, pelas alíquotas que foram irradiadas e posteriormente foram tratadas com a endonuclease VIII. O feixe de menor tensão (28 kVp), possivelmente, induz maior índice de mortalidade devido a maior absorção da energia depositada pela radiação em um curto perímetro do meio, levando a formação de lesões do tipo *cluster*, que dificultam o seu reparo e levam a formação indireta de DSB, aumentando o seu índice de mortalidade em relação ao feixe de 150 kVp. Em trabalho desenvolvido com cepas bacterianas (*E.coli*) selvagens e mutantes, para genes associados ao sistema de reparo por excisão de bases, expostos a raios X (50 kVp e 2 mA; não cita o anodo, e intervalo de dose 0-270 Gy) por Jiang e colaboradores (1997), as cepas com única mutação no gene *nei* (endonuclease VIII) exibiram uma sutil sensibilidade comparada a cepa selvagem, o que não ocorreu nas doses mais baixas de nosso estudo. Entretanto, a energia e corrente utilizada no feixe de raios X do trabalho realizado pelos autores supracitados é bem inferior ao que utilizamos neste estudo (150 kVp), o que pode ter influenciado na diferença de suscetibilidade entre as cepas com sensibilidade para a endonuclease VIII.

Como mencionado anteriormente, as DSB desempenham um papel crítico na morte celular. Estudos experimentais demonstram que cepas de *E. coli* apresentam formação de DSB em maior proporção pela ação de determinadas enzimas de reparo entre as lesões estreitamente opostas na fita do DNA do que apenas pela exposição à radiação [Bresler et al., 1984]. Essa referência pode ser uma hipótese pela qual o índice de sobrevivência da cepa deficiente em endonuclease VIII (JW0704-1), quando exposta ao feixe de 150 kVp, parece ter obtido um resultado com índice de sobrevivência maior do que a cepa selvagem (AB1157) exposta ao mesmo feixe.

Em *E. coli* agentes genotóxicos podem induzir um sistema complexo de alterações celulares conhecidos como resposta SOS. Uma das hipóteses levantadas para o resultado obtido pela cepa JW0704-1 (deficiente em endonuclease VIII) ao feixe de 150 kVp foi que a ativação deste sistema possibilitou o aumento da viabilidade celular da cepa em decorrência das lesões transgredidas pela exposição ao feixe de maior tensão. Conforme a literatura, as células que ativam a resposta SOS suspendem a divisão e aumentam sua capacidade de reparar o DNA danificado [Fuji et al., 2004]. Nesses casos, o mecanismo de tolerância a danos denominados síntese translesão (TSL) promoveu o desbloqueio da replicação e a sobrevivência celular [Courcelle and Hanawalt, 2003].

Já quando observamos a curva de sobrevivência da cepa JW0704-1 ao feixe de 28 kVp observamos uma redução mais expressiva da sobrevivência bacteriana do que a apresentada pela cepa selvagem (AB1157) pelo mesmo feixe. Além do feixe de 28 kVp ter se manifestado mais sintomático em induzir lesões agravantes do que o feixe de 150 kVp, possivelmente, a deficiência de uma das vias de reparo de lesões oxidativas parece ter um prejuízo maior para a cepa JW0704-1 do que as lesões indiretas que a mesma via de reparo poderia desencadear quando tentasse reparar as lesões geradas pela exposição a este feixe, que seria o quadro apresentado pela cepa selvagem (AB1157). Hipoteticamente, essa redução da sobrevivência bacteriana apresentada pela cepa JW0704-1 quando exposta ao feixe de 28 kVp deve ter desencadeado níveis tão acentuados de lesões ao DNA, ao qual, ultrapassou os níveis tolerados pelo sistema SOS para que ocorresse sua ativação. Conforme Goodhead (1989) as curvas de sobrevivência são resultado de um longo histórico de reparos bem e mal sucedidos e que se a capacidade da célula em realizar o reparo atingir um nível de saturação, a taxa de reparo não aumentará em função do aumento da taxa de dano.

Ward e colaboradores (1987) demonstraram que existe maior probabilidade de ocorrência de lesões de base danificadas ocorrerem em exposições de raios X do que lesões de quebra de fita. Logo, as vias de reparo por excisão (excisão de base, excisão de nucleotídeo e *mismatch repair*) são os mecanismos de reparo mais importantes nesta situação. As DBS desempenham um papel crítico na morte celular, todavia, se levar em consideração a probabilidade de ocorrência da formação de lesões de base danificada em relação as lesões de quebra de fita, tanto em células procariontas quanto nas eucariontes, quando expostas a feixes de raios X, as lesões de base danificada tem uma proporção muito mais relevante do que as lesões de quebra de fita. Logo, dependendo da condição de exposição, a deficiência de uma dessas vias de reparo pode ocasionar consequências críticas ao organismo, como o apresentado pela cepa JW0704-1 quando exposto ao feixe de 28 kVp.

A morte celular decorrente da exposição à radiação ionizante pode advir de vários mecanismos, desde a inativação de sistemas vitais para a célula até sua incapacidade de replicação. Porém, as células procariontes apresentam uma via de translesão ao dano, que garantem, na maioria das vezes, a replicação do DNA, mesmo quando nem todas as lesões foram reparadas [Fuji e Funchs, 2004], com a intenção de perpetuar a sobrevivência celular. Portanto, apesar da replicação do DNA acontecer, a célula pode não ser capaz de se dividir, formando grandes filamentos bacterianos.

Na tentativa de confirmar se as cepas bacterianas (AB1157 e JW0704-1) poderiam estar acionando o sistema SOS para lidar com as lesões radioinduzidas pelos feixes de raios X foi realizado uma avaliação morfológica óptica das suspensões bacterianas após terem sido expostas à radiação. Onde os parâmetros avaliados foram: área, perímetro e porcentagem do aumento da área. Essa investigação foi realizada com o pressuposto de que em muitas ocasiões quando o sistema SOS das *E. coli* são ativados as bactérias desencadeiam um processo de filamentação.

A avaliação de filamentação bacteriana foi inserida no estudo com o propósito de confirmar se a hipótese do aumento da sobrevivência da cepa JW0704-1, em relação ao da cepa selvagem, quando exposta ao feixe de 150 kVp, no experimento da curva de sobrevivência seria decorrente da ativação do sistema SOS e consequente filamentação bacteriana. Todavia, nenhuma das cepas apresentou alteração significativa no aumento da sua área em relação ao controle, ou apresentou a formação de filamentos.

Talvez a ausência de crescimento e/ou filamentação das bactérias fixadas em lâminas, coradas e observadas em microscópio óptico tenha decorrido de falha na metodologia do ensaio de filamentação. Uma vez que os esfregaços das suspensões bacterianas irradiadas e sua posterior fixação em lâmina ocorreram logo após ter finalizado o procedimento de irradiação, não permitindo um período de incubação, como o período de 24h ocorrido no ensaio da curva de sobrevivência bacteriana. Essa suposição faz sentido mediante ao fato de que o período de incubação, que ocorreu no ensaio de curva de sobrevivência bacterianas, poderiam ter sido utilizadas pela suspensão bacteriana irradiada para a recuperação do metabolismo tanto quanto para a ativação do sistema SOS. Após transcorrido o período de 24h então as suspensões bacterianas seriam fixadas nas lâminas.

Todavia, foi detectado uma diminuição dos parâmetros área e perímetro ( $p < 0.01$ ), das amostras irradiadas em relação ao controle, em todas as doses expostas a cepa selvagem (AB1157), tanto pelo feixe de 150 kVp quanto pelo de 28 kVp. Como não há diferença desse efeito entre as amostras da cepa AB1157 que foram irradiadas pelos feixes de raios X,

possivelmente, o comportamento apresentado pode estar relacionado com a interferências da radiação na atividade metabólica da bactéria, sendo indiferentes quanto a sua tensão. O mesmo não ocorreu na cepa deficiente em endonuclease VIII (JW0704-1). Talvez a endonuclease VIII desempenhe alguma função correlacionada ao metabolismo, já que o mesmo decorre da oxidação dos nutrientes. Porém, seria necessário avaliações diretamente relacionados ao metabolismo da bactéria e a endonuclease VIII para poder determinar quelaquer comprovação.

Supõem-se que esse comportamento apresentado pela cepa AB1157 no ensaio de filamentação seja decorrente ao processo de reparo do DNA ser altamente dependente de energia, de tal maneira que, quando a quantidade de lesões é excessiva, o reparo do DNA pode consumir muito ATP, de modo que a célula compromete a realização de outros processos metabólicos fundamentais [Bernstein, 2002; Fuji et al., 2004], dessa forma suspendendo o seu desenvolvimento e metabolismo [Imlay, 2013]. Na revisão realizada por Imlay (2013), a autora menciona que quando cepas de *E. coli* são expostas a altas concentrações de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que também induzem lesões oxidativas, apenas quando o peróxido de hidrogênio é retirado pela ação da peroxidase e catalase é que as células bacterianas retomam a atividade metabólica. Outras hipóteses para o “encolhimento” da bactéria pode estar vinculada com a condensação da cromatina nuclear, que pode estar relacionado com a morte celular programada [Yin and Dong, 2003], a célula “encolheria” devido a condensação citoplasmática resultante de crosslink entre proteínas e/ou a perda de água [Hall, 2006].

O feixe de 150 kVp expôs uma eficiência inferior ao feixe de 28 kVp em induzir lesões radioinduzidas no plasmídeo e mortalidade nas cepas bacterianas; logo, pode-se deduzir que o somatório de um feixe de raios X com características de maior capacidade de absorção da energia pelo meio, em um curto perímetro, ao qual desencadearia um elevado contingente de lesões, de baixa gravidade, mas em elevada proporção e proximidade pode elevar o critério de gravidade da exposição, uma vez que se tornaria lesões de difícil manutenção e que a tentativa de reparo poderia prejudicar um pouco mais a situação, devido a indução de lesões de fita de forma indireta. Tal consequência poderia repercutir em mutações e/ou morte celular.

Na tentativa de realizar a avaliação do efeito da exposição à radiação ionizante com doses mais compatíveis aos utilizados em exames de rastreio/diagnóstico para a conclusão deste estudo foi escolhido o modelo experimental de cultura de células mamárias MCF10A, devido esta linhagem celular não ser tumoral e ser proficiente em enzimas de reparo. Apenas

o modelo experimental da cultura celular (MCF-10A) permitiu a adequação de um intervalo de doses mais próximo da realidade diagnóstica. Todavia, para atingir níveis de mortalidade que fossem significativos em relação ao controle na curva de sobrevivência houve a necessidade de inserir doses mais elevadas do que as utilizadas a nível de diagnóstico. Foram introduzidas doses consideradas de nível terapêutico (radioterapia), de 2 e 6 Gy.

Apesar das diversas diferenças morfológicas do modelo experimental desta fase ser diferente dos modelos experimentais utilizados nos ensaios anteriores e de não termos conseguido manter a metodologia de irradiação anterior, devido o irradiador com o alvo de molibdênio ter danificado durante o estudo, ambos os resultados obtidos nas curvas de sobrevivência dos diferentes modelos experimentais possibilitaram o cálculo da RBE. O fato de um modelo experimental ser proveniente de células procariontes e a outra de células eucariontes foi interessante, pois verificou-se a diferença da composição celular poderia influenciar demasiadamente no resultado da RBE.

A capacidade dos feixes de raios X em induzir a morte celular na cultura de células mamárias (MCF-10A) foi avaliado por meio do ensaio clonogênico. Esse tipo de ensaio permite avaliar se após determinada exposição a um agente adverso específico as células conseguiriam manter a sua integridade, sendo aptas em gerar descendentes e formar colônias durante determinado período de tempo. Após a exposição das baixas doses de radiação (0,01 e 0,1 Gy) as células irradiadas apresentaram elevação no percentual de sobrevivência em relação ao controle. Sendo significativa na dose de 0,01 Gy do feixe 150 kVp em relação ao controle. Nesse intervalo de dose observa-se uma tendência de aumento na capacidade de sobrevivência celular. Já no intervalo das doses mais elevadas (2 e 6 Gy) apenas a dose de 6 Gy apresentou uma importante redução na fração de sobrevivência, tanto pro feixe de 28 kVp quanto para o de 150 kVp.

Existe na literatura crescentes evidências demonstrando que a exposição abaixo de certas doses poderia estimular o mecanismo de reparo das células revertendo danos iniciais e promovendo a sobrevivência celular, processo a qual é denominado hormesis [Marple e Joiner, 1993; Lehnert, 2008; Yang et al., 2014]. Dentro desse aspecto é possível interpretar que a elevação no percentual de sobrevivência das células MCF-10A, quando expostas as doses de 0,01 e 0,1 Gy, sejam decorrentes da hormesis. Entretanto, esta suposição teria que ser confirmada mediante ensaios complementares.

Determinados efeitos biológicos decorrentes da exposição a baixas doses de radiação ionizante (LDR) são diferentes daqueles determinados pela exposição a altas doses (HDR). Logo, os efeitos biológicos LDR não podem ser completamente explicados pelo modelo

linear (LNT) geralmente utilizado para efeitos biológicos HDR. Ou seja, que o risco de indução de câncer provocado por altas doses ( $>1$  Gy) é estatisticamente significativo, contudo, a baixas doses ( $< 0,1$  Gy) o risco é incerto [Kadhim et al., 2004]. O efeito de hormosis, que engloba os efeitos benéficos da LDR em estimular o crescimento e desenvolvimento de animais, aumentar a vida útil, ampliar a fertilidade e diminuir a incidência de câncer [Lindahl e Wood, 1999] ainda é bem controverso.

Sokolov e Neumann (2016) revisaram vários estudos da resposta de diferentes células humanas a exposição de LDR, em níveis globais de transcrição, e concluíram que a resposta à exposição LDR é altamente dependente do tipo celular e tecidual, com notável grau de variação entre indivíduos. Por analogia, cada tipo de célula humana possui seu perfil de alteração de expressão gênica característica induzida pela LDR. Contudo, o resultado de elevação do percentual de sobrevivência à baixas doses de radiação apresentado pelo feixe de 150 kVp no ensaio clonogênico das células MCF-10A é superior ao apresentado pelo feixe de 28 kVp. O que corrobora com os resultados anteriores onde o feixe de 28 kVp demonstrou ser mais efetivo em induzir lesões radioinduzidas mais relevantes na mortalidade celular do que o feixe de 150 kVp.

Danos complexos ao DNA, tais como quebra dupla e duas ou mais lesões opostas nas fitas do DNA, dentro de uma curta extensão (1-10 bp), são lesões resistentestres e difíceis de serem reparadas desafiando os mecanismos de reparo das células [Gaillard et al., 2015]. Para verificar a presença e intensidade de danos, além da dinâmica de reparo das lesões radioinduzidas, o ensaio cometa de cultura de células mamárias foi realizado. O ensaio cometa foi realizado em dois períodos distintos: 30 minutos e 24 horas. No período de 30 minutos após a irradiação, quase todas as doses conduziram a um aumento significativo de lesões no DNA, em relação ao controle, das células mamárias MCF-10A, a única dose que não obteve esse resultado foi a dose 0,01 Gy do feixe de 150 kVp. Já no período de 24 horas após a irradiação, todas as doses apresentaram redução no número de lesões radioinduzidas, quando comparadas ao contingente alcançado no período de 30 minutos após a irradiação. Ao ponto de que as doses mais baixas de exposição obtiveram resultado equivalente as lâminas controle. Os dados sugerem que a intensidade do dano radioinduzido pelas doses testadas foram revertidas no período de 24 horas de ambos os feixes.

A única dose que permaneceu com um total de unidades arbitrárias (U.A) com diferença significativa em relação ao controle, no período de 24 horas, foi a dose de 2 Gy do feixe de 150 kVp. Apesar do resultado obtido pela exposição ao feixe de 28 kVp com mesma dose e período pós irradiação não ter alcançado diferença significativa em relação ao controle,

o perfil do resultado foi muito similar ao apresentado pelo feixe de 150 kVp. Naturalmente, a dose mais elevada iria conduzir a danos mais severos. Pelos resultado obtido, a dose de 2 Gy, seja pelo feixe de 150 ou 28 kVp, mostrou-se ser evetiva em induzir danos complexos que poderiam ser capazes de comprometer o reparo da célula de forma integra. Desencadeando a probabilidade de reparos incorretos, aberrações cromossômicas e morte celular.

Por meio dos resultados obtidos pelo ensaio cometa pode-se prever que o modelo experimental de cultura de células mamárias (MFC-10A) possui um sistema de reparo bastante satisfatório para lesões radioinduzidas, uma vez que reduziu as lesões (unidades arbitrárias) quantificadas no período de 30 minutos de forma nítida em relação ao período de 24 horas, de ambos os feixes. Nos trabalhos desenvolvidos por Mills (2015) e Stankevics (2013) e seus respectivos colaboradores, as células MCF-10A também apresentaram boa recuperação as lesões radioinduzidas por um feixe de 30 kVp.

Embora as células MCF-10A terem apresentado uma grande capacidade de reparo de lesões radioinduzidas, ainda sim, existe na lituratura um grande debate a respeito do aumento do risco de câncer em pacientes que são frequentemente expostos à raios X ao longo de suas vidas, especialmente quando a exposição é realizada com certa frequência desde a infância. Apesar de muitos desses estudos sofrerem questionamentos sobre a metodologia aplicada, existem relatos de frequente ocorrência de neoplasia secundária em pacientes que foram tratados com radioterapia, após um intervalo de cinco anos [Chen et al., 2010].

Para efetuar o cálculo da Eficiência Biológica Relativa (RBE) foram utilizados os resultados obtidos nas curvas de sobrevivência (cepas bacterianas e cultura de células, MFC-10A) construídas neste estudo. Para se calcular a RBE é necessário realizar uma relação entre os feixes de raios X. Consequentemente, o feixe de 150 kVp foi denominado o feixe padrão e o feixe de 28 kVp o feixe teste. A relação entre os feixes atribui um determinado nível de efeito (sobrevivência) entre tipos de exposição ao meio (eficiência biológica).

O valor médio ( $RBE_M$ ) encontrado para a cepa selvagem (AB1157) foi igual a 1,57. Para a cultura de células mamárias (MCF-10A) foi igual a 0,93. Como esperado, a cepa deficiente em endonuclease VIII (JW0704-1) apresentou uma  $RBE_M$  mais elevada, igual a 2,20. A diferença entre as médias foi relativamente aproximada, entre os modelos experimentais sem restrições no sistema de reparo, mesmo o intervalo de doses administradas serem totalmente diversificados. Isto é, devido as cepas bacterianas possuírem uma resistência extremamente elevada a radiação ionizante. Fazendo-se necessário a utilização de doses extremamente elevadas. Fora de qualquer contingente dignóstico ou terapêutico.

O valor médio da RBE dos modelos experimentais sem restrições no sistema de reparo deste estudo estão em aproximados aos descritos na literatura [Brenner e Amols, 1989; Kellerer, 2002; Kellerer e Chen, 2003]. Estudos em torno dos espectros de elétrons de diferentes energias, como os referenciados anteriormente, sugerem que a RBE dos feixes de raios X com tensão aproximada a 28 kVp em relação ao feixe padrão, ou de referência (raios  $\gamma$  e/ou raios X com tensão entre 150-250 kVp), será entre 1 e 2. Esse valor também está de acordo com outros trabalhos desenvolvidos em colaboração em nosso laboratório, onde foi determinado  $RBE=1,3\pm 0,1$  definido por simulação com código de Monte Carlo [Bernal et al., 2011].

Normalmente, conforme a literatura, os diferentes estudos de determinação da RBE, a qual ela é estabelecida mediante a exposição do meio a diferentes radiações, de alta e baixa transferência linear de energia (LET), apresentam como resultado uma redução da RBE por meio da diminuição da porcentagem de sobrevivência, ou qualquer outro atributo similar utilizado no estudo [Goggelmann et al, 2003; Nikjoo e Lindborg, 2010; Depuydt et al, 2013]. Todavia, na tabela de porcentagem de sobrevivência construída neste estudo, para a cultura de células MCF-10A, não transcorreu dessa forma. A RBE da MCF-10A aumenta com a redução da porcentagem de sobrevivência.

Estudos relacionados a determinação da RBE comumente utilizam doses muito elevadas, fora do intervalo de diagnóstico. E quando trabalham com baixas doses, normalmente, não trabalham exclusivamente com modelos experimentais que não sejam provenientes de uma linhagem celular não-tumorogênica, assim como é a MCF-10A. Dentro da literatura para realizar este estudo encontrei dois trabalhos que trabalharam com a eficiência biológica relativa de cultura de células mamárias não tumorogênicas expostas a baixas doses de feixes de raios X de baixa tensão [Lehnert et al., 2006; Mills et al., 2015]. Mills utilizou a mesma linhagem de células utilizadas neste trabalho (MCF-10A) enquanto Lehnert utilizou uma linhagem de células de glândulas mamárias a MCF-12A.

O valores encontrados por Mills e Lehnert foram respectivamente  $RBE_M=1,1\pm 0,2$  e  $RBE_{0,1}=1,13\pm 0,03$ , que são próximos ao encontrado neste estudo, além de estar dentro do intervalo de 1 a 2 da literatura. Lehnert ressalta que a eficiência dos raios X de baixa tensão foi significativamente maiores do que 1 para frações de sobrevivência na faixa de 0,005 a 0,2. Comenta que o fato é bastante incomum, uma vez que demonstra um aumento no ombro da curva de sobrevivência após a exposição aos raios X de 25 kV. Como ocorreu nas doses mais baixas do ensaio clonogênico realizado neste trabalho.

Lehnert e colaboradores não mencionam ou conjecturam o efeito hormesis em seu trabalho, como suposição do aumento da curva de sobrevivência após a exposição aos raios X de 25 kV. Mas criticam a hipótese de que a exposição desse tipo celular aos raios X de 25 kV aumentem a fração de sobrevivência devido a hipersensibilidade da célula desencadeando uma radioresistência a baixas doses. Eles acreditam que estudos mais abrangentes devem ser realizados para tentar compreender a incerteza da RBE a baixas doses.

A maioria das análises realizadas neste trabalho demonstraram que o feixe de raios X de 28 kVp foi mais efetivo na redução das frações de sobrevivência do que o feixe de 150 kVp, mesmo a diferença tendo sendo sutil nos modelos experimentais sem nenhuma restrição ao reparo (cepa AB1157 e cultura de células MCF-10A). Possivelmente, a sua maior eficiência está associado as suas lesões ocorrerem mais próximas umas das outras, o que dificulta para o sistema de reparo realizar a manutenção de forma efetiva. Supostamente a proximidade das lesões ocorram da maior capacidade de interação da energia disponibilizada pelo feixe ao meio. Entretanto, o ensaio cometa demonstrou que a cultura de células foi capaz de regenerar de forma surpreendente o efeito da exposição à radiação em um período de 24h. O efeito e eficiência da exposição à radiação ionizante de baixa transferência de energia (LET) e a baixas doses deve ser melhor estudado. Ainda existem muitas lacunas sobre a compreensão do efeito da exposição a baixas doses desse tipo de radiação; como, o aumento da fração de sobrevivência e até que ponto o sistema de reparo é benéfico ou maléfico. Para só então determinar um valor de RBE, que talvez seja específico para esse tipo de radiação, e não generalizar como 1 para qualquer raios X diagnóstico.

## CONCLUSÃO

Os ensaios realizados neste estudo demonstraram que existem diversas variáveis no cálculo da eficiência relativa biológica de um sistema biológico, como por exemplo: a tensão do feixe de raios X, o meio irradiado e a dose administrada.

Além das variáveis físicas também existem as variáveis biológicas. Como a deficiência de uma única via de reparo de lesões oxidativas, que pode estabelecer diferença no efeito da exposição à radiação, mesmo havendo uma outra via similar que é responsável pelo mesmo tipo de lesão, como foi o caso da curva de sobrevivência da cepa JW0704-1. Apesar das lesões, em um primeiro momento, serem muito numerosas, o sistema de reparo possui grande capacidade de reparação, como demonstrado no ensaio cometa. Ao mesmo tempo, a tentativa de reparo pode comprometer a sobrevivência da célula, uma vez que uma lesão supostamente simples pode tornar-se grave. Ou seja, um sítio abásico e/ou uma quebra de fita simples podem gerar uma lesão mais séria como a quebra de fita dupla, como ilustrado pelos experimentos com plasmídeo e a enzima endonuclease VIII.

Entretanto, estudos mais aprofundados teriam que ser realizados para evitar conclusões errôneas sobre o efeito e a efetividade da exposição a pequenas doses de radiação de baixa LET em modelos experimentais e organismos. Além de tentar compreender porque dentro de um determinado intervalo de baixas doses os modelos íntegros deste estudo aparentaram terem sido estimulados a crescer em vez de reduzir sua fração de sobrevivência. Mais adiante, também seria interessante realizar estudos onde pudesse ser avaliado o efeito estocástico a baixas doses, uma vez que existe a possibilidade de repetição de nova exposição à radiação, já que o propósito é diagnóstico, principalmente exames de rastreamento para detecção precoce de disfunção.

## REFERENCIAS

1. Adelstein SJ. *Biologic responses to low doses of ionizing radiation: adaptive response versus bystander effect.* J Nucl Med. 2003.44(1):125-126.
2. Azzam EI, Raaphorst GP, Mitchel RE. *Radiation-induced adaptive response for protection against micronucleus formation and neoplastic transformation in C3H 10T 1/2 mouse embryo cells.* Radiat Res. 1994.138(1):s28-31.
3. Balajee AS, Bertucci A, Taveras M, Brenner DJ. *Multicolour FISH analysis of ionising radiation induced micronucleus formation in human lymphocytes.* Mutagenesis. 2014.29(6):447-455.
4. Beels L, Werbrouck J, Thierens H. *Dose response and repair kinetics of  $\gamma$ -H2AX foci induced by in vitro irradiation of whole blood and T-lymphocytes with X- and  $\gamma$ -radiation.* Int. J. Radiat. Biol. 2010.86(9):760-768.
5. Bernal MA, de Almeida CE, Sampaio C. *The invariance of the total direct DNA strand break yield.* Med. Phys. 2011.38(7):4147-4152.
6. Bernal MA, de Almeida CE, David M, Pires E. *Estimation of the RBE of mammography-quality beams using a combination of a Monte Carlo code with a B-DNA geometrical model.* Physics in Medicine and Biology. 2011.56:7393-7403.
7. Bernstein C, Bernstein H, Payne CM, Garewal H. *DNA repair/Pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis.* Mutation Research. 2002.511:145-178.
8. Bertram JS. *The molecular biology of cancer.* Mol Aspects Med. 2000.21(6):167-223.
9. Beyreuther E, Dörr W, Lehnert A, Lessmann E, Pawelke J. *Relative biological effectiveness of 25 and 10 kV X-rays for the induction of chromosomal aberration in two human mammary epithelial cells lines.* Radiation Environ BioPhys. 2009.48:333-340.
10. Blasdell JO and Wallace SS. *Abortive base-excision repair of radiation-induced clustered DNA lesions in Escherichia coli.* PNAS. 2001. 98(13):7426-7430.
11. Blasdell JO, Harrison L and Wallace SS. *Base excision repair processing of radiation-induced clustered DNA lesions.* Radiat. Prot. Dosim. 2001. 97(1):25-31.

12. Blankenbecler R. *Low-dose pretreatment for radiation therapy dose response*. 2010.8:534-42.
13. Blankenbecler RB. *Low-dose radiation induces potentially cytoprotective gene activity in neoplastic canine cells: demonstration of effects in vitro and implications for*. *Radiation therapy*. 47(5), p. 199-34, 2010.
14. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria 453, 01/06/1998. Portaria SVS/MS 453, 01/06/1998, v. 1, 1998.
15. Brenner DJ, Amols HI. *Enhanced risk from low-energy screen-film mammography x-rays*. *Br J Radiol*. 1989.62:910-914.
16. Brenner DJ, Doll R, Goodhead DT, Hall EJ, Land CE, Little JB, Lubin JH, Preston DL, Preston RJ, Puskini JS, Ron E, Sachs RK, Samet JM, Setlow RB and Zaider M. *Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: Assessing what we really know*. *PNAS*. 2003. 100(24):13761-66.
17. Bresler SE, Noskin LA, Suslov AV. *Induction by gamma-irradiator of double strands breaks of Escherichia coli chromosomes and their role in cell lethality*. *Biophys J*. 1984. 45:749-54.
18. Bushong SC. *Radiologic Science for Technologists – Physics, Biology and Radiation Protection*, 6<sup>th</sup>, Missouri: Mosby Company, 1997.
19. Butala M, Klose D, Hodnik V, Rems A, Rodlesek Z, Klave JP, Anderluh G, BUSky SJ, Steinhoff HJ, Zgur-Bertok D. *Interconversion between bound and free conformation of LexA orchestrate the bacterial SOS response*. *Nucleic Acids Res* 2011 39:6546-6557.
20. Cadet J, Ravanat JL, TavernaPorro M, Menoni H, Angelov D. *Oxidatively generated complex DNA damage: Tandem and clustered lesions*. *Cancer Letters*. 2012. 327:5-15.
21. Cappuccino JG and Sherman N. 1999. *Microbiology: a laboratory manual* (California, Benjamin Cummings Science Publishing).
22. Charlton DE, Nikjoo H, Humm JL. *Calculation of initial yields of single-strands and double-strands breaks in cell-nuclei from electrons, protons and alpha-particles*. *International Journal of Radiation Biology*. 1989.56:1-19.

23. Chen J, Einstein AJ, Fazel R, Krumholz HM, Wang Y, Ross JS, Ting HH, Shah ND, Nasir K, Nallamothu BK. *Cumulative exposure to ionizing radiation from diagnostic and therapeutics cardiac image procedures: a populaion-based analysis*. J Am Coll Cardiol 2010 Aug 24; 56(9): 702-711.
  
24. Collins SJ, Schwaninger JM, Ntambi AJ, Keller TW, Nelson WG, Dillehay LE, DeWeese TL. *Evasion of early cellular response mechanisms following low level radiation-induced DNA damage*. The Journal of Biological Chemistry. 2004. 279:49624-49632.
  
25. Courcelle J, Hanawalt PC. RecA-dependent recovery of arrested DNA replications forks. Annu Rev Genet 2003 37:611-646.
  
26. Curtis SB. *Lethal and potentially lethal lesions induced by radiation—a unified repair model*. Radiat Res.1986.106(2):252-270.
  
27. Francisco DC, Peddi P, Hair JM, Flood BA, Cecil AM, Kalogerins PT, Sigounas G, Geogarkilas AG. *Induction and processing of complex DNA damage in human breast cancer cells MCF-7 and nonmalignant MCF-10A cells*. Free Radical Biology & Medicine. 2008.44:558-569.
  
28. Da Silva, J., Freitas, TR.O, Marinho, JR., Speit, G., e Erdtmann, B. *Alkaline Single-Cell Gel Electrophoresis (Comet Assay) to Environmental In Vivo Biomonitoring With Native Rodents*. Genetics and Molecular Biology, 2000. 23 (1), 241-245.
  
29. Depuydt J, Baert A, Vandersickel V, Thierens H and Vral A. *Relative biological effectiveness of mammography X-rays at the level of DNA and chromosomes in lymphocytes*. International Journal of Radiation Biology.2013.89(7):532-538.
  
30. Dincer Y, Sezgin Z. *Medical radiation exposure and human carcinogenesis-genetic and epigenetic mechanisms*. Biomed Environ Sci. 2014.27(9):718-28.
  
31. DNA Damage and Repair, vol.1: *DNA Repair in Prokaryotes and Lower Eukaryotes*. Totowa: Humana Press Inc, 1998.
  
32. Eccles LJ, O'Neill P, Lomax ME. *Delayed repair radiation induced clustered DNA damage: Friend or foe?* Mutation Research.2011.711:134-141.
  
33. Egan AJF, Vollmer W. *The physiology of bacterial cell division*. Annals Of The New York Academy of Sciences.2013:8-28.

34. Ellsworth DL, Ellsworth RE, Liebman MN, Hook JA, Shriver CD. *Genomic instability in histologically normal breast tissue: implications for carcinogenesis*. Lancet. 2004.5:753-758.
35. Feinendegen LE. *Evidence for beneficial low level radiation effects and radiation hormesis*. Br J Radiol. 2005. 78:3-7.
36. Fonseca AS, Moreira TO, Paixão DL, Farias FM, Guimarães OR, de Paoli S, Geller M, de Paoli F. *Effects of laser therapy on DNA damage*. Laser Surg. Med. 2010. 42:481-488.
37. Franco R, Sanches-Olea R, Reyes-Reyes EM, Anayiotidis MI. *Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: ménage a trios*. Mut Res-Gen Tox En. 2009.674:3-22.
38. Franken NAP, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. *Clonogenic assay of cells in vitro*. Nature Protocols.2006.1(5):2315-2319.
39. Frankenberg D, Frankenberg-Schwager M, Garg I, Pralle E, Uthe B, Greve B, Severin E and Göhde W. *Mutation induction and neoplastic transformation in human and human-hamster hybrid cells: dependence on photon energy and modulation in the low-dose range*. J. Radiol. Prot. 2002. 22:A17-A20.
40. Frankenberg D, Kelnhofer K, Bar K and Frankenberg-Schwager M. *Enhanced neoplastic transformation by mammography x-rays relative to 200 kVp x-rays: Indication for a strong dependence on photon energy of RBE for various end points*. Radiation Research. 2002. 157:99-105.
41. Frankenberg D, Kelnhofer K, Garg I, Bär K and Frankenberg-Schwager M. *Enhanced mutation and neoplastic transformation in human cells by 29 kVp relative to 200 kVp x-rays indicating a strong dependence of RBE on photon energy*. Radiat. Prot. Dosim. 2002. 99:261-264.
42. Frankenberg-Schwager M, Garg I, Frankenberg D, Greve B, Severin E, Uthe D, Gohde W. *Mutagenicity of low-filtered 30 kVp X-rays, mammography X-rays and conventional X-rays in cultured mammalian cells*.2002.Int. J. Radiat. Biol.78(9):781-789.
43. Friedberg EC. *DNA repair and mutagenesis*. Washington DC., ASM Press, 2006.
44. Fuji S, Funchs RP. *Defining the position of the switches between replicative and bypass DNA polymerases*. EMBO J. 2004.23:4342-4352.

45. Fuji S, Gasser V, Funch RP. *The biochemical requirements of DNA polymerase V-mediated translesions synthesis revisited*. J Mol Biol. 2004.341:405-417.
46. Gaillard H, Garcia-Muse T, Aguilera A. *Replication stress and cancer*. Nat Rev Cancer. 2015.15:276-289.
47. Goggelmann W, Jacobsen C, Panzer W, Walsh L, Roos H and Schmid E. *Re-evaluation of the RBE of 29 Kv x-rays (mammography x-rays) relative to 220 kV using neoplastic transformation of human CGL1-hybrid cells*. Radiation Environ. Biophys. 2003. 42:175-182.
48. Gomolka M, Rössler U, Hornhardt S, Walsh L, Panzer W, Schmid E. *Measurement of the initial levels of DNA damage in human lymphocytes induced by 29 kV x-rays (mammography x-rays) relative to 220 kV x-rays and  $\gamma$  rays*. Radiat Res. 2005.163:510-9.
49. Goodhead DT. *The initial physical damage produced by ionizing radiation*. Int. J. Radiat. Biol. 56:623-634.
50. Goodhead DT. *Initial events in the cellular effects of ionizing radiation: cluster damage in DNA*. Int J Radiation Biol. 1994.65:7-17.
51. Hall EL. *Radiobiology for the radiologist*. Philadelphia: Lippincott Wilkins & Willians, 2006.
52. Hancock SL, Tucker MA, Hoppe RT. *Breast cancer after treatment of Hodgkin's disease*. Journal National Cancer Institute 1993 85:25-31.
53. Harrison L, Hatahet Z, Purnal AA, Wallace SS. *Multiply damaged sites in DNA: interactions with Escherischia coli endonuclease III and VIII*. Nucleic Acids Res. 1998.26:932-941.
54. Harrison L and Malyarchuk S. *Can DNA repair cause enhanced cell killing following treatment with ionizing radiation?*. Pathophysiology. 2002. 8:149-159.
55. Harrison L, Hatahet Z, Wallace SS. *In vitro repair of synthetic ionizing radiation-induced multiply damaged DNA sites*. J. Mol. Biol. 1999. 290:667-684.
56. Heller A. *Cells respond uniquely to low-dose ionizing radiation*. S &TR. 2003.12-20.

57. Heyes GJ, Mill AJ. *The neoplastic transformation potential of mammography X-rays and atomic bomb spectrum radiation*. 2004. *Radiation Research*. 162(2):120-127.
58. ICRP, *The 2007 Recommendation of the International Commission on Radiological Protection*. ICRP Publication 103. Ann ICRP, 2007; 37.
59. Imlay JA. *The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium*. *Nature Reviews-Microbiology*. 2013. 11:443-453.
60. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSE DE ALENCAR GOMES DA SILVA. Apresenta informações gerais sobre índices de câncer de mama. Disponível em: <[www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br)>. Acesso em: 25/01/2017.
61. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Apresenta “Annual Report 2010” Disponível em: [https://www.iaea.org/sites/default/files/publications/reports//anrep2010\\_full.pdf](https://www.iaea.org/sites/default/files/publications/reports//anrep2010_full.pdf). Acesso em: 10/06/2015.
62. *Introdução à Radiobiologia: conexões bioquímicas e biomoleculares*. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2010.
63. Jiang D, Hatahet Z, Blaisdell JO, Melamede RJ and Wallace SS. *Escherichia coli endonuclease VIII: Cloning, sequencing and overexpression of the nei structural gene and characterization of nei and nei nth mutants*. *Journal of Bacteriology*. 1997. 179(11):3773-3782.
64. Junqueira JC. *Biologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
65. Kaadhim MA, Moore SR, Goodwin EH. *Interrelationships amongst radiation-induced genomic instability, bystander effects, and adaptive response*. *Mutat Res*. 2004. 568(1):21-32.
66. Kellerer AM. *Electron spectra and the RBE of x-rays*. *Radiation Research*. 2002. 158:13-22.
67. Kellerer AM, Chen J. *Comparative microdosimetry of photon electrons and Compton electrons: An analysis in terms of generalized proximity functions*. *Radiat Res*. 2003. 160:324-333
68. Kamiya K, Ozasa K, Akiba S, Niwa O, Kodama K, Takamura N, Zaharieva E, Kimura Y, Wakeford R. *Long-term effects of radiation exposure on health*. *Lancet*. 2015. 386:469-78.

69. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer. 1972. 26(4):239-257.
70. Kühne M, Urban G, Frankenberg D, Löbrich M. *DNA double-strand break misrejoining after exposure of primary human fibroblasts to C $\alpha$  characteristic X-rays, 29 kVp X-rays and  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  Rays*. Radiation Research. 2005. 164(5):669-676.
71. Lambin P, Marples B, Fertl B, Malaise EP, Joiner EP, Joiner MC. *Hypersensitivity of human tumour cell line to very low radiation doses*. Inter J Radiat Biol. 1993. 63(5):639-650.
72. Lehnert A, Lessmann E, Pawelke J, Dörr W. *RBE of 25 kV X-rays for the survival induction of micronuclei in the human mammary epithelial cells line MCF-12A*. Radiat. Environ. Biophys. 2006. 45:253-260.
73. Lehnert A. *Biomolecular action of ionizing radiation: medical physics and biomedical engineering*. Montreal: Taylor & Francis Group, LLC, 2008.
74. Lehrer S, Rosenzweig KE. *Lung cancer hormesis in high impact states where nuclear testing occurred*. Clin Lung Cancer. 2015. 16:152-5.
75. Lindahl T and Wood RD. *Quality Control by DNA Repair*. Science. 1999. 286:1897-1905.
76. Lindahl T, Karran P and Wood RD. *DNA excision repair pathways*. Current Opinion in Genetics & Development. 1997. 7:158-169.
77. Little JB. *Radiation Carcinogenesis*. Carcinogenesis, 2000. 21:397-404.
78. Luckey TD. *Physiological benefits from low levels of ionizing radiation*. Health Phys. 1982. 43:771-89.
79. Marples B, Joiner MC. *The response of chinese hamster V79 cells to low radiation dose: evidence of enhanced sensitivity of the whole cell population*. Rad Res. 1993. 133(1):41-51.
80. Marples B, Skov KA. *Small doses of high-linear energy transfer radiation increase the radioresistance of Chinese hamster V79 cells to subsequent X-irradiation*. Rad Res. 1996. 146(4):382-387.

81. Marples B, Collis SJ. *Low-dose hyper-radiosensitivity: past, present and future*. Int. J. Radiation Biol. Phys.2008.70(5):1310-1318.
82. Mestres M, Benkhaled L, Caballín MR, Barrios L, Ribas M, Barquinero JF. *Induction of incomplete and complex chromosome aberrations by 30 kVp X-rays*. Radiation Research.2011.175(2):201-207.
83. Mifune M, Sobue T, Arimoto H, Komoto S, Tanooka H. *Cancer mortality survey in a spa area (Misasa, Japan) with a high radon background*. Japan J Cancer Res Gann. 1992.83:1-5.
84. Mills CE, Thome C, Koff D, Andrews DW and Boreham DR. *The Relative Effectiveness of Low-Dose Mammography Quality X rays in the Human Breast MCF-10A Cell Line*. Radiation Research. 2015.183(1):42-51.
85. Mitchel RE, Jackson JS, McCann RA, Boreham DR. *The adaptive response modifies latency for radiation-induced myeloid leukemia in CB/H mice*. Radiation Rsearch. 1999. 152(3):273-279.
86. Doody MM, Lonstein JE, Stovall M, Hacker DG, Luckyanov N, Land CE. *Breast cancer mortality after diagnostic radiography: Findings from the result*. U.S. Scoliosis Cohort Study. 2000 25:2052-2063.
87. Natale P, Pazos M, Vicente M. *Escherichia coli divisome: born to divide*. Environmental Microbiology.2013.15(12):3169-3182.
88. Nikjoo H and Lindborg L. *RBE of low energy electrons and photons*. Phys. Med. Biol. 2010. 55:R65-R109.
89. O'Rourke SF, McAneney H, Hillen T. *Linear quadratic and tumour control probabiliting modelling in external beam radiotherapy*. J Math Biol. 2009.58(4-5):799-817.
90. Panteleeva A, Solonina D, Brankovic K, Spekl K, Pawelke J, Hoinkis C, Dörr W. *Clonogenic survival of human keratinocytes and rodent fibroblasts after irradiation with 25 kV X-rays*. Radiation Environ BioPhys.2003.42:95-100.
91. Pauwels EKJ, Foray N, Bourguignon MH. *Breast Cancer Induced by X-Ray Mammography Screening? A Review Based on Recent Understanding of Low-Dose Radiobiology*. Medical Principles and Praticice. 2016.25:101-109.
92. Pimentel M, Santos-Rebouças C, Gallo C. *Genética Essencial*, 1<sup>th</sup>, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Ltda, 2013.

93. Pires EJ, David MG, Peixoto JG, deAlmeida CE. *Establishments of radiation qualities for mammography according to the IEC 61267 and TRS 457*. Radiation Protection Dosimetry. 2011. 145(1):45-51.
94. Pochin EE. *Problems involved in detecting increased malignancy rates in areas of high natural radiation background*. Health Phys. 1976 31:148-151.
95. Prakash A, Doublé S and Wallace SS. *The Fpg/Nei family of DNA glycosylases: substrates, structures and search for damage*. Prog Mol Biol Transl Sci. 2012. 110:71–91.
96. Prise KM, Pullar CHL, Michael BD. *A study of endonuclease III-sensitive sites in irradiated DNA: detection of  $\alpha$ -particle-induced oxidative damage*. Carcinogenesis. 1999.20(5):905-909.
97. Redpath JL, Antoniono J. *Induction of an adaptative response against spontaneous neoplastic transformation in vitro by low-dose gamma-radiation*. Rad Res. 1998.149(5):517-520.
98. Roos H and Schmid E. *Analysis of chromosome aberration in human peripheral lymphocytes induced by 5.4 keV x-rays*. Radiation Environ. Biophys. 1998. 36:251-54.
99. Saloua KS, Girouard S, Cloutier P, Sanches L and Hunting JD. *The relative contributions of DNA strands breaks, base damage and clustered lesions to the loss of DNA functionality induced by ionizing radiation*. Radiation Research. 2014. 181(1):99-110.
100. Shikzonos N, Noguchi M, Fujii K, Urushibara A and Yokoyay A. *The yield, processing, and biological consequences of clustered DNA damage induced by ionizing radiation*. J. Radiat. Res. 2009. 50:27-36.
101. Shmakova NL, Fadeeva TA, Nasonova EA, Rzianina VA. *Cytogenetic effects of low doses of radiation in mammalian cells: analysis of the hypersensitivity phenomenon and induced resistance*. Radiat Biol Radioecol. 2002.42(3):245-250.
102. Shore RE, Hildreth N, Woodart E, Dvoretzky P, Hempelmann L, Pastemack B. *Breast cancer among women given X-ray therapy for acute postpartum mastitis*. Journal National Cancer Insitute. 1986 77:689–696.
103. Sonntag V. *The chemical basis of radiation biology*. London: Taylor and Francis, 1987.
104. Sokolov M, Neumann R. *Global gene expression alterations as a crucial constituent of human cell response to low doses of ionizing radiation exposure*. Int J Mol Sci. 2016.17.

105. Stankevicius L, Silva APA, Passos FV, Ferreira ES, Ribeiro MCM, David MG, Pires EJ, Machado SCF, Vassetzky Y, de Almeida CE, Gallo CVM. *MiR-34a is up-regulated in response to low-dose, low-energy X-ray induced DNA damage in breast cells*. Radiation Oncology.2013.8:231.
106. Sutherland BM, Bennett PV, Sidorkina O, Laval J. *Clustered damages and total lesions induced in DNA by ionizing radiation: Oxidized bases and strands breaks*. Biochemistry (NY). 2000. 30:8026-8031.
107. Sutherland BM, Bennett PV, Sutherland JC and Laval J. *Clustered DNA damages induced by x-rays in human cells*. Radiation Research. 2002. 157:611-616.
108. Tauhata L, Salati IPA, Prizio RD, Prizio ARD. *Radioproteção e Dosimetria: Fundamentos*. Instituto de Radioproteção e Dosimetria. Comissão Nacional de Energia Nuclear. 5ª Revisão. Agosto: Rio de Janeiro.
109. Terradas M, Martin M, Hernandez L, Tusell L, Genesca A. *Is DNA damage ready for action anywhere?* Int J Mol Sci.2012.13:11569-11583.
110. Trevor KT, Hersh EM, Brailey J, Balloul J, Acres B. *Transduction of human dendritic cells with a recombinant modified vaccinia Ankara virus encoding MUC1 and IL-2*. Cancer Immunol. Immunother. 2001. 50:397-407.
111. Verhaegen F, Reniers B. *Microdosimetry analysis of various mammography spectra: Linear energy distribution and ionization cluster analysis*. Radiation Research.2004. 162:910-914.
112. Ward JF, Evans CL, Limoli PM, Calabro-Jones. *Radiation and hydrogen peroxide induce free radical damage to DNA*. Cancer. 1987.55:105-112.
113. Weidhaas JB, Eisenmann DM, Holub JM, Nallur SV. *A caenorhabditis elegans tissue model of radiation-induced reproductive cell death*. Proc Natl Acad Sci. 2006. 103(26):9946-9951.
114. Yang G, Li W, Jiang H, Liang X, Zhao Y, Yu D, Zhou L, Wang G, Tian H, Han F, Cai Lu, Cui J. *Low-dose radiation may be a novel approach to enhance the effectiveness of cancer therapeutics*. International Journal of Cancer. 2016.139:2157-2168.
115. Yin XM e Dong Z. *Essential of Apoptosis: A guide for basic and chemical research*. Spring Science + Business Media, LLC. New York: 2003.