

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA PARA SUSTENTABILIDADE
DEPARTAMENTO DE FÍSICA, QUÍMICA E MATEMÁTICA

Jullyana Mendes Vasconcelos

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS GERADOS EM
QUERATINÓCITOS IMORTALIZADOS (HACAT) PELA EXPOSIÇÃO
A RAIOS X POLICROMÁTICOS E DE BAIXO FLUXO**

Sorocaba

2024

Jullyana Mendes Vasconcelos

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS GERADOS EM
QUERATINÓCITOS IMORTALIZADOS (HACAT) PELA EXPOSIÇÃO
A RAIOS X POLICROMÁTICOS E DE BAIXO FLUXO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Licenciatura Plena em Física para obtenção do título de Licenciado em Física.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Adriana de Oliveira Delgado Silva

Coorientação: Prof. Dr. Murilo de Carvalho

Financiamento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo nº 122288/2022-0

Sorocaba

2024

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS****COORDENAÇÃO DO CURSO DE LICENCIATURA EM FÍSICA - SOROCABA - CCFL-So/CCTS**

Rod. João Leme dos Santos km 110 - SP-264, s/n - Bairro Itinga, Sorocaba/SP, CEP 18052-780

Telefone: (15) 32298859 - <http://www.ufscar.br>

DP-TCC-FA nº 2/2024/CCFL-So/CCTS

Graduação: Defesa Pública de Trabalho de Conclusão de Curso**Folha Aprovação (GDP-TCC-FA)****FOLHA DE APROVAÇÃO****JULLYANA MENDES VASCONCELOS****AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS GERADOS EM QUERATINÓCITOS IMORTALIZADOS (HACAT) PELA EXPOSIÇÃO A RAIOS X POLICROMÁTICOS E DE BAIXO FLUXO****Trabalho de Conclusão de Curso****Universidade Federal de São Carlos – Campus Sorocaba**

Sorocaba, 31 de janeiro de 2024

ASSINATURAS E CIÊNCIAS

Cargo/Função	Nome Completo
Orientadora	Profa. Dra. Adriana de Oliveira Delgado Silva
Membro da Banca 1	Prof. Dr. Airton Natanael Coelho Dias
Membro da Banca 2	Prof. Dr. Walter Ruggeri Waldman



Documento assinado eletronicamente por **Adriana de Oliveira Delgado Silva, Docente**, em 06/02/2024, às 19:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Airton Natanael Coelho Dias, Docente**, em 07/02/2024, às 17:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Walter Ruggeri Waldman, Docente**, em 16/02/2024, às 09:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.ufscar.br/autenticacao>, informando o código verificador **1331604** e o código CRC **014E5684**.

Referência: Caso responda a este documento, indicar expressamente o Processo nº 23112.001399/2024-60

SEI nº 1331604

Modelo de Documento: Grad: Defesa TCC: Folha Aprovação, versão de 02/Agosto/2019

Agradecimentos

A Deus, por me amparar em toda minha vida e me permitir sonhar e realizar meus sonhos.

A minha família, por ser a base de quem sou hoje.

Aos meus amigos, por me apoiarem e compreenderem meus momentos de ausência.

Ao meu orientador de Iniciação Científica Dr. Murilo de Carvalho, por me instruir ao longo de todo o projeto, em conjunto com a Dra. Renata Tavares, minha principal colaboradora e instrutora.

A Dra. Sandra Martha Dias, por colaborar com o projeto do início ao fim.

A minha orientadora do Trabalho de Conclusão de Curso Profa. Dra. Adriana Delgado por me incentivar antes da graduação e me apoiar ao longo dela.

A minha amiga e colaboradora, Isabela Castro, por me ensinar tanto e me aconselhar sempre.

Aos precursores do meu projeto, Fernanda Moura e Fernando Bacchim, que prepararam o caminho e me apoiaram ao longo dele.

Aos colegas do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), especialmente dos grupos LIB e PMT, por tornarem a rotina laboratorial ainda mais agradável.

Aos colegas do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), especialmente dos grupos RAD, por me incentivarem sempre e tornarem a vida mais leve, e DET, por me incluírem no cronograma.

A todos os meus professores, desde o ensino fundamental até a graduação, por me fornecerem as bases teóricas, técnicas e de experiência de vida que me permitiram chegar até aqui.

A empresa Sagra Landauer, por se disponibilizar a fornecer seu material gratuitamente.

Ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) como um todo, por prover um ambiente agradável, motivador e repleto de ciência de ponta.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por financiar o projeto.

A todos que de alguma forma se fizeram presentes ao longo de minha incrível jornada neste pálido ponto azul até agora.

“Nós somos uma maneira do Cosmos conhecer a si mesmo.”
(Carl Sagan)

Resumo

O Sirius, acelerador síncrotron brasileiro, é capaz de investigar a matéria utilizando especialmente raios X. Os raios X possuem energia suficiente para ionizar a matéria e acabam por causar danos a materiais biológicos, que compõem grande parte das amostras estudadas no Sirius. Neste trabalho, foram avaliados os danos biológicos causados em queratinócitos imortalizados por raios X gerados em uma fonte de bancada. Com isso, foi possível a elaboração de um protocolo de preparo de amostra e de avaliação de efeitos biológicos dos raios X que poderá, posteriormente, ser estendido aos experimentos nas diversas linhas de luz do Sirius. O método de preparo de amostras desenvolvido consistiu em uma composição de meio de cultura Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) e agarose, de modo a imobilizar placas de cultura verticalmente, além de hidratar e nutrir as células da linhagem HaCaT. O preparo foi bem-sucedido tanto de forma técnica quanto biológica, como indicado pelos resultados do teste de viabilidade celular resazurina, que mostrou células nutridas e viáveis após serem submetidas ao meio composto com agarose. As irradiações foram feitas utilizando o gerador de raios X *Mini-X2*, com tensão de 70 kV e corrente de até 140 μ A. A taxa de dose foi determinada a partir de simulações computacionais com o *software* SpekCalc e validadas com dosímetros termoluminescentes (TLD) e de luminescência opticamente estimulada (OSLD). Os valores de taxa de dose resultaram em $(3,19 \pm 0,14)$ Gy/h sem agarose e aproximadamente 1,89 Gy/h com agarose. O intervalo de doses utilizado para irradiação das células foi de 0 a 4 Gy. O teste de resazurina indicou que os valores de dose utilizados não foram altos o suficiente para gerar danos observáveis nas células considerando o intervalo de tempo testado. Com o ensaio de espécies reativas de oxigênio (ROS), que utiliza a sonda química DCFH₂-DA, observou-se uma tendência de aumento de ROS em função do aumento da dose, mas o pico de produção se deu em 2 Gy, sendo que o esperado seria em 4 Gy. Isto eventualmente se deve aos mecanismos antioxidantes das células, que eliminam as ROS em vez de armazená-las linearmente. Com os ensaios DAPI, marcador fluorescente e intercalante de DNA, e clonogênico, foi possível verificar que após 6 dias de incubação das células inicialmente irradiadas, houve uma diminuição da proliferação celular conforme o aumento da dose recebida. Isso indica que mesmo com doses relativamente baixas, é possível observar danos se for feito um acompanhamento temporal. Em suma, os resultados obtidos mostraram que os protocolos de preparo de amostras e avaliação dos efeitos da irradiação podem ser estendidos às várias linhas de luz do Sirius, o que é fundamental para os estudos com amostras biológicas.

Palavras-chave: raios X; dosimetria; danos biológicos.

Abstract

Sirius, the Brazilian synchrotron accelerator, is capable of investigating matter, especially using X-rays. X-rays have enough energy to ionize matter and end up causing damage to biological materials, which constitute a large part of the samples studied at Sirius. In this work, the biological damage caused in immortalized keratinocytes by X-rays generated in a benchtop source was evaluated. This allowed the development of a sample preparation and evaluation protocol for the biological effects of X-rays, which could later be extended to experiments in the various beamlines of Sirius. The developed sample preparation method consisted of a composition of Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) culture medium and agarose, immobilizing culture plates vertically and hydrating and nourishing HaCaT cell lineage. The preparation was successful both technically and biologically, as indicated by the resazurin cell viability test results, showing nourished and viable cells after exposure to the agarose-composed medium. Irradiations were performed using the Mini-X2 X-ray generator, with a voltage of 70 kV and a current of up to 140 μ A. The dose rate was determined from computational simulations with the SpekCalc software and validated with thermoluminescent dosimeters (TLD) and optically stimulated luminescence dosimeters (OSLD). The dose rate values resulted in (3.19 ± 0.14) Gy/h without agarose and approximately 1.89 Gy/h with agarose. The dose range used for cell irradiation was from 0 to 4 Gy. The resazurin test indicated that the dose values used were not high enough to generate observable damage to the cells within the tested time frame. With the reactive oxygen species (ROS) assay using the chemical probe DCFH₂-DA, a trend of increasing ROS was observed with increasing dose, but the peak production occurred at 2 Gy, while it was expected at 4 Gy. This is eventually attributed to the antioxidant mechanisms of cells, which eliminate ROS instead of storing them linearly. With DAPI assays, a fluorescent DNA marker, and clonogenic assays, it was possible to verify that after 6 days of incubation of initially irradiated cells, there was a decrease in cell proliferation with an increase in the received dose. This indicates that even with relatively low doses, damage can be observed with temporal monitoring. In summary, the results obtained showed that the sample preparation and irradiation effects evaluation protocols can be extended to various beamlines of Sirius, which is crucial for studies involving biological samples.

Keywords: X-rays; dosimetry; biological damages.

Lista de Figuras

Figura 1.1 – Linha do tempo do desenvolvimento do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Organização Social (OS) que abriga o Sirius.	14
Figura 2.1 – Radiações direta e indiretamente ionizantes.	17
Figura 2.2 – Representação visual do espectro eletromagnético.	18
Figura 2.3 – Seções de choque da absorção fotoelétrica e do espalhamento Compton para os principais elementos componentes de tecidos biológicos	19
Figura 2.4 – Processos subsequentes à (a) ejeção de um elétron atômico. (b) emissão de raios X característicos ou (c) emissão de um elétron Auger.	22
Figura 2.5 – Esquema gerador de raios X.	24
Figura 2.6 – Exemplo espectro de raios X.	24
Figura 2.7 – Diagrama do acelerador Sirius, onde destaca-se (1) Acelerador linear; (2) Booster; (3) Anel de Armazenamento e (4) Linhas de Luz.	25
Figura 2.8 – Escala de tempo dos efeitos da exposição de sistemas biológicos à radiação.	29
Figura 2.9 – Diferentes destinos possíveis após irradiação de células.	31
Figura 3.1 – Arranjo experimental. Corte transversal da câmara de vácuo em que o <i>Mini-X2</i> é utilizado. Fora de escala.	32
Figura 3.2 – <i>Mini-X2</i> .	33
Figura 3.3 – Tela inicial do <i>SpekCalc</i> com o espectro padrão gerado.	34
Figura 3.4 – Preparo e posicionamento das amostras na câmara de vácuo. (a) Fixação dos dosímetros nas 4 primeiras condições, (b) na última condição, (c) alinhamento dos dosímetros ao centro do feixe e (d) posicionamento final das amostras dentro da câmara de vácuo.	35
Figura 3.5 – Condições de exposição dos dosímetros OSLD e TLD, sendo $d \approx 15$ cm. Gerador: 70 kV, 140 μ A, 30 cm.	36
Figura 3.6 – Unidade constituinte das cadeias poliméricas da agarose.	37
Figura 3.7 – Layout da placa de 6 poços para o teste inicial com Agarose 1%.	39
Figura 3.8 – Layout das placas de 12 poços para o experimento de (a) 2 horas de incubação com agarose e de (b) 19 horas de incubação com agarose. Com este <i>layout</i> , utilizou-se 6 placas de 12 poços para a realização dos dois experimentos.	40
Figura 3.9 – Condições de exposição para os experimentos D, T e R. Células com a mesma cor representam a mesma condição, totalizando 7 condições diferentes.	41
Figura 3.10–(a) Posicionamento das placas dentro da câmara de vácuo e (b) distribuição e posicionamento dos dosímetros no fundo de cada placa.	41
Figura 4.1 – Gráfico da taxa de dose em função do ângulo obtido com os dados simulados no <i>SpekCalc</i> .	44

Figura 4.2 – (a) Dose absorvida em função do tempo para os dosímetros OSLD e TLD sem agarose, (b) com agarose e (c) com agarose, separados por uma distância de aproximadamente 15 cm.	46
Figura 4.3 – Imagens obtidas das células submetidas à agarose 1%	48
Figura 4.4 – Comparação entre o número de células por campo de cada um dos tratamentos – controle e agarose.	48
Figura 4.5 – Resultados do teste Giemsa para todas as condições experimentais. A = agarose, C = controle.	49
Figura 4.6 – (a) Resultados resazurina para incubação da agarose 1% por 2 e (b) por 19 horas.	50
Figura 4.7 – Dose absorvida medida com OSLDs e TLDs nas condições D, T e R.	52
Figura 4.8 – Ensaio de resazurina após irradiações.	53
Figura 4.9 – (a) <i>Boxplot</i> e <i>violin plot</i> dos resultados obtidos com o ensaio de ROS após irradiação das células na condição D. (b) Imagens de campo claro e fluorescência para cada uma das exposições específicas da condição.	54
Figura 4.10–(a) <i>Boxplot</i> e <i>violin plot</i> dos resultados obtidos com o ensaio de ROS após irradiação das células na condição T. (b) Imagens de campo claro e fluorescência para cada uma das exposições específicas da condição.	55
Figura 4.11–(a) <i>Boxplot</i> e <i>violin plot</i> dos resultados obtidos com o ensaio de ROS após irradiação das células na condição R. (b) Imagens de campo claro e fluorescência para cada uma das exposições específicas da condição.	56
Figura 4.12–(a) <i>Boxplot</i> e <i>violin plot</i> dos resultados obtidos com o ensaio de ROS após irradiação das células na condição R na semana 1 e (b) na semana 2.	57
Figura 4.13–Fluorescência com DAPI obtidas após 6 dias de incubação pós-irradiação. As imagens representativas foram obtidas do mesmo experimento e ilustram a morfologia das colônias.	57
Figura 4.14–Fração sobrevivente de células após a irradiação da (a) semana 1, (b) semana 2 e (c) da média entre as duas semanas.	58
Figura 4.15–Imagens das colônias coradas após adição do violeta cristal.	59

Lista de Tabelas

Tabela 2.1 – Regiões do espectro eletromagnético.	18
Tabela 2.2 – Principais grandezas relacionadas à radiobiologia.	23
Tabela 2.3 – Principais organelas das células animais e suas funções.	26
Tabela 2.4 – Características dos diferentes tipos de morte celular.	28
Tabela 3.1 – Especificações do <i>Mini-X2</i>	33
Tabela 3.2 – Diferentes condições testadas no experimento com agarose 1%.	40
Tabela 4.1 – Dados obtidos após segunda exposição de dosímetros ao feixe do <i>Mini-X2</i> . SD = desvio padrão.	45
Tabela 4.2 – Dados obtidos após leituras dos dosímetros em diferentes correntes de ope- ração do <i>Mini-X2</i>	52

Sumário

1	INTRODUÇÃO E HISTÓRICO DO LNLS	13
1.1	Objetivo geral	15
1.1.1	Objetivos específicos	15
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1	Interação da radiação com a matéria	16
2.1.1	Radiação	16
2.1.2	Seção de choque e processos de interação	18
2.1.2.1	Absorção Fotoelétrica	20
2.1.2.2	Espalhamento Compton	20
2.1.2.3	Processos de de-excitação: Raios X característicos e elétrons Auger	21
2.1.3	Grandezas radiológicas	22
2.1.4	Dosímetros	23
2.2	Produção de raios X	24
2.2.1	Tubos de raios X	24
2.2.2	Aceleradores síncrotron	25
2.3	Células, estresse e morte celular	26
2.3.1	Células animais	26
2.3.2	Queratinócitos	26
2.3.3	Estresse celular	27
2.3.4	Morte celular	27
2.3.5	Cultura de células e imortalização de linhagens	28
2.4	Efeitos biológicos das radiações ionizantes	29
2.4.1	Dano direto	29
2.4.2	Dano indireto	30
2.4.3	Radiossensibilidade	30
2.4.4	Respostas biológicas a dose absorvida e taxa de dose	31
3	METODOLOGIA	32
3.1	Mini-X2	32
3.1.1	Simulações	33
3.1.2	Validação da taxa de dose do <i>Mini-X2</i>	35
3.2	Compostos e ensaios biológicos	36
3.3	Elaboração do protocolo	38
3.3.1	Cultivo celular	38
3.3.2	Testes iniciais com agarose 1%	38

3.3.3	Citotoxicidade da agarose 1%	39
3.4	Irradiação das amostras biológicas	40
3.5	Ensaio biológico pós-irradiação	42
3.5.1	Citotoxicidade com resazurina	42
3.5.2	ROS com variáveis fixas no tempo, dose e taxa de dose	42
3.5.3	ROS, DAPI e ensaio clonogênico com taxa de dose fixa	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	44
4.1	<i>Mini-X2</i>	44
4.1.1	Simulações	44
4.1.2	Validação da taxa de dose	45
4.2	Elaboração do protocolo	47
4.3	Irradiação das amostras biológicas	51
4.4	Ensaio biológico pós-irradiação	53
4.4.1	Citotoxicidade com resazurina	53
4.4.2	ROS	54
4.4.3	DAPI	57
4.4.4	Ensaio Clonogênico	58
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
	Referências	62

1 Introdução e Histórico do LNLS

O desenvolvimento de tecnologias voltadas para a solução de problemas científicos nas últimas décadas é inegável. Ao passo que alguns desafios são resolvidos, outros mais profundos surgem e, com isso, se faz necessário o aprimoramento dos aparatos experimentais existentes. Foi com esse olhar que, na década de 80, o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) requisitou ao Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF) a construção de um equipamento que pudesse beneficiar as pesquisas dos cientistas brasileiros, dando início ao Projeto Radiação Síncrotron, que visava construir um acelerador de elétrons para gerar radiação eletromagnética desde o infravermelho até os raios X de alta energia – chamada radiação síncrotron (OLIVEIRA et al., 2020).

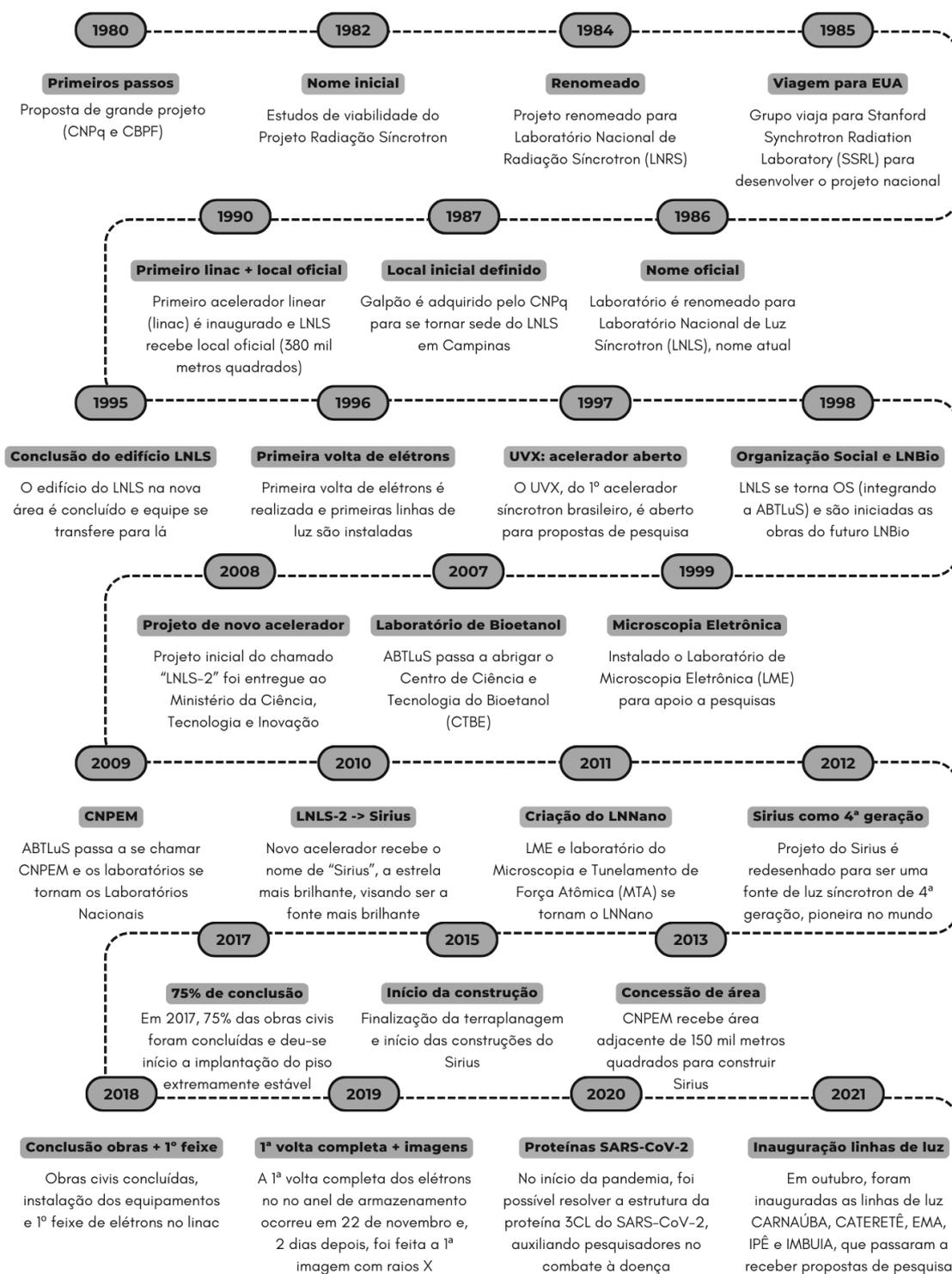
Após avaliações de viabilidade e visitas internacionais a aceleradores de partículas, foi criado formalmente em 1984 o Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), que após 15 anos de planejamento e construção deu início às suas atividades em 1997 com o acelerador UVX, o primeiro acelerador síncrotron de 2ª geração do hemisfério Sul, que beneficiou não só os cientistas brasileiros, mas toda a comunidade científica internacional (OLIVEIRA et al., 2020).

Em 2012, com o UVX em plena operação, foi apresentado um projeto para o desenvolvimento de um acelerador síncrotron de 4ª geração, que seria pioneiro em sua categoria: o Sirius. As obras foram iniciadas em 2013 e a primeira volta dos elétrons ocorreu em março de 2019. Com o potencial tecnológico superior do Sirius, o UVX encerrou suas atividades no final de 2019 (OLIVEIRA et al., 2020). A Figura 1.1 apresenta a linha do tempo detalhada do histórico de desenvolvimento do LNLS, desde as ideias iniciais, até a inauguração das primeiras linhas de luz.

Hoje, 14 linhas de luz do Sirius estão em funcionamento ou comissionamento, dando a oportunidade de pesquisadores do mundo inteiro submeterem propostas para realizar suas pesquisas nas mais diversas áreas do conhecimento em alguma delas. Dentre as técnicas experimentais disponibilizadas estão a absorção, espectroscopia, espalhamento, difração e tomografia de raios X, além de espectroscopia de infravermelho e dicroísmo circular, que podem ser realizadas em amostras geológicas, químicas, físicas ou biológicas, dependendo do problema científico a ser resolvido (LNLS, 2022).

Além das 14 linhas de luz já disponíveis para envio de propostas de pesquisa, o Sirius tem capacidade para abrigar mais 25 linhas de luz, que estão em fase de projeto ou ainda apenas em proposições iniciais. Com as linhas e com os diversos laboratórios de apoio integrado ao Sirius, bem como com a colaboração dos outros Laboratórios Nacionais, tem-se um cenário extremamente competitivo no âmbito científico, colocando o Brasil como um país de alto potencial relacionado a pesquisa e inovação (OLIVEIRA et al., 2020).

Figura 1.1 – Linha do tempo do desenvolvimento do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Organização Social (OS) que abriga o Sirius.



Fonte: Elaborado pelo autor com base em (OLIVEIRA et al., 2020).

Para todas as amostras, especialmente as biológicas vivas, como células, tecidos e até pequenos animais, é necessário realizar um preparo adequado antes da exposição à radiação nas linhas de luz, considerando os diversos fatores que podem influenciar os resultados obtidos e dada a complexidade e sensibilidade de sistemas biológicos.

No caso da realização de medidas *in vivo*, como espera-se desenvolver futuramente na linha de luz MOGNO, deve-se tomar um cuidado especial ao expor as amostras aos raios X, em qualquer escala – células, tecidos ou pequenos animais.

Os raios X são radiação ionizante, portanto, possuem potencial para danificar o material genético da amostra e inviabilizá-la, o que pode levar a resultados não esperados em experimentos específicos – especialmente longitudinais –, seja a alteração dos resultados ou até mesmo a perda da amostra.

Nesse contexto, espera-se ser possível desenvolver um protocolo de avaliação dos danos biológicos gerados por raios X, de modo a compreender os efeitos para evitá-los, seja na linha de luz MOGNO ou em qualquer outra linha de luz que se interesse pelo desenvolvimento de pesquisas *in vivo*.

1.1 Objetivo geral

Avaliar os danos biológicos causados em células de pele em cultura por raios X de fonte de bancada para desenvolvimento de protocolo de preparo de amostras e avaliação de efeitos biológicos, que poderá ser utilizado em experimentos semelhantes nas diferentes linhas de luz do Sirius.

1.1.1 Objetivos específicos

- Determinar a taxa de dose teórica do gerador de raios X *Mini-X2*, a ser utilizado nos experimentos, com auxílio do *software* SpekCalc;
- Validar experimentalmente a taxa de dose do *Mini-X2*, bem como o SpekCalc, utilizando dosímetros luminescentes;
- Desenvolver um protocolo de preparo de amostras para posicionamento vertical de placas de cultura;
- Determinar estresse mitocondrial das células expostas ao método de preparo desenvolvido e à radiação ionizante utilizando resazurina;
- Quantificar formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células imediatamente após a exposição aos raios X utilizando DCFH₂-DA;
- Avaliar a formação de clones das células irradiadas utilizando DAPI e ensaio clonogênico.

2 Fundamentação teórica

2.1 Interação da radiação com a matéria

Antes de investigar os efeitos dos raios X nas células de interesse, será feita uma breve revisão sobre o conceito de radiação, suas propriedades e sua interação com meios materiais. A proposta desta seção é apontar os principais elementos conceituais necessários ao entendimento dos processos físicos que investigaremos, sem contudo, aprofundar demasiadamente a teoria correspondente.

2.1.1 Radiação

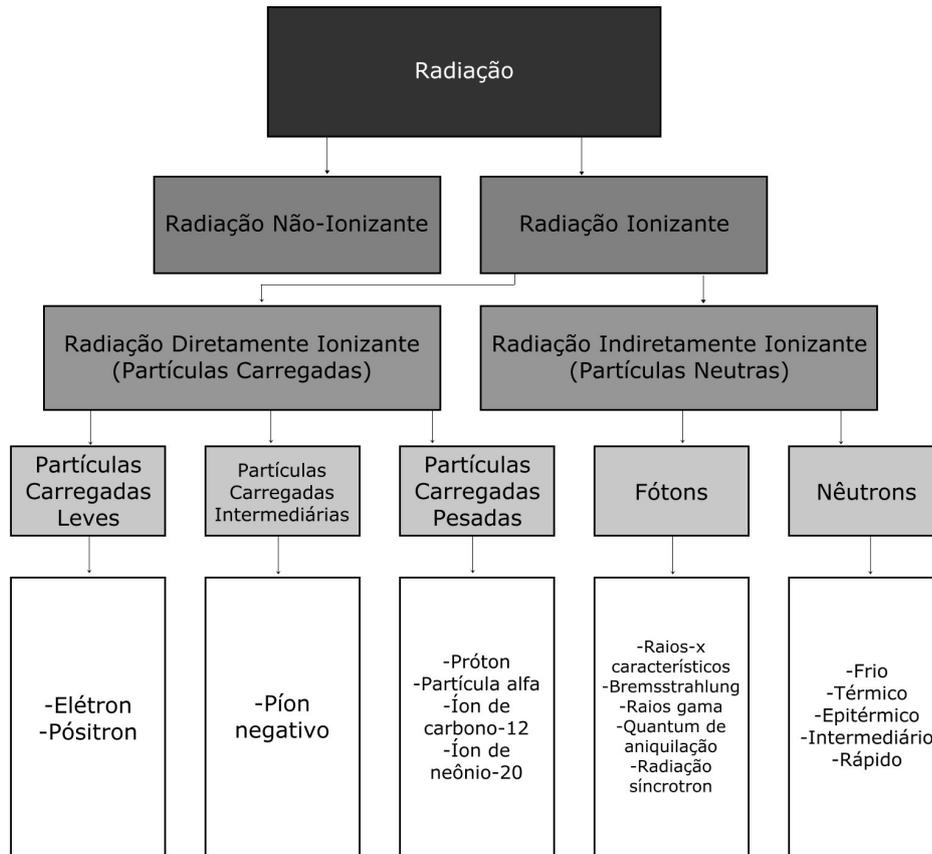
A radiação pode ser definida como energia emitida por uma fonte e transmitida através do vácuo ou de algum meio material. Uma forma usual de dividir as diferentes radiações é separá-las de acordo com sua natureza. Partículas alfa, elétrons e nêutrons, por exemplo, são classificados como radiações corpusculares, enquanto radiação infravermelha, ultravioleta e raios X são classificados como radiação eletromagnética, posto que são constituídos por ondas eletromagnéticas de diferentes frequências (OKUNO; YOSHIMURA, 2010).

Além de dividir as radiações em corpusculares e eletromagnéticas, também é possível classificá-las em radiações não-ionizantes e radiações ionizantes. As radiações não-ionizantes não possuem energia suficiente para remover elétrons da matéria, uma vez que suas energias são menores do que a energia de ionização – energia mínima para ionizar um átomo – dos átomos dos absorvedores. De modo contrário, a radiação ionizante excede a energia de ionização dos átomos e, portanto, é capaz de ionizar a matéria (PODGORSAK, 2016).

As radiações ionizantes podem ser classificadas de acordo com seu modo de ionização em radiações direta ou indiretamente ionizantes. As radiações diretamente ionizantes são partículas carregadas, como elétrons e pósitrons, que depositam energia no meio absorvedor através de interações coulombianas com seus elétrons orbitais. Por outro lado, as radiações indiretamente ionizantes não possuem carga, assim como fótons e nêutrons, e transferem energia para partículas carregadas do material absorvedor, que por sua vez são ejetadas e depositam energia no meio (PODGORSAK, 2016; ANTONI; BOURGOIS, 2017). Na Figura 2.1 estão listadas as diferentes radiações ionizantes de acordo com sua classificação.

Neste trabalho, o interesse concentra-se nos efeitos dos raios X, que consistem em radiação eletromagnética. Essa radiação possui propriedades ondulatórias ao se propagar, como é possível observar pela ocorrência de fenômenos de interferência e difração. Contudo, ao interagir com a matéria, a radiação eletromagnética possui propriedades corpusculares. Ambos os fatos foram evidenciados em 1923 pelos experimentos de Arthur Holly Compton e posteriormente por Louis de Broglie (EISBERG; RESNICK, 1994).

Figura 2.1 – Radiações direta e indiretamente ionizantes.



Fonte: Adaptado de (PODGORSAK, 2016).

Para descrição das suas propriedades corpusculares, utiliza-se a ideia de fóton, que consiste em uma partícula mediadora da interação eletromagnética. Os fótons possuem energia proporcional à frequência da radiação, cujo valor pode ser calculado de acordo com (WILLMOTT, 2019):

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda}, \quad (2.1)$$

onde h é a constante de Planck, ν é a frequência da radiação em hertz (Hz), c é a velocidade da luz no vácuo e λ é o comprimento de onda da radiação no vácuo em metros (m). Quando todas as unidades empregadas são do Sistema Internacional de Unidades (S.I.), a energia do fóton é dada em joules (J). Todavia, nas ordens de grandeza comumente utilizadas, adota-se o elétron-volt (eV), que é definido como a energia cinética adquirida por um elétron de carga $e = 1,602 \times 10^{-19}$ coulomb (C) passando por uma diferença de potencial de 1 volt (V) no vácuo (PODGORSAK, 2016; EISBERG; RESNICK, 1994; WILLMOTT, 2019).

A Tabela 2.1 apresenta as principais regiões do espectro eletromagnético de acordo com comprimento de onda, frequência e energia dos fótons de cada radiação. A Figura 2.2, por sua vez, mostra uma representação visual das diferentes regiões do espectro eletromagnético.

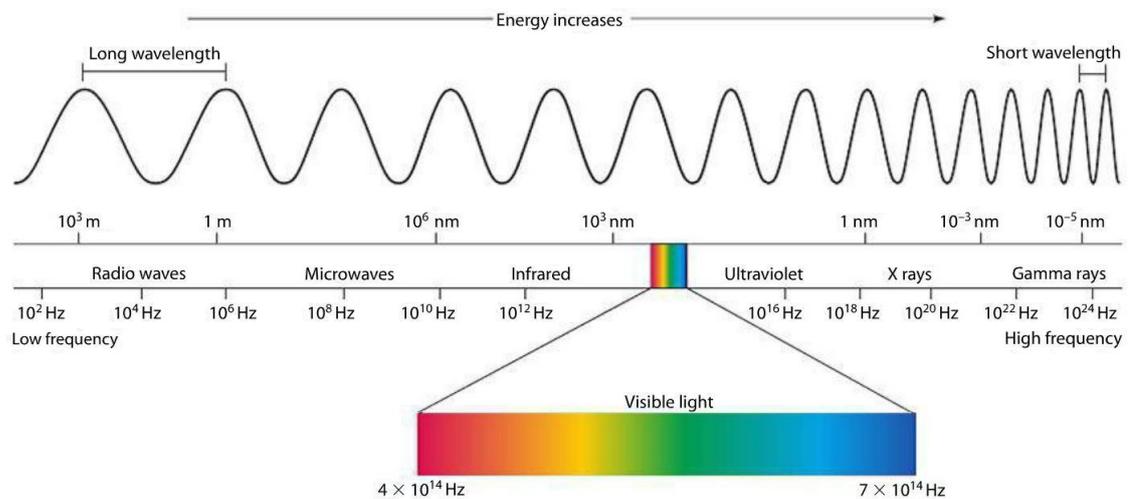
Quando a radiação emitida por uma fonte possui fótons com energias bem definidas, essa

Tabela 2.1 – Regiões do espectro eletromagnético.

Tipo da radiação	Faixa de comprimento de onda (m)	Faixa de frequência (Hz)	Faixa de energia dos fótons (eV)
Rádio	$\rightarrow \infty - 10^6$	0 – 300	Extremamente pequena
Microondas	$1 - 10^{-3}$	$300 \times 10^6 - 300 \times 10^9$	Muito pequena
Infravermelho	$10^{-3} - 780 \times 10^{-9}$	$300 \times 10^9 - 385 \times 10^{12}$	$1,24 \times 10^{-3} - 1,59$
Visível	$700 \times 10^{-9} - 400 \times 10^{-9}$	$0,428 \times 10^{15} - 0,75 \times 10^{15}$	1,77 – 3,10
Ultravioleta	$400 \times 10^{-9} - 100 \times 10^{-9}$	$0,75 \times 10^{15} - 3 \times 10^{15}$	3,10 – 12,42
raios X	$10^{-8} - 10^{-11}$	$10^{16} - 10^{19}$	> 12,42
Raios Gama	$< 10^{-11}$	$> 10^{19}$	> 12,42

Fonte: Adaptado de (OKUNO; YOSHIMURA, 2010; HOBBIE; ROTH, 2015; FINKENTHAL et al., 1996).

Figura 2.2 – Representação visual do espectro eletromagnético.



Fonte: Ade Stewart, 2019. Disponível em: https://wiki.travellerrpg.com/File:Graphic_electromagnetic_spectrum_corrected.jpg. Acesso em: 25 out. 2023.

radiação é dita monocromática. Por outro lado, se a radiação for composta de um conjunto de fótons de diferentes energias, essa radiação é dita policromática (OKUNO; YOSHIMURA, 2010).

2.1.2 Seção de choque e processos de interação

Um fóton incidente pode interagir com elétrons fortemente ligados, com elétrons orbitais considerados essencialmente livres ou com núcleos dos átomos do absorvedor (PODGORSAK, 2016).

Após interagir com a matéria, um fóton pode ser absorvido e transferir toda sua energia para um elétron, que será ejetado, ou pode ser espalhado, seja com a mesma energia incidente ou com uma energia menor. No último caso, parte de sua energia é transferida para um elétron essencialmente livre, que também será ejetado. Os elétrons ejetados depositarão energia no meio absorvedor. O tipo de interação que o fóton sofrerá depende de uma grandeza chamada seção de choque.

A seção de choque (σ) é definida como uma quantidade proporcional à probabilidade de in-

teração entre um fóton de determinada energia e um certo material. Pode ser interpretada como a área aparente que um centro de interação – seja um núcleo, um elétron ou um átomo como um todo – exhibe para que a radiação interaja com ele. O valor da seção de choque é expresso em unidades de área, no S.I., m^2 . No entanto, como se tratam de dimensões de ordens de grandeza próximas ao raio do núcleo, adota-se uma unidade especial chamada barn (b), dada por (OKUNO; YOSHIMURA, 2010; EISBERG; RESNICK, 1994; CERRITO, 2017; TAUHATA et al., 2014):

$$1 \text{ barn} = 10^{-28} \text{ m}^2. \quad (2.2)$$

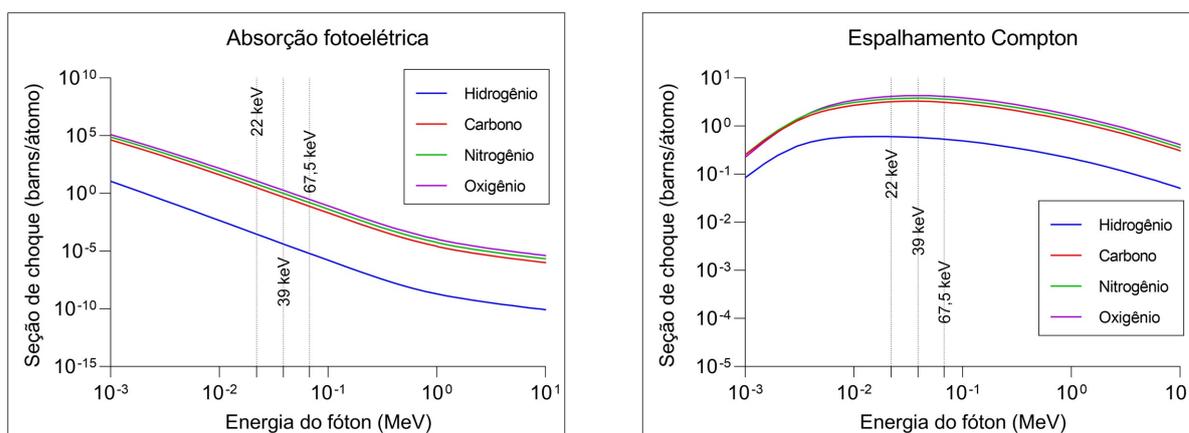
Destaca-se que, em virtude da ausência de carga e massa de repouso dos fótons, é possível que eles atravessem grandes distâncias nos materiais antes de sofrer qualquer tipo de interação (TAUHATA et al., 2014).

Fótons de baixa energia, na região do infravermelho e visível, podem promover processos de polarização das moléculas e átomos do meio, que dão origem aos fenômenos óticos (refração) e térmicos (vibração e rotação) (HOBBIE; ROTH, 2015). Esses processos não serão explorados nesse trabalho.

No caso dos fótons de alta energia, como os raios X, há tipos diferentes de interação. As que possuem maior relevância para a faixa de energia estudada e para meios materiais biológicos correspondem aos processos de absorção fotoelétrica e espalhamento Compton (PODGORSAK, 2016; EISBERG; RESNICK, 1994; YOSHIMURA, 2009).

Na Figura 2.3 são apresentadas as seções de choque do efeito fotoelétrico e do efeito Compton para os elementos hidrogênio, carbono, oxigênio e nitrogênio.

Figura 2.3 – Seções de choque da absorção fotoelétrica e do espalhamento Compton para os principais elementos componentes de tecidos biológicos



Fonte: Elaborado pelo autor a partir dos dados de (BERGER, s.d.).

Maiores detalhamentos dessas interações são apresentados a seguir.

2.1.2.1 Absorção Fotoelétrica

A absorção fotoelétrica, ou efeito fotoelétrico, ocorre quando um fóton é totalmente absorvido por um elétron orbital, que é ejetado com energia cinética E_K bem definida, recebendo o nome de fotoelétron (HOBBIE; ROTH, 2015; TAUHATA et al., 2014).

Nesse processo, energia e momento devem ser conservados, portanto, os elétrons fortemente ligados transferem momento e energia ao átomo como um todo, por meio das forças de ligação (EISBERG; RESNICK, 1994).

A energia cinética do fotoelétron ejetado é dada pela diferença entre a energia do fóton incidente e a energia de ligação E_B do elétron ao átomo em sua camada eletrônica (K, L, M...), isto é (PODGORSAK, 2016; YOSHIMURA, 2009; TURNER, 2004):

$$E_K = h\nu - E_B. \quad (2.3)$$

Após ser ejetado, o fotoelétron seguirá em uma direção dependente da energia do fóton incidente. Para energias da ordem de 10 keV, o fotoelétron tenderá a ser emitido a ângulos próximos de 90° em relação à direção de incidência do fóton. Para energias mais altas, da ordem de 3 MeV, há uma grande probabilidade de que o elétron seja ejetado na mesma direção e sentido do fóton incidente (PODGORSAK, 2016; TAUHATA et al., 2014).

Com a perda do elétron orbital, a vacância deixada no átomo será preenchida por um elétron de outra camada eletrônica e a energia da transição será emitida na forma de raios X característicos ou elétrons Auger, processos que serão discutidos mais adiante (ANTONI; BOURGOIS, 2017).

Na absorção fotoelétrica, a seção de choque é comumente referida como τ e é dada pela soma dos termos da seção de choque de cada camada eletrônica. Devido à dificuldade de descrição correta de átomos com muitos elétrons, não existe uma expressão analítica exata para a seção de choque da absorção fotoelétrica. Contudo, uma das aproximações relaciona que (OKUNO; YOSHIMURA, 2010; HOBBIE; ROTH, 2015):

$$\tau \propto Z^4 E^{-3}, \quad (2.4)$$

isto é, a probabilidade de ocorrência da absorção fotoelétrica é diretamente proporcional à quarta potência do número atômico Z e inversamente proporcional ao cubo da energia E do fóton, o que significa que o efeito é predominante para elementos de alto número atômico e para fótons de energias mais baixas (YOSHIMURA, 2009).

2.1.2.2 Espalhamento Compton

No espalhamento Compton, também chamado de efeito Compton, um fóton incide em um elétron, considerado livre e inicialmente em repouso, e é espalhado com uma menor energia a um ângulo θ em relação a sua direção original. O elétron no qual o fóton incidiu é ejetado com energia cinética E_K a um ângulo ϕ . Os detalhes dos mecanismos de interação do espalhamento

Compton, como sua cinemática, por exemplo, são descritos pela conservação de momento e energia do processo e providenciam relações importantes, como a energia cinética do elétron ejetado, que é dada por (EISBERG; RESNICK, 1994; HOBBIE; ROTH, 2015; TURNER, 2004):

$$E_K = h\nu \frac{1 - \cos\theta}{\frac{mc^2}{h\nu} + 1 - \cos\theta}, \quad (2.5)$$

e a energia do fóton espalhado, que é dada por (TURNER, 2004):

$$h\nu' = \frac{h\nu}{1 + \frac{h\nu}{mc^2}(1 - \cos\theta)}. \quad (2.6)$$

O ângulo θ de espalhamento do fóton incidente é definido como o ângulo entre sua direção inicial e sua direção após a interação, podendo variar de 0 até 180°. O elétron, por sua vez, pode ser espalhado a um ângulo ϕ que varia de 0 até 90°. Os elétrons ejetados no espalhamento Compton são chamados de elétrons Compton ou elétrons de recuo (PODGORSAK, 2016; TURNER, 2004).

No espalhamento Compton, a seção de choque é independente do número atômico do átomo com o qual o fóton interage, uma vez que a interação ocorre com um elétron livre. Sua seção de choque diferencial é determinada pelas expressões de Klein-Nishina. O efeito é predominante para todas as energias de fótons se os números atômicos são baixos e predomina para todos os elementos se as energias dos fótons estão entre centenas de keV e alguns MeV (OKUNO; YOSHIMURA, 2010; HOBBIE; ROTH, 2015; YOSHIMURA, 2009).

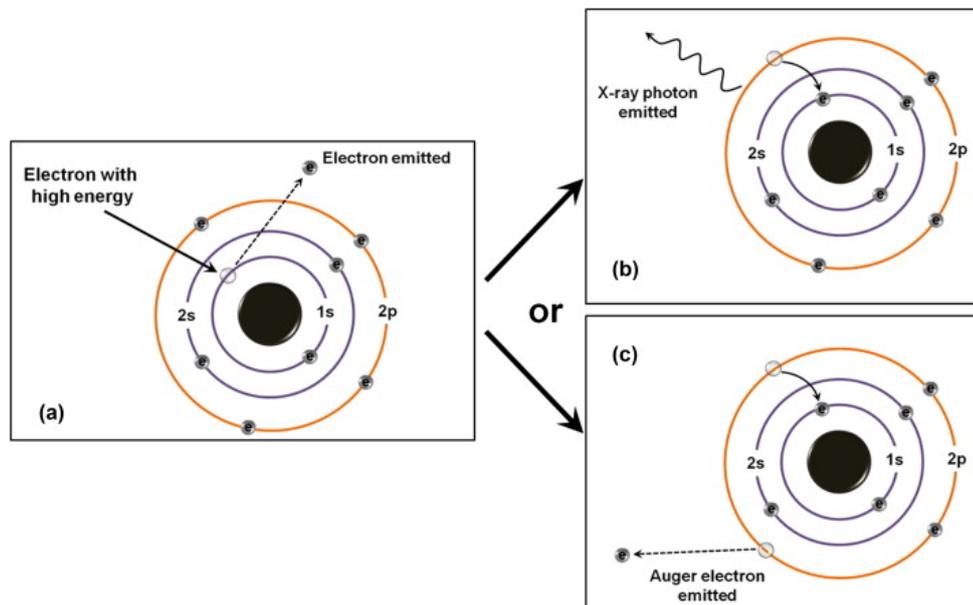
2.1.2.3 Processos de de-excitação: Raios X característicos e elétrons Auger

A ejeção de um elétron orbital de uma camada eletrônica interna devido a interação de fótons com átomos do meio absorvedor resulta em uma vacância no local onde o elétron se encontrava, deixando o átomo em um estado excitado. Os processos de de-excitação pelo qual o átomo pode passar são a emissão de raios X característicos ou de elétrons Auger (WILLMOTT, 2019).

A emissão de raios X característicos ocorre quando um elétron de uma camada mais externa muda para uma camada mais interna preenchendo a vacância anteriormente deixada e liberando o excesso de energia na forma de um fóton na faixa de raios X (PODGORSAK, 2016).

O processo de emissão de elétrons Auger, que compete com o primeiro processo, é semelhante, mas em vez de emitir um fóton de raios X, o átomo transfere o excesso de energia para um outro elétron, que também é ejetado. Em ambos os casos, pode haver um cascadeamento de emissões de raios X característicos ou de emissões de elétrons Auger após a ocorrência de uma vacância (OKUNO; YOSHIMURA, 2010; PODGORSAK, 2016). A Figura 2.4 ilustra os processos mencionados.

Figura 2.4 – Processos subsequentes à (a) ejeção de um elétron atômico. (b) emissão de raios X característicos ou (c) emissão de um elétron Auger.



Fonte: Retirado de (WANG; CHU, 2013).

2.1.3 Grandezas radiológicas

A Transferência Linear de Energia (LET, do inglês *Linear Energy Transfer*) é definida como a quantidade média de energia transferida para o meio por unidade de caminho de uma partícula carregada. No caso das radiações indiretamente ionizantes, como os raios X, o LET está associado aos elétrons liberados por absorção fotoelétrica e espalhamento Compton, bem como aos eventuais elétrons Auger liberados. Fótons são considerados radiação de baixo LET, pois possuem um baixo poder de ionização relativo e uma baixa taxa de transferência de energia, assim como os próprios elétrons (OKUNO; YOSHIMURA, 2010; TAUHATA et al., 2014).

A Tabela 2.2 apresenta uma relação das principais grandezas utilizadas na radiobiologia, definidas de forma sucinta. De maneira geral, o kerma está intimamente relacionado ao LET, a dose absorvida relaciona o quanto de energia é depositada no meio, a dose equivalente é essencial para limitar a exposição de partes específicas do corpo e para o cálculo da dose efetiva, que é crucial para estabelecer limites de exposição de corpo inteiro (OKUNO; YOSHIMURA, 2010; PODGORSK, 2016; CERRITO, 2017).

Quando a radiação ionizante interage com a matéria, dependendo especialmente do tipo e da energia da radiação, bem como do material com o qual ela está interagindo, há uma deposição de energia no meio que é definida como dose absorvida. A dose absorvida D_{med} é dada pela energia média W absorvida por um material de densidade ρ por unidade de volume V , ou seja (CERRITO, 2017):

$$D_{med} = \frac{W}{V\rho}. \quad (2.7)$$

Tabela 2.2 – Principais grandezas relacionadas à radiobiologia.

Grandeza	Breve definição	Expressão	Unidade
Kerma K	Energia transferida de partículas neutras para carregadas	$K = \frac{\Delta E_{tr}}{\Delta m}$	1 Gy = 1 $\frac{J}{kg}$
Dose absorvida D	Energia absorvida por unidade de massa.	$D = \frac{\Delta E_{ab}}{\Delta m}$	1 Gy = 1 $\frac{J}{kg}$
Dose equivalente H	D multiplicada por fator de ponderação da radiação	$H = \sum_R w_R D$	Sv = $w_R \frac{J}{kg}$
Dose efetiva E	H multiplicada por fator de ponderação do tecido biológico	$E = \sum_T w_T H$	Sv = $w_T \frac{J}{kg}$

onde ΔE_{tr} é a energia transferida para o meio absorvedor, Δm é a massa do meio, ΔE_{ab} é a energia absorvida, w_R é o fator de ponderação específico para cada radiação e w_T é o fator de ponderação específico para cada tecido biológico (PODGORSAK, 2016).

Fonte: Adaptado de (OKUNO; YOSHIMURA, 2010; PODGORSAK, 2016; CERRITO, 2017).

A unidade utilizada no Sistema Internacional de Unidades (S.I.) para dose absorvida é o gray (Gy), que é equivalente a 1 joule por quilograma (J/kg) (CERRITO, 2017).

A dose absorvida pode ser uma variável temporal e, nesse caso, ela é definida como taxa de dose absorvida, ou seja, a variação da dose em um intervalo de tempo. A taxa de dose absorvida \dot{D}_{med} é dada pela derivada de D_{med} em relação a um intervalo de tempo dt (PODGORSAK, 2016; GRUPEN; RODGERS, 2016):

$$\dot{D}_{med} = \frac{dD_{med}}{dt}. \quad (2.8)$$

A unidade utilizada no S.I. para taxa de dose absorvida é o gray por segundo (Gy/s), que equivale a 1 joule por quilograma segundo (J/kg s) (CERRITO, 2017).

Vale mencionar que a taxa de dose é um dos fatores que determina os efeitos biológicos originados pela radiação ionizante. Esse efeito também varia entre os diferentes tipos de células (SEGRETO et al., 2016).

2.1.4 Dosímetros

É possível medir a dose absorvida em determinados materiais por meio de um dispositivo capaz de converter a radiação absorvida em um sinal, cuja resposta é proporcional à dose incidente. Os dispositivos utilizados com essa finalidade são chamados de dosímetros, e eles podem demandar calibração (dosímetros relativos) ou não (dosímetros absolutos) (PODGORSAK, 2016).

Dentre os dosímetros relativos, estão os dosímetros luminescentes, onde o sinal de luminescência que é lido é proporcional à dose absorvida de radiação. Esses dosímetros são compostos de materiais cristalinos que armazenam a energia absorvida da radiação em estados metaestáveis chamados de armadilhas. Essa energia será subsequentemente emitida na forma de infravermelho, luz visível ou ultravioleta, em diferentes intervalos de tempo. O processo de emissão do sinal pode ser acelerado por calor – termoluminescência – ou por luz visível ou luz ultravioleta – luminescência opticamente estimulada. Os dosímetros baseados nesses conceitos são chamados de dosímetros termoluminescentes (TLD, do inglês *Thermoluminescent Dosimeter*)

ou dosímetros de luminescência opticamente estimulada (OSLD, do inglês *Optically Stimulated Luminescence Dosimeter*), respectivamente (PODGORSAK, 2016).

2.2 Produção de raios X

Existem dois processos físicos para obtenção de raios X: produção de raios X característicos e produção de radiação de freamento (*bremsstrahlung*). O primeiro tipo, já mencionado nesse texto, acontece quando elétrons em estados excitados decaem para estados de menor energia, emitindo fótons de energia correspondente à diferença de energia entre os níveis eletrônicos inicial e final. Já a radiação de freamento corresponde à emissão de radiação policromática quando cargas (positivas ou negativas) são aceleradas ou desaceleradas. Nesse caso a radiação é emitida preferencialmente na direção do movimento da partícula carregada.

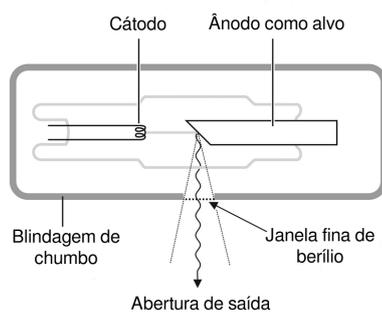
Destacaremos a seguir dois equipamentos que são utilizados para a obtenção de raios X: tubos de raios X e aceleradores síncrotron.

2.2.1 Tubos de raios X

Um gerador de raios X pode ser representado como mostra a Figura 2.5. O cátodo é um filamento que, quando aquecido, emite elétrons que serão acelerados por uma diferença de potencial (ddp). Ao atingirem o alvo, que pode ser constituído de diferentes metais, ocorre o processo de produção de *bremsstrahlung* e, dependendo da energia cinética dos elétrons incidentes, produção de raios X característicos do material do alvo. A energia máxima dos fótons está diretamente relacionada à ddp. Por exemplo, se há um gerador com ddp de 35 kV, a energia máxima dos fótons será de 35 keV. (OKUNO; YOSHIMURA, 2010; GRUPEN; RODGERS, 2016).

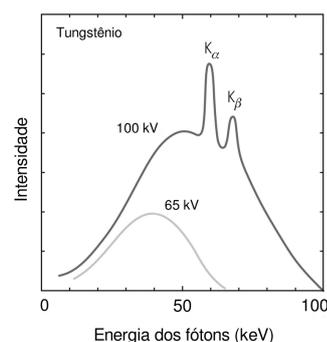
A Figura 2.6 apresenta um exemplo de um espectro contínuo produzido em um gerador de raios X com alvo de tungstênio quando a diferença de potencial é de 65 kV, e um exemplo de um espectro contínuo somado a picos do espectro discreto de raios X característicos em uma ddp de 100 kV (GRUPEN; RODGERS, 2016).

Figura 2.5 – Esquema gerador de raios X.



Fonte: Adaptado de (GRUPEN; RODGERS, 2016).

Figura 2.6 – Exemplo espectro de raios X.

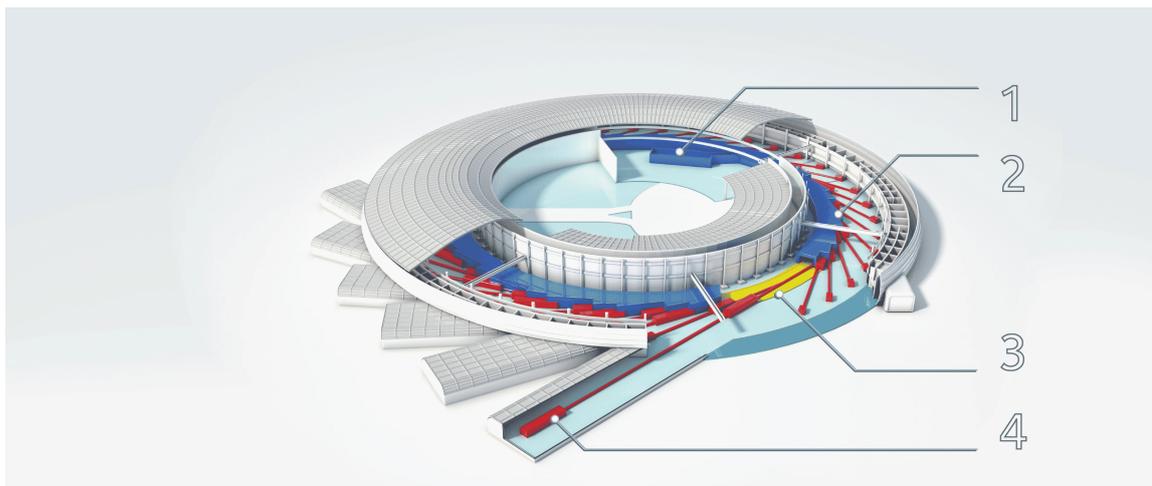


Fonte: Adaptado de (GRUPEN; RODGERS, 2016).

2.2.2 Aceleradores síncrotron

Uma forma alternativa e eficiente de produzir raios X é utilizando aceleradores de partículas do tipo síncrotron, representados pelo Sirius na Figura 2.7 (CNPEM, s.d.). A radiação síncrotron é, de um modo geral, radiação eletromagnética de amplo espectro, englobando desde o infravermelho até raios X de alta energia (WILLMOTT, 2019).

Figura 2.7 – Diagrama do acelerador Sirius, onde destaca-se (1) Acelerador linear; (2) Booster; (3) Anel de Armazenamento e (4) Linhas de Luz.



Fonte: Retirado de <https://lnls.cnpem.br/sirius/como-funciona-o-sirius/>. Acesso em: 19 ago. 2023.

Quando partículas carregadas, como elétrons, estão em repouso ou se movendo com velocidade constante, não há emissão de radiação eletromagnética. No entanto, quando essas partículas são aceleradas, suas linhas de campo também são aceleradas e irradiam para longe da partícula, em uma direção tangencial a ela e com a velocidade da luz, o que é a chamada radiação síncrotron (JAESCHKE et al., 2016).

Os principais componentes de um acelerador de partículas do tipo síncrotron são: canhão de elétrons; acelerador linear (*linac*, do inglês *linear accelerator*); *booster*; anel de armazenamento; e as linhas de luz. No canhão, um catodo aquecido emite um feixe de elétrons que é acelerado e injetado no *linac*. No acelerador linear, os elétrons são acelerados a uma velocidade próxima à da luz e somente chegam à energia final de operação ao serem transferidos para o *booster*, responsável por manter os elétrons em órbitas circulares e incrementar a energia a partir de ímãs sincronizados e cavidades de radiofrequência. A partir daí, os elétrons são transferidos para o anel de armazenamento, mantidos em órbita por ímãs chamados de "*bending-magnet achromats*" e direcionados para dispositivos de inserção - como dipolos, onduladores e *wigglers*. A radiação síncrotron emitida a partir dos *bending magnets* nas seções curvas e a partir dos dispositivos de inserção nas seções retas é direcionada para as linhas de luz (WILLMOTT, 2019).

As linhas de luz merecem um destaque especial pois o esforço para construir aceleradores síncrotron cada vez melhores é grandemente motivado por elas. As linhas de luz são as estações experimentais que recebem a radiação síncrotron com todas as faixas do espectro eletromagné-

tico geradas. Com isso, cada linha de luz filtra o feixe completo para selecionar apenas parte da radiação a ser utilizada empregando elementos óticos como espelhos e monocromadores. Assim, é possível obter linhas de luz com óticas diferentes que permitem utilizar diferentes técnicas experimentais como espalhamento de raios X, difração de raios X e técnicas de imageamento (WILLMOTT, 2019).

2.3 Células, estresse e morte celular

2.3.1 Células animais

Assim como os átomos são as unidades básicas da matéria, as células são as unidades básicas dos seres vivos. Muitos dos componentes dessas células são comuns a todas elas, como as mitocôndrias, os lisossomos e os ribossomos, por exemplo. No entanto, as estruturas e formas das células podem variar, de acordo com suas especializações funcionais (CARVALHO; RECCO-PIMENTEL, 2013). A Tabela 2.3 apresenta uma relação das principais organelas e suas funções.

Tabela 2.3 – Principais organelas das células animais e suas funções.

Organela	Função
Membrana plasmática	Permeabilidade seletiva, mediação de interações célula-célula, adesão a superfícies, secreção, etc.
Citoplasma	Local de vários processos metabólico
Citoesqueleto	Provê a estrutura da célula e seus movimentos
Reticulo endoplasmático	Transporte de materiais e síntese de lipídeos
Ribossomos	Síntese de proteínas
Complexo de Golgi	Empacotamento e secreção de materiais e formação de lisossomos
Lisossomos	Digestão intracelular
Mitocôndria	Produção de energia, transporte de elétrons, fosforilação oxidativa e outras vias metabólicas
Núcleo	Repositório para informação genética
Nucléolo	Síntese de RNA ribossômico e construção de ribossomos

Fonte: Adaptado de (WILLEY; SANDMAN; WOOD, 2013).

Uma das principais estruturas presentes na célula é o seu material genético, que armazena toda a informação necessária sobre um organismo na forma de moléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA). Essa informação é transmitida para outras células a partir da replicação do DNA, separação das cópias e divisão do citoplasma, um processo chamado mitose no caso de células somáticas, que são maioria nos seres humanos (ALBERTS et al., 2017; PIERCE, 2016).

A mitose faz parte do ciclo celular, processo no qual a célula cresce e então se divide. Ao final do processo, haverá duas células resultantes, que terão seus próprios ciclos celulares. No ciclo celular ainda estão inclusos os pontos de verificação, importantes para garantir que todos os componentes da célula estejam presentes e funcionais (PIERCE, 2016).

2.3.2 Queratinócitos

A pele é o principal órgão com o qual temos contato direto. Ela apresenta um importante papel de regulação do corpo humano na relação com o ambiente. Dentre as células que compõem

a pele, estão os queratinócitos, que ocupam 90% da população de células constituintes deste órgão (MC MANUS; MITCHELL, 2014).

Os queratinócitos possuem diversas e importantes funções, mas as principais são, especialmente, prover estrutura para a pele e atuar como parte do sistema imune, uma vez que ao interagir com fatores estressantes, como radiação ultravioleta ou ionizante, enviam sinais pró-inflamatórios para o organismo, auxiliando na homeostase (MC MANUS; MITCHELL, 2014).

Com isso, os queratinócitos se tornam um modelo inicial interessante para a realização de estudos envolvendo radiação ionizante, tendo em vista que até mesmo em estudos com pequenos animais, a pele é o órgão de barreira que recebe a dose de entrada.

2.3.3 Estresse celular

Sabe-se que células saudáveis possuem a capacidade de se proliferar e de se adaptar a mudanças, dependendo de suas funções específicas. O estresse celular é uma das mudanças às quais as células são eventualmente submetidas (CARVALHO; RECCO-PIMENTEL, 2013).

O estresse celular pode ser definido como “uma variedade de processos que são desencadeados por uma variação aguda ou crônica das condições celulares usuais” (BAROUKI, 2007) e a forma como a célula lida com as variações depende do tipo e nível do estresse. Existem diversos tipos de estresse celular, dentre os quais pode-se mencionar o choque térmico, estresse oxidativo, estresse mecânico e até dano ao material genético por radiação ionizante, por exemplo. A depender do nível de estresse ao qual a célula é submetida, ela pode ser levada ao processo de morte celular (FULDA et al., 2009).

2.3.4 Morte celular

Uma característica geral sobre os mecanismos de reparo intrínsecos às células e que corrigem eventuais danos no DNA é que eles são redundantes, ou seja, muitos tipos de dano podem ser corrigidos por mais de uma via de reparo. Graças a isso, a maior parte dos danos causados pelos diferentes tipos de estresse celular, como pela radiação ionizante, são reparados. No entanto, se os mecanismos de reparo falham, a célula como um todo pode morrer, e o tipo de morte celular ou o tempo necessário para que isso ocorra pode variar entre os diferentes tipos celulares (PIERCE, 2016; JOINER; KOGEL, 2019).

Os principais tipos de morte celular são a apoptose e a necrose. A apoptose é a morte celular programada, atuando como resposta fisiológica a células e tecidos alterados, podendo ocorrer naturalmente pelos processos do corpo humano ou ser induzida por agentes externos, como a radiação. A necrose, por outro lado, é uma forma acidental e não controlada de morte celular, sendo induzida especialmente por estímulos patológicos severos (CARVALHO; RECCO-PIMENTEL, 2013). A Tabela 2.4 apresenta outros tipos de morte celular e suas características.

Tabela 2.4 – Características dos diferentes tipos de morte celular.

Tipo de morte celular	Alterações morfológicas			Características bioquímicas
	Núcleo	Membrana celular	Citoplasma	
Apoptose	Condensação da cromatina; fragmentação nuclear.	Bolhas.	Fragmentação; formação de corpos apoptóticos.	Dependente de caspase.
Autofagia	Condensação parcial da cromatina.	Bolhas.	Aumento do número de vesículas autofágicas.	Independente de caspase; aumento na atividade de lisossomos.
Necrose	Aglomerção e degradação aleatória do DNA nuclear; geração de espécies reativas de oxigênio ou perda da permeabilidade seletiva da membrana.	Inchaço; ruptura.	Aumento da vacuolização; degeneração de organelas; inchaço mitocondrial.	Independente de caspase; aumento nas formas de espécies reativas de oxigênio; rompimento da membrana plasmática e dos lisossomos.
Senescência	Estrutura heterocromática distinta.	-	Achatamento e aumento da granulidade.	Atividade da SA- β -gal.
Catástrofe mitótica	Múltiplos micronúcleos; fragmentação nuclear; cromossomos dicêntricos.	-	-	Independente de caspase (na fase inicial); ativação anormal da CDK1/ciclina B.

Fonte: Adaptado de (JOINER; KOGEL, 2019).

2.3.5 Cultura de células e imortalização de linhagens

Com o avanço das pesquisas em biologia, surgem cada vez mais possibilidades menos invasivas de estudos dos seres vivos. Uma técnica já amplamente empregada nos dias atuais é a cultura de células, em que células de um tipo específico podem ser mantidas em condições controladas e fora de seu ambiente natural (FRESHNEY, 2010).

Uma das formas de manter uma cultura de células é utilizando células primárias, que são obtidas diretamente de tecidos vivos. A principal vantagem desse tipo de cultura é a maior acurácia quanto ao metabolismo da célula em seu ambiente natural. No entanto, culturas primárias duram pouco tempo devido aos efeitos da senescência¹ (FRESHNEY, 2010).

Ao estudar processos biológicos, muitas vezes se faz necessário um maior tempo de acompanhamento da cultura. Com as chamadas linhagens celulares imortalizadas, isso se torna possível, pois através de técnicas químicas ou biológicas, é possível desativar os mecanismos de morte celular e manter uma cultura que se prolifera indefinidamente. Existem diversas linhagens celulares estabelecidas e comercializadas, entre elas a linhagem HaCaT de queratinócitos

¹ Processo de envelhecimento celular.

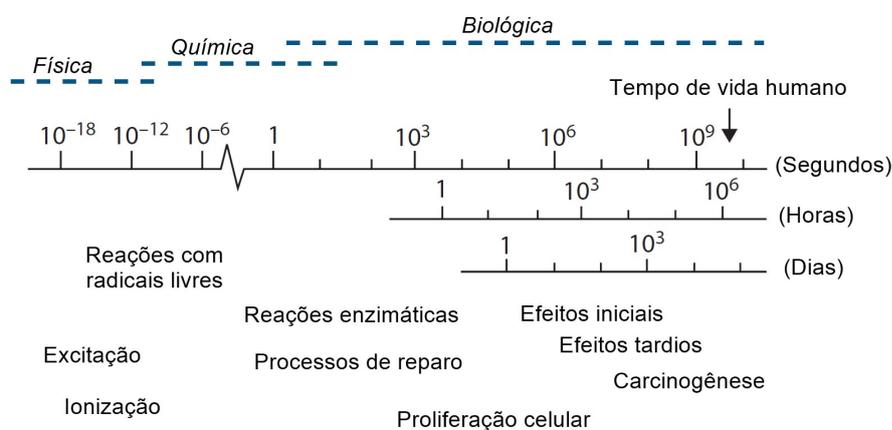
imortalizados (FRESHNEY, 2010).

A principal desvantagem da utilização das linhagens celulares é a diferença entre alguns fatores fisiológicos naturais e novos fatores necessariamente incorporados às células para que se tornem imortais. Portanto, as linhagens celulares são modelos fiéis, mas caso seja necessária uma maior acurácia, deve-se realizar estudos complementares utilizando células primárias (FRESHNEY, 2010).

2.4 Efeitos biológicos das radiações ionizantes

Quando a radiação ionizante incide em material biológico, há uma probabilidade de que ela interaja com o meio, conforme o conceito de seção de choque, e deposite energia nele, conforme o conceito de LET. Os átomos que compõem pontos críticos desse meio podem ser ionizados, o que levará a uma cadeia de eventos que acarretam em mudanças biológicas. Esses eventos ocorrem em escalas de tempo diferentes e podem ser divididos em três etapas, como ilustra a Figura 2.8 (HALL; GIACCIA, 2019).

Figura 2.8 – Escala de tempo dos efeitos da exposição de sistemas biológicos à radiação.



Fonte: Adaptado de (JOINER; KOGEL, 2019).

No primeiro estágio, ocorre a etapa física, onde acontece a interação da radiação ionizante com os átomos componentes do material biológico. Existem dois mecanismos pelos quais essa interação pode ocorrer: o mecanismo direto e o mecanismo indireto (JOINER; KOGEL, 2019; MARTA, 2014). Os dois mecanismos serão explorados a seguir.

2.4.1 Dano direto

No mecanismo direto, a radiação, no caso, raios X, é absorvida pelo meio e os elétrons secundários interagem diretamente com pontos críticos das células, em especial o DNA, dando origem a mudanças na estrutura e função da molécula. Aproximadamente 30% do efeito biológico total ocorre devido a esse mecanismo. Vale mencionar que um elétron rápido leva 10^{-18}

segundos para atravessar a molécula de DNA e 10^{-14} segundos para atravessar uma célula de $10\ \mu\text{m}$ de diâmetro. Para 1 Gy de dose absorvida, ocorrem 10^5 ionizações em uma única célula, o que gera aproximadamente 1000 quebras na molécula de DNA. E, de modo a fornecer uma melhor perspectiva, 1 Gy pode levar a morte de aproximadamente 30% das células de uma linhagem celular típica de mamíferos (JOINER; KOGEL, 2019; MARTA, 2014).

2.4.2 Dano indireto

No mecanismo indireto de interação da radiação com material biológico, por outro lado, a radiação incide nas moléculas de água, causando a radiólise e dando início à etapa química (OKUNO; YOSHIMURA, 2010). Nesse processo, são produzidas as espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*). Dentre elas, estão a hidroxila (OH), hidropéroxido ($\text{HO}_2\cdot$), superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e singlete de oxigênio ($^1\text{O}_2$). Como o próprio nome diz, as espécies são muito reativas e podem romper ligações das moléculas de DNA e danificar outras macromoléculas (CELIK et al., 2016).

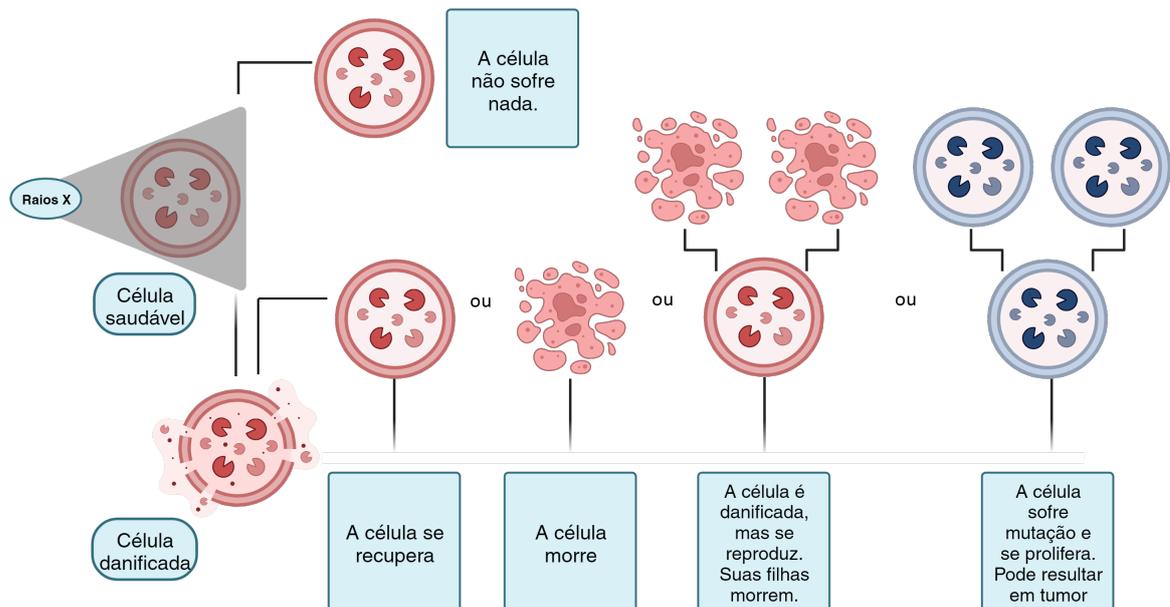
2.4.3 Radiossensibilidade

As diferentes células, tecidos e órgãos que fazem parte dos seres humanos possuem características próprias que as diferenciam de outros constituintes da mesma categoria. Ao considerar a interação da radiação com material biológico, as respostas podem ser diferentes dependendo da célula, tecido ou órgão atingido (HALL; GIACCIA, 2019).

Os fatores preponderantes que impulsionam uma maior radiossensibilidade incluem o nível de especialização da célula, a idade do tecido ou órgão – quanto mais jovem, mais radiossensível – e a elevada taxa de proliferação celular ou crescimento tecidual. Ao avaliar a radiossensibilidade da pele, por exemplo, verifica-se que ela é um dos órgãos mais radiossensíveis do corpo (HALL; GIACCIA, 2019).

Em nível celular, de um modo geral, é possível prever os possíveis destinos das células irradiadas conforme ilustra a Figura 2.9. Uma célula saudável, quando irradiada, pode não sofrer nenhum dano e seguir seu ciclo naturalmente. Por outro lado, a célula pode ser danificada e, neste caso, são quatro cenários possíveis: a célula pode se recuperar por meio de seus mecanismos de reparo; pode morrer por meio de algum dos mecanismos de morte celular; pode ser danificada, mas ainda conseguir se replicar, dando origem a células que subsequentemente morrerão; e pode sofrer mutações que não serão reparadas e, ao se proliferar, dará origem a um tumor (JOINER; KOGEL, 2019).

Figura 2.9 – Diferentes destinos possíveis após irradiação de células.



Fonte: Elaborado pelo autor.

2.4.4 Respostas biológicas a dose absorvida e taxa de dose

Como mencionado anteriormente, o LET é um dos fatores considerados ao se tratar da interação da radiação ionizante com a matéria biológica. No entanto, seja na área de proteção radiológica ou em pesquisas envolvendo irradiação de células em cultura, um outro fator considerado crucial é a dose absorvida de radiação (LOWE et al., 2022).

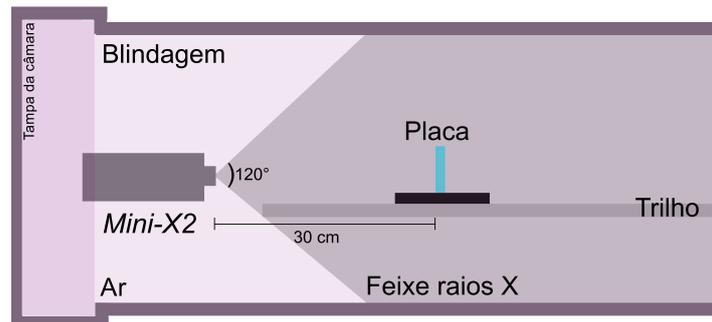
Por outro lado, estudos recentes têm mostrado o papel determinante da taxa de dose em sistemas biológicos. A principal diferença se encontra na variação temporal da entrega da dose de radiação. Os mecanismos celulares responsáveis pelas respostas biológicas a diferentes taxas de dose ainda não são compreendidos e, portanto, pesquisadores da área têm se esforçado para compreender estes mecanismos (LOWE et al., 2022).

Em vista disso, dentre os experimentos realizados neste trabalho, manteve-se a mesma fonte de raios X (mesmo LET) e considerou-se diversos cenários de entrega da dose, como será explicado na próxima seção.

3 Metodologia

Foram realizadas simulações e diferentes experimentos utilizando dosímetros e amostras biológicas. Para todos os ensaios executados, utilizamos o mesmo arranjo experimental, como ilustra a Figura 3.1.

Figura 3.1 – Arranjo experimental. Corte transversal da câmara de vácuo em que o *Mini-X2* é utilizado. Fora de escala.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Todas as amostras, dosímetros e/ou células, foram expostas ao feixe do gerador de raios X *Mini-X2* em placas de 6 poços (Costar®) tratadas para cultura celular.

Mais detalhes sobre o gerador de raios X *Mini-X2* e as condições de exposição são fornecidos nas próximas seções.

3.1 *Mini-X2*

Como mencionado na Seção 2.2, os raios X podem ser gerados em tubos de raios X e em aceleradores síncrotron. Neste trabalho, utilizou-se o gerador de raios X *Mini-X2* (*Amptek*), que é um equipamento disponível no Sirius sob a responsabilidade do grupo de detectores (DET) e supervisão do grupo de proteção radiológica (RAD). Existem duas versões do *Mini-X2* disponibilizadas pela *Amptek*, uma com tensão máxima de 50 kV e outra com tensão máxima de 70 kV. O *Mini-X2* utilizado foi o de tensão máxima de 70 kV, retratado na Figura 3.2, e suas especificações completas são como indica a Tabela 3.1.

Figura 3.2 – *Mini-X2*.

Fonte: Elaborado pelo Autor.

Tabela 3.1 – Especificações do *Mini-X2*.

Parâmetro	Valor
Tensão	35-70 kV
Corrente	5-200 μ A
Material do alvo	Tungstênio (W)
Espessura do alvo	1,00 μ m
Ângulo do alvo	-
Material da janela	Berílio (Be)
Espessura da janela	125 μ m
Taxa de dose	-

Fonte: Retirado de (AMPTEK, s.d.).

Para esta versão do *Mini-X2*, o valor de taxa de dose não está disponível, no entanto, esta informação é crucial para realização dos experimentos com amostras biológicas, uma vez que a determinação do tempo de exposição e da dose absorvida são baseadas nela. Desta forma, foram feitas simulações computacionais seguidas de experimentos com dosímetros de modo a obter informações sobre o perfil dosimétrico do gerador.

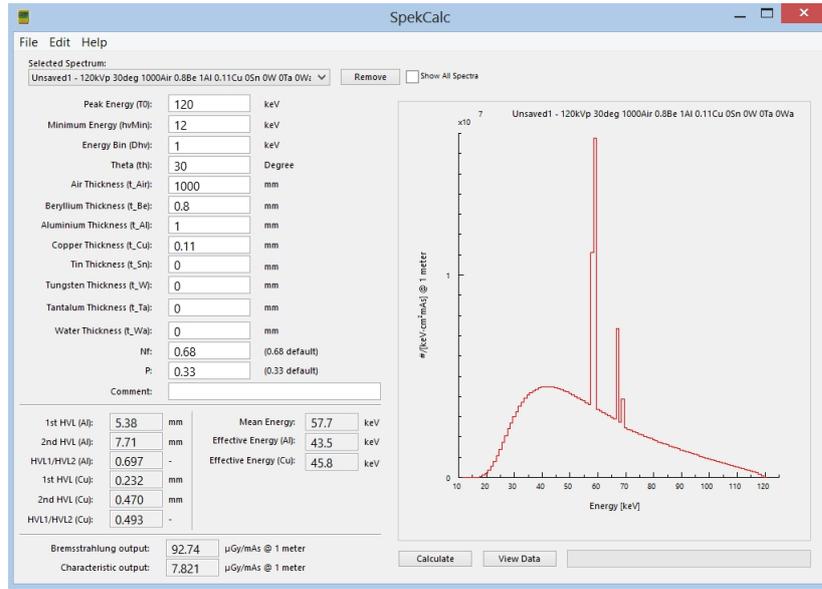
3.1.1 Simulações

O *software SpekCalc* (POLUNDNIOWSKI; EVANS, 2007a,b; POLUNDNIOWSKI et al., 2009) é um *software* gratuito que foi desenvolvido especialmente para simulação de espectros de raios X. Além disso, o *SpekCalc* também fornece a taxa de dose do feixe simulado e, portanto, foi utilizado para obter o espectro do *Mini-X2*, bem como para calcular sua taxa de dose. A Figura 3.3 apresenta a página inicial do *SpekCalc* versão 1.1.

Para obter a taxa de dose simulada, é necessário saber o ângulo de incidência dos elétrons no alvo de tungstênio. Como observado na Tabela 3.1, esta informação não é fornecida pela empresa, assim como a taxa de dose. No entanto, no manual (AMPTEK, s.d.) consta a taxa de dose do *Mini-X2* de tensão máxima de 50 kV, que é de aproximadamente 2,2 Gy/h a 30 cm da fonte e com 80 μ A de corrente. Considerando que ao configurar a tensão máxima do *Mini-X2* de 70 kV para 50 kV o espectro será idêntico – uma vez que as energias dos fótons variam de 0 a 50 keV nos dois casos, é possível utilizar a taxa de dose do *Mini-X2* de 50 kV para estimar o ângulo interno do alvo.

Sendo assim, calculou-se um intervalo de taxas de dose em função do ângulo, a fim de verificar qual ângulo de incidência dos elétrons no alvo do gerador resultaria na taxa de dose descrita no manual (AMPTEK, s.d.). Considerou-se um valor de corrente de 80 μ A, tensão de 50 kV e uma distância de 30 cm da fonte, de acordo com as especificações. Como o *software* calcula a taxa de dose apenas para 1 metro de distância da fonte, considerou-se a lei do inverso

Figura 3.3 – Tela inicial do *SpekCalc* com o espectro padrão gerado.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

do quadrado para 0,3 metros:

$$\text{Intensidade} \propto \frac{1}{\text{distância}^2} \rightarrow \frac{1}{(0,3)^2} = \frac{1}{0,09}, \quad (3.1)$$

resultando no fator de correção da distância.

Como é possível observar na Figura 3.3, a taxa de dose é expressa em unidades de [$\mu\text{Gy}/\text{mAs}$]. Para expressar em [Gy/h], realiza-se a multiplicação pelos fatores de correção de corrente e tempo. Considerando a corrente de $80 \mu\text{A}$, tem-se:

$$\begin{aligned} 1 \frac{\mu\text{Gy}}{\text{mAs}} &= \frac{10^{-6}[\text{Gy}]}{(10^{-3}[\text{A}])([s])} \times (80 \times 10^{-6}[\text{A}]) \times 3600 \\ 1 \frac{\mu\text{Gy}}{\text{mAs}} &= \frac{3,6 \times 80 \times 10^{-6}[\text{Gy}]}{[h]} \\ 1 \frac{\mu\text{Gy}}{\text{mAs}} &= 2,88 \times 10^{-4} \frac{\text{Gy}}{h}. \end{aligned} \quad (3.2)$$

Considerando o fator de correção da distância:

$$\begin{aligned} 1 \frac{\mu\text{Gy}}{\text{mAs}} &= 2,88 \times 10^{-4} \times \frac{1}{0,09} \frac{\text{Gy}}{h} \\ 1 \frac{\mu\text{Gy}}{\text{mAs}} &= 3,2 \times 10^{-3} \frac{\text{Gy}}{h}. \end{aligned} \quad (3.3)$$

Uma vez encontrado o ângulo correspondente ao valor de taxa de dose fornecido no manual do *Mini-X2* com tensão máxima de 50 kV, expandiu-se as análises para tensão de 70 kV e corrente de 140 μA , obtendo o valor da taxa de dose simulada do *Mini-X2* de 70 kV.

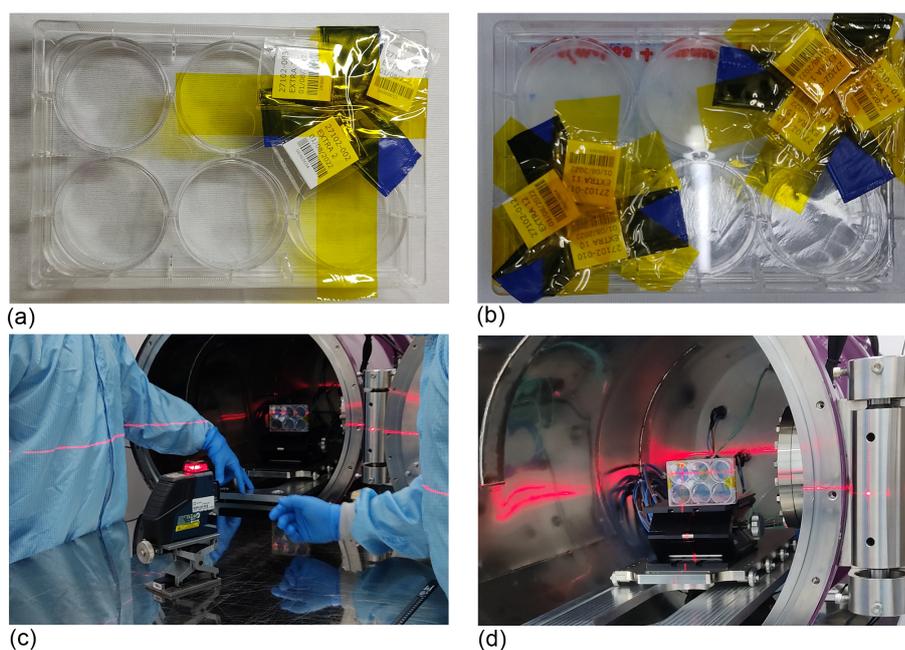
3.1.2 Validação da taxa de dose do *Mini-X2*

Para validar a taxa de dose simulada, foram utilizados 15 dosímetros OSLD (Al_2O_3) e 15 dosímetros TLD (LiF), juntamente com um dosímetro padrão de cada tipo. Todos os dosímetros foram fornecidos pela empresa Sapra Landauer.

Os dosímetros foram expostos a 30 cm do feixe do gerador de raios X *Mini-X2* dentro de uma câmara de vácuo com blindagem apropriada, como ilustra a Figura 3.1.

Foram fixados 3 dosímetros TLD e 3 dosímetros OSLD na região de um poço de uma placa de 6 poços, como ilustra a Figura 3.4(a). A fixação foi feita com fita *kapton*, transparente aos raios X. Cada placa foi exposta individualmente em sua condição específica e todas foram posicionadas de modo que a tampa ficasse virada para o feixe e os dosímetros ficassem do lado oposto, como mostra a Figura 3.4(d). A medida da distância das placas em relação ao foco do feixe foi feita com trena e o alinhamento dos dosímetros nas placas foi feito com um nível a laser [Figura 3.4(c)].

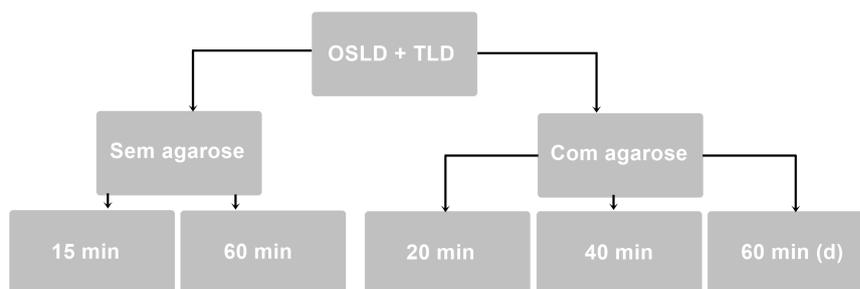
Figura 3.4 – Preparo e posicionamento das amostras na câmara de vácuo. (a) Fixação dos dosímetros nas 4 primeiras condições, (b) na última condição, (c) alinhamento dos dosímetros ao centro do feixe e (d) posicionamento final das amostras dentro da câmara de vácuo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os dois tipos de dosímetros foram expostos em triplicata em 5 condições diferentes, variando tempo de exposição, presença ou não de agarose, composto orgânico gelatinoso abordado em detalhes mais adiante, e distância entre dosímetros expostos em um mesmo porta amostra, como esquematizado na Figura 3.5.

Figura 3.5 – Condições de exposição dos dosímetros OSLD e TLD, sendo $d \approx 15$ cm. Gerador: 70 kV, 140 μ A, 30 cm.



Fonte: Elaborado pelo autor.

As exposições foram realizadas com e sem agarose para verificar qual implicação a presença do composto gera na dose absorvida final, dado que ele seria utilizado no preparo de amostras, como será abordado com mais detalhes na Seção 3.3. A condição descrita como 60 minutos (d) na Figura 3.5 indica a condição da Figura 3.4(b), em que dois conjuntos de dosímetros foram expostos a 15 cm de distância um do outro para revelar se existe influência na dose absorvida em diferentes posições da placa.

Os dosímetros expostos foram enviados de volta para a Sapr Landauer para leitura de dose em equipamentos específicos. As leituras foram recebidas posteriormente por *e-mail*.

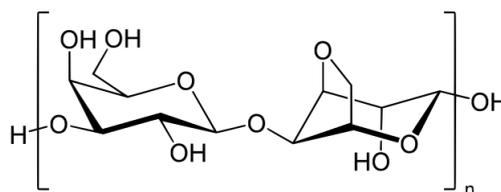
3.2 Compostos e ensaios biológicos

A agarose é um polímero natural obtido principalmente através de algas vermelhas. Sua estrutura é constituída de unidades como a Figura 3.6, que se repetem ao longo de cadeias lineares (GUSTAVSSON; OLOFLARSSON, 2003).

Este polímero é diluído e aquecido e, ao ser refrigerado, se torna um gel – é gelificado, devido às ligações de hidrogênio entre suas unidades. A temperatura para que a agarose gelifique depende tanto da composição dos monômeros quanto da concentração da solução (GUSTAVSSON; OLOFLARSSON, 2003).

A agarose é largamente utilizada em técnicas de eletroforese em gel, devido a sua porosidade, que permite a passagem de moléculas com dimensões específicas. (GUSTAVSSON; OLOFLARSSON, 2003). Uma aplicação não usual, mas que foi testada neste trabalho, é o emprego da agarose na composição de meios de cultura para células animais, a fim de investir em suas propriedades de gel para viabilizar o posicionamento vertical de placas de cultura.

Figura 3.6 – Unidade constituinte das cadeias poliméricas da agarose.



Fonte: Domínio público.

Ainda em se tratando de compostos de importância biológica, vale mencionar que vários deles possuem a capacidade de fornecer informações relevantes, dependendo do objetivo da investigação. Alguns deles foram empregados neste trabalho:

Trypan O azul de Trypan é um corante que possui a capacidade de corar apenas células mortas. Como a maioria dos testes de viabilidade, o corante depende da quebra da integridade da membrana celular, que é medida pela absorção do corante, ao qual a célula viável é normalmente impermeável (FRESHNEY, 2010);

DAPI O DAPI é um marcador utilizado em microscopia de fluorescência para a marcação de DNA. Quando a molécula do corante se liga ao DNA, ocorre um aumento em sua fluorescência e pode-se observar uma faixa de absorção na região do ultravioleta (360 nm) e de emissão na região do azul (461 nm) (REIS, s.d.);

Resazurina A resazurina é um corante azul pouco fluorescente, que quando é metabolizado pelas mitocôndrias das células viáveis, é reduzido em resorufina, composto rosa altamente fluorescente. A emissão é proporcional ao número de células viáveis presente na amostra e ocorre em 584 nm após ser excitado em 571 nm (BORRA et al., 2009);

Giemsa O corante Giemsa é um marcador que se liga a regiões ricas em adenina e timina do DNA e é capaz de promover a identificação de aberrações cromossômicas, com a vantagem de ser visível com microscopia óptica. Além disso, é possível visualizar células macroscopicamente em placas de cultura após fixação, uma vez que regiões com células serão tingidas, e regiões sem células permanecerão transparentes (SEAGER et al., 2014);

DCFH₂-DA O DCFH₂-DA é um composto pouco fluorescente que, ao ser hidrolisado por enzimas celulares, produz o composto DCFH₂ que, por sua vez, é oxidado por espécies reativas de oxigênio e se torna o DCF, um composto altamente fluorescente. A intensidade de fluorescência emitida pelo DCF é diretamente proporcional à quantidade de ROS na célula. O DCF é excitado em 504 nm e emite em 525 nm (NG; OOI, 2021);

Azida de sódio A azida de sódio é um composto químico tóxico, comumente utilizado em sínteses orgânicas e *airbags*². No contexto biológico, possui ação mutagênica e pode ser usado como controle positivo em experimentos com radiação ionizante (TAT et al., 2021);

Violeta de metila O violeta cristal é um corante que se liga a proteínas e ao DNA. Quando células aderentes morrem, elas são destacadas do fundo das placas de cultura e não são coradas. Essa técnica é utilizada para quantificação indireta de morte e proliferação celular (FEOKTISTOVA; GESERICK; LEVERKUS, 2016), como por meio do ensaio clonogênico, que é baseado na habilidade de formação de colônias celulares a partir de uma única célula. Este método é frequentemente utilizado para verificar a capacidade de divisão celular após tratamento com radiação ionizante (FRANKEN et al., 2006).

3.3 Elaboração do protocolo

3.3.1 Cultivo celular

Em todos os experimentos com células, foram utilizados queratinócitos imortalizados da linhagem HaCaT. As células congeladas em criotubos foram retiradas do nitrogênio líquido, descongeladas com 1 mL de meio de cultura em temperatura ambiente, adicionadas a uma suspensão de 5 mL de meio de cultura e centrifugadas para posterior ressuspensão e transferência para placas de Petri.

O meio de cultura utilizado foi o Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (ATCC) com 4 mM de L-glutamina, 4500 mg/L de glicose, 1500 mg/L de bicarbonato de sódio e HEPES a 25 mM. As culturas foram mantidas em placas de Petri a 37 °C e com 5% de CO₂. Foram realizadas subculturas frequentes sempre que as células atingiam uma confluência de aproximadamente 80%.

Vale ressaltar que todo o manuseio das células foi feito em fluxo laminar – de modo a evitar contaminação – no Laboratório de Cultura de Células e Insetos (LCCMI) do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio). Além disso, não houve a aplicação de antibióticos ao meio de cultura para evidenciá-la rapidamente caso ocorresse.

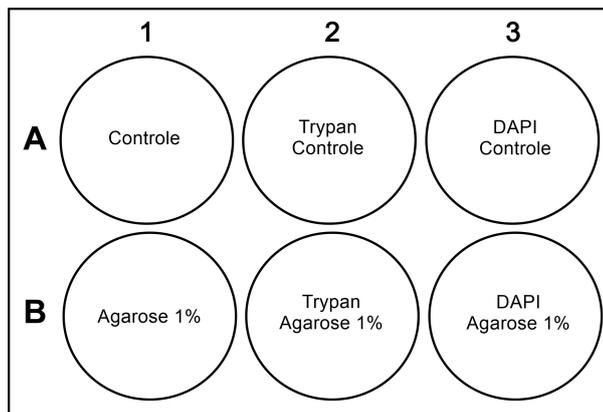
3.3.2 Testes iniciais com agarose 1%

A agarose foi preparada a partir do pó autoclavado. Foram utilizadas 2,2 g da UltraPure™ Low Melting Point Agarose (ThermoFisher), que foi diluída em 200 mL de tampão fosfato-salino (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*) de modo a manter uma concentração de 2%. A concentração de aplicação nas células foi de 1%, sendo metade do volume aplicado constituída de agarose 2% e a outra metade de meio de cultura, resultando no que chamaremos agarose 1%.

² A azida é sensível a colisões e se decompõe em sódio e gás nitrogênio ao detonar, inflando o *airbag*.

Para a realização do teste inicial, foram utilizadas placas de 6 poços tratadas para cultura celular. Foram plaqueadas $1,0 \times 10^6$ células por poço. O *layout* das placas foi como ilustra a Figura 3.7, de modo que cada poço foi utilizado para um teste diferente. O controle consistia das células com 2 mL de meio de cultura e os outros poços continham 2 mL de agarose 1%.

Figura 3.7 – Layout da placa de 6 poços para o teste inicial com Agarose 1%.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para verificar se a agarose 1% gelificada causaria danos às células e, além disso, se sua remoção também poderia promover a remoção de células aderidas, aplicou-se o corante azul de Trypan 0,4% e o marcador fluorescente DAPI, após fixação das células com paraformaldeído (PFA) 4%. A análise da coloração com o Trypan foi feita com microscópio óptico e a leitura do DAPI foi feita utilizando o Operetta[®] CLS[™], leitor de placas multipoços de alto rendimento.

3.3.3 Citotoxicidade da agarose 1%

Para avaliar as possíveis implicações biológicas da utilização da agarose após os testes iniciais, foram realizados experimentos com 2 e 19 horas de incubação da agarose 1%, tanto na estufa quanto fora dela.

Os tempos de incubação foram escolhidos considerando-se os possíveis tempos de exposição das células e a condição “fora da estufa” foi adotada pois, durante as exposições, as células estão sujeitas às condições ambientes, que são diferentes das condições padrão de cultura (na estufa, com temperatura de 37 °C e 5% de CO₂, que é a condição controle).

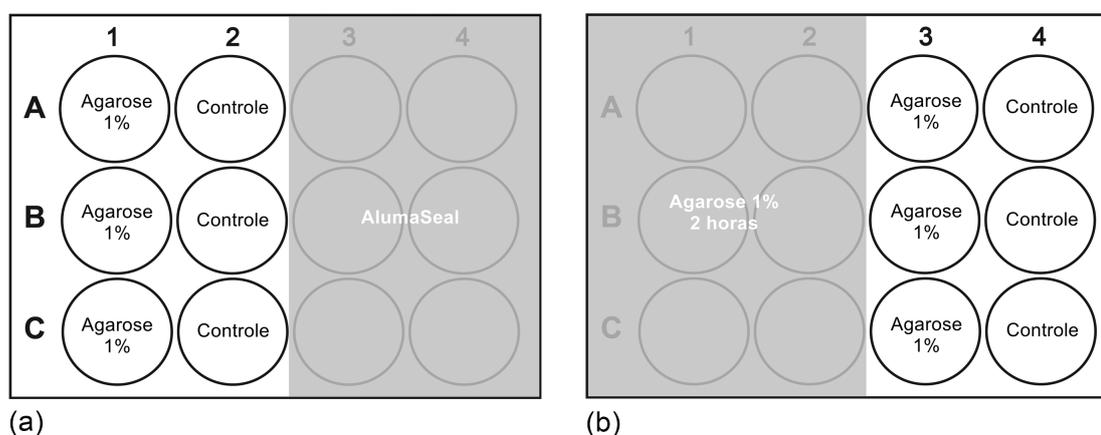
Além disso, analisou-se os possíveis efeitos dessas condições em 0, 24 e 48 horas após a remoção da agarose para verificar a recuperação e proliferação das células, totalizando 12 condições. A Tabela 3.2 apresenta todas as condições testadas.

O *layout* das placas foi de acordo com o que ilustra a Figura 3.8. Os 6 primeiros poços da extremidade esquerda de uma placa de 12 poços (NEST) foram utilizados para o experimento de 2 horas em uma semana, enquanto os poços da extremidade direita foram cobertos com AlumaSeal[®] para serem utilizados na semana seguinte no ensaio de 19 horas.

Tabela 3.2 – Diferentes condições testadas no experimento com agarose 1%.

2 h com agarose 1%				19 h com agarose 1%			
Tempo de incubação com meio de cultura após remoção da agarose 1%							
Na estufa		Fora da estufa		Na estufa		Fora da estufa	
0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h	0 h	48 h

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 3.8 – Layout das placas de 12 poços para o experimento de (a) 2 horas de incubação com agarose e de (b) 19 horas de incubação com agarose. Com este *layout*, utilizou-se 6 placas de 12 poços para a realização dos dois experimentos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Após serem submetidas à agarose 1% nas 12 diferentes condições, realizou-se o ensaio de resazurina para verificar a viabilidade das células. A concentração da solução estoque de resazurina era de $150 \mu\text{g/mL}$ e esta foi diluída em meio de cultura para que ficasse com $30 \mu\text{g/mL}$. Foram adicionados 2 mL da solução diluída de resazurina a cada um dos poços e as placas foram incubadas por 4 horas. Após a incubação, as placas foram lidas no EnSpire[®], leitor de placas multimodal.

Após a leitura das placas, a solução de resazurina foi removida de todos os poços, que foram lavados com PBS. Em seguida, fixou-se as células com PFA 4% e adicionou-se 2 mL de Giemsa a 4% de concentração. As placas foram deixadas na bancada com o corante durante 18 horas. Após a incubação, o corante foi devolvido para o frasco estoque e os poços foram lavados cuidadosamente em água corrente.

3.4 Irradiação das amostras biológicas

Para todas as exposições, as células foram plaqueadas com meio de cultura convencional em placas de 6 poços aproximadamente 24 horas antes da exposição, de modo que as células pudessem aderir ao fundo da placa. Antes da exposição, o meio de cultura foi substituído pela agarose 1%. As placas foram mantidas em repouso na bancada por 30 minutos para gelificação

da agarose e subsequentemente transportadas para irradiação.

Com a taxa de dose validada, foram desenhados três experimentos diferentes para verificar as respostas biológicas das células à dose fixa de 1 Gy (experimento D), à taxa de dose fixa de aproximadamente 1,9 Gy/h (experimento R) e ao tempo de exposição fixo em 2 horas (experimento T). A corrente do *Mini-X2* foi ajustada para permitir a fixação de cada variável – a corrente é proporcional à taxa de dose – e as condições resultantes foram como indica a Figura 3.9.

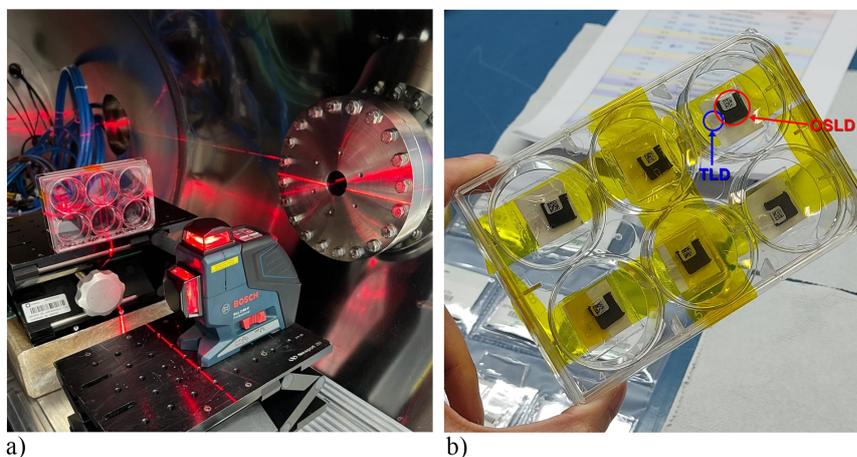
Figura 3.9 – Condições de exposição para os experimentos D, T e R. Células com a mesma cor representam a mesma condição, totalizando 7 condições diferentes.

Variáveis	Experimentos			
	Condições (7)			
Dose = Taxa*Tempo	Experimento D - Dose Fixa (1 Gy)			
	Tempo (h)	2	1	0,5
	Corrente (µA)	35	70	140
Tempo = Dose/Taxa	Experimento T - Tempo fixo (2 h)			
	Dose (Gy)	4	2	1
	Corrente (µA)	140	70	35
Taxa = Dose/Tempo	Experimento R - Taxa de dose fixa (1,9 Gy/h)			
	Tempo (h)	2	1	0,5
	Dose (Gy)	4	2	1
Controle - D, T e R				
	Dose (Gy)	1		
	Tempo (h)	0		
	Corrente (µA)	0		

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para averiguar a dose absorvida recebida pelas células, foram adicionados dosímetros OSLD e TLD ao fundo de todos os poços de cada placa, de maneira que cada uma recebeu 6 dosímetros de cada tipo. As placas foram posicionadas no interior da câmara de vácuo do mesmo modo que indica a Figura 3.1. A Figura 3.10 mostra o posicionamento das placas na câmara e a distribuição dos dosímetros em cada placa.

Figura 3.10 – (a) Posicionamento das placas dentro da câmara de vácuo e (b) distribuição e posicionamento dos dosímetros no fundo de cada placa.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Devido a necessidade de realização dos ensaios biológicos, as irradiações foram repetidas em diversas semanas diferentes, conforme a disponibilidade do gerador de raios X e seguindo desenhos experimentais específicos, que serão descritos em detalhes na Seção 3.5

3.5 Ensaios biológicos pós-irradiação

3.5.1 Citotoxicidade com resazurina

O ensaio de resazurina foi aplicado para avaliar a viabilidade das células imediatamente após a irradiação, nas condições do experimento R (taxa de dose fixa). Neste experimento, as células foram plaqueadas de modo que cada poço contivesse $3,5 \times 10^5$ células e 2 mL de meio de cultura. As amostras foram preparadas com agarose 1% e foram irradiadas por 0 (controle), 0,5, 1 e 2 horas, totalizando 4 placas.

Após a irradiação de cada placa, a agarose gelificada foi removida de todos os poços para que fosse possível realizar o ensaio de resazurina. A solução estoque do composto estava com 150 $\mu\text{g/mL}$ de concentração e foi diluída em meio de cultura para uma concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$. Adicionou-se 1 mL da solução de resazurina por poço. Após uma incubação de 4 horas ao abrigo da luz, as placas foram lidas na leitora de placas multimodal EnSpire®e os dados foram exportados para análise.

3.5.2 ROS com variáveis fixas no tempo, dose e taxa de dose

A fim de executar os três desenhos experimentais propostos (D, T e R) otimizando o tempo de utilização do gerador de raios X e diminuindo o uso de materiais, as condições iguais – como indicado na Figura 3.9 – foram realizadas uma única vez, resultando em 7 placas expostas, possuindo 4×10^5 células por poço.

Para a realização do experimento com DCFH₂-DA, foi necessário aplicar a sonda química intracelular antes da adição da agarose. Sendo assim, foi preparada uma solução de 5,5 $\mu\text{g/mL}$ do composto em PBS 1X, o meio de cultura foi removido dos poços – exceto de um deles, que foi considerado o branco, cada um foi lavado com PBS 1X, o DCFH₂-DA foi adicionado e mantido nas células por 45 minutos dentro da estufa, removido em seguida e, por fim, as células foram lavadas 3 vezes com PBS 1X para remoção do excesso do composto. Após a adição da sonda, o meio de cultura do branco foi removido para adição da agarose e posterior transporte para irradiação.

Após a exposição em cada condição específica, as placas foram lidas no CLARIOstar®Plus – leitor de placas multimodal – no modo de leitura única e os dados foram exportados. Para verificar a resposta de cada experimento independente, os dados foram organizados e analisados posteriormente.

3.5.3 ROS, DAPI e ensaio clonogênico com taxa de dose fixa

Após a realização dos três experimentos (D, T e R) simultaneamente, o experimento R (taxa de dose fixa) foi realizado novamente para aprofundamento na compreensão dos efeitos biológicos nesta condição. Conforme indica a Figura 3.9, os tempos de exposição são de 0 (controle), 0,5, 1 e 2 horas, resultando em 4 placas com 3×10^5 células por poço, neste caso. Para realização do ensaio de ROS, foi feita a incubação com DCFH₂-DA – novamente excluindo um poço – seguida da adição da agarose.

Ao final de cada exposição, o sinal de ROS foi lido no CLARIOstar®Plus e a placa foi levada à sala de cultura. O poço sem DCFH₂-DA passou pelo procedimento de passagem para que as células irradiadas fossem replaqueadas para o ensaio clonogênico. Neste caso, foram adicionadas 10^3 células a três poços de uma nova placa, para cada condição, resultando em 2 novas placas. Foram adicionadas 10^3 células do controle (0 h) a três poços de outra placa separada para adição de azida de sódio como controle positivo. Todas as placas foram mantidas na estufa para adesão das células.

No terceiro dia de incubação, o meio de cultura foi trocado e, no sexto dia, as células foram fixadas com PFA 4% para adição de DAPI e realização de imageamento com fluorescência no Operetta®CLSTM *High-Content Analysis System*.

Após o imageamento, as células fixadas foram incubadas com violeta de metila por 30 minutos e lavadas em água corrente para contagem de colônias e posterior análise dos dados.

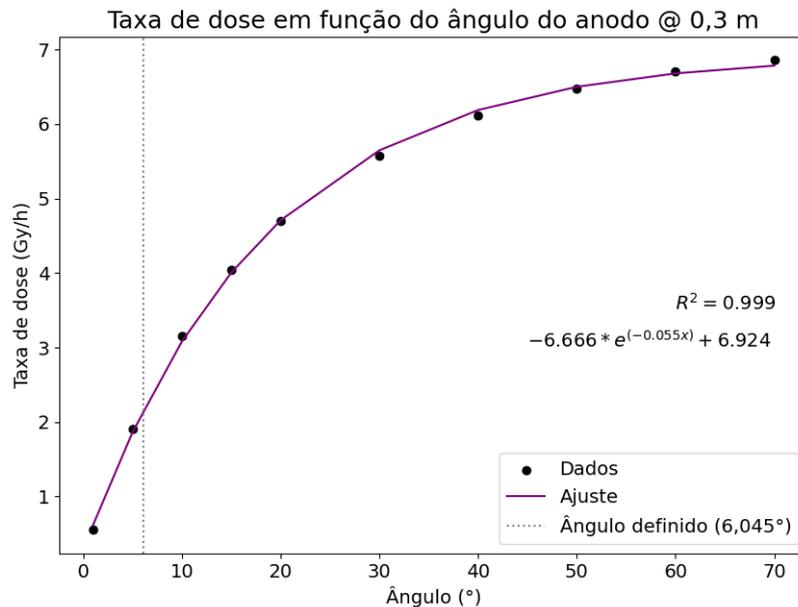
4 Resultados e discussões

4.1 *Mini-X2*

4.1.1 Simulações

Para obter o ângulo de incidência dos elétrons no anodo do gerador *Mini-X2*, simulou-se a taxa de dose esperada para diferentes ângulos, nas condições de 50 kV, 80 μA e a 30 cm da fonte, em que a taxa de dose é fornecida pelo manual, sendo de aproximadamente 2,2 Gy/h. Com essa informação, obteve-se um ângulo de incidência de 6,045°, como indicado no gráfico da Figura 4.1.

Figura 4.1 – Gráfico da taxa de dose em função do ângulo obtido com os dados simulados no SpekCalc.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Em posse do ângulo de incidência aproximado, foi possível simular a taxa de dose do gerador nas condições de operação a serem utilizadas nos experimentos, isto é, 70 kV, 140 μA , ainda a 30 cm da fonte. Nessas condições, obteve-se que a taxa de dose seria, a 1 m da fonte:

$$\text{Taxa de dose} = 538,6 \mu\text{Gy}/\text{mAs}. \quad (4.1)$$

Pela lei do inverso do quadrado e pela adequação das unidades, tem-se que a taxa de dose simulada seria, a 0,3 m da fonte:

$$\text{Taxa de dose} \approx 3,02 \text{ Gy}/\text{h}. \quad (4.2)$$

A partir da Figura 4.1, é possível observar que o ajuste exponencial possui uma adequação de aproximadamente 99% aos dados de taxa de dose em função do ângulo de incidência dos elétrons no anodo. A adequação indica que o modelo exponencial explica a variabilidade dos dados obtidos a partir das simulações.

Uma vez que a taxa de dose aproximada para as condições de 50 kV, 80 μA e 30 cm de distância do foco do feixe do gerador é dada no manual (AMPTEK, s.d.), utilizou-se o ajuste realizado para estimar o ângulo de incidência dos elétrons, informação que não é fornecida, mas que é relevante para a estimativa da taxa de dose em outras condições de tensão e corrente, uma vez que o *software* SpekCalc necessita dessa informação para fornecer os dados de espectro e taxa de dose.

O ângulo obtido foi de $6,045^\circ$ e, com essa informação, foi possível encontrar uma taxa de dose de aproximadamente 3,02 Gy/h a 70 kV, 140 μA e 30 cm do gerador, condições intencionadas e utilizadas para os experimentos.

4.1.2 Validação da taxa de dose

De modo a verificar experimentalmente se os resultados obtidos nas simulações correspondem à realidade, realizou-se exposições de dosímetros de dois diferentes tipos. Os resultados recebidos da Sapr Landauer após as leituras dos dosímetros são apresentados na Tabela 4.1 e plotados na Figura 4.2. Como indica a legenda da Figura 4.2, a curva azul mostra os dados esperados, que foram calculados com base na taxa de dose obtida pelas simulações. No caso, para as exposições de 15 minutos, esperava-se uma dose absorvida de 750 mGy, enquanto esperava-se uma dose absorvida de 3000 mGy para as exposições de 60 minutos.

Tabela 4.1 – Dados obtidos após segunda exposição de dosímetros ao feixe do *Mini-X2*. SD = desvio padrão.

Parâmetros		OSLD		TLD	
Condição	Tempo (min)	Dose (mGy)	SD (mGy)	Dose (mGy)	SD (mGy)
Com agarose	20	543,9	28,8	595,1	115,9
Com agarose	40	1127,8	19,3	1214,3	183,8
Com agarose	160	5360,0	323,0	5176,0	277,4
Sem agarose	15	708,5	26,7	770,8	97,3
Sem agarose	60	3189,1	135,4	3426,0	200,2

Fonte: Elaborado pelo autor.

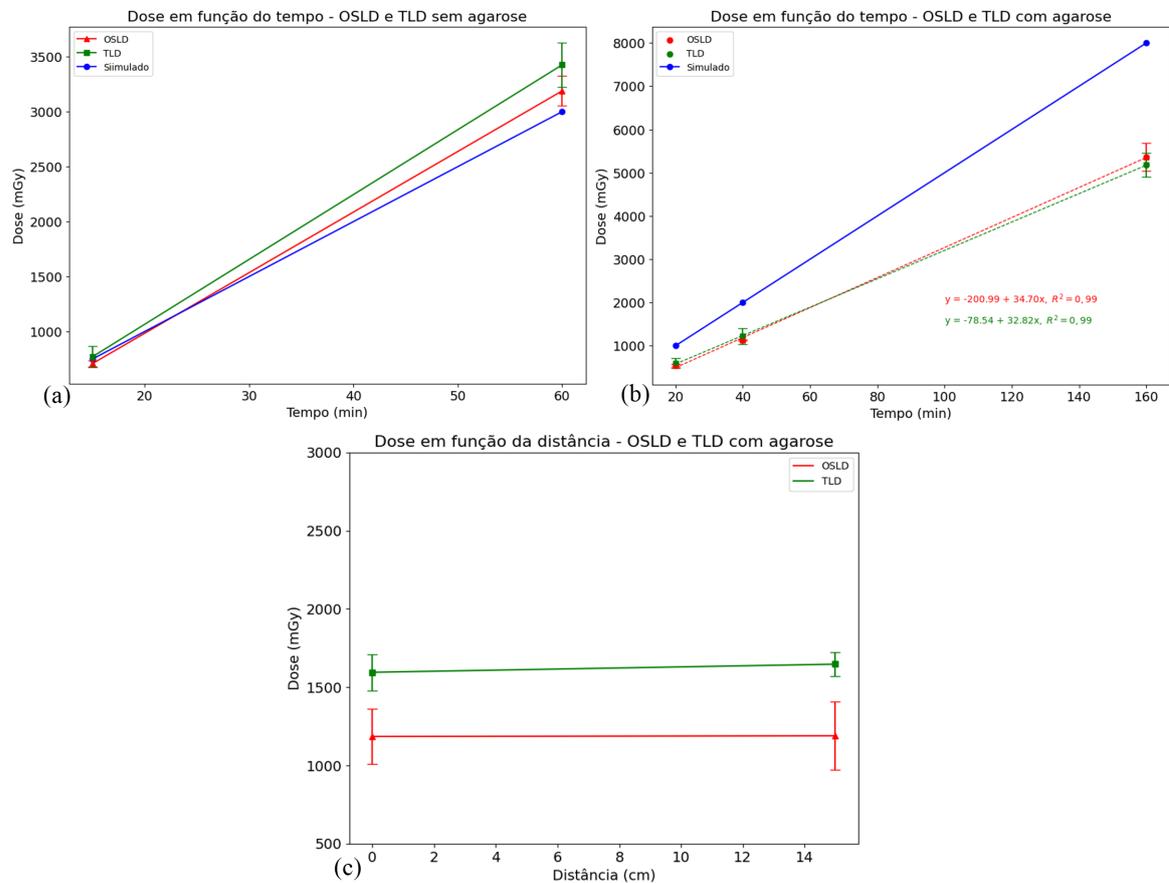
Com os dados dos dosímetros expostos sem agarose por 60 min [Figura 4.2(a)], é possível determinar a taxa de dose do *Mini-X2*:

$$OSLD : (3,19 \pm 0,14) \text{ Gy/h}$$

$$TLD : (3,43 \pm 0,20) \text{ Gy/h.}$$

A Figura 4.2(b) mostra a dose absorvida em função do tempo para os dosímetros OSLD e TLD com agarose.

Figura 4.2 – (a) Dose absorvida em função do tempo para os dosímetros OSLD e TLD sem agarose, (b) com agarose e (c) com agarose, separados por uma distância de aproximadamente 15 cm.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nesse caso, como não há uma exposição de 60 minutos, pode-se obter a taxa de dose substituindo o valor do tempo nas curvas ajustadas aos dados.

$$OSLD \approx 1,88 \text{ Gy/h}$$

$$TLD \approx 1,89 \text{ Gy/h.}$$

Quantitativamente, verifica-se que a taxa de dose de $(3,19 \pm 0,14)$ Gy/h fornecida pelos OSLDs e a taxa de dose de $(3,43 \pm 0,20)$ Gy/h fornecida pelos TLDs apresentam erro relativo percentual de 5,63 % e 13,58 % respectivamente em relação ao valor de 3,02 Gy/h simulado previamente, o que indica que a taxa de dose real do gerador está de acordo com as simulações do *SpekCalc*. Além disso, é importante ressaltar o baixo desvio padrão das medidas, que indica uma baixa variabilidade.

Existem duas razões pelas quais é importante destacar os resultados obtidos: em primeiro lugar, esses resultados validam tanto a taxa de dose do gerador quanto o *software* SpekCalc, que não haviam sido previamente testados nos laboratórios internos do CNPEM. Em segundo

lugar, esses resultados demonstram a capacidade de alcançar doses absorvidas significativas em períodos de exposição relativamente curtos, o que é interessante no caso da exposição de amostras biológicas – dado que não devem permanecer o menor tempo possível fora da cultura.

Para os dosímetros expostos com agarose, no entanto, há uma diminuição significativa da taxa de dose, como é possível verificar pela Figura 4.2(b). Neste caso, a taxa de dose de aproximadamente 1,88 Gy/h fornecida pelos OSLDs e a taxa de dose dos TLDs de aproximadamente 1,89 Gy/h apresentam erro relativo percentual de 37,8% e 37,4%, respectivamente.

Pela Tabela 4.1, observa-se que os desvios das medidas dos dosímetros com agarose são baixos. Portanto, é improvável que o alto erro relativo percentual se deva a problemas experimentais, mas possivelmente à absorção dos fótons de baixa energia pela agarose. É importante notar que a filtragem dos fótons de baixa energia era esperada, e a análise dos valores experimentais é crucial para aprimorar os desenhos experimentais com base nesses resultados.

Quanto à variação da dose absorvida em função da distância do foco de incidência do feixe [Figura 4.2(c)], pode-se concluir que não há diferença considerável entre a dose absorvida em cada poço, mesmo que estejam em extremos opostos. Isso possivelmente se deve à grande divergência do feixe, que é de 120°, o que torna a variação da dose absorvida quase insignificante para as dimensões da placa à distância de 30 cm da fonte.

4.2 Elaboração do protocolo

A Figura 4.3 mostra as imagens obtidas com microscopia óptica sem e com Trypan, bem como as imagens obtidas com microscopia de fluorescência, todas para as condições do poço do controle e do poço com agarose 1%.

A utilização do Trypan visou mostrar qualitativamente se havia alguma diferença visual entre o número de células no controle e o número de células no poço em que a agarose foi removida e se haveria um maior número de células inviáveis no poço em que as células foram tratadas com agarose. Pela Figura 4.3 é possível notar que não há diferença visual aparente.

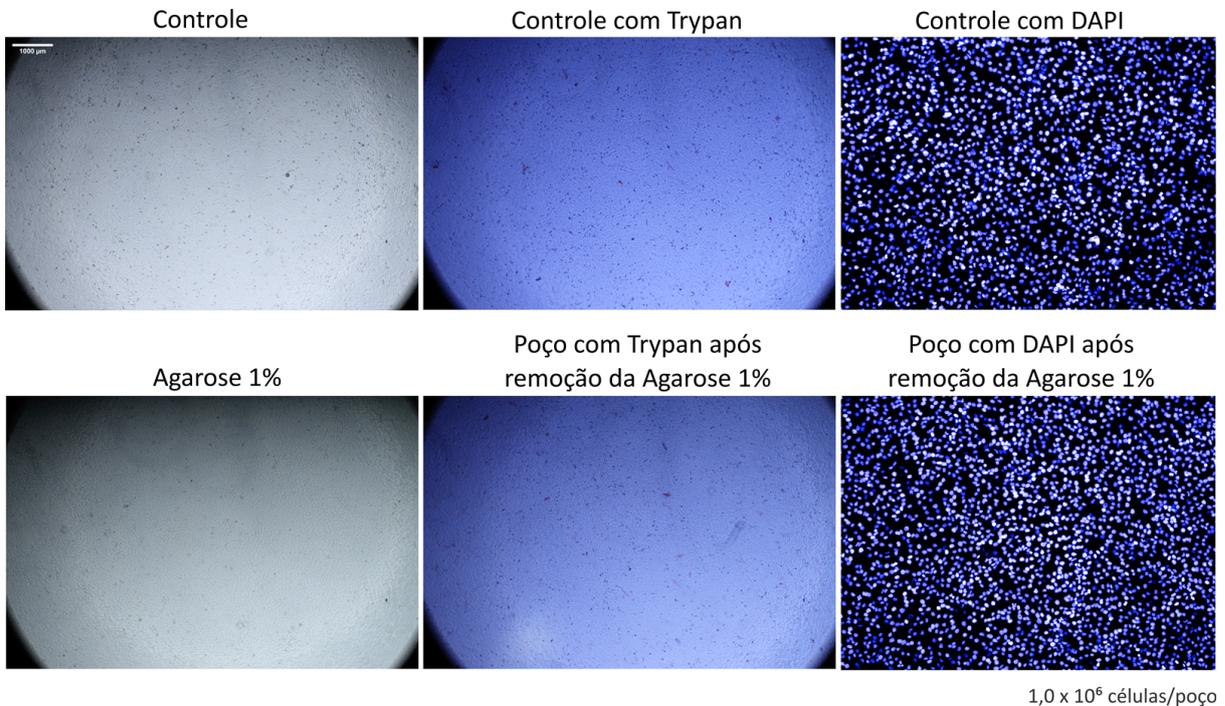
A utilização do DAPI visou, além de uma análise qualitativa, promover uma quantificação das células no poço controle e no poço tratado com agarose. Qualitativamente, pode-se observar pela Figura 4.3 que, assim como no caso do Trypan, não há nenhuma indicação de remoção de células pela agarose nem de morte celular, uma vez que as imagens são semelhantes nas duas condições.

A Figura 4.4 dispõe os resultados quantitativos da análise feita com os dados do DAPI. Foram obtidas 25 imagens, denominadas “campos”, de cada um dos poços com DAPI: controle e células previamente submetidas à agarose 1%. Cada imagem corresponde a um n , portanto para cada condição obteve-se $n = 25$ amostras. Após o cálculo da média e do desvio padrão de cada uma das condições, aplicou-se o teste t^3 e foi possível confirmar as observações qualitativas, isto

³ O teste t de Student é o método estatístico mais utilizado para calcular a diferença entre as médias de dois grupos de dados paramétricos – que seguem uma distribuição normal.

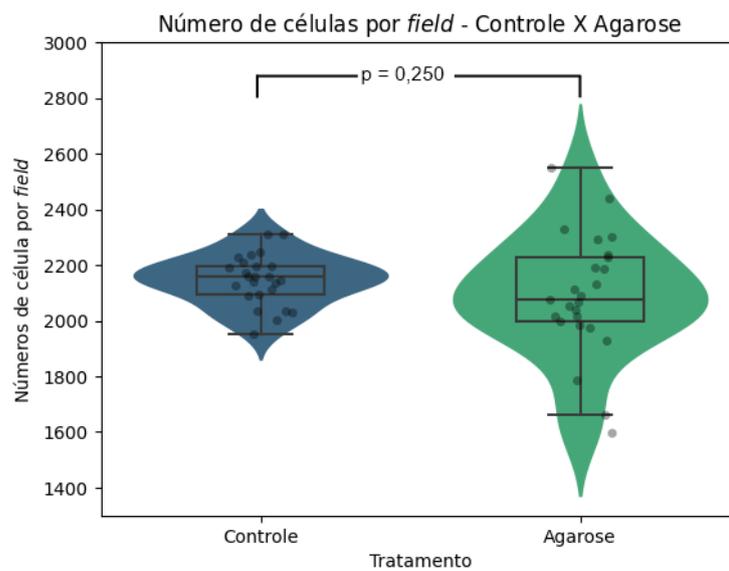
é, não há diminuição da viabilidade nem remoção de células aderidas após a adição, gelificação e remoção da agarose 1%, uma vez que $p = 0,250$.

Figura 4.3 – Imagens obtidas das células submetidas à agarose 1%



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4.4 – Comparação entre o número de células por campo de cada um dos tratamentos – controle e agarose.



Fonte: Elaborado pelo autor.

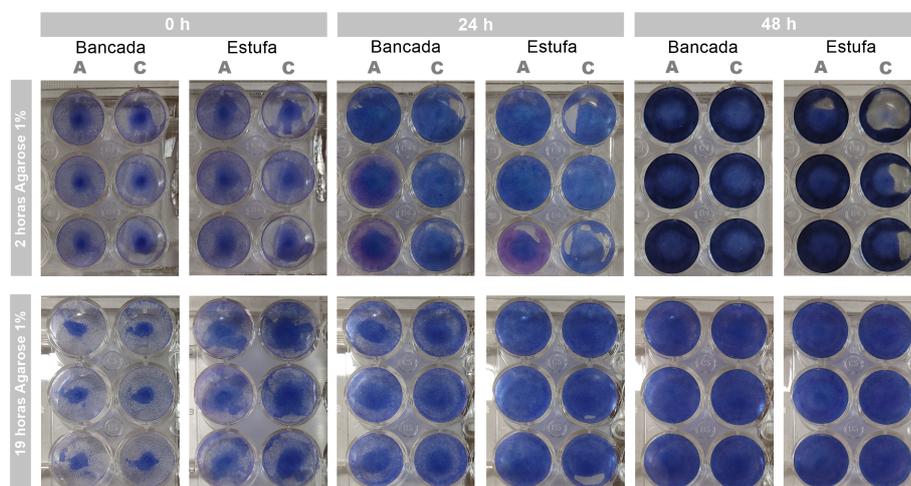
Após a realização do teste inicial com agarose 1%, partiu-se para experimentos maiores com o composto. O primeiro experimento realizado consistiu na exposição das células à agarose 1% por 2 horas, tempo de exposição calculado para que fosse atingida a dose absorvida de 4 Gy com o *Mini-X2*, considerando-se a taxa de dose medida de aproximadamente 1,9 Gy/h. Além disso, considerou-se as condições dentro e fora da incubadora, de modo a verificar se a permanência das células fora do ambiente de cultura durante o tempo de exposição poderia danificá-las para além dos danos causados pela radiação. Tanto uma possível toxicidade da agarose quanto o estresse causado pela ausência do ambiente de cultura são indesejáveis, uma vez que se quer analisar apenas os danos da radiação sem ruídos causados por outros tipos de estresse.

O segundo experimento seguiu exatamente o mesmo princípio, com a diferença de que as células permaneceram por 19 horas com agarose, também dentro e fora da incubadora. O tempo de incubação de 19 horas foi escolhido considerando-se um maior tempo de exposição, caso fosse necessário.

Nos dois experimentos, cada condição foi realizada em triplicata e todas tiveram seus respectivos controles – células com meio de cultura convencional. As amostras foram analisadas imediatamente, 24 e 48 horas após a remoção da agarose, sendo que as placas foram todas mantidas na estufa com meio de cultura convencional após a remoção, de modo a observar a recuperação e proliferação das células. As células foram analisadas qualitativamente com o teste Giemsa e quantitativamente com o ensaio de resazurina.

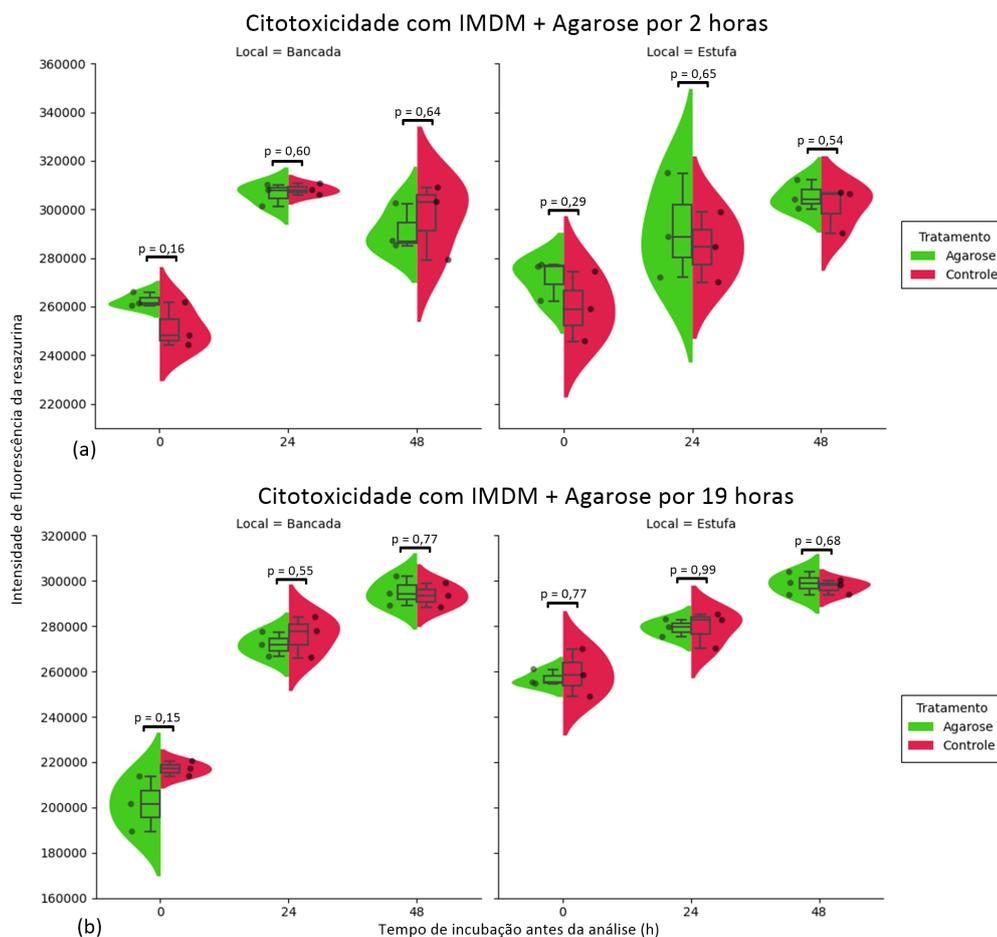
A Figura 4.5 mostra os resultados qualitativos do teste Giemsa para as condições experimentais testadas: 2 ou 19 horas de exposição à agarose 1%, na estufa ou na bancada, analisadas 0, 24 ou 48 horas após a remoção da substância. A Figura 4.6 mostra as comparações quantitativas entre poços do controle e poços com agarose, para 2 e 19 horas de incubação. Os gráficos foram plotados a partir dos resultados do teste de resazurina.

Figura 4.5 – Resultados do teste Giemsa para todas as condições experimentais. A = agarose, C = controle.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4.6 – (a) Resultados resazurina para incubação da agarose 1% por 2 e (b) por 19 horas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir da Figura 4.5 é possível observar que, macroscopicamente, quase não há diferença entre células submetidas à agarose e células do controle. No experimento de 2 horas, observa-se inclusive que as células que descolaram do poço foram do controle, e não da agarose 1%, o que significa que havia um número muito grande de células, que perdeu a aderência. No caso da agarose 1%, pode-se ver que quase não houve regiões vazias, provavelmente devido a uma diminuição da proliferação celular na agarose 1%, o que é esperado, visto que há apenas metade do volume de meio de cultura e outra metade é agarose.

Ainda sobre a análise qualitativa do experimento de 2 horas, pode-se observar que também há uma diminuição da proliferação celular na condição fora da estufa, o que também é esperado dado que o metabolismo das células é reduzido fora das condições de cultura. No entanto, ainda há proliferação.

Analisando os resultados quantitativos do teste de resazurina para o experimento de 2 horas, confirma-se o observado qualitativamente. Os gráficos da Figura 4.6 mostram a intensidade de fluorescência para cada um dos tratamentos, sendo que a intensidade de fluorescência é proporcional à viabilidade das células.

De modo geral, é possível concluir que não houve diferença estatística significativa entre

controle e agarose nas 6 diferentes condições, uma vez que $p > 0,05$ para todas elas. Pode-se observar que há uma pequena diminuição na intensidade de fluorescência na condição em que a placa permaneceu na bancada e foi analisada imediatamente após a remoção da agarose quando comparada com a placa da mesma condição, porém que permaneceu na estufa. No entanto, nota-se que as células se recuperaram e se proliferaram ao analisar os resultados obtidos 24 e 48 horas após a remoção da agarose.

No caso do experimento de 19 horas com agarose 1%, é possível observar na Figura 4.5 que, qualitativamente, não há diferença aparente entre os poços do controle e os poços tratados. Nesse caso, nem os controles e nem os poços com agarose apresentam um descolamento, tanto pelo fato de a agarose não remover as células aderidas quanto pelo fato de ter havido uma diminuição no número de células plaqueadas no segundo experimento, a fim de evitar um descolamento dos controles. Com isso, pode-se concluir que, de maneira qualitativa, não há diferença entre células tratadas ou não.

Quantitativamente, pode-se observar que, de modo geral, também não há diferença estatística significativa entre células do controle e células com agarose para as mesmas condições, uma vez que $p > 0,05$ em todos os casos. A diminuição na intensidade de fluorescência das células que permaneceram por 19 horas na bancada em relação às células que permaneceram na estufa é maior, mas também observa-se que há recuperação após 24 e 48 horas e a proliferação também é mantida, em vista do aumento da intensidade de fluorescência – e consequente aumento da viabilidade.

Dessa forma, é possível concluir que a agarose, além de não prejudicar as células, ainda possibilita o fornecimento de nutrientes quando utilizada como meio de cultura. Observa-se que há uma diminuição no metabolismo das células, assim como no tempo fora da estufa, mas nenhuma das condições é significativamente danosa para as células, tornando o meio de cultura com agarose uma opção para preparo de amostras biológicas que precisem permanecer hidratadas, nutridas e serem dispostas verticalmente. Dessa forma, pode-se utilizar este preparo para exposição das células ao feixe do *Mini-X2* e de qualquer linha de luz do Sirius.

4.3 Irradiação das amostras biológicas

A Tabela 4.2 apresenta os resultados dos dosímetros expostos em conjunto com as amostras biológicas e agrupa os dados de acordo com as condições em que foram expostos. A Figura 4.7 apresenta os gráficos plotados a partir dos resultados da Tabela 4.2.

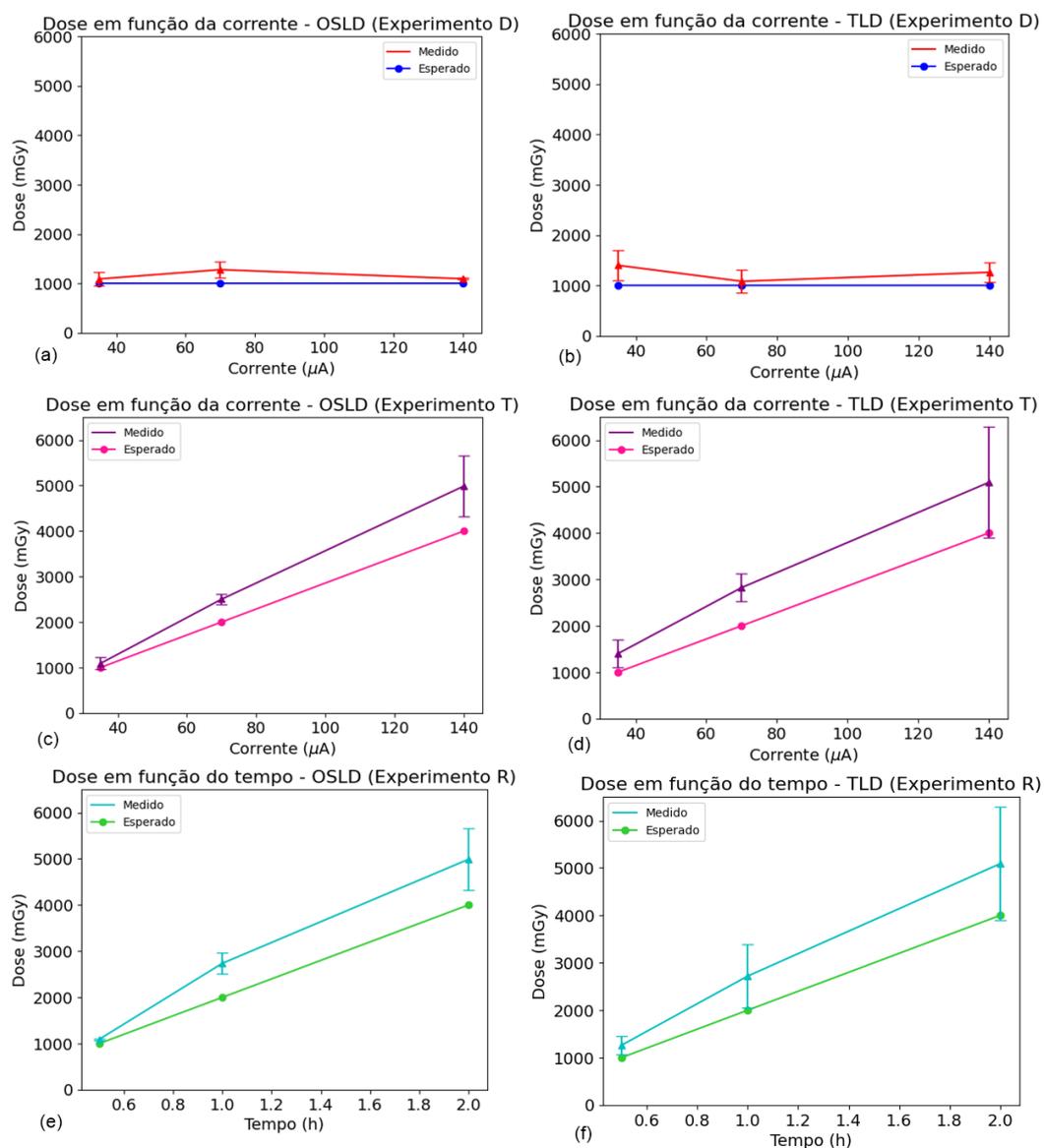
A partir da Figura 4.7 é possível observar que em todas as condições, as doses absorvidas medidas estão acima do esperado. Isto pode ocorrer devido a alterações na espessura da agarose adicionada às placas, o que aumenta a quantidade de fótons de raios X que chegam às amostras e, consequentemente, a dose de radiação que chega aos dosímetros (OKUNO; YOSHIMURA, 2010).

Tabela 4.2 – Dados obtidos após leituras dos dosímetros em diferentes correntes de operação do *Mini-X2*.

Experimento	Parâmetros			OSLD		TLD	
	Tempo (h)	Corrente (uA)	Dose esperada (mGy)	Dose (mGy)	SD (mGy)	Dose (mGy)	SD (mGy)
D	2	35	1000	1089,7	132,2	1400,1	300,5
	1	70		1277,1	165,6	1082,3	230,9
	0,5	140		1093,7	17,8	1262,2	191,4
T	2	35	1000	1089,7	132,2	1400,1	300,5
		70	2000	2501,6	106,8	2822,4	294,6
		140	4000	4988,4	663,6	5090,7	1197,1
R	0,5	140	1000	1093,7	17,8	1262,2	191,4
	1		2000	2737,3	227,8	2720,2	672,8
	2		4000	4988,4	663,6	5090,7	1197,1

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4.7 – Dose absorvida medida com OSLDs e TLDs nas condições D, T e R.



Fonte: Elaborado pelo autor.

No entanto, é possível observar que, mesmo com as alterações numéricas, a tendência linear

das funções é mantida, como esperado, exceto nas condições do experimento D (Figura 4.7 (a) e (b)), em que o desvio padrão é tão alto que desfaz a tendência linear.

Embora espere-se que ao diminuir a corrente e aumentar o tempo de exposição seja possível atingir a mesma dose de radiação, dado que a dose varia de forma linear com a corrente (LIRA et al., 2015), deve-se atentar a fluxos e doses baixas, pois os dosímetros possuem limites de detecção em que se tornam menos eficazes (PODGORSAK, 2016).

No que diz respeito à reprodutibilidade, é evidente que tanto os dosímetros OSLD quanto os dosímetros TLD demonstram uma consistência semelhante, embora o OSLD se destaque levemente como o mais eficaz nesse aspecto.

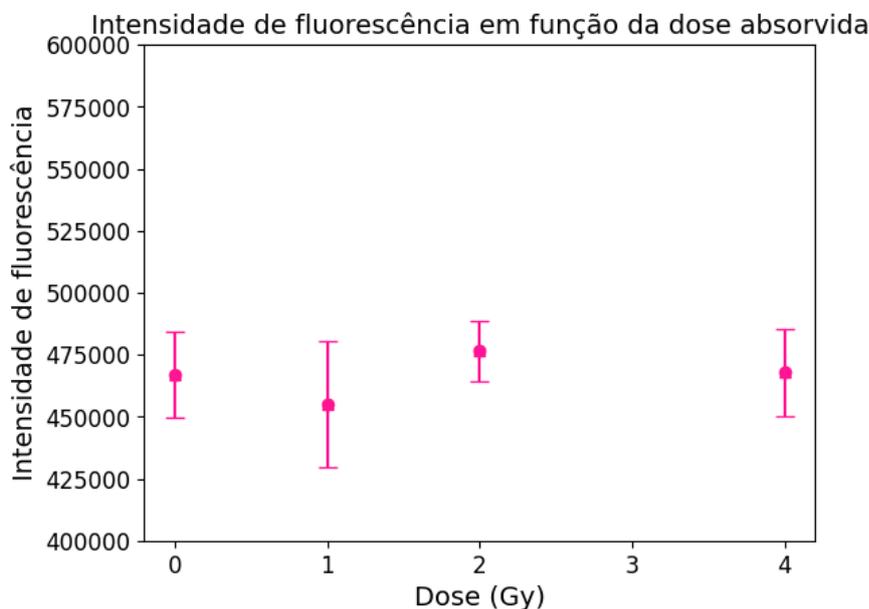
De modo geral, é possível concluir que, mesmo considerando eventuais variações, os dosímetros corresponderam às tendências esperadas.

4.4 Ensaios biológicos pós-irradiação

4.4.1 Citotoxicidade com resazurina

A Figura 4.8 apresenta os resultados obtidos após ensaio de resazurina com células irradiadas.

Figura 4.8 – Ensaio de resazurina após irradiações.



Fonte: Elaborado pelo autor.

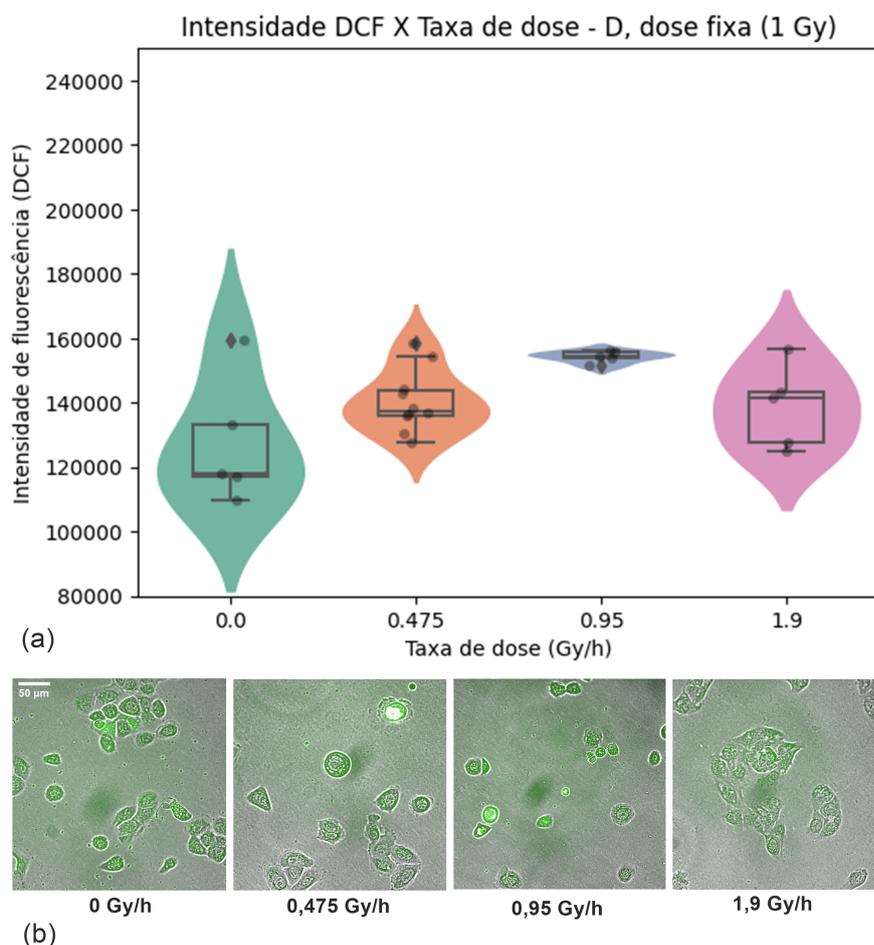
Os mecanismos de ação da radiação são razoavelmente bem conhecidos, mas os mecanismos de resposta das células à irradiação são complexos. Diversos processos biológicos intracelulares podem levar a diferentes respostas à radiação, especialmente se tratando de baixas doses depositadas em tempos consideravelmente longos, como algumas horas (JOINER; KOGEL, 2019).

Como é possível observar na Figura 4.8, não houve diferença significativa entre células expostas a qualquer dose de radiação entre 1 e 4 Gy e o controle não irradiado. Diferente dos dosímetros que apenas acumulam a dose absorvida, as células são um organismo ativo, que possui sensibilidade ou resistência específicas a determinados tipos de radiação, bem como possui mecanismos de proteção e reparo. Ao verificar a atividade mitocondrial das células imediatamente após a irradiação, é possível que as células não tenham tido tempo suficiente para responder aos danos (SANCAR et al., 2010). Dessa forma, para avaliar completamente os danos biológicos causados por esta faixa de dose e por este perfil de raios X, se faz necessário acompanhar as amostras ao longo do ciclo celular.

4.4.2 ROS

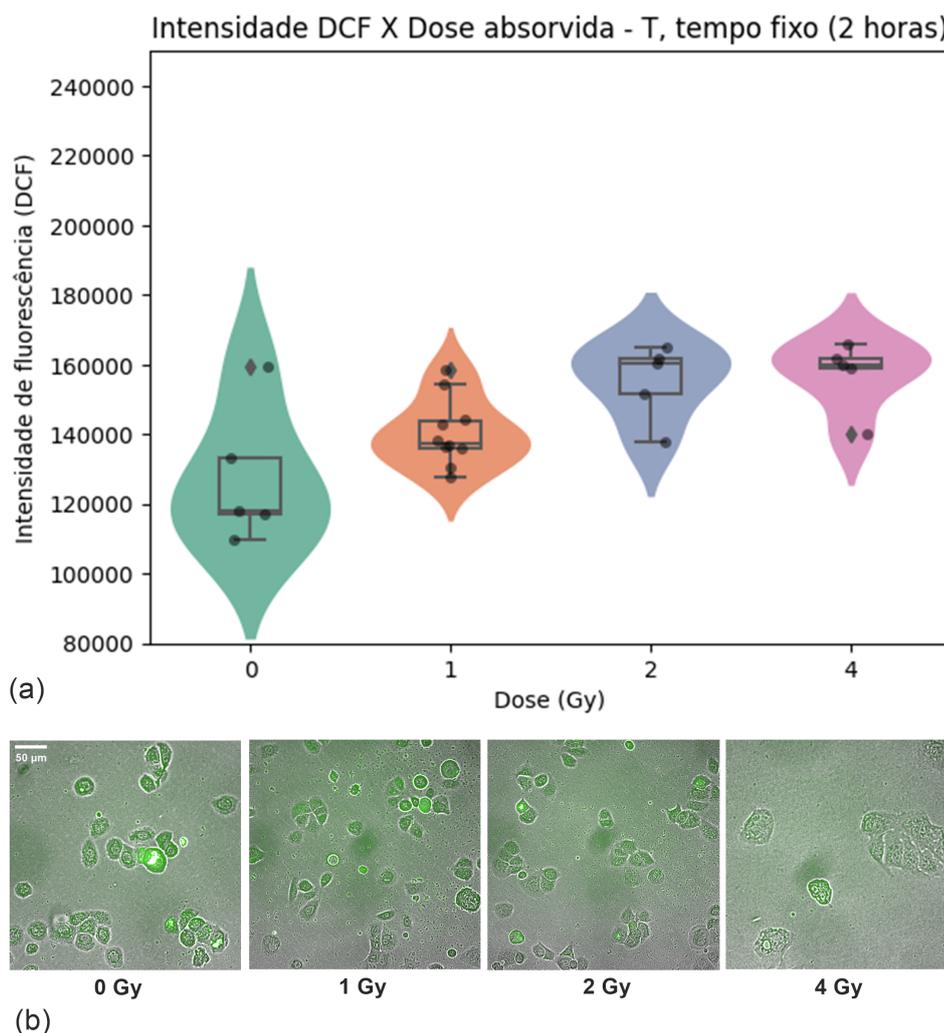
Os resultados quantitativos e qualitativos obtidos na realização dos experimentos em todas as condições (D, T e R) são expressos nas Figuras 4.9, 4.10 e 4.11. A Figura 4.12 apresenta os resultados qualitativos obtidos na repetição do experimento na condição R.

Figura 4.9 – (a) *Boxplot* e *violin plot* dos resultados obtidos com o ensaio de ROS após irradiação das células na condição D. (b) Imagens de campo claro e fluorescência para cada uma das exposições específicas da condição.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4.10 – (a) *Boxplot* e *violin plot* dos resultados obtidos com o ensaio de ROS após irradiação das células na condição T. (b) Imagens de campo claro e fluorescência para cada uma das exposições específicas da condição.



Fonte: Elaborado pelo autor.

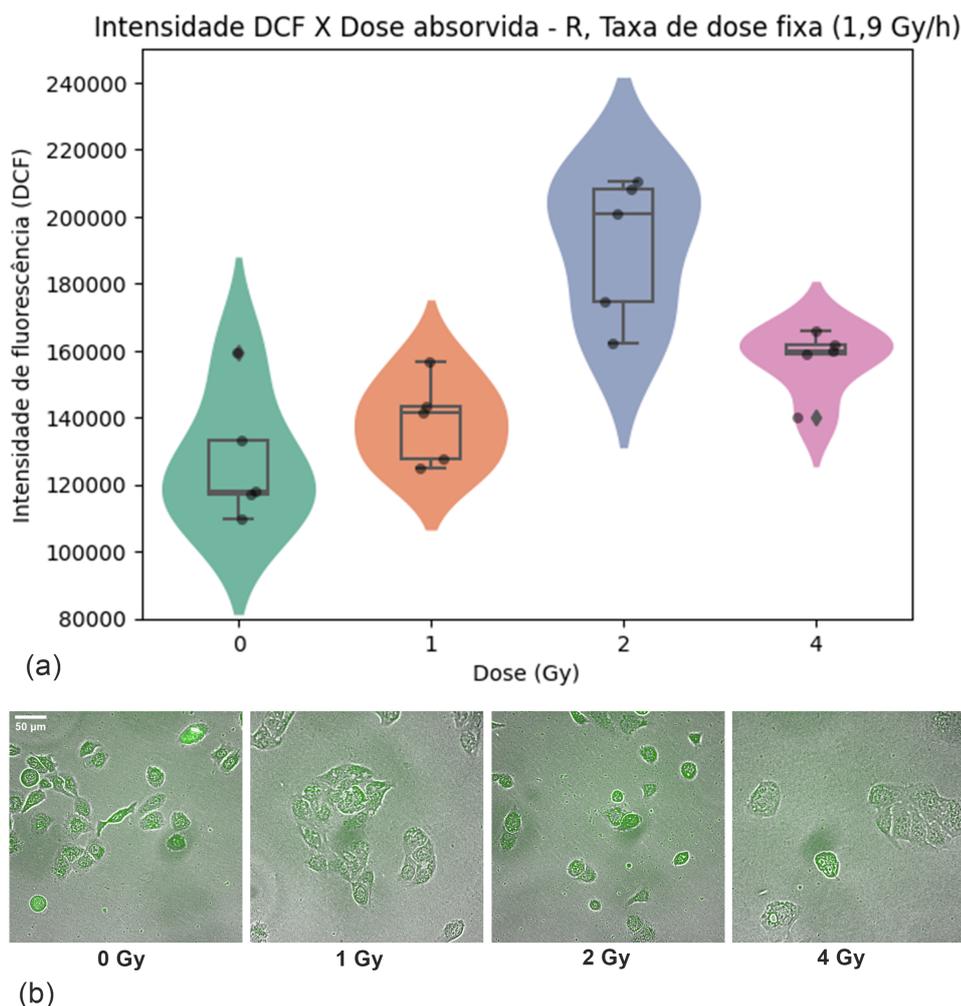
A quantificação de espécies reativas de oxigênio é uma forma interessante de avaliar os possíveis efeitos da radiação ionizante em células vivas, dado que a maior parte da célula é composta por água. Os efeitos diretos da radiação são mais difíceis de se observar, dada a pequena área de interação apresentada pelo material genético (JOINER; KOGEL, 2019).

Naturalmente, as células produzem ROS, devido a diversos fatores estressantes. No entanto, a radiação ionizante é um fator adicional que aumenta esta produção (JOINER; KOGEL, 2019).

Nas Figuras 4.9, 4.10 e 4.11, observa-se de modo geral que há uma tendência de aumento na produção de ROS conforme aumenta o valor da dose absorvida – ou da taxa de dose, no caso da Figura 4.9. Como todas apresentam a mesma tendência, verifica-se que, neste intervalo de doses, não há diferença significativa entre as três formas de entrega – dose, tempo ou taxa de dose fixas.

Na Figura 4.11, é possível averiguar que a maior produção de ROS se deu na amostra cuja dose absorvida foi de 2 Gy. Esperava-se que, quanto maior o valor da dose absorvida, maior a

Figura 4.11 – (a) *Boxplot* e *violin plot* dos resultados obtidos com o ensaio de ROS após irradiação das células na condição R. (b) Imagens de campo claro e fluorescência para cada uma das exposições específicas da condição.

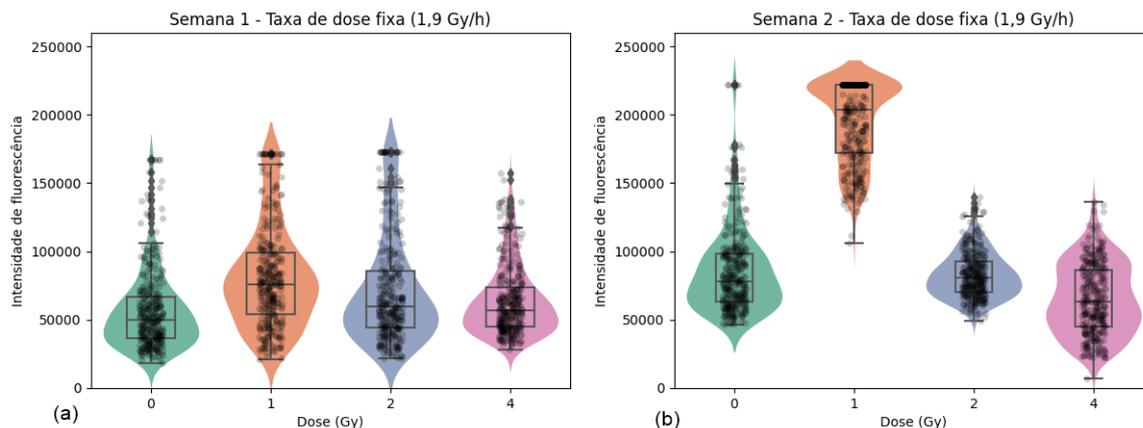


Fonte: Elaborado pelo autor.

produção de ROS. No entanto, uma hipótese é de que isto pode ocorrer devido ao longo tempo de exposição, que pode permitir que a célula ative seus mecanismos de proteção contra peróxidos – constantemente presentes nas células. Estes mecanismos consistem especialmente em: consumo de antioxidantes e ativação de enzimas de degradação (HUCHZERMAYER et al., 2022). Com isso, é possível que a célula controle os níveis de ROS e não haja um acúmulo linear, como seria esperado no caso de um dosímetro.

Nos experimentos replicados referentes à condição R, verifica-se que os resultados da semana 1 indicam que não há diferença significativa entre amostras irradiadas e controle não irradiado. No entanto, na semana 2, a amostra irradiada com 1 Gy apresentou elevada intensidade de fluorescência em relação ao controle e até em relação às doses maiores. É possível observar que tanto o terceiro quartil do *boxplot* quanto o limite superior e os *outliers* são coincidentes, o que é uma característica típica de saturação de detectores. Neste caso, a saturação pode ter ocorrido por um estresse em excesso sofrido pela amostra, que não necessariamente está relacionado

Figura 4.12 – (a) *Boxplot* e *violin plot* dos resultados obtidos com o ensaio de ROS após irradiação das células na condição R na semana 1 e (b) na semana 2.



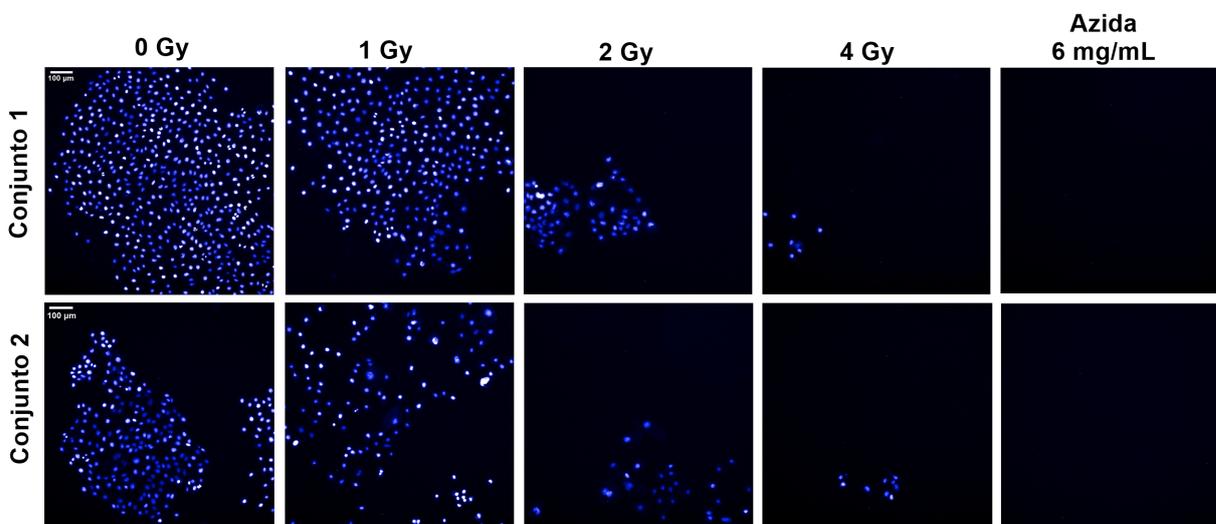
Fonte: Elaborado pelo autor.

à radiação. Um exemplo de estresse adicional pode ser o tempo fora das condições de cultura, mesmo com meio de cultura suplementado com HEPES.

Um ponto importante a ser mencionado é que, para obter melhores sinais de ROS, deve-se utilizar poços com células confluentes. Como pode ser observado nas imagens, a confluência nos experimentos realizados estava baixa, o que também é um fator que pode contribuir na ausência de diferença entre controle e células irradiadas.

4.4.3 DAPI

Figura 4.13 – Fluorescência com DAPI obtidas após 6 dias de incubação pós-irradiação. As imagens representativas foram obtidas do mesmo experimento e ilustram a morfologia das colônias.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O teste com DAPI foi realizado com as amostras incubadas por 6 dias após as irradiações (na

condição R), antes da realização do ensaio clonogênico. A Figura 4.13 oferece uma representação da morfologia dos núcleos das células descendentes das células inicialmente irradiadas. É perceptível, tanto no primeiro conjunto quanto no segundo conjunto, que ocorre um aumento na deformação dos núcleos à medida que a dose de radiação à qual as células-mãe foram expostas aumenta.

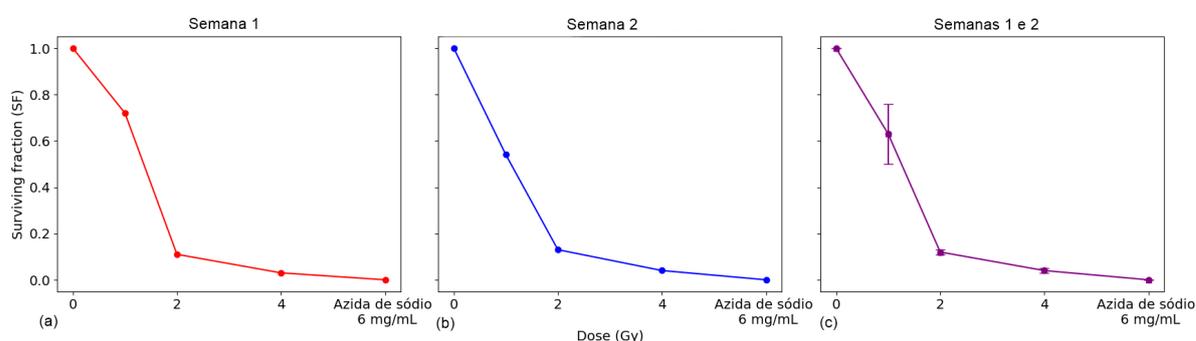
De acordo com (KOBAYASHI et al., 2017), é possível observar os três principais mecanismos de morte celular por irradiação utilizando DAPI: apoptose, catástrofe mitótica e senescência. Na Figura 4.13, verifica-se especialmente núcleos condensados referentes à apoptose e núcleos senescentes, mesmo a partir de 1 Gy.

Além disso, é possível observar uma redução no número de células por colônia com o aumento da dose de radiação. Este ponto será abordado na próxima seção.

4.4.4 Ensaio Clonogênico

A Figura 4.14 apresenta os resultados quantitativos do ensaio clonogênico e a Figura 4.15 apresenta imagens das placas em que o ensaio foi realizado.

Figura 4.14 – Fração sobrevivente de células após a irradiação da (a) semana 1, (b) semana 2 e (c) da média entre as duas semanas.



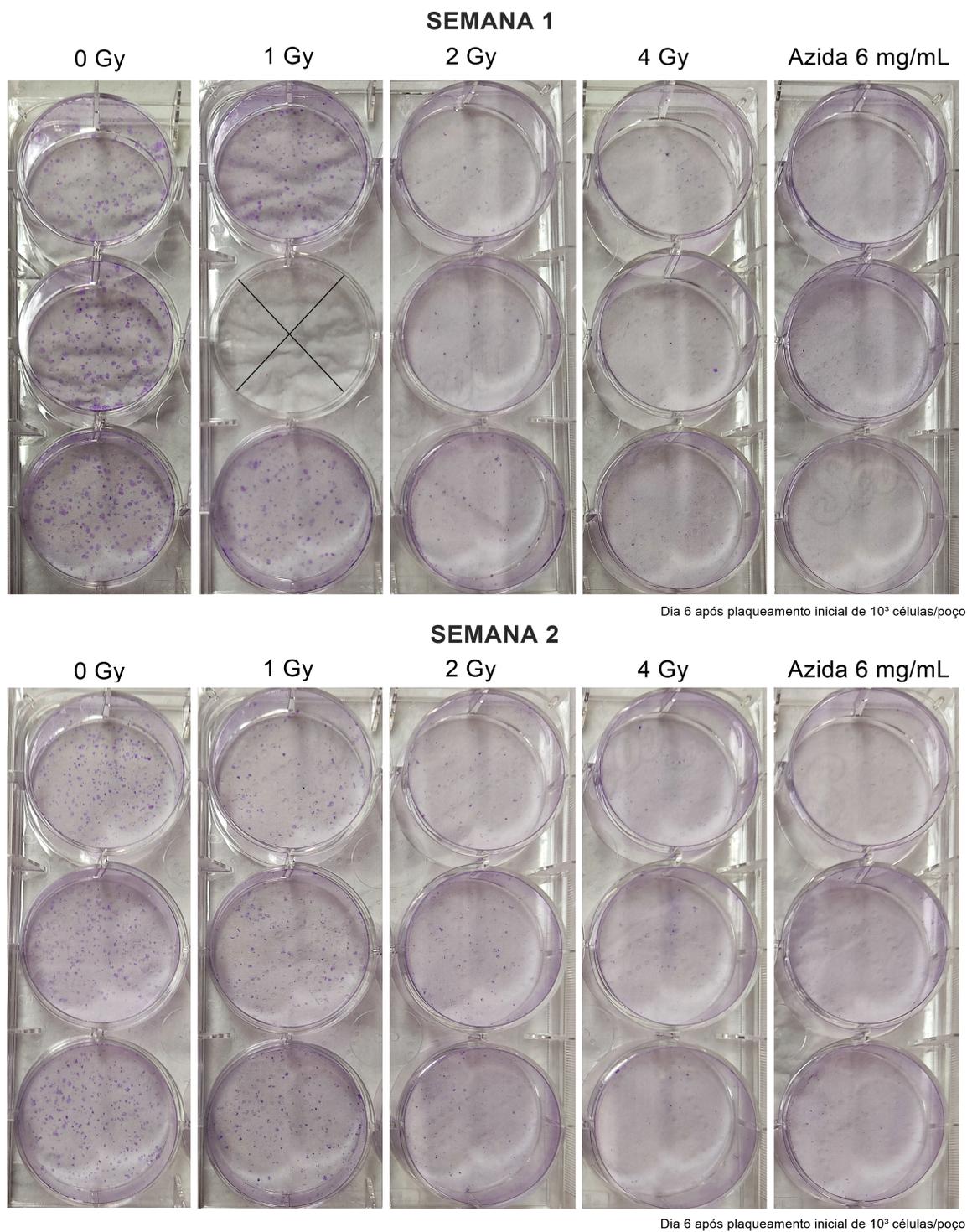
Fonte: Elaborado pelo autor.

O ensaio clonogênico permitiu verificar a capacidade de sobrevivência e proliferação das células após a irradiação, fornecendo informações sobre sua resistência ao tratamento. Avaliando qualitativamente a Figura 4.15, é possível verificar que as colônias diminuíram conforme aumentou a dose de radiação, de acordo com o esperado (FRANKEN et al., 2006).

Ao serem mantidas em cultura após as irradiações, as células possuem tempo para se recuperar e manifestar suas respostas aos danos biológicos. Por serem submetidas a maiores doses acumuladas de radiação, as células expostas a 2 e 4 Gy possuem uma maior quantidade de DNA aberrante e, conseqüentemente, perdem significativamente sua capacidade de proliferação (HALL; GIACCIA, 2019).

A Figura 4.14 mostra as curvas de sobrevivência das células em função da dose absorvida de radiação, que concorda com as indicações qualitativas. Além disso, é possível observar que os resultados das semanas 1 e 2 são reprodutíveis e apresentam poucas diferenças entre si.

Figura 4.15 – Imagens das colônias coradas após adição do violeta cristal.



Fonte: Elaborado pelo autor.

5 Considerações finais

Neste trabalho, realizou-se um estudo com queratinócitos imortalizados irradiados por um gerador de raios X de bancada. Para isso, desenvolveu-se um protocolo de preparo de amostras que permitisse a nutrição e hidratação das células ao mesmo tempo em que permanecessem imobilizadas verticalmente para irradiação. Além de verificar as respostas das células expostas à radiação, desenvolveu-se também um protocolo para avaliação dos efeitos biológicos dos raios X, por meio de métodos de avaliação de danos imediatos e longitudinais.

O método utilizando meio de cultura com agarose mostrou-se viável no aspecto técnico, pois possibilitou o posicionamento vertical das placas, e biológico, pois após a aplicação do teste de resazurina, verificou-se que a agarose adicionada ao meio de cultura não gerou estresse celular. Portanto, este método foi utilizado durante a irradiação das amostras e se apresenta como uma possibilidade para outros experimentos semelhantes. O único ponto a ser considerado é a correção da dose de radiação depositada na amostra, uma vez que a espessura do meio influencia no valor da dose absorvida pelas células.

Com o teste de resazurina, avaliou-se o metabolismo mitocondrial das células 4 horas após a irradiação. Foi possível observar que, independentemente da dose recebida, as células irradiadas não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle não irradiado. Esta resposta não indica que as células não foram danificadas, mas que os valores de dose utilizados não foram altos o suficiente para gerar danos observáveis no intervalo de tempo testado. Desta forma, como não seria possível aumentar o intervalo de dose, se fez necessário realizar experimentos que avaliassem os efeitos biológicos em um maior intervalo de tempo.

O ensaio de ROS permitiu quantificar as espécies reativas de oxigênio nas células através da fluorescência. A radiação ionizante é um dos fatores que leva a um aumento na produção de ROS, portanto este teste é crucial na avaliação de danos. Com os resultados obtidos, foi possível verificar que, no intervalo de doses utilizado, não houve diferença entre as três formas de entrega – dose, tempo e taxa de dose fixos. No geral, observou-se uma tendência de aumento de ROS com o aumento da dose, mas o pico de produção se deu em 2 Gy, sendo que o esperado seria em 4 Gy. Isto eventualmente se deve aos mecanismos antioxidantes das células, que eliminam as ROS em vez de armazená-las linearmente. Com isso, é possível concluir que o ensaio de ROS apresenta sensibilidade às quantidades de ROS geradas pela radiação ionizante até mesmo em baixas doses, sendo, portanto, aplicável a experimentos nas linhas de luz, que ocasionalmente podem atingir doses mais altas.

Com o DAPI, marcador fluorescente intercalante de DNA, foi possível observar a morfologia das colônias formadas pelas células-filhas das células irradiadas. Com o aumento da dose, as células diminuíram em quantidade nas colônias e apresentaram corpos apoptóticos e sinais de senescência. Embora o DAPI tenha sido utilizado com caráter qualitativo, é possível utilizá-lo para quantificação de células senescentes, núcleos apoptóticos e de catástrofe mitótica, o que

pode ser de grande importância em desenhos experimentais semelhantes.

Com o ensaio clonogênico, obtivemos os resultados quantitativos da capacidade de proliferação das células irradiadas, seis dias após a irradiação. Observamos a diminuição da fração de células sobreviventes com o aumento da dose de radiação, assim como indicado pelo DAPI. Isso era esperado pois, quanto maior a dose absorvida, maior a probabilidade de a célula sofrer mutações e perder a capacidade de proliferação. Como mencionado, ao realizar testes considerando um maior intervalo de tempo entre a irradiação e a aferição dos efeitos biológicos, foi possível verificar que as células sofreram danos, mesmo com o intervalo de doses utilizados.

Vale ressaltar a importância deste trabalho no interior das instalações do Sirius, uma vez que todas as linhas de luz com interesse em pesquisas biológicas precisam conhecer os efeitos da radiação entregue, dado que seus perfis energéticos são únicos. A linha de luz MOGNO, em especial, será uma das principais beneficiadas pelos resultados obtidos, uma vez que pretende-se realizar imagens de tomografia computadorizada de forma longitudinal em pequenos animais, sendo assim, os danos gerados pelo seu feixe de raios X quasi-monocromático e de alto fluxo devem ser bem conhecidos para serem contornados ou evitados.

Por fim, outro grande beneficiado destes resultados será o Projeto Órion, laboratório de biossegurança nível 4 (NB4) que está sendo construído de maneira acoplada ao Sirius. O Órion será um laboratório exclusivo no mundo, dado que será o único NB4 com linhas de luz em seu interior. As pesquisas serão voltadas para doenças causadas por vírus e bactérias de alto risco, portanto as amostras utilizadas serão biológicas e, conseqüentemente, poderão sofrer danos indesejáveis ao serem expostas aos feixes. Compreender os efeitos biológicos destas linhas de luz será não somente interessante, mas extremamente necessário.

Referências

- ALBERTS, Bruce et al. **Biologia Molecular da Célula**. 6. ed. Massachusetts: Artmed, 2017.
- AMPTEK. **Mini-X2 X-Ray Tube Specifications**. Página da internet. Disponível em: <https://www.amptek.com/products/mini-x2-x-ray-tube>. Acesso em: 27 set. 2023.
- ANTONI, Rodolphe; BOURGOIS, Laurent. **Applied Physics of External Radiation Exposure: Dosimetry and Radiation Protection**. 1. ed. Paris: Springer, 2017.
- BAROUKI, Robert. Cellular stress. **FEBS Letters**, Paris, 2007. v. 581, n. 19, p. 3581. Disponível em: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/j.febslet.2007.07.001>. Acesso em: 22 set. 2023.
- BERGER, M. J. **XCOM: Photon Cross Sections Database**. Página da internet. Disponível em: <https://physics.nist.gov/PhysRefData/Xcom/html/xcom1.html>. Acesso em 23 jul. 2023.
- BORRA, Ricardo Carneiro et al. A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. **Brazilian Oral Research**, São Paulo, 2009. v. 23, n. 3, p. 255-262. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bor/a/9frN6FtbLbBnckz34fHLQKc/?lang=en>. Acesso em: 12 ago. 2023.
- CARVALHO, Hernandes F.; RECCO-PIMENTEL, Shirlei Maria. **A célula**. 3. ed. Barueri: Manole, 2013.
- CELIK, Hakim et al. Effects of Ionizing and Non-Ionizing Radiation on Oxidative Stress and the Total Antioxidant Status in Humans Working in Radiation Environments. **Bezmialem Science**, Turquia, 2016. v. 3, p. 106-109. Disponível em: http://cms.galenos.com.tr/Uploads/Article_20323/BAS-4-106-En.pdf. Acesso em: 7 ago. 2023.
- CERRITO, Lucio. **Radiation and Detectors: Introduction to the Physics of Radiation and Detection Devices**. 1. ed. Londres: Springer, 2017.
- CNPEN. **Projeto Sirius: A nova fonte de luz síncrotron brasileira**. Página da internet. Disponível em: <http://www.lnls.cnpem.br/sirius/projeto-sirius/>. Acesso em: 07 jul. 2023.
- EISBERG, Robert; RESNICK, Robert. **Física Quântica: Átomos, Moléculas, Sólidos, Núcleos e Partículas**. 9. ed. Rio de Janeiro: Editora Campus, 1994.
- FEOKTISTOVA, M.; GESERICK, P.; LEVERKUS, M. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. **Cold Spring Harbor Protocols**, Heidelberg, 2016. v. 4, p. 343-46. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27037069/>. Acesso em: 23 set. 2023.
- FINKENTHAL, Daniel et al. **Introduction to the Electromagnetic Spectrum**. 1. ed. Califórnia: General Atomics, 1996.
- FRANKEN, N. A. P. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, Amsterdam, 2006. v. 1, n. 5, p. 2315-9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17406473/>. Acesso em: 23 set. 2023.

- FRESHNEY, Ian R. **Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications**. 6. ed. Glasgow: Wiley, 2010.
- FULDA, Simone et al. Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death. **International Journal of Cell Biology**, Ulm, 2009. v. 2010, p. 1-23. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20182529/>. Acesso em: 16 set. 2023.
- GRUPEN, Claus; RODGERS, Mark. **Radioactivity and Radiation: What they are, what they do and how to harness them**. 1. ed. Siegen: Springer, 2016.
- GUSTAVSSON, Per Erik; OLOFLARSSON, Per. Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death. **Journal of Chromatography Library**, Lund, 2003. v. 67, p. 122-141. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0301477003800222>. Acesso em: 17 set. 2023.
- HALL, Eric J.; GIACCIA, Amato J. **Radiobiology for the Radiologist**. 8. ed. Califórnia: Wolters Kluwer, 2019.
- HOBBIE, Russell K.; ROTH, Bradley J. **Intermediate Physics for Medicine and Biology**. 5. ed. Nova York: Springer, 2015.
- HUCHZERMEYER, B. et al. Metabolic Pathway of Natural Antioxidants, Antioxidant Enzymes and ROS Providence. **Antioxidants**, Hannover, 2022. v. 11, n. 761, p. 1-20. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9025363/pdf/antioxidants-11-00761.pdf>. Acesso em: 14 set. 2023.
- JAESCHKE, E. J. et al. **Synchrotron Light Sources and Free-Electron Lasers**. 1. ed. Berlim: Springer, 2016.
- JOINER, Michael C.; KOGEL, Albert J. van der. **Basic clinical radiobiology**. 5. ed. New York: CRC Press, 2019.
- KOBAYASHI, D. et al. One-step Protocol for Evaluation of the Mode of Radiation-induced Clonogenic Cell Death by Fluorescence Microscopy. **Journal of Visualized Experiments**, Gunma, 2017. v. 18, p. 1-6. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5755180/pdf/jove-128-56338.pdf>. Acesso em: 14 set. 2023.
- LIRA, D. et al. Tube Potential and CT Radiation Dose Optimization. **American Journal of Roentgenology**, Massachusetts, 2015. v. 204, p. 5-10. Disponível em: <https://www.ajronline.org/doi/pdf/10.2214/AJR.14.13281>. Acesso em: 14 set. 2023.
- LNLS. **Linhas de Luz**. Disponível em: <https://lnls.cnpem.br/linhas-de-luz/>. Acesso em: 20 Set. 2023. 2022.
- LOWE, D. et al. Radiation dose rate effects: what is new and what is needed? **Radiat Environ Biophys**, Oxford, 2022. v. 61, p. 507-543. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00411-022-00996-0#citeas>. Acesso em: 23 set. 2023.

MARTA, Gustavo Nader. Radiobiologia: princípios básicos aplicados à prática clínica.

Diagnóstico & Tratamento, São Paulo, 2014. v. 19, n. 1, p. 45-47. Disponível em:

<http://files.bvs.br/upload/S/1413-9979/2014/v19n1/a3970.pdf>. Acesso em: 7 ago. 2023.

MC MANUS, L. M; MITCHELL, R. N. **Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms**. 1. ed. San Antonio: Elsevier, 2014.

NG, N. S.; OOI, L. A Simple Microplate Assay for Reactive Oxygen Species Generation and Rapid Cellular Protein Normalization. **Bio-protocol**, New South Wales, 2021. v. 1, n. 1, p.

1-10. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33732765/>. Acesso em: 23 set. 2023.

OKUNO, Emico; YOSHIMURA, Elisabeth Mateus. **Física das Radiações**. 1. ed. São Paulo: Oficina de Textos, 2010.

OLIVEIRA, Luciana Noronha C (ed.) et al. **Sirius: Acelerando o futuro da Ciência**. 2. ed. Campinas: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações (MCTI), 2020.

PIERCE, Benjamin A. **Genética: um enfoque conceitual**. 5. ed. Nova York: Guanabara Koogan, 2016.

PODGORSAK, Ervin B. **Radiation Physics for Medical Physicists**. 3. ed. Montreal: Springer, 2016.

POLUNDNIOWSKI, G. G. et al. SpekCalc: a program to calculate photon spectra from tungsten anode x-ray tubes. **Physics in Medicine and Biology**, Surrey, 2009. v. 54, n. 19, p. 433-38. Disponível em: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0031-9155/54/19/N01>. Acesso em: 21 set. 2023.

POLUNDNIOWSKI, G. G.; EVANS, P. M. Calculation of x-ray spectra emerging from an x-ray tube. Part I. Electron penetration characteristics in x-ray targets. **Medical Physics**, Surrey, 2007. v. 34, n. 6, p. 2164-74. Disponível em:

<https://aapm.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1118/1.2734725>. Acesso em: 21 jan. 2023.

POLUNDNIOWSKI, G. G.; EVANS, P. M. Calculation of x-ray spectra emerging from an x-ray tube. Part II. X-ray production and filtration in x-ray targets. **Medical Physics**, Surrey, 2007. v. 34, n. 6, p. 2175-86. Disponível em:

<https://aapm.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1118/1.2734726>. 21 jan. 2023.

REIS, Luana Aparecida. **Estudo da interação do DNA com o corante fluorescente DAPI utilizando a técnica de pinça óptica**. Tese (Doutorado). Dissertação (Mestrado em Física Aplicada) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2017. Disponível em:

<https://www.locus.ufv.br/bitstream/123456789/11580/1/texto%20completo.pdf>. Acesso em: 18 set. 2023.

SANCAR, A. et al. Circadian clock control of the cellular response to DNA damage.

Federation of European Biochemical Societies Letters, North Carolina, 2010. v. 584, n. 12, p. 2618-25. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20227409/>. Acesso em: 25 set. 2023.

- SEAGER, A L et al. Recommendations, evaluation and validation of a semi-automated, fluorescentbased scoring protocol for micronucleus testing in human cells. **Mutagenesis**, Swansea, 2014. v. 29, p. 155-164. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24705543/>. Acesso em: 19 ago. 2023.
- SEGRETO, Helena Regina Comodo et al. **Radiobiologia: da bancada à clínica**. 1. ed. São Paulo: Scortecci, 2016.
- TAT, J et al. Sodium azide poisoning: a narrative review. **Clin Toxicol (Phila)**, Califórnia, 2021. v. 59, n. 8, p. 683-697. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8349855/>. Acesso em: 21 set. 2023.
- TAUHATA, Luiz et al. **Radioproteção e Dosimetria: Fundamentos**. 10. ed. Rio de Janeiro: Comissão Nacional de Energia Nuclear, 2014.
- TURNER, James E. Interaction of ionizing radiation with matter. **Health Phys.**, Tennessee, 2004. v. 86, n. 3, p. 228-252. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15891451/>. Acesso em: 20 jul. 2023.
- WANG, Huaiyu; CHU, Paul K. **Characterization of Biomaterials**. 1. ed. Oxford: Academic Press, 2013.
- WILLEY, Joanne M.; SANDMAN, Kathleen M.; WOOD, Dorothy H. **Prescott's Microbiology**. 9. ed. Nova York: Mc Graw Hill Education, 2013.
- WILLMOTT, Philip. **An Introduction to Synchrotron Radiation: Techniques and Applications**. 2. ed. Nova Jersey: Wiley, 2019.
- YOSHIMURA, Elisabeth Matheus. Física das Radiações: interação da radiação com a matéria. **Revista Brasileira de Física Médica**, Rio de Janeiro, 2009. v. 3, n. 1, p. 56-67. Disponível em: <https://www.rbfm.org.br/rbfm/article/view/35>. Acesso em: 18 jul. 2023.