

Adriana Alexandre dos Santos Tavares

Análise dos Efeitos Terapêuticos dos Electrões de Auger em Culturas de Células



Universidade do Porto

Faculdade de Engenharia

FEUP

Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

Julho de 2009

Análise dos Efeitos Terapêuticos dos Electrões de Auger em Culturas de Células

Dissertação submetida à Faculdade de Engenharia da Universidade do
Porto para satisfação parcial dos requisitos do:

Mestrado em Engenharia Biomédica

Por:

Adriana Alexandre dos Santos Tavares

Licenciada em Medicina Nuclear pela Escola Superior de Tecnologia
da Saúde do Porto (2007)

Orientador:

João Manuel R. S. Tavares

Professor Auxiliar do Departamento de Engenharia Mecânica
Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

A. Tavares *Análise dos Efeitos Terapêuticos dos Electrões de Auger em Culturas de Células* 2009

Agradecimentos

Ao Professor João Manuel R. S. Tavares pelo apoio fornecido ao longo desta Dissertação, particularmente pela orientação, disponibilidade e apoio, fundamentais para a correcta e construtiva elaboração da mesma.

Ao Dr. Robert Stewart (*School of Health Sciences – Purdue University, USA*) pelo fornecimento dos sistemas computacionais *MCDS*, *MCER* e *VC*, fundamentais para a realização da presente Dissertação.

Aos meus pais e irmão por terem demonstrado, como sempre, um apoio incondicional.

A todos os que possibilitaram o desenvolvimento desta Dissertação.

Sumário

A radioterapia dirigida com electrões de Auger apresenta várias características vantajosas, mas também muitos desafios. As vantagens deste tipo de radioterapia explicam o crescente interesse da comunidade científica por este tipo de terapêutica.

O ^{99m}Tc tem sido utilizado frequentemente como agente imagiológico; contudo, recentemente, têm-se questionado o seu potencial interesse enquanto agente terapêutico. Algumas das características do ^{99m}Tc que têm motivado o crescente interesse para a sua utilização em radioterapia dirigida incluem: emissão de 4 electrões de Auger e 1.1 electrão de conversão interna por decaimento com energias entre 33 eV e 140 keV; semi-vida física de aproximadamente 6 horas e radionuclídeo-filho estável. Estas características físicas vantajosas aliadas à possibilidade de obtenção deste radionuclídeo através de um gerador *in situ* podem representar uma nova vertente da radioterapia metabólica dirigida. O objectivo principal da presente Dissertação foi avaliar o potencial terapêutico dos electrões de Auger do ^{99m}Tc em dois tipos de células: fibroblastos humanos e células da cripta intestinal humana. Para tal, foi executada uma pesquisa bibliográfica minuciosa sobre a terapia com electrões de Auger, e em particular, com electrões de Auger do ^{99m}Tc , tendo sido também utilizados métodos computacionais para modelação da cinética celular após irradiação.

Os resultados obtidos permitem concluir que: (1) os electrões CKMMX e Auger MXY do ^{99m}Tc possuem potencial terapêutico comparável às partículas alfa de elevado LET do ^{211}At e superior às partículas beta menos do ^{131}I ; (2) em termos celulares os seus efeitos são superiores (menor sobrevida celular) em células da cripta intestinal face aos fibroblastos, o que está de acordo com as premissas de radiosensibilidade celular; (3) as células quiescentes são mais sensíveis aos efeitos da radiação, face às populações heterogéneas ou em divisão; (4) a probabilidade de indução de apoptose é superior para os electrões CKMMX e Auger MXY do ^{99m}Tc face às partículas beta menos do ^{131}I (e comparáveis às partículas alfa do ^{211}At), o que se traduz numa maior eficácia em destruição celular e, portanto, no contexto tumoral numa destruição do tecido alvo potencialmente maior.

Summary

Targetted radiotherapy using Auger electrons presents multiple advantages and challenges. The advantageous characteristics of this type of radiotherapy may explain the growing interest for these specific electrons for cancer therapy.

In the last decade, ^{99m}Tc has been mainly used as an imaging agent and only recently has been analysed as a potential therapeutic agent. It is known that ^{99m}Tc emits 4 Auger electrons per decay and 1.1 internal conversion electron per decay with energies between 33 eV and 140 keV, presents a half-life of approximately 6 hours and a stable daughter nuclide. These physical properties allied to its large availability through a generator *in situ* may represent a new and important pathway in target radiotherapy. The present thesis aimed to evaluate the potential therapeutic use of ^{99m}Tc on two different cells type: human fibroblasts and human intestinal crypt cells. In order to accomplish that, a review on Auger electrons for target tumour therapy, especially those with ^{99m}Tc Auger electrons was undertaken and also computational models of cell kinetics after irradiation were used.

Experimental data obtained allow us to conclude that: (1) ^{99m}Tc electrons CKMMX and Auger MXY presents therapeutic potential comparable to high LET ^{211}At alpha particles and higher than beta minus particles of ^{131}I ; (2) cell survival after Auger electrons irradiation is lower for intestinal cells than for fibroblasts, which correlates with previous radiosensitivity data; (3) quiescent cells are more sensitive to irradiation with Auger electrons than heterogeneous cell's populations or cells on cycle; (4) apoptosis induction probability is higher for ^{99m}Tc electrons CKMMX and Auger MXY than ^{131}I beta minus particles and similar to ^{211}At alpha particles, which represents an high ability to induce cell destruction and thus, potentially higher target tissue destruction on target tumour radiotherapy.

Índice

Capítulo I: Introdução e Estrutura da Dissertação	1
1.1. Enquadramento	3
1.2. Principais Objectivos.....	3
1.3. Estrutura Organizativa	4
1.4. Contribuições Principais.....	6
Capítulo II. Radiobiologia do Ciclo Celular e Apoptose.....	7
2.1 Introdução.....	9
2.2 Principais Constituintes da Célula Eucariótica.....	9
2.2.1 Membrana Plasmática e Citoplasma.....	10
2.2.2 Material Genético e Núcleo Celular.....	10
2.3 Princípios Gerais do Ciclo Celular	13
2.4 Radiobiologia Celular.....	16
2.4.1 Efeitos Directos e Indirectos da Radiação.....	17
2.4.2 Destino das Células Irradiadas.....	18
2.4.3 Curvas de Sobrevida Celular.....	20
2.4.4 Efeito do Oxigénio e Eficácia Biológica Relativa.....	22
2.4.5 Radioprotectores e Radiossensibilizadores Celulares.....	23
2.5 Apoptose.....	24
2.5.1 Processo Apoptótico.....	24
2.5.2 Regulação da Apoptose e Relação com Ciclo Celular	28
2.5.3 Necrose e Apoptose	31
2.6 Sumário	32
Capítulo III. ^{99m}Tc Electrões de Auger: Estado da Arte	33
3.1 Introdução.....	35
3.2 Principais Características dos Electrões de Auger	35
3.3 Estudos de Avaliação da Eficácia dos Electrões de Auger	45
3.4 Electrões de Auger no Contexto Terapêutico	47
3.5 Características Físicas dos Electrões de Auger do ^{99m}Tc	50
3.6 Estudos Realizados com Electrões de Auger do ^{99m}Tc	53
3.7 Sumário	55
Capítulo IV. Simuladores de Radiobiologia Celular	57
4.1 Introdução.....	59
4.2 Simulador de Danos Monte Carlo.....	61
4.2.1 Enquadramento.....	61
4.2.2 Algoritmo para Simular Danos ADN.....	62
4.2.3 Parâmetros da Estimação.....	64
4.2.4 Informação de Entrada e Saída.....	65
4.2.5 Método de Classificação das Lesões ao ADN.....	67
4.2.6 Vantagens/Desvantagens	68
4.3 Simulação de Reparação por Excisão Monte Carlo.....	69
4.3.1 Enquadramento.....	69
4.3.2 Modelo Reparação por Excisão Monte Carlo.....	70
4.3.3 Informação de Entrada/Saída	73
4.3.4 Vantagens e Desvantagens	75
4.4 Simulador de Radiobiologia Celular.....	76
4.4.1 Enquadramento.....	76
4.4.2 Modelo TLK.....	77
4.4.3 Informação de Entrada/Saída	78
4.4.4 Vantagens e Desvantagens	84
4.5 Interligação dos Diferentes Simuladores.....	84

4.6 Parâmetros Experimentais Testados	85
4.7 Sumário	88
Capítulo V. Resultados Experimentais Simulados e Discussão.....	89
5.1 Introdução	91
5.2 Resultados do Simulador de Danos Monte Carlo	91
5.3 Resultados do Simulador MCER	95
5.4 Resultados do Simulador de Radiobiologia Celular	98
5.5 Discussão	103
5.6 Sumário	108
Capítulo VI. Conclusões Finais e Perspectivas Futuras	109
6.1 Conclusões Finais.....	111
6.2 Perspectivas Futuras	113
Bibliografia	115

Capítulo I: Introdução e Estrutura da Dissertação

1.1. Enquadramento

A Terapia Metabólica com utilização de isótopos radioactivos é encarada cada vez com maior atenção, dado o reconhecimento do seu inegável interesse e potencial, particularmente pela elevada especificidade que a caracteriza, podendo ser considerada como uma “cirurgia” com radiação. Dos múltiplos isótopos disponíveis e utilizados para terapêutica pela radiação, salientam-se os emissores beta, para destruição tecidual (*beta knife*); os emissores alfa, que funcionam como cirurgia celular (*alfa knife*) e, finalmente, os emissores de electrões de Auger, os quais visam a destruição molecular, nomeadamente a nível do ácido desoxiribonucleico – ADN – (*Auger knife*). É neste cenário que se insere este estudo dos efeitos terapêuticos dos electrões de Auger em culturas de células.

Actualmente o conhecimento dos efeitos terapêuticos dos electrões de Auger emitidos pelo Tecnécio-99m (^{99m}Tc) é relativamente diminuto, pois trata-se de um novo campo de investigação, dado que durante muitos anos este agente foi principalmente utilizado e, continua ainda hoje a ser, como agente diagnóstico. Esta nova perspectiva sobre um agente sobretudo utilizado no campo do diagnóstico tem despertado atenção da comunidade científica à medida que mais peso e importância é dada aos electrões de Auger, até agora apontados como partículas de baixa eficiência biológica, ou seja, baixa capacidade de induzir danos biológicos nas células. No entanto, tem-se vindo a descobrir que afinal os electrões de Auger possuem um potencial terapêutico que não deve ser ignorado.

Para melhor compreensão do trabalho realizado sobre electrões de Auger e seus efeitos em células, nomeadamente, recolha de informação minuciosa e do estado da arte desta temática e ainda utilização de métodos computacionais, apresenta-se adicionalmente nesta Dissertação uma descrição de alguns termos de crucial importância para o trabalho realizado; nomeadamente, pela explicação de conceitos fundamentais como ciclo celular, processo apoptótico e radiobiologia celular.

1.2. Principais Objectivos

Estudos recentes documentam o interesse da terapêutica por radiação com aplicação em múltiplas patologias oncológicas, constituindo um tema cada vez mais actual. Neste sentido, acredita-se que estudos radiobiológicos como os que se realizaram no âmbito desta Dissertação

são absolutamente pertinentes, necessários e adequados para caracterizar, de uma forma mais completa possível, a natureza dos efeitos produzidos pelos electrões de Auger em células e ainda a obtenção de dados necessários à caracterização do potencial do ^{99m}Tc enquanto agente terapêutico; isto é, em contexto de radioterapia metabólica. Assim, a presente Dissertação pretende contribuir para um maior conhecimento científico sobre:

- O eventual potencial do ^{99m}Tc enquanto agente terapêutico, nomeadamente através da análise dos efeitos radiobiológicos dos electrões de Auger emitidos por este radionuclídeo;
- A comparação entre os efeitos radiobiológicos dos electrões de Auger emitidos pelo ^{99m}Tc e outros radioisótopos utilizados actualmente no contexto de radioterapia metabólica, designadamente emissores de partículas alfa e beta menos;
- A avaliação dos efeitos radiobiológicos dos electrões de Auger do ^{99m}Tc em dois tipos de culturas de células com diferentes radiosensibilidades (fibroblastos humanos e células da cripta intestinal humana).

Por outro lado, esta Dissertação pretende ser um documento conciso do estado da arte no que refere ao uso de electrões de Auger para radioterapia metabólica, e em particular daqueles emitidos pelo ^{99m}Tc . Para tal, uma recolha cuidada de informação científica em revistas da especialidade, livros e outros meios de pesquisa, serviu de base à construção do presente documento.

1.3. Estrutura Organizativa

Pretendeu-se organizar a presente Dissertação de forma autónoma e independente, para facilitar o acesso aos diversos temas abordados e estruturados em seis capítulos. Assim, descreve-se de seguida sucintamente o tema central de cada um dos restantes cinco capítulos:

- **Capítulo II. Radiobiologia do Ciclo Celular e Apoptose**

Neste capítulo são abordados, de forma global, os princípios da radiobiologia celular, com particular relevo nos conceitos de sobrevivência celular, destino das células após irradiação e efeitos directos e indirectos da radiação. São ainda estabelecidas relações entre a resposta celular à radiação e o ciclo celular, com concomitante relação destes com a morte celular programada, isto é, a apoptose. Realiza-se igualmente um levantamento dos principais constituintes celulares,

em particular o citoplasma, a membrana celular e o núcleo, pois são os que demais interessam para compreensão dos capítulos seguintes e do trabalho realizado de uma forma geral.

- **Capítulo III. Electrões de Auger: Estado da Arte**

O capítulo terceiro aborda as principais características ideais de um radiofármaco para radioterapia metabólica, os resultados de vários estudos que apontam para uma superioridade dos emissores de Auger face aos emissores de partículas beta menos, e as características do ^{99m}Tc , enquanto emissor de electrões Auger. Para além disso, uma revisão do estado da arte no que refere a estudos reportados com electrões de Auger do ^{99m}Tc *in vitro*, *in vivo* e usando métodos computacionais é apresentada.

- **Capítulo IV. Simuladores de Radiobiologia Celular**

O quarto capítulo expõe o princípio de funcionamento, as vantagens e desvantagens dos simuladores de radiobiologia celular, bem como os comandos de entrada de dados e as informações obtidas nos ficheiros de saída dos simuladores computacionais considerados. Os simuladores utilizados para a realização da presente Dissertação são: o simulador de danos Monte Carlo (MCDS), para avaliação dos danos radioinduzidos ao ADN; o simulador de reparação por excisão Monte Carlo (MCER), para avaliação dos processos de reparação dos danos radioinduzidos aos ADN; e o simulador de radiobiologia celular (VC), para avaliação da cinética celular após irradiação com diferentes radioisótopos.

- **Capítulo V. Resultados Experimentais Simulados e Discussão**

Os agentes irradiantes estudados foram os electrões de Auger do ^{99m}Tc , as partículas beta menos do ^{131}I e as partículas alfa do ^{211}At . As células estudadas foram fibroblastos humanos e células da cripta intestinal humana, em ciclo celular, quiescentes e em populações heterogéneas. Este capítulo apresenta assim os resultados obtidos com os diferentes simuladores utilizados, para os diferentes agentes irradiantes e tipos de células, bem como a sua análise e discussão.

- **Capítulo VI. Conclusões Finais e Perspectivas Futuras**

Neste capítulo expõe-se as conclusões finais do trabalho desenvolvido durante a execução da presente Dissertação e, finalmente, apresentam-se as perspectivas para desenvolvimentos futuros.

1.4. Contribuições Principais

Como principais contribuições desta Dissertação salientam-se o estudo aprofundado de várias investigações conduzidas no âmbito da terapêutica com electrões de Auger, a revisão bibliográfica e organização da informação mais pertinente num único documento. Para além disso, o estudo dos efeitos radiobiológicos dos electrões de Auger do ^{99m}Tc em células, pelo uso de métodos de simulação computacional avançados; bem como, a classificação de toda a gama de electrões de Auger do ^{99m}Tc face a outros radioisótopos utilizados como agentes terapêuticos, constituem as principais contribuições inovadoras desta Dissertação, num campo de intensa pesquisa e interesse crescente.

Capítulo II. Radiobiologia do Ciclo Celular e Apoptose

2.1 Introdução

O presente capítulo versa sobre os aspectos mais importantes da radiobiologia celular e apoptose. Como principais objectivos a atingir com o mesmo encontram-se: o conhecimento sobre os principais constituintes de células eucarióticas animais; noções sobre ADN e processos intimamente relacionados com esta molécula, como por exemplo, replicação semi-conservativa e síntese proteica; compreensão do ciclo celular e, com maior detalhe, dos processos que ocorrem em cada fase deste; noções de radiobiologia celular (diferentes tipos de efeitos da radiação em células, curvas de sobre-vida celular e destino celular após irradiação); e finalmente, conhecer os princípios gerais por detrás do processo apoptótico.

No âmbito do trabalho desenvolvido nesta Dissertação, este capítulo reveste-se de particular importância pois sem a análise introdutória apresentada no mesmo, a compreensão dos capítulos seguintes poderia ser substancialmente comprometida, uma vez que, os conceitos abordados serão utilizados nos capítulos subsequentes, para análise dos efeitos dos electrões de Auger em culturas de células. Assim, organizou-se este capítulo por 4 tópicos centrais, iniciando-se com a descrição dos principais constituintes celulares, dos quais se destaca a membrana celular e o núcleo celular; seguindo-se uma descrição dos princípios gerais do ciclo celular e finalmente noções de radiobiologia celular e apoptose.

2.2 Principais Constituintes da Célula Eucariótica

As células são as unidades estruturais e funcionais de todos os organismos vivos. Existem essencialmente dois tipos de células: as procarióticas e as eucarióticas. Para a compreensão do presente trabalho focar-se-á apenas o segundo grupo e somente na célula animal, pois a constituição da célula vegetal não carece de explicação para compreensão do mesmo trabalho.

A estrutura básica das células eucarióticas inclui a presença de um citoplasma, uma membrana plasmática, material genético e vários organelos; nomeadamente, ribossomas, mitocôndrias, retículo endoplasmático (liso ou rugoso), complexo de Golgi, lisossomas e peroxissomas. De seguida descreve-se resumidamente as principais funções de alguns dos organelos supracitados, que são fundamentais para compreensão do trabalho desenvolvido.

2.2.1 Membrana Plasmática e Citoplasma

A membrana plasmática rodeia toda a célula eucariótica, apresentando como função básica a proteção da célula do ambiente envolvente. É constituída por duas camadas de fosfolípidos com moléculas transmembranares incorporadas, das quais se destacam as proteínas e os ácidos gordos. Possui também outras moléculas que funcionam como canais e bombas, responsáveis pela movimentação de diferentes moléculas para o interior ou exterior das células, Figura 2.1.

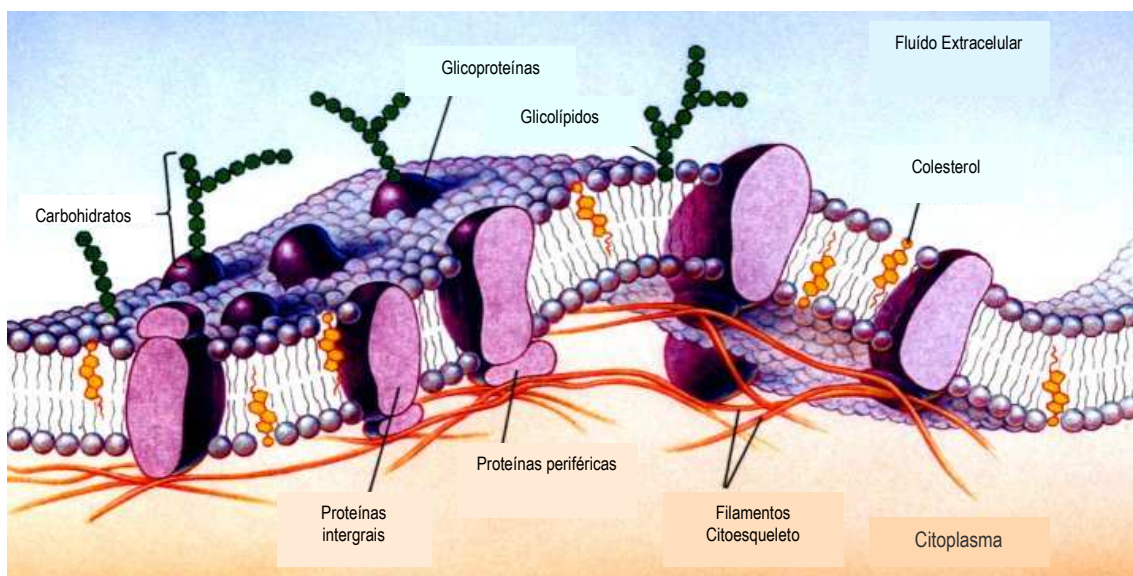


Figura 2.1. Representação esquemática da membrana plasmática (adaptado de (Dekker 2004)).

No interior da célula existe um espaço preenchido por um fluido denominado citoplasma ou citosol. Este fluido contém dissolvidos inúmeros nutrientes celulares, facilita a destruição de produtos de excreção celular e movimenta material no interior celular, por um processo denominado corrente citoplasmática. Adicionalmente, o citoplasma contém sais em número considerável e apresenta-se como um excelente condutor de electricidade.

2.2.2 Material Genético e Núcleo Celular

Existem basicamente dois tipos de material genético: o ácido desoxiribonucleico (ADN) e o ácido ribonucleico (ARN). A informação genética dos indivíduos está codificada no ADN ou em sequências de ARN, apresentando-se dividida em unidades discretas denominadas genes. O

material genético humano é produzido em dois compartimentos distintos: o genoma nuclear e o genoma mitocondrial.

O núcleo celular é de crucial importância para a célula, pois alberga os cromossomas, processa a replicação do ADN e a síntese do ARN. O núcleo celular, de forma esférica, separa-se do citoplasma pela membrana nuclear. No seu interior, o ADN é transcrito ou sintetizado para ARN, tomando este último a designação de ARN mensageiro (mARN), o qual é posteriormente transportado para o exterior do núcleo, para tradução, originando diversas proteínas, (NCBI 2004).

Os ácidos nucleicos são constituídos essencialmente por:

- Ácido fosfórico – confere aos ácidos nucleicos as suas características ácidas, encontrando-se presente no ADN e ARN;
- Pentoses – ocorrem dois tipos: a desoxirribose ($C_5H_{10}O_4$) e a ribose ($C_5H_{10}O_5$). As designadas pentoses relacionam-se com a existência de menos um átomo de oxigénio na desoxirribose em relação à ribose;
- Bases azotadas – existem cinco bases azotadas diferentes, que formam dois grupos:
 - o Bases de anel duplo – adenina (A) e guanina (G);
 - o Bases de anel simples – timina (T), citosina (C) e Uracilo (U).

Em cada um dos ácidos nucleicos existem apenas quatro das bases azotadas referidas:

- No ADN existe a timina, a adenina, a guanina e a citosina;
- No ARN existe o uracilo, a adenina, a guanina e a citosina.

Os ácidos nucleicos são polímeros cujas unidades básicas que os constituem; ou seja, os monómeros são nucleótidos.

Um nucleótido é constituído por três componentes diferentes: um grupo fosfato, uma pentose e uma base azotada. Estes podem unir-se sequencialmente, originando uma cadeia polinucleotídica. A molécula de ADN é constituída por duas cadeias polinucleotídicas enroladas helicoidalmente à volta de um mesmo eixo. As bandas laterais da hélice são formadas por moléculas de fosfato, alternando com moléculas de desoxirribose, e as porções centrais são pares de bases ligados entre si por ligações de hidrogénio, sendo estas complementares. As duas cadeias polinucleotídicas da dupla hélice desenvolvem-se em direcções opostas, Figura 2.2. Cada uma delas inicia-se por uma extremidade 5' e termina em 3'. À extremidade 3' de uma cadeia corresponde a extremidade 5' da outra, designando-se por isso cadeias antiparalelas. Embora exista um pequeno número de diferentes tipos de nucleótidos (apenas quatro), como

cada um pode estar presente um grande número de vezes e podem existir diferentes ordenações desses nucleótidos, é possível uma grande diversidade de moléculas de ADN, pelo que, cada indivíduo tem o seu próprio ADN.

O ADN de cada célula autoduplica-se por replicação semi-conservativa, assegurando a conservação do património genético próprio de cada espécie. O termo replicação provém do facto de as novas cadeias formadas serem uma réplica das cadeias originais, o que leva a uma igualdade de identidade entre as moléculas recém-formadas e a molécula inicial. Esta replicação é semi-conservativa, como referido anteriormente, pois permanece, em cada uma das novas moléculas, uma das cadeias polinucleotídicas da molécula inicial.

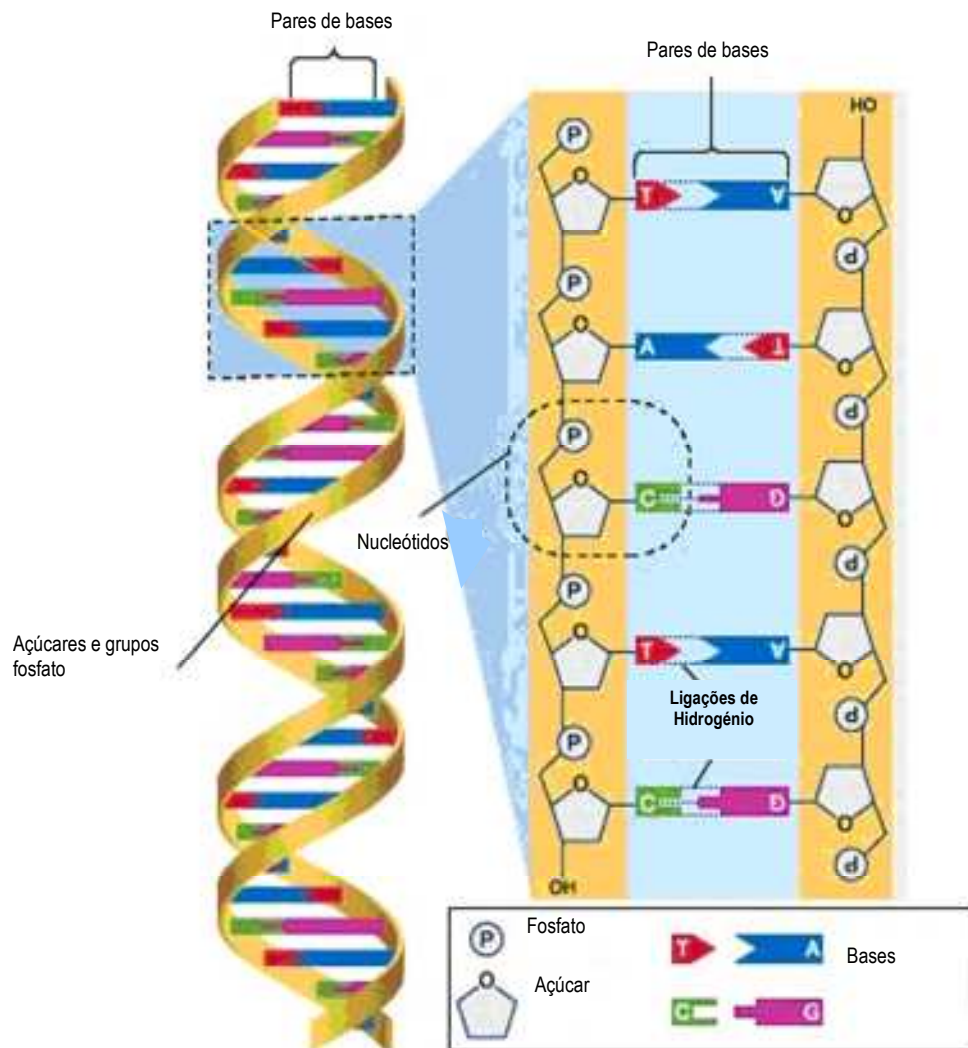


Figura 2.2. Esquema da estrutura básica do ADN (adaptado de (Britannica 2007)).

A síntese proteica inicia-se pela transcrição da informação contida no ADN para uma sequência de ribonucleótidos que constituem uma molécula de ARN mensageiro. Este abandona o núcleo, transportando a mensagem, ainda em código, para os ribossomas, onde a mensagem

é decodificada, ou seja, traduzida para uma linguagem proteica. Este é um princípio central da biologia celular. Cada tripleto (conjunto de três nucleótidos consecutivos de DNA) do ARN mensageiro, que codifica um determinado aminoácido ou o início e fim da síntese proteína, tem o nome de codão.

2.3 Princípios Gerais do Ciclo Celular

De um modo geral, as células crescem, aumentam o seu conteúdo e depois dividem-se. Cada célula origina duas células-filhas que, se tudo se processar conforme esperado, serão geneticamente iguais à célula-mãe. As células-filhas, por sua vez, podem tornar-se células-mães de uma outra geração celular. Assim, a vida de uma célula começa quando ela surge a partir da célula-mãe e acaba, quando ela própria se divide para originar duas células-filhas.

A multiplicação das células segue assim o interessante carácter cíclico da vida, intercalando períodos de crescimento com períodos de divisão. O conjunto de transformação que decorre desde a formação da célula até ao momento em que ela própria, por divisão, origina duas células-filhas constitui um processo dinâmico e contínuo, denominado ciclo celular.

Durante a divisão celular, os organelos, as enzimas e outros constituintes que fazem parte das células são distribuídos pelas células-filhas. O ADN é exactamente auto-duplicado e as cópias rigorosamente distribuídas. É esta fidelidade na duplicação e na distribuição de material genético pelas células-filhas que assegura a continuidade genética da vida.

A unidade básica de um cromossoma eucariótico é uma longa molécula de ADN que se encontra ligada a proteínas. Em alguns períodos da vida celular, cada cromossoma contém, para além das proteínas, apenas uma molécula de ADN. Contudo, noutros períodos esta molécula duplica e o cromossoma fica constituído por dois cromatídios, isto é, duas moléculas de ADN associadas a proteínas. Dois cromatídeos apresentam-se ligados por uma estrutura sólida e resistente chamada centrómero (que significa corpo central).

Baseando-se na actividade das células que é visível no microscópio óptico, consideram-se, num ciclo celular duas fases principais: interfase e fase mitótica ou período de divisão celular. A primeira (interfase) corresponde ao período compreendido entre o fim de uma divisão celular e o início da divisão seguinte; enquanto, a fase mitótica diz respeito ao período durante o qual ocorre divisão celular, (Silva 2000; Suntharalingam 2002).

Na interfase os cromossomas não são visíveis ao microscópio óptico. Os complexos ADN-Proteínas que constituem a cromatina estão pouco condensados e dispersos pelo núcleo,

por isso, a fase mitótica constituiu, durante muitos anos, o principal ponto de interesse e a interfase foi considerada uma fase de repouso.

Na interfase existem um ou mais nucléolos em cada núcleo. A replicação de ADN de uma célula ocorre durante uma parte limitada da interfase, denominada *fase S* ou *fase de síntese*, que é precedida e seguida por dois intervalos, respectivamente, G_1 e G_2 (G de *gap*, que significa intervalo).

O intervalo G_1 , ou pós-mitótico, corresponde ao período que decorre entre o fim da mitose e o início da síntese de ADN. Caracteriza-se por uma intensa actividade biossintética, nomeadamente, de proteínas, enzimas e ARN, ocorrendo ainda formação de organelos celulares e consequentemente um notório crescimento da célula.

Na *Fase S* ocorre a autoreplicação de cada uma das moléculas de ADN. Estas novas moléculas associam-se às respectivas proteínas e a partir desse momento cada cromossoma passa a ser constituído por dois cromátídeos ligados pelo centrómero. Nas células animais, ao nível do citoplasma, dá-se ainda a duplicação dos centríolos (feixes curtos de microtúbulos localizados no citoplasma das células eucariontes).

O Intervalo G_2 , ou pré-mitótico, ocorre entre o final da síntese de ADN e o início da mitose. Neste período dá-se sobretudo a síntese de biomoléculas necessárias à divisão celular.

Na fase final da etapa G_1 as células fazem uma avaliação interna relativamente ao prosseguimento do ciclo celular (*checkpoint* 1, entre G_1 e S). Se a avaliação é negativa, as células não se dividem, permanecendo num estágio denominado G_0 . O tempo de permanência em G_0 depende não só do tipo de célula, mas também das circunstâncias que a rodeiam. As células que não voltam a dividir-se permanecem num estágio G_0 semanas ou mesmo anos até que morrem (por exemplo, os neurónios e fibras musculares de um indivíduo adulto). Se, pelo contrário, a avaliação efectuada pelas células é positiva, estas iniciam a síntese de ADN. Outro *checkpoint* celular ocorre entre a fase G_2 e M .

A duração das subfases G_1 , S e G_2 varia com as espécies, com o tipo de tecido e com o estágio de desenvolvimento do organismo, Figura 2.3. No mesmo tecido, a variabilidade da duração do ciclo celular depende sobretudo do tempo de permanência em G_1 . Por exemplo, nas células de um embrião, o período G_1 é muito curto; contudo, nas células de um indivíduo adulto o período G_1 é muito mais longo, (Silva 2000). Geralmente, para células de mamíferos em cultura a fase S tem uma duração de sensivelmente 6 a 8 horas, a fase M tem duração inferior a uma hora, G_2 varia entre 2 a 4 horas e G_1 entre 1 e 8 horas, o que perfaz um ciclo celular com duração normal de 10 a 20 horas. Para além disso, tem-se verificado que o ciclo celular em

células malignas ou danificadas é mais acelerado que nas células normais, (Suntharalingam 2002).

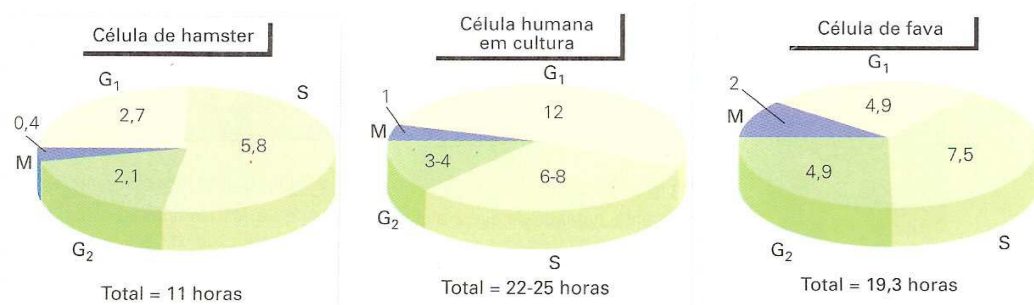


Figura 2. 3. Duração de ciclos celulares de diferentes espécies (adaptado de (Silva 2000)).

Relativamente à fase mitótica esta pode ser dividida em duas etapas principais, que embora possam apresentar alguma variabilidade para diferentes espécies, globalmente seguem um processo similar que inclui: a mitose, a qual corresponde à divisão do núcleo, e a citocinese (divisão do citoplasma). A primeira (mitose), embora seja um processo contínuo, apresenta convencionalmente quatro estádios: a profase, a metafase, a anafase e a telofase.

A profase é, de um modo geral, a etapa mais longa da mitose. Nesta fase, os cromossomas enrolam-se, tornando-se cada vez mais espessos e curtos; cada cromossoma é constituído por dois cromátídeos unidos pelo centrómero; os dois pares de centríolos começam a afastar-se em sentidos opostos, formando-se entre eles o fuso acromático ou fuso mitótico, constituído por um sistema de microtúbulos proteicos que se agregam para formar fibrilas. Adicionalmente, algumas fibrilas dispõem-se radialmente nos pólos da célula, constituindo o áster e, quando os centríolos atingem os pólos, a membrana nuclear fragmenta-se e os nucléolos desaparecem.

Na metafase os cromossomas atingem o máximo de encurtamento devido a uma elevada condensação; os pares de centríolos estão nos pólos da célula; o fuso acromático completa o seu desenvolvimento, notando-se que algumas das suas fibrilas se ligam aos cromossomas (fibrilas cromossómicas), enquanto outras vão de pólo a pólo (fibrilas contínuas). Para além disso, os cromossomas dispõem-se com os centrómeros no plano equatorial (plano equidistante entre os dois pólos celulares), voltados para o centro desse plano e com os “braços” para fora. Os cromossomas assim imobilizados constituem a chamada placa equatorial e estão prontos para se dividir.

Por seu lado, a anafase caracteriza-se pela clivagem de cada um dos centrómeros, separando-se os dois cromátídeos que passam a constituir dois cromossomas independentes.

Ainda nesta fase da mitose, as fibrilas ligadas aos cromossomas encurtam e estes começam a afastar-se, migrando para pólos opostos da célula - ascensão dos cromossomas filhos. No final da anafase os dois pólos da célula têm colecções completas e equivalentes de cromossomas e, portanto, de ADN.

Durante a telofase a membrana nuclear reorganiza-se em torno dos cromossomas de cada célula-filha; os nucléolos reaparecem; dissolve-se o fuso mitótico; os cromossomas descondensam e alongam-se, tornando-se menos visíveis; a célula fica constituída por dois núcleos, terminado assim a mitose.

A citocinese caracteriza-se pela divisão do citoplasma e consequente individualização das duas células-filhas. Geralmente, nos dois últimos estádios da mitose (fim da anafase e telofase), forma-se na zona do plano equatorial um anel contráctil de filamentos proteicos. Estes contraem-se e puxam a membrana para dentro, causando um sulco de clivagem, que vai lentamente estrangulando o citoplasma até separar as duas células filhas, (Silva 2000).

Para além da divisão das células somáticas, isto é a mitose, existe outro processo de propagação e divisão celular denominado meiose, que ocorre aquando da fecundação; contudo, tal processo não será explicado no presente trabalho, pois não se considera fundamental para a sua compreensão, (Suntharalingam 2002).

2.4 Radiobiologia Celular

A radiobiologia é uma ciência que estuda a acção da radiação ionizante nas células, nos tecidos biológicos e nos seres vivos, combinando para tal, duas disciplinas: a física da radiação e a biologia.

A célula é constituída por compostos inorgânicos (água e minerais), assim como por compostos orgânicos (proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos e lípidos). O citoplasma, cuja função é servir de suporte para as funções metabólicas que ocorrem no interior da célula; e o núcleo, que contém a informação genética (ADN); são de crucial importância para o estudo da radiobiologia celular.

Em termos de radiobiologia, as células somáticas podem ser classificadas em, (Suntharalingam 2002):

- Células estaminais – existem para perpetuar e produzir células para uma dada população diferenciada (como por exemplo: células estaminais da medula óssea, da epiderme ou da mucosa intestinal);

- Células em trânsito – são células que estão em movimento para outra população (por exemplo o reticulócito que se irá diferenciar, transformando-se em eritrócito);
- Células maduras – são células completamente diferenciadas e não exibem actividade mitótica (tais como: células musculares e tecido nervoso).

Em radiobiologia a qualidade de um feixe de radiação ionizante é caracterizada pela Transferência Linear de Energia (LET). Contrariamente ao poder de travagem, cuja atenção é focada na perda de energia de um feixe de radiação ou partícula ao longo de um meio, a LET foca atenções na taxa linear de energia absorvida pelo meio à medida que a partícula carregada ou feixe de energia o atravessa.

Segundo a *International Commission on Radiation Units* (ICRU), a LET pode ser definida pelo “quociente dE/dl , no qual dE é a energia média localmente depositada no meio por uma partícula ou radiação de energia especificada ao longo de uma distância dl ”. A título de exemplo, o valor de LET para 1 keV de electrões é 12.3 keV/ μm , (Suntharalingam 2002).

2.4.1 Efeitos Directos e Indirectos da Radiação

Quando as células são expostas a radiação ionizante, efeitos físicos entre a radiação e os átomos ou moléculas das células ocorrem em primeiro lugar e só depois se verificam os danos biológicos. Os efeitos biológicos da radiação resultam sobretudo de danos ao ADN, o qual é o componente mais crítico da célula no que toca a radiação ionizante. Contudo, existem outros locais na célula, que uma vez danificados, podem conduzir a morte celular. Quando a radiação incidente é absorvida pelo material biológico, o dano na célula pode ocorrer por dois processos: efeito directo e indirecto, Figura 2.4.

No efeito directo, a radiação interage directamente com o alvo crítico da célula, isto é, o ADN. Os átomos do alvo podem ser ionizados ou excitados pelas interacções de Coulomb, conduzindo a uma cadeia de eventos físicos e químicos, que eventualmente produzem dano biológico. O efeito directo é o processo dominante em interacções de radiação de alta LET.

No efeito indirecto, a radiação interage com outras moléculas e átomos (sobretudo água, dado que 80% da célula é composta por este elemento) no interior da célula, produzindo radicais livres, os quais, por difusão, podem danificar o alvo crítico da célula. As interacções da radiação com a água no interior da célula produzem os denominados radicais livres de curta vida;

nomeadamente, o H_2O^+ (ião água) e o $\text{OH}^\bullet$ (radical hidroxilo). Os radicais livres quebram as ligações químicas e produzem alterações químicas que conduzem a danos biológicos devido à sua elevada reactividade e à ausência de emparelhamento do electrão de valência. Cerca de dois terços do dano biológico provocado por radiações de baixa LET é devido ao efeito indirecto.

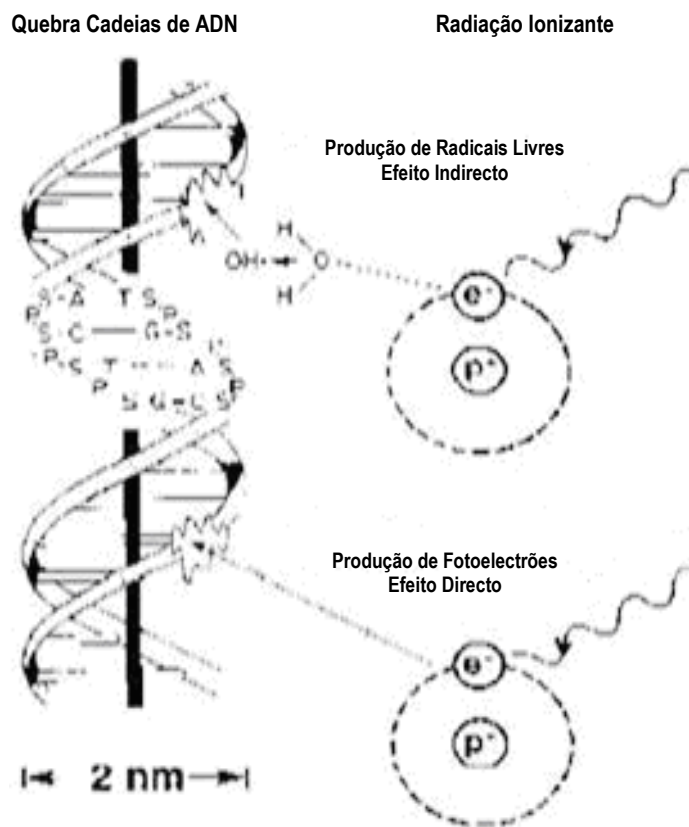


Figura 2.4. Efeitos da radiação na célula: em cima, efeito indirecto e, em baixo, efeito directo (adaptado de (Goodall 2003)).

2.4.2 Destino das Células Irradiadas

A irradiação da célula pode resultar em nove possíveis destinos finais, (Suntharalingam 2002):

- Ausência de efeito;
- Atraso na divisão: a célula atrasa a entrada no processo de divisão (retida no estágio G_0);
- Apoptose: a célula morre antes de se dividir ou após divisão por fragmentação em pequenos corpos, que são posteriormente absorvidos pelas células vizinhas;

- Falha reprodutiva: a célula morre na tentativa de executar mitose pela primeira ou subsequentes vezes;
- Instabilidade genómica: caracteriza-se por um atraso da falha reprodutiva como resultado da introdução de instabilidade genómica;
- Mutação: a célula sobrevive, mas está mutada;
- Transformação: a célula sobrevive, mas a mutação leva a alterações de fenotipo e possibilidade de carcinogénese;
- Efeito *bystander*: uma célula irradiada envia sinais às células vizinhas não irradiadas, induzindo danos genéticos nas mesmas;
- Respostas adaptativas: a célula irradiada é estimulada para reagir e torna-se mais resistente à radiação subsequente.

A escala temporal associada à quebra de ligações químicas e subsequente dano biológico situa-se entre algumas horas a anos, dependendo do tipo de dano. Caso a morte celular seja o resultado da irradiação, esta pode ocorrer dentro de algumas horas (efeitos precoces da radiação); contudo, se o dano for oncogénico a sua expressão pode ser adiada durante anos (efeito tardio da radiação).

Os danos provocados pela radiação em células de mamíferos podem ser classificados em três grandes grupos, (Suntharalingam 2002):

- Danos letais: os quais são irreversíveis e irreparáveis, conduzindo à morte da célula;
- Danos subletais: podem ser reparados em algumas horas excepto se outros danos subletais forem adicionados antes da recuperação celular, o que conduzirá ao aparecimento de um dano letal;
- Danos potencialmente letais: podem ser manipulados pela reparação quando as células são retidas num estágio de não divisão (G_0).

Os efeitos perigosos da radiação podem ser classificados em duas categorias principais, (Suntharalingam 2002):

- Efeitos estocásticos: nestes efeitos não existe *threshold* (limiar), pelo que os efeitos são verdadeiramente aleatórios, pois surgem em células singulares e assume-se que existe sempre a probabilidade de ocorrerem, mesmo para pequenas doses de radiação;

- Efeitos determinísticos: são os efeitos cuja severidade aumenta com o aumento da dose, usualmente acima de um *threshold* de dose. Uma vez que os efeitos causados danificam populações de células, existe a presença de uma dose de *threshold*.

2.4.3 Curvas de Sobrevida Celular

As curvas de sobrevida celular descrevem a relação entre a fracção de células que sobrevivem; ou seja, a fracção de células que após irradiação mantêm a integridade reprodutiva, e a dose absorvida.

O tipo de radiação influencia a forma da curva de sobrevida celular, pois radiações densamente ionizantes apresentam curvas de sobrevida celulares quase exponenciais face à dose; enquanto radiações com baixa densidade de ionização apresentam uma pequena diminuição inicial seguida de uma região denominada em “ombro”, mantendo-se quase um decréscimo constante para altas doses, Figura 2.5. Factores que tornam as células menos radiosensíveis incluem: remoção de oxigénio celular, criando-se assim um estado de hipoxia; adição de sequestradores de radicais livres; uso de baixas taxas de dose ou multifraccionamento da irradiação, sincronização das células na fase S tardia do ciclo celular.

O modelo linear quadrático, Figura 2.5b, actualmente utilizado, descreve a sobrevida celular assumindo que existem dois componentes para morte celular por radiação, de acordo com a expressão:

$$S(D) = e^{-\alpha D - \beta D^2},$$

em que $S(D)$ é a fracção de células que sobrevivem a uma dose D , α é a constante descrita pela inclinação inicial da curva de sobrevida celular e β a constante pequena descrita no componente quadrático de morte celular.

A razão α/β fornece a dose para a qual os componentes lineares e quadráticos da morte celular são iguais, por exemplo, na Figura 2.5, corresponde a 8 Gy. Por outro lado, o modelo antigo, Figura 2.5a descreve a inclinação da curva com D_0 como a dose para reduzir a sobrevida para 37% do seu valor a qualquer ponto na porção final da exponencial da curva, sendo n o número de extrapolação; isto é, o ponto de intercepção da curva no eixo de sobrevida logarítmica; por seu lado, D_q é a dose quase-limiar. Este modelo não é actualmente empregue para estudos biológicos, (Suntharalingam 2002).

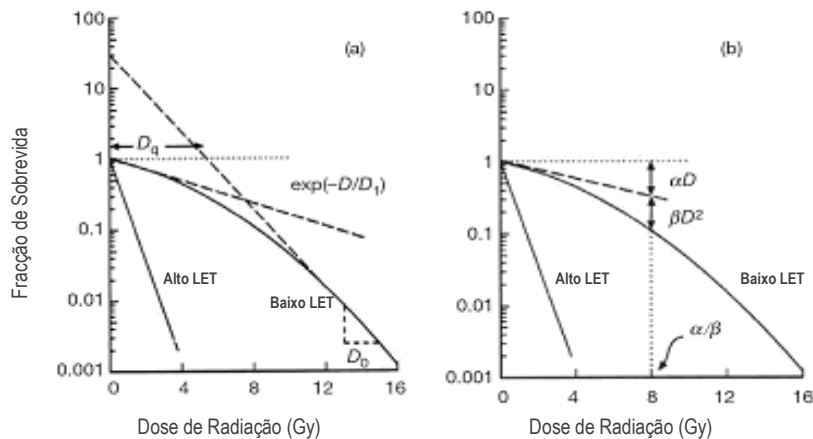


Figura 2.5. Curvas de sobrevida celular típicas para radiação de alta LET (densamente ionizantes) e baixa LET (pouco ionizantes): (a) Primeiro modelo e (b) modelo mais actual (adaptado de (Suntharalingam 2002)).

As curvas de dose-reposta celular são traçadas com base no efeito biológico observado face à dose fornecida, Figura 2.6. Geralmente, à medida que a dose aumenta, também o efeito biológico aumenta. Existem basicamente três tipos de relações entre dose-resposta: linear, linear quadrática e sigmóide. Na Figura 2.6 observam-se curvas típicas de resposta celular (curvas de A até D) e resposta tecidual face a diferentes doses de radiação (curva E). A curva A representa uma relação linear sem limiar; a curva B representa uma relação linear com limiar D_T ; a curva C representa uma relação quadrática linear sem limiar (por exemplo em casos de efeitos estocásticos, como é o caso da carcinogénise); curva D representa uma relação linear sem limiar, sendo que a área abaixo da linha picotada representa a incidência natural do efeito, por exemplo carcinogénise; e a curva E representa uma curva sigmoide com limiar de D_1 , caracterizando por exemplo efeitos determinísticos nos tecidos, (Suntharalingam 2002).

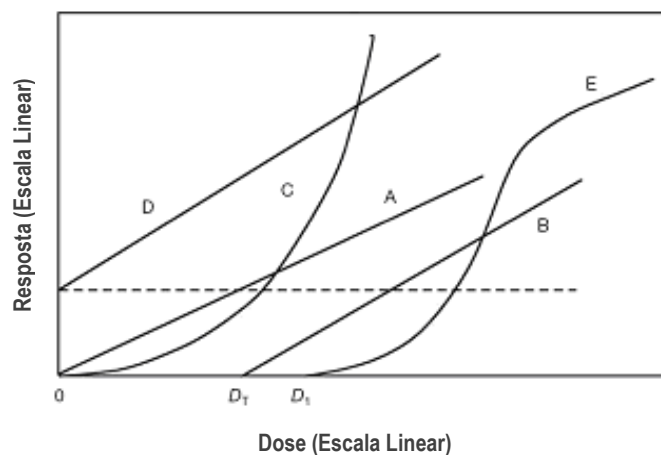


Figura 2.6. Curvas dose-resposta (adaptado de (Suntharalingam 2002)).

A resposta de diferentes tecidos ou órgão à radiação depende marcadamente de dois factores principais: a sensibilidade individual das células e a cinética da população em estudo. Existe por isso uma distinção notória entre os tecidos com resposta precoce à radiação, tais como a pele, as mucosas e o epitélio intestinal; e aqueles cuja resposta é tardia, tais como a espinal medula, Figura 2.7

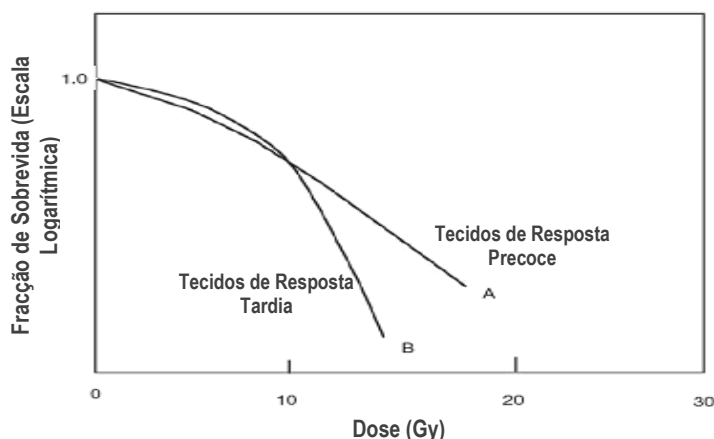


Figura 2.7. Curvas de sobrevivência hipotéticas para tecidos de resposta precoce (curva A) e resposta tardia (curva B) (adaptado de (Suntharalingam 2002)).

2.4.4 Efeito do Oxigénio e Eficácia Biológica Relativa

A presença ou ausência da molécula de oxigénio no interior da célula influencia o efeito biológico da radiação ionizante. Especialmente para radiações de baixa LET, quanto maior a oxigenação da célula, maior o efeito biológico, Figura 2.8. Este efeito, é portanto mais acentuado para radiações de baixa LET que para radiações de alta LET. A razão entre as dose sem e com oxigénio (células hipóxicas face a células oxigenadas) para produzir o mesmo efeito radiobiológico denomina-se OER (*Oxygen Enhancement Ratio*) e determina-se pela expressão:

$$OER = \frac{\text{Dose para produzir um dado efeito sem oxigénio}}{\text{Dose para produzir o mesmo efeito com oxigénio}}$$

À medida que a LET aumenta, a capacidade da radiação produzir um dado efeito biológico também aumenta, como referido previamente. Deste modo, a eficácia biológica relativa (RBE) compara a dose de uma radiação teste com a dose padrão necessária para produzir um dado efeito biológico. Por razões históricas, utiliza-se 250 kVp de raios X como radiação padrão, contudo actualmente recomenda-se o uso dos raios gama de ^{60}Co . A RBE é definida pela razão:

$$RBE = \frac{\text{Dose da radiação padrão para produzir um dado efeito biológico}}{\text{Dose da radiação teste para produzir o mesmo efeito biológico}}$$

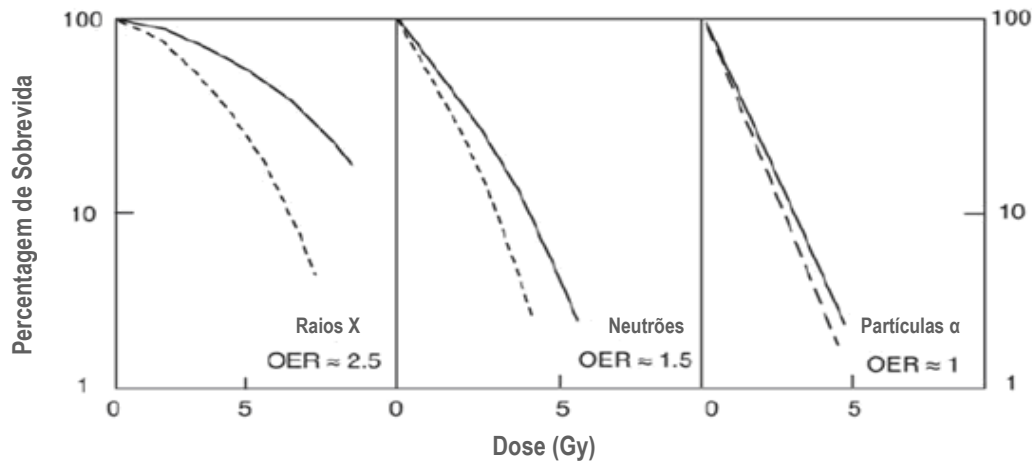


Figura 2.8. Fracção de sobrevivência celular para os raios X, neutrões e partículas α ; curvas a tracejado para células oxigenadas e curvas a cheio para células hipóxicas (adaptado de (Suntharalingam 2002)).

A RBE varia não só para o tipo de radiação utilizada, mas também para diferentes tipos de células ou tecidos, para o efeito biológico em estudo, para a dose, taxa de dose e fraccionamento. Um aumento da RBE apenas apresenta interesse terapêutico quando o RBE para o tecido normal é inferior à do tumor, aumentando-se assim, o nível de morte celular no tumor e a razão terapêutica, (Suntharalingam 2002).

2.4.5 Radioprotectores e Radiossensibilizadores Celulares

Os agentes químicos que reduzem a resposta celular à radiação denominam-se radioprotectores, podendo intervir face aos efeitos indirectos da radiação através da captura dos radicais livres produzidos. O factor modificador de dose (DMF) define-se como:

$$DMF = \frac{\text{Dose para produzir um dado efeito com radioprotector}}{\text{Dose para produzir o mesmo efeito sem radioprotector}}.$$

Os agentes químicos utilizados para potenciar a resposta celular à radiação denominam-se por radiossensibilizadores e promovem quer os efeitos directos da radiação quer os indirectos. Exemplos comuns incluem: pirimidinas halogenadas, que uma vez intercaladas no ADN inibem a sua reparação; e radiossensibilizadores de células hipóxicas, que actuam através de processos similares ao oxigénio, (Suntharalingam 2002).

2.5 Apoptose

Apoptose, ou morte celular programada, foi reconhecida morfológicamente como um processo distinto de outros tipos de morte celular há mais de 30 anos por Kerr, Wyllie e Currie (1972). Basicamente, esta caracteriza-se por ocorrer de forma individual, não infligindo, por isso, morte às células vizinhas. A morte celular por apoptose participa em múltiplas situações fisiológicas, tais como, o colapso endometrial durante a menstruação, a depleção de células nas criptas intestinais e a embriogénese, (Anazetti and Melo 2007). A combinação da apoptose com a proliferação celular é responsável pelo delineamento de tecidos e órgãos nos embriões, por exemplo, a apoptose regula a separação entre os dedos dos fetos. Problemas com a regulação da apoptose podem conduzir ao aparecimento de inúmeras patologias, nomeadamente cancro. Por estes motivos, a apoptose é um mecanismo rigidamente controlado por expressões genéticas decorrentes da interacção célula/meio externo, levando à produção de várias moléculas com actividades específicas que conduzem a alterações celulares funcionais expressas morfológicamente pela condensação e fragmentação da cromatina e formação de protuberâncias na superfície celular, (Dash 2008).

Após o reconhecimento do processo apoptótico como um mecanismo celular fundamental, a biologia da apoptose continuou a ser investigada avaliando-se as alterações morfológicas e bioquímicas características, a natureza das vias intracelulares, a complexa biologia molecular de genes e elementos efectores, a sua relação no desenvolvimento embrionário, o seu papel na homeostasia celular e o seu envolvimento na patogénese de várias doenças; tais como, doenças auto-imunes, infecções por parasitas, doenças neurodegenerativas, lesões isquémicas e cancro.

Com o aparecimento de novos conhecimentos na biologia associada ao cancro e, consequentemente, na indução química da apoptose, os tratamentos tornam-se mais eficazes face às terapêuticas tradicionais, (Anazetti and Melo 2007).

2.5.1 Processo Apoptótico

As células, após receberem o sinal para entrarem em apoptose, realizam um vasto conjunto de alterações. Uma família de proteínas denominada caspase, é tipicamente activada nas fases iniciais da apoptose, sendo responsável pela quebra de componentes celulares importantes que são fundamentais para o funcionamento celular normal, incluindo proteínas

nucleares, tais como as enzimas responsáveis pela reparação do ADN. Por outro lado, as caspases podem activar enzimas destruidoras, tais como, ADNases, que iniciam a quebra do ADN nuclear. Kerr, Wyllie e Durrie, já em 1972, caracterizaram as caspases como enzimas com um resíduo de cisteína activo, sendo capazes de clivar substratos que possuem resíduos de ácido aspártico em sequências específicas. A especificidade pelos seus respectivos substratos é determinada por quatro resíduos amino-terminal no local de clivagem, (Anazetti and Melo 2007; Dash 2008).

A célula em apoptose apresenta uma morfologia distinta, Figura 2.9, que se caracteriza por, (Dash 2008):

- Encurtamento celular devido a destruição dos filamentos de actina e lâminas do citoesqueleto (caso A da Figura 2.9);
- Quebra da cromatina no núcleo que conduz frequentemente a condensação nuclear e, muitas vezes, o núcleo celular toma uma aparência em “ferradura” (situação B da Figura 2.9);
- Contínuo encurtamento celular para permitir posterior remoção pelos macrófagos (caso C da Figura 2.9);
- Na fase final da apoptose surgem pequenas “esferas membranadas”, que formam pequenas vesículas, denominadas corpos apoptóticos (exemplo D da Figura 2.9).

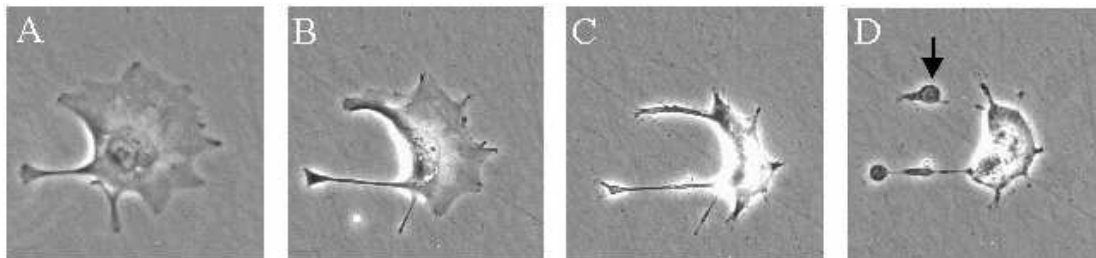


Figura 2.9. Alterações morfológicas observadas num trofoblasto em apoptose; imagem recolhida com microscópio durante um período de 6 horas (retirado de (Dash 2008)).

As alterações morfológicas são comuns a todas as células em apoptose explícita, independentemente do agente indutor do processo. Quer isto dizer que a acção das caspases representa uma via comum, que opera em todas as células programadas para morrer, (Anazetti and Melo 2007).

Existe um vasto número de mecanismos que induzem apoptose nas células, sendo que a sensibilidade da célula face a um dado estímulo depende de um número de factores como a expressão de proteínas pró e anti-apoptóticas (por exemplo o Bcl-2 e as proteínas inibidoras de

apoptose), a severidade do estímulo e o estágio do ciclo celular. Alguns dos estímulos que podem induzir a apoptose incluem: infecções com vírus, *stress* celular e danos ao ADN. Na Figura 2.10 apresenta-se um esquema representativo do processo de indução de apoptose.

Nalguns casos, o estímulo para o processo apoptótico inclui sinais extrínsecos, tais como, a ligação de indutores de apoptose a receptores da membrana da célula, denominados receptores de morte celular. Estes ligandos podem ser factores solúveis ou podem ser expressos à superfície da membrana celular, como é o caso dos linfócitos T. Este segundo processo ocorre quando a célula T reconhece células infectadas com vírus ou danificadas, sendo iniciado o processo apoptótico para impedir que os danos das células se tornem neoplásicos ou ocorra a dispersão da infecção. Adicionalmente, a apoptose induzida por linfócitos T citotóxicos pode ser conseguida pelo uso de enzimas.

Para além dos processos supracitados, a apoptose pode ser induzida por sinais intrínsecos que produzem *stress* celular, devido à exposição à radiação, a químicos ou vírus. Pode igualmente resultar de uma privação de factor de crescimento ou *stress* oxidativo induzido pela formação de radicais livres. Em geral, os sinais intrínsecos capazes de iniciar a apoptose envolvem a mitocôndria. As razões relativas de várias proteínas Bcl-2 é geralmente capaz de quantificar o *stress* celular necessário para induzir apoptose, (Dash 2008).

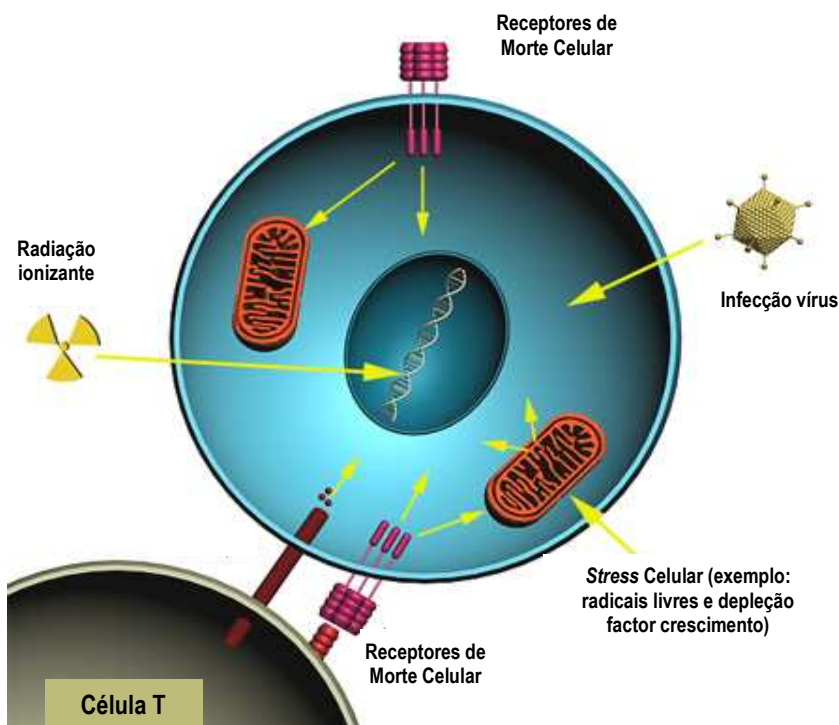


Figura 2.10. Representação esquemática de algumas das vias de indução de apoptose e transmissão do sinal apoptótico (adaptado de (Dash 2008)).

Apesar de existirem várias rotas distintas para a activação de caspases (como exemplificado na Figura 2.10), dependendo do estímulo que desencadeia a morte celular, a evidência científica parece apontar para, essencialmente, duas vias distintas activas para o início da apoptose, (Anazetti and Melo 2007):

- A apoptose iniciada via receptores de morte, Figura 2.11, tais como Fas, também chamado de CD95 ou Apo-1 e TNF-R1 (receptor/factor de necrose tumoral), requerem pró-caspase-8 ou -10 no complexo;
- Apoptose iniciada devido a estímulos induzidos por agentes externos, nomeadamente, quimioterapêuticos ou radiação.

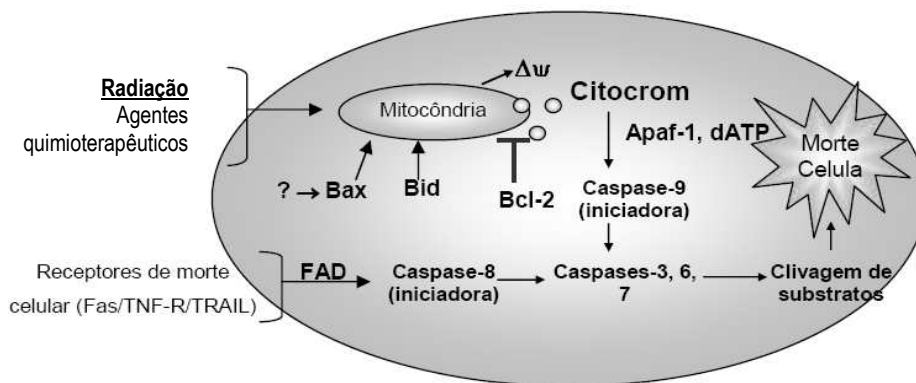


Figura 2.11. Representação das duas principais vias de activação das caspases num processo de apoptose celular (adaptado de (Anazetti and Melo 2007)).

De seguida aborda-se com maior detalhe a segunda via de activação das caspases num processo apoptótico, isto é, a via mitocondrial iniciada por estímulos externos, pois esta é a via que se reveste de maior interesse para compreensão do presente trabalho.

A via mitocondrial é activada predominantemente, com envolvimento de alterações de permeabilidade de membrana mitocondrial e liberação do Citocromo C para o citoplasma, que se liga ao dATP, Apaf-1 e pró-caspase-9, formando o complexo apoptossomo. A caspase-9 activa (iniciadora) pode então clivar as caspases efectoras subsequentes (-2, -3, -6, -7, -8, -9, e -10). Portanto, a activação da caspase-9 mediada pelo Citocromo C serve como um mecanismo de amplificação de sinais durante o processo apoptótico. Membros pró-apoptóticos e antiapoptóticos da família Bcl-2 regulam a liberação de Citocromo C a partir da membrana mitocondrial interna. A via mitocondrial é, frequentemente, activada em resposta a danos no ADN, envolvendo a activação de um membro pró-apoptótico da família Bcl-2 (Bax, Bid). Em oposição, os membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 inibem a apoptose impedindo a formação

de poros na membrana mitocondrial, com consequente inibição da libertação do Citocromo C para o citoplasma.

Uma vez iniciada a cascata das caspases, o processo apoptótico culmina na clivagem de substratos específicos e, finalmente, na morte celular, Figura 2.12, (Anazetti and Melo 2007).

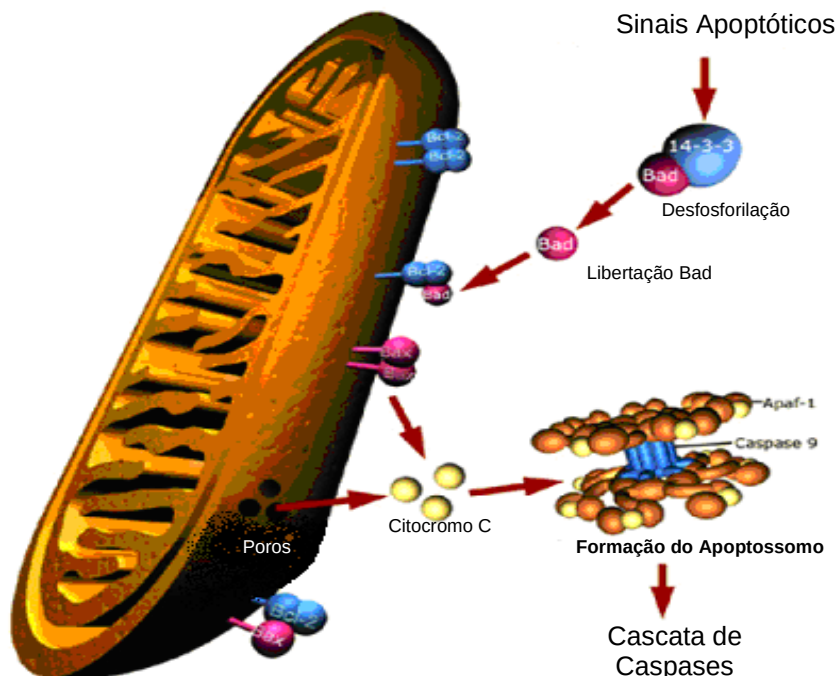


Figura 2.12. Representação da via mitocôncrial presente num processo apoptótico (adaptado de (Dash 2008)).

Um dos princípios objectivos da apoptose é fragmentar o ADN em pequenas unidades nucleossomáticas. As caspases são fundamentais para este processo, realizando-o de três possíveis formas: activação das ADNases, inibição das enzimas de reparação do ADN e quebra das proteínas estruturais no núcleo celular, (Dash 2008).

2.5.2 Regulação da Apoptose e Relação com Ciclo Celular

A homeostasia tecidual depende do balanço entre proliferação e morte celular, que são eventos intimamente acoplados. Alguns reguladores do ciclo celular participam em ambos os processos, morte celular programada e divisão celular. A relação entre ciclo celular e apoptose é reconhecida pelos genes que codificam as proteínas c-Myc, p53, pRb, Ras, PKA, PKC, Bcl-2, NF-κB, CDK, ciclinas e CKI. Após estimulação, estas proteínas podem induzir proliferação celular, interrupção do ciclo celular ou morte celular. O *background* genético, o micro-ambiente

celular, a extensão de danos ao ADN e o nível presente de diferentes proteínas são factores importantes e interligados na resposta celular.

Como descrito anteriormente, algumas das proteínas da família Bcl-2 apresentam uma importante função anti-apoptótica, que é regulada por fosforilação envolvendo interacções entre várias proteínas da família; contudo, se níveis elevados de proteínas dessa família de genes bloqueiam a apoptose (Bcl-2 e Bcl-x), outras promovem-na (Bax, Bad e Bak). Os genes anti-apoptóticos da família Bcl-2 são promotores da sobrevivência celular, porque inibem a ocorrência da apoptose. A proteína Bcl-2 está localizada na membrana mitocondrial externa de diferentes tipos celulares, como por exemplo, epitélios capazes de proliferação e morfogénese. As suas funções incluem o bloqueio da liberação de Citocromo C pela mitocôndria após estímulo apoptótico, impedindo assim, a activação de caspases. A proteína Bax pode produzir heterodímeros com a Bcl-2 (Bax/Bcl-2) ou homodímeros (Bax/Bax), suprimindo, desta forma, a morte celular quando heterodimerizada, e promovendo a apoptose enquanto homodímero Bax/Bax. O mecanismo de controlo da apoptose pelos genes da família Bcl-2 envolve a formação de poros na membrana mitocondrial, permitindo a interacção de várias proteínas envolvidas na regulação da morte celular.

A proteína c-Myc é uma fosfoproteína nuclear que funciona como um factor de transcrição, estimulando a progressão do ciclo celular e a apoptose. A expressão da c-Myc é regulada por fosforilação e interacção com outras proteínas celulares. É responsável pela resposta inicial, ou seja, responde directamente a sinais de mitose, estimulando o avanço das células da fase G1 do ciclo celular. Pode exercer o seu efeito na progressão do ciclo celular pela transcrição de genes importantes no controlo do ciclo celular, tais como, ciclinas, quinases e outros factores de transcrição. Simultaneamente, funciona como regulador negativo da interrupção do ciclo celular, suprimindo a transcrição de alguns genes envolvidos. Além deste papel no ciclo celular, a c-Myc também apresenta uma função chave na regulação do processo apoptótico. Apesar dos eventos moleculares envolvidos no processo de apoptose induzida pela c-Myc não serem bem compreendidos, tem-se observado que, tanto a super-expressão quanto a diminuição da expressão da c-Myc pode levar a morte celular. Em geral a indução de apoptose pela c-Myc parece ocorrer quando há privação de factores de sobrevivência celular. Também se considera a possibilidade da c-Myc poder estar envolvida em vias independentes ou dependentes do p53, bem como, na liberação de Citocromo C envolvendo proteínas Bax (pró-apoptóticas) funcionalmente activas e ainda, na expressão do Fas ligante e do receptor Fas.

Um outro importante gene envolvido no processo de morte e proliferação celular é o supressor tumoral p53. Este gene é o mais frequentemente mutado em todos os tipos de cancro

humano e é um sensor universal de *stress* genotóxico. A frequência de mutações do gene p53 varia dependendo do tipo de tumor, mas em média, 50% dos tumores apresentam uma lesão no *locus* p53. A proteína p53, cujo nome se refere à massa molecular, é amplamente conhecida como indutora da interrupção do ciclo celular e de apoptose. Esses processos são regulados por transactivação de genes envolvidos em diferentes funções celulares, mas também pela activação de mecanismos independentes de transcrição genética. Normalmente, a proteína p53 é encontrada nas células em níveis reduzidos, sugerindo que, esta proteína é requerida, ocasionalmente, pelas células em circunstâncias especiais.

A indução do aumento nos níveis da proteína p53 em culturas celulares inibe a proliferação celular. Assim, a célula permanece na fase *G1* do ciclo celular, o chamado ponto de “verificação” da integridade do material genético, impedindo sua passagem para a fase *S*. As células expostas a irradiação e que não codificam a proteína p53 continuam em divisão replicando o DNA sem qualquer interrupção e, portanto, propagando deste modo o erro.

O gene p53 foi inicialmente identificado em estudos de células tumorais, pois o tumor surge quando as células recém-formadas apresentam mutações simultâneas em genes que controlam o crescimento e a sobrevivência celular. Estes defeitos, quando pouco extensos, podem ser corrigidos por enzimas especializadas. Contudo, se a mutação é irreparável ocorre o desencadeamento do processo de morte celular por apoptose. Ao contrário do gene Bcl-2, o p53 pára o ciclo celular e desencadeia a apoptose. Contudo, em células mutantes (como é o caso das células tumorais), que não codificam este gene, a apoptose não ocorre, pelo que, estas células sobrevivem por mais tempo, acumulam mais mutações e multiplicam-se sem controlo, gerando tumores. Por impedir a proliferação de células mutadas, protegendo o organismo de células cancerosas, o p53 é denominado gene supressor tumoral.

A proteína retinoblastoma (Rb) inibe a progressão do ciclo celular pela interacção com factores de transcrição, como por exemplo, o E2F. Quando a proteína Rb se torna fosforilada, o factor E2F é libertado, estimulando a proliferação celular. Por outro lado, esta proteína pode actuar também na regulação negativa do processo apoptótico. O factor E2F induz a expressão do factor pró-apoptótico Apaf-1 e evidências sugerem um papel do factor E2F em apoptose após ocorrência de dano no ADN.

O p53 e a Rb/E2F podem estar directamente ligados na proliferação celular e apoptose, porque, a proteína p53 activada causa interrupção do ciclo celular na fase *G1*, o que implica que, nestas condições, a proteína Rb não seja fosforilada e as células não possam progredir no ciclo celular. Por outro lado, a pRb fosforilada libera o factor E2F, que induz directamente a transcrição do gene que codifica o p53. Portanto, a via apoptótica dependente do p53 está assim

intimamente relacionada com o par Rb/E2F, pelo que, cada um dos supressores tumorais (p53 e Rb) podem ser capazes de compensar a perda do outro, (Anazetti and Melo 2007).

2.5.3 Necrose e Apoptose

O padrão de alterações morfológicas e bioquímicas celulares associadas à morte celular programada em alguns processos patológicos *in vivo* inclui: formação de vacúolos citoplasmáticos, encolhimento e diminuição do contacto entre células vizinhas, fragmentação da membrana nuclear e condensação cromatinica, despolarização de membrana mitocondrial, fragmentação internucleossomal do ADN e alterações na assimetria de fosfolípidos da membrana plasmática. Por outro lado, a morte celular por necrose ocorre, geralmente, em resposta a danos severos às células e é caracterizada, morfológicamente, por um aumento do volume citoplasmático e mitocondrial, ruptura da membrana plasmática e liberação do conteúdo extracelular. Consequentemente, gera-se uma resposta inflamatória, que pode causar danos e, por vezes até morte às células vizinhas, Figura 2.13; ou seja, nesta condição um grande número de células são afectadas e lesadas ao mesmo tempo e, devido ao desenrolar do processo inflamatório, verificam-se alterações irreversíveis no tecido e/ou órgão afectado.

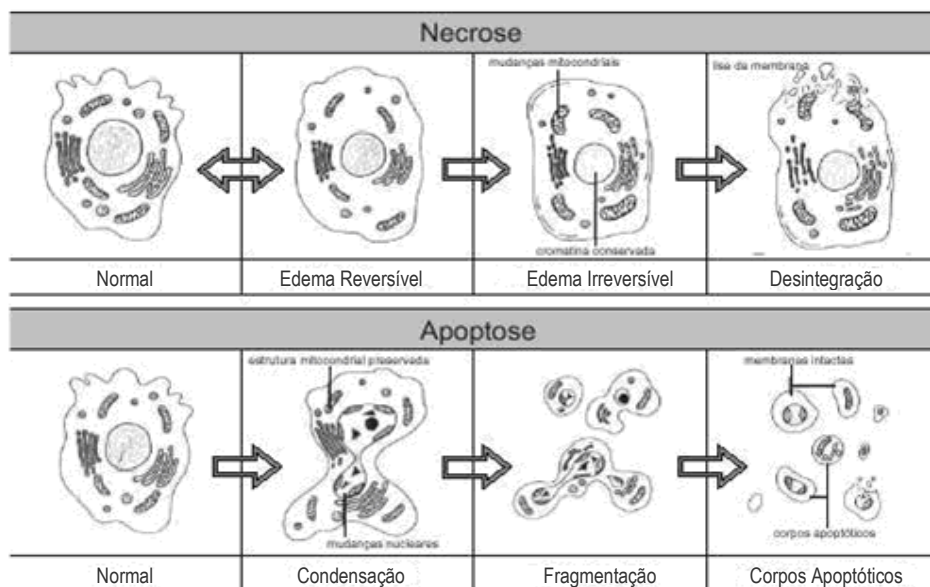


Figura 2.13. Esquema da morfologia celular em processos de necrose (em cima) e apoptose (em baixo) (adaptado de (Anazetti and Melo 2007)).

No processo de morte celular por necrose ocorrem alterações da função mitocondrial, diminuindo drasticamente a produção de ATP (adenosina trifosfato) e interferindo na função da

bomba Na^+/K^+ , o que conduz à tumefacção (ou edema) celular devido ao aumento de Na^+ presente no citoplasma. O aumento do Ca^{2+} no citoplasma provoca a activação de fosfolipases e de proteases que, juntamente com o aumento de espécies reactivas de oxigénio, induzem ruptura da membrana plasmática e activam as proteases, com consequente indução do extravasamento do conteúdo celular, sinalizando, deste modo, a migração de macrófagos e activando uma resposta inflamatória do sistema imunitário. Ao contrário da retracção celular observada em células apoptóticas, na necrose observa-se um edema celular devido às lesões no citoesqueleto e inibição da bomba de Na^+/K^+ , o que origina a perda da permeabilidade selectiva da membrana. Em contraste, o processo apoptótico envolve a participação activa das células afectadas na cascata de autodestruição que culmina em degradação do ADN via activação de endonucleases, desintegração nuclear e formação de corpos apoptóticos. Estes são rapidamente retirados do tecido por macrófagos, sendo que, esta sinalização ocorre devido a translocação da fosfatidilserina do lado interno para o lado externo da membrana “assinalando” as células que deverão ser fagocitadas, (Anazetti and Melo 2007).

Em suma, na apoptose, ou morte celular programada, as células morrem como resultado de um grande variedade de estímulos; contudo, o processo é controlado e regulado, podendo ser considerado como um “suicídio” celular. Contrariamente à apoptose, a necrose, que corresponde à morte celular descontrolada, conduz ao aparecimento de lise celular e concomitante resposta inflamatórias, (Dash 2008).

2.6 Sumário

Deste capítulo pode-se concluir que o núcleo celular é fundamental para a sobrevivência celular, desempenhando processos essenciais à vida através do ADN. Verificou-se ainda que a célula começa a sua vida quando resulta da divisão da célula-mãe e termina quando ela própria se divide em duas células-filhas, daí que se denomine esta existência cíclica das células por ciclo celular. O ciclo celular desempenha um papel fundamental na resposta celular à irradiação, pois aquando de um dano pode repará-lo, pode ordenar a morte celular (apoptose) ou pode retirar essas células do ciclo celular, colocando-as num estágio de paragem (denominado G_0).

No capítulo seguinte serão abordadas as características principais dos emissores de electrões de Auger, em particular do $^{99\text{m}}\text{Tc}$, apresentado-se uma pesquisa minuciosa do estado da arte da radioterapia metabólica com emissores de Auger, com especial relevância do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (radioisótopo em estudo na presente Dissertação).

Capítulo III. ^{99m}Tc Electrões de Auger: Estado da Arte

3.1 Introdução

Este capítulo expõe múltiplos estudos recentes realizados com emissores de Auger, comparando as vantagens e desvantagens dos emissores de Auger face aos emissores beta menos e alfa num contexto de radioterapia metabólica. Adicionalmente, expõe as principais características físicas do ^{99m}Tc (agente irradiante utilizado), bem como os principais estudos realizados na área com este emissor de Auger.

A terapia dirigida ao núcleo ou ao citoplasma das células tumorais, com electrões de Auger, é uma abordagem apelativa; contudo, múltiplos obstáculos têm sido reconhecidos e alguns têm sido parcial ou totalmente resolvidos. Um maior conhecimento da dosimetria dos electrões de Auger e dos seus efeitos biológicos continuam a ser pontos-chave para este tipo de terapia, devendo este último ser estudado e investigado com o maior número de radiofármacos possível, de forma a determinar os verdadeiros efeitos dos electrões de Auger nos diferentes constituintes celulares, (Buehger 2006).

Algumas das características mais importantes de um radionuclídeo ideal com para radioterapia tumoral dirigida incluem, (Unak 2002):

- Electrões emitidos pelos radionuclídeos com menos de 40 keV;
- Razão entre a emissão fotónica/electrão inferior a 2;
- Semi-vida física entre 30 minutos e 10 dias;
- Nuclídeo-filho estável e com semi-vida física superior a 60 dias;
- Química adequada aos processos de radiomarcagem.

O presente capítulo inicia com a explicação das principais características dos electrões de Auger e dos seus efeitos em culturas de células, segue-se uma descrição da importância dos electrões de Auger no contexto de radioterapia metabólica e, finalmente, aborda a potencial utilidade do ^{99m}Tc para terapêutica com electrões de Auger pela exposição de estudos realizados nesta área.

3.2 Principais Características dos Electrões de Auger

As implicações biológicas do efeito de Auger, denominado em homenagem ao físico francês, Pierre Auger, que descobriu o processo em 1925, foram durante muitos anos

consideradas negligenciáveis face à energia total libertada pelos emissores de Auger durante o decaimento radioactivo. Contudo, em 1964 Carlson e White demonstram que o ^{125}I -iodeto de metil/etil causava fragmentação molecular. Desde então múltiplos estudos têm sido conduzidos para melhor caracterizar os efeitos biológicos dos electrões de Auger, (Hofer 2000).

Os electrões de Auger são emitidos por cerca de metade dos radionuclídeos conhecidos que decaem por captura electrónica ou conversão interna. Em ambos os processos de decaimento, cria-se uma lacuna numa orbital atómica interna. O preenchimento dessa lacuna produz uma cascata de transições de electrões das orbitais mais externas, com consequente emissão de electrões de Auger. Tais radionuclídeos são referenciados como emissores de Auger, sendo vastamente utilizados na Medicina Nuclear (alguns exemplos incluem: ^{67}Ga , ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{123}I , ^{125}I e ^{201}Tl), (Humm 1994).

O processo de captura electrónica cria lacunas na orbital mais interna, devido à transferência de um electrão desta orbital para o núcleo. As lacunas da orbital interna são subsequentemente preenchidas por transições de electrões de orbitais de energia mais elevada. A diferença de energia entre as transições pode ser libertada sob a forma de fóton ou de electrões de baixa energia, ou seja, os electrões de Auger. Dependendo da relação das orbitais envolvidas, as transições podem ser classificadas em Auger, Coster-Kroning e Super-Coster-Kroning.

Os electrões criados por conversão interna resultam da colisão de fótons (emitidos pelo núcleo durante o processo de decaimento radioactivo) com os electrões das orbitais mais internas, resultando na ejeção dos mesmos. Estes têm energias na ordem dos quiloelétron-volt (keV), sendo superior à maioria dos electrões de Auger, mas inferior à emissão típica beta menos (por exemplo, ^{131}I e ^{90}Y), (Buehger 2006).

Os electrões de Auger mais energéticos resultam de transições da orbital K (25 a 27 keV). Contudo, a grande maioria dos electrões produzidos surgem de transições entre as orbitais mais externas, apresentando energias inferiores de 500 eV e alcances inferiores a 25 nm em materiais de densidade unitária. Caso os electrões de Auger surjam a partir das orbitais mais internas (orbital K ou L), cerca de 1 a 20 electrões de Auger são emitidos por cada lacuna a preencher, com uma média de 7 a 10 electrões de Auger, (Humm 1994). A título de exemplo, considere-se o ^{125}I que emite uma média de 21 electrões de Auger por decaimento, com energias entre 10 eV e 34 keV e um alcance de 40 a 45 nm, (Unak 2002). Vários radionuclídeos emissores de electrões de Auger são adequados à radioterapia dirigida e incluem: halogéneos (^{125}I , ^{123}I , ^{80m}Br e ^{77}Br) e metais (^{201}Tl , ^{195m}Pt , ^{193m}Pt , ^{114m}In , ^{111}In , ^{99m}Tc , ^{67}Ga , ^{55}Fe e ^{51}Cr). De entre estes radionuclídeos, o ^{195m}Pt exhibe o rendimento mais elevado de electrões de Auger, com

33 electrões emitidos por decaimento, seguido do ^{125}I com 21 electrões, do ^{123}I com 11 electrões, do ^{111}In com 8 electrões e do ^{77}Br , do ^{67}Ga , do ^{55}Fe e do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ com 7 a 4 electrões por decaimento, (Mariani 2000).

O espectro de emissões de electrões de Auger é discreto e reflecte a diferença de energias entre transições de orbitais no átomo (de acordo com o processo de emissão de electrões de Auger previamente descrito). Assim, apenas um número finito de energias dos electrões é possível, podendo variar em apenas algumas para átomos de muito baixo número atómico (Z) a centenas para elementos de elevado Z . Dado que o processo de desexcitação atómica, seguido de criação de lacunas nas orbitais mais internas do átomo, é estocástico, as permutações nos espectros individuais dos electrões, resultantes das cascatas de Auger em átomos de elevado Z , podem atingir valores na ordem dos milhares, (Humm 1994). O tempo necessário para que a cascata de electrões de Auger termine é de aproximadamente 10^{-15} s, sendo a região na vizinhança imediata do átomo envolvida numa nuvem de electrões de Auger, (Howell 1992).

Na Tabela 3.1, expõe-se alguns exemplos de agentes emissores de electrões de Auger, (Buchegger 2006).

Tabela 3.1. Exemplos de emissores de Auger e suas energias (adaptada de (Buchegger 2006)).

Isótopo	e ⁻ Auger/ Dec	e ⁻ IC /Dec	E e ⁻ Auger/Dec [keV]	E e ⁻ IC /Dec [keV]	E total/Dec [keV]	% E e ⁻ Auger da E total/Dec	% E e ⁻ IC da E total/Dec	T _{1/2}
^{55}Fe	5.1	0	4.2	0	5.8	71.9	0	2.7 anos
^{67}Ga	4.7	0.3	6.3	28.1	201.6	3.1	13.9	78 h
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	4.0	1.1	0.9	15.4	142.6	0.6	10.8	6 h
^{111}In	14.7	0.2	6.8	25.9	419.2	1.6	6.2	67 h
^{123}I	14.9	0.2	7.4	20.2	200.4	3.7	10.1	13 h
^{125}I	24.9	0.9	12.2	7.2	61.4	19.9	11.8	59.4 dias
^{201}Tl	36.9	1.2	15.3	30.2	138.5	11.0	21.8	73 h

Legenda: e⁻ Auger – electrões de Auger; e⁻ IC – electrões de Conversão Interna; E – Energia; Dec – Decaimento; T_{1/2} – tempo de semi-vida física.

Uma semi-vida física curta é considerada mais adequada para alcançar doses por unidade de tempo mais elevadas, dado que, se considerar 1000 moléculas radiomarcadas com emissores de Auger dentro da célula alvo e, se se utilizar como radionuclídeo o ^{125}I (com semi-vida física de 60 dias), apenas 1 decaimento ocorre em 2 horas, enquanto se se utilizar o ^{123}I (com semi-vida física de 13.13 horas), ocorrem 100 decaimentos em 2 horas. Analogamente, se se utilizar o $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ocorrem cerca de 206 decaimentos em 2 horas, (Unak 2002). A semi-vida

física e o tempo de permanência do radiofármaco, no núcleo da célula alvo, devem ser suficientes para permitir um número de decaimentos necessários à destruição do tumor sendo de, geralmente, 5 logaritmos da morte celular. Assim, a escolha dos radionuclídeos adequados à terapia molecular dirigida pressupõe uma relação entre o número de electrões emitidos, as suas energias e a semi-vida dos nuclídeos, (Mariani 2000). Para além disso, segundo Buchegger e colaboradores, em 2006, os emissores de Auger com elevada semi-vida física (como por exemplo o ^{125}I) conduzem à diminuição da toxicidade celular, devido ao insuficiente bombardeamento celular por electrões de Auger ao longo da divisão celular. Tal situação resultará numa diluição da radiação de Auger por múltiplas células-filha e, consequentemente, numa maior probabilidade de sobrevivência, para o mesmo número de decaimentos, das células-filha face a uma única célula-mãe, (Buchegger 2006).

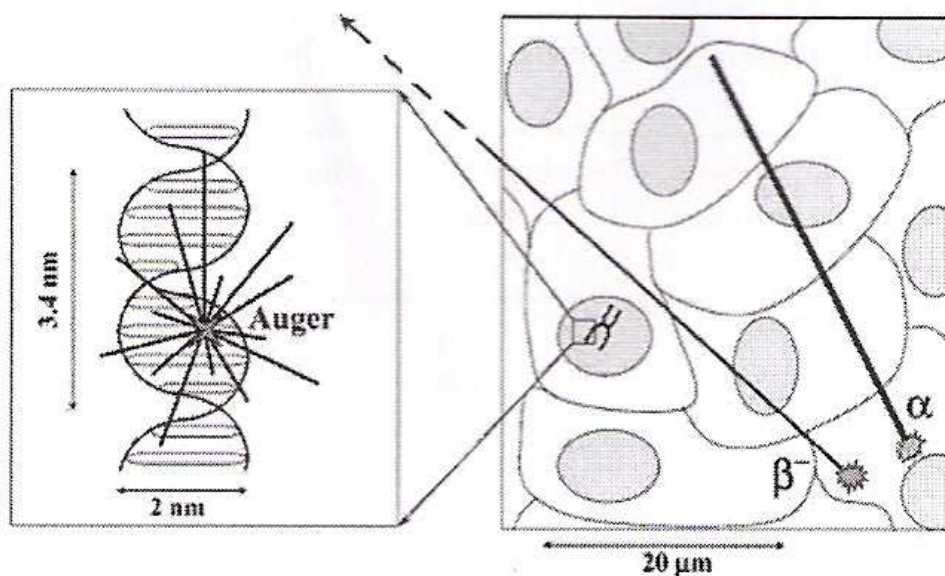


Figura 3.1. Representação do percurso dos emissores beta menos, alfa e electrões de Auger num contexto celular e subcelular (retirado de (Buchegger 2006)).

Outras considerações igualmente importantes quando se considera a radioterapia tumoral dirigida abrangem o alcance da partícula emitida (neste caso o electrão de Auger) e a sua relação com o tamanho celular. Deste modo, Zalutsky e colaboradores, no ano 2000, verificaram que as partículas β^- emitidas pelo ^{90}Y apresentavam um alcance médio de 215 células, o ^{131}I (emissor de partículas β^-) de 40 células e o ^{211}At (emissor de partículas alfa) de apenas 3 células, Figura 3.1, (Unak 2002). Destes resultados, depreende-se que um isótopo emissor de electrões de Auger terá vantagens face aos emissores beta, pois o alcance da partícula é menor, permitindo uma radioterapia bem focada e com repercussões molecular e

celular e não tecidulares, o que se traduz numa taxa de dose tumor/tecido normal mais eficiente, dado que, os cerca de 1 a 10 mm de alcance das partículas beta menos, resultam numa possível irradiação das células normais por *crossfire*. Assim, os electrões de Auger parecem apresentar resultados terapêuticos potencialmente mais favoráveis que os emissores beta menos, (Mariani 2000; Unak 2002; Boswell and Brechbiel 2005). O efeito *crossfire* (fogo cruzado) caracteriza-se, basicamente, pela irradiação accidental das células vizinhas devido ao elevado alcance das partículas.

Estudos celulares e em órgãos têm demonstrado que quando os emissores de electrões de Auger são introduzidos no citoplasma das células, os efeitos são similares aos causados pelas radiações de baixa LET. Por outro lado, quando são incorporados no ADN, as curvas de sobrevivência celular são similares às obtidas com partículas alfa de elevada LET (com produção de radicais livres, por exemplo, $\text{OH}\cdot$, $\text{H}\cdot$, e^-). De acordo com Buchegger e colaboradores, em 2006, os electrões de Auger depositam cerca de 4 a 26 keV/ μm , realizando um percurso inferior a 1 μm , (Sastry 1992; Buchegger 2006). À luz destes conhecimentos, parece claro que os riscos radiobiológicos associados à exposição de electrões de Auger têm sido subestimados durante muitas décadas até à actualidade em que despertam cada vez mais atenções, (Humm 1994). Também os emissores gama e X, cujo alcance é na ordem de muitos diâmetros celulares, são caracterizados por possuírem uma baixa LET; contudo, os seus efeitos radiobiológicos celulares são fortemente dependentes dos efeitos biológicos do oxigénio (muitas vezes ausente em células tumorais hipóxicas). Dado que os electrões de Auger possuem um baixo alcance (mesmo que apresentem uma baixa LET), a deposição de muita energia (10^6 - 10^9 cGy) é realizada um volume extremamente reduzido (na ordem de alguns nanómetros cúbicos) em torno do local de decaimento, (O'Donoghue and Wheldon 1996; Kassis 2003; Boswell and Brechbiel 2005; Ginj 2005). A título exemplificativo, considere-se os efeitos do ^{125}I em ADN de células de mamíferos, que englobam a produção de mais do que uma quebra dupla das hélices do ADN por decaimento, (Kassis 2003).

Segundo Boswell e colaboradores (2005), a taxa de dose absorvida estimada fornecida ao centro da célula pelo $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{123}I , ^{111}In , ^{67}Ga e ^{201}Tl é, respectivamente, 94, 21, 18, 74 e 76 vezes superior caso a radioactividade se encontre localizada no núcleo face à membrana celular, (Boswell and Brechbiel 2005). Também Chen e colaboradores, com base em cálculos previamente estabelecidos, calcularam em 2006 que a dose absorvida para o ^{111}In era amplificada para o dobro quando o radionuclídeo decaía no citoplasma face ao decaimento na superfície da membrana celular, e para cerca de 34 vezes quando decaía no próprio núcleo, (Chen 2006). Também Watanabe e colaboradores em 2006 e Faraggi e colaboradores em 1994

verificaram que, uma vez introduzido próximo do alvo celular, o emissor de electrões de Auger possui potencial para radioterapia dirigida, (Faraggi 1994; Watanabe 2006). Dentro da gama dos electrões referidos (Auger, Coster-Kroning, Super-Coster-Kroning e electrões formados por conversão interna), os electrões formados por conversão interna que decaem no citoplasma podem atingir o ADN nuclear, contudo a sua eficácia biológica é similar à radiação beta menos e raios X. Isto é, apresentam baixa LET, enquanto os electrões de Auger formados por captura electrónica apresentam um comportamento de elevada LET e, portanto, outro valor de eficácia biológica relativa (RBE). De forma a comparar diferentes RBE de múltiplos tipos de radiação, um factor de ponderação de radiação foi introduzido (W_r), tendo-se atribuído um valor de 1 (um) para radiações de baixa LET (por exemplo os raios X). O RBE do ^{125}I e do ^{123}I foi de 8 e 7, respectivamente, o que significa que a sua eficácia biológica era oito e sete vezes superior que a radiação X, radiação gama ou radiação beta menos convencional. Estes valores, algo controversos, têm sido avançados em muitos estudos da área, tendo sido apresentados por alguns grupos valores em situações de irradiação crónica tão elevados como 64. A AAPM (*American Association of Physics in Medicine*) propôs valores de RBE de 10 para os efeitos determinísticos da radiação de Auger e 20 para efeitos estocásticos. Estes factores aplicam-se aos electrões de Auger produzidos por captura electrónica, dado que os electrões de Auger obtidos por conversão interna são classificados de baixa LET e portanto, associados a quebras simples de ADN, apresentando assim, um valor de W_r de 1 (um), (Buehger 2006).

Segundo O'Donnell (2006), os electrões de Auger, que possuem alcances na ordem dos nanómetros a micrometros, são suficientes para danificar o ADN, mas não as células vizinhas normais, (O'Donnell 2006). Por outro lado, Kassis (2003), afirma que a radiotoxicidade dos electrões de Auger deve-se sobretudo (cerca de 90%) a mecanismos indirectos, principalmente devido ao chamado efeito *by-stander*, o qual aumentará a resposta radiobiológica, (Kassis 2003; Gijnj 2005). O efeito *by-stander* é um fenómeno em que células radiobiologicamente danificadas induzem a morte celular em células não irradiadas, através da libertação de citoquininas e radicais livres. Este fenómeno permite concluir que os efeitos terapêuticos dos electrões de Auger excedem as estimativas microdosimétricas, (Britz-Cunningham and Adelstein 2003; Boswell and Brechbiel 2005). Também Boyd e colaboradores, em 2006, num estudo para avaliação do efeito *by-stander in vitro*, verificaram que o ^{123}I -MIBG (metaiodobenzilguanidina), emissor de electrões de Auger, induzia a libertação de citoquininas, pelo que, este grupo de investigadores considerou que o ^{123}I poderá ter potencial terapêutico. Outra conclusão deste estudo foi que novas investigações com objectivo de melhor caracterizar o efeito *by-stander* radioinduzido conduzirá certamente a novas estratégias para aumentar a captação tumoral e

diminuir o dano às células vizinhas, (Boyd 2006). Em contrapartida, um estudo realizado por Chen e colaboradores (2006) demonstrou uma ausência de citotoxicidade nos tecidos normais envolventes, o que poderá significar que um melhor desenho dos radiofármacos conduzirá a resultados mais adequados e dirigidos apenas ao tecido alvo. Uma melhoria importante que este estudo revelou foi a utilização de um complexo regulador dos poros nucleares que mediava a importação de proteínas do citoplasma para o núcleo. Este complexo de nucleoporinas com um canal interno de diâmetro aproximado de 9 nm, que permitia a difusão passiva de moléculas com 40 a 60 kDa, requerendo transporte activo para as restantes, lançava as proteínas ao longo dos poros para o interior do núcleo, (Chen 2006). Também um estudo realizado por Watanabe e colaboradores, em 2006, verificou que 30 dias após o tratamento, a maioria das quebras no ADN causadas pelo ^{125}I se encontravam localizadas nos 10 pares de bases em torno do local de decaimento, sendo o resultado de acção directa do radioisótopo e não dos radicais livres, (Watanabe 2006).

Actualmente, sabe-se que os danos causados ao ADN estimulam diversos trajectos de acção celular. As células podem ficar retidas nos *checkpoints* do ciclo celular ($G_1 \rightarrow S$ ou $G_2 \rightarrow M$), enquanto as reparações são finalizadas ou realizadas, ou então, podem entrar na chamada morte celular programada ou apoptose. Como referido no capítulo anterior, a apoptose é um mecanismo de morte celular que ocorre com muito pouco ou nenhum processo inflamatório, sendo utilizada aquando do modelo embriológico, mas também quando um agente nefasto coloca em perigo o futuro celular. As diferentes vias que conduzem à apoptose envolvem a transdução do sinal proteico e, no caso de danos induzidos pela radiação, o gene p53 apresenta um papel crucial. As células linfoides são mais susceptíveis ao processo apoptótico, enquanto as células de origem epitelial morrem, geralmente, por falha reprodutiva após uma ou mais divisões celulares, apesar de também poderem ficar retidas nos *checkpoints* celulares. A eficiência da radiação em produzir morte reprodutiva celular é dependente da taxa de dose, bem como da densidade de ionização.

Fenómenos de apoptose podem ser observados em múltiplos tumores malignos, particularmente em zonas hipóxicas anexas a áreas necrosadas, constituindo o último recurso de terapia antitumoral. Em processos apoptóticos são activadas as proteases de ácido cisteínio-aspartico (caspases) que conduzem a alterações irreversíveis que incluem: desmembramento do citoesqueleto celular, enrolamento da cromatina, quebra de ADN intranuclear e, finalmente, desintegração da célula em pequenos alvos membranados remanescentes para remoção pelos macrófagos. Este processo, como já referido, é rápido e pode ser alcançado sem invocar o processo inflamatório, (Britz-Cunningham and Adelstein 2003).

De acordo com um estudo realizado por Urashima e colaboradores em 2006 sobre indução de apoptose por exposição a electrões de Auger face à exposição a raios gama, após irradiação com ^{125}I , a apoptose induzida pela radiação gama é iniciada provavelmente via CASP-3 independente e/ou via CASP-3 mediada, não estando correlacionada com a radiosensibilidade celular; enquanto que, a apoptose iniciada devido à incorporação de ^{125}I no ADN é dependente da dose, correlaciona-se com a sensibilidade à radiação e parece ocorrer apenas pela via CASP-3 mediada. Este estudo chamou à atenção para o facto das diferenças na natureza da radiação emitida (raios gama ou electrões de Auger), assim como o seu local de deposição energética, parecerem activar diferentes vias de indução de apoptose, (Urashima 2006).

De acordo com Kassis (2003), os efeitos tóxicos dos emissores de electrões de baixa energia são frequentemente associados à ligação covalente entre o radionuclídeo emissor de electrões de Auger e o ADN celular; contudo, também tem sido demonstrado que várias das moléculas ligadas ao radionuclídeo apresentam alta toxicidade em células de mamíferos, (Kassis 2003).

Pressupostos iniciais associavam covalentemente o emissor de electrões de Auger e o ADN; porém, mais uma vez, estudos recentes vêm demonstrar que algumas moléculas capazes de penetrar o núcleo celular, não necessitam da ligação covalente ao ADN para induzir toxicidade, pelo que, tais moléculas poderão ser utilizadas como transportadores dos radionuclídeos emissores de electrões Auger, (Kassis 2003). De facto, um estudo realizado por Buchegger e colaboradores, em 2006, verificou que o uso de nucleótidos radiomarcados apresentava algumas limitações; nomeadamente, o facto de estes serem incorporados no ADN apenas durante a fase de síntese (fase S) do ciclo celular. Esta restrição é facilmente ultrapassada em estudos *in vitro* através do uso de tempos de incubação capazes de cobrir dois ou três ciclos celulares, tendo-se tentado eliminar nesses estudos pela utilização de bombas osmóticas que libertavam durante vários dias nucleótidos radiomarcados, para colmatar o problema do tempo de circulação reduzido destes agentes, visto que, eram rapidamente degradados após administração. Em alternativa opta-se, frequentemente, por sincronizar todas as células na fase S através da administração de fármacos previamente ao tratamento para aumentar a eficácia da terapêutica, (Buchegger 2006).

Apesar destas múltiplas interpretações e resultados, todos os autores estudados parecem unânimes quanto à necessidade de colocação do emissor de electrões de Auger o mais perto possível do núcleo celular e consequentemente, do ADN. Outro exemplo que suporta esta afirmação é o relatório número 49 da AAPM sobre radionuclídeos emissores de electrões de Auger. Também neste relatório verifica-se que os electrões de Auger exibem uma

radiotoxicidade de alto LET quando colocados próximos do ADN, Figura 3.2, (Humm 1994; Chen 2006).

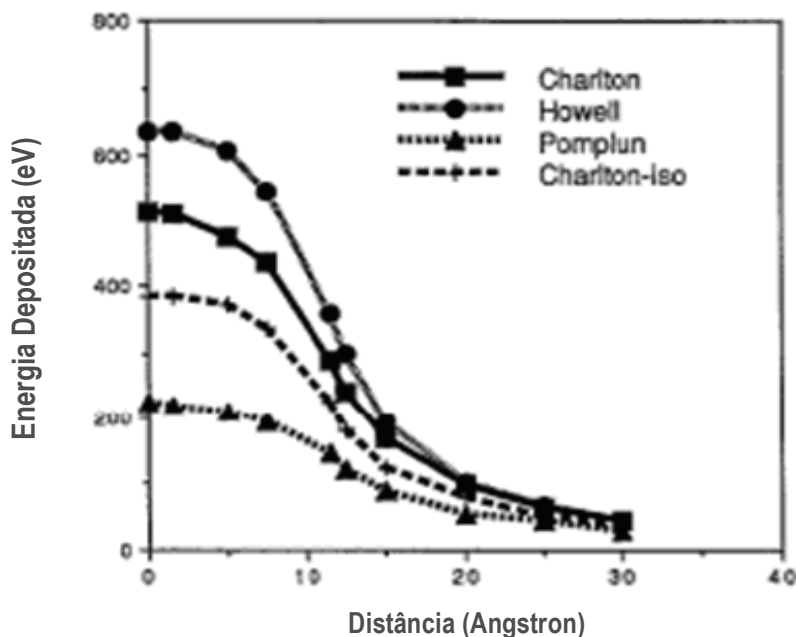


Figura 3.2. Energia média depositada por um decaimento do ^{125}I face a um cilindro de ADN com raio 1.15nm: O decaimento ocorre a diferentes distâncias do eixo central da molécula de ADN; Distâncias superiores a 1.15 nm representam locais de decaimento fora do ADN; Representação dos resultados de 4 investigadores (adaptado de (Humm 1994)).

Também Mariani e seus colaboradores, no ano 2000, concluíram que os efeitos biológicos dos electrões de Auger se deviam ao seu baixo alcance (menor ou igual a 1 μm), tendo também eles verificado a necessidade do radiofármaco ultrapassar a barreira da membrana celular, de forma a aumentar a proximidade ao núcleo celular. Tal compreende-se facilmente, pois, as ionizações são maiores na localização imediatamente próxima ao decaimento, estendendo-se um raio de cerca de 1 μm em todas as direcções, (Stepanek 1996; Mariani 2000). Deste modo, as moléculas transportadoras do radionuclídeo deverão ter capacidade de ultrapassar a barreira celular quer por difusão passiva quer por processos específicos de mediação membranar, (Unak 2002). De acordo com Buchegger e colaboradores (em 2006), a deposição de energia dos emissores de Auger verifica-se nas esferas de 1 a 2 nm, tendo sido calculado que, uma vez incorporado no ADN uma energia igual ou superior a 1.6 MGy seria depositada nas cadeias duplas deste, (Buchegger 2006).

De acordo com Boswell e co-autores (2005), os radiometais a marcar anticorpos são residualizados no interior da célula, enquanto os marcados com radioiodo sofrem degradação

pelos lisossomas, sendo rapidamente eliminados da célula, (Boswell and Brechbiel 2005). Por outro lado, segundo Häflicher (2005), mesmo dentro de um radionuclídeo, a forma com que este é introduzido na célula altera o seu comportamento, dado que, este grupo de investigadores verificou que o ^{99m}Tc na sua forma livre ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) não entrava nas células, o que é compatível com o facto de esta molécula possuir uma natureza mais hidrofílica, (Häflicher 2005). Conclusões idênticas foram apontadas pela AAPM no relatório número 6 de 1992, tendo este grupo reconhecido a importância da forma química do emissor de Auger, pois tal determina a localização subcelular, distribuição e efeitos biológicos, (Sastri 1992). Também Adelstein e colaboradores em 1996 verificaram a importância da formulação química do traçador utilizada na eficiência biológica, pelo que o ^{111}In -DTPA ligava-se à superfície do ADN e produzia cerca de 10 a 20 vezes mais quebras duplas neste que o isótopo não ligado ou livre em solução, (Adelstein and Kassis 1996).

A energia dos electrões de Auger é também um ponto fundamental para a destruição celular, dado que, segundo o relatório número 49 da AAPM, o limiar de energia para produção de quebra do ADN é de 17.5 a 22.5 eV. No mesmo relatório, os valores de dose absorvida por unidade acumulada de actividade (S), para diferentes radionuclídeos emissores de electrões de Auger e com potencial terapêutico, foram determinados e apresentam-se na Tabela 3.2, (Humm 1994).

Tabela 3.2. Diferentes valores S para alguns dos emissores de electrões de Auger, assumindo uma distribuição uniforme em diferentes compartimentos de célula com 10 μm de diâmetro e núcleo com 8 μm (adaptada de (Humm 1994)).

Radionuclídeo	C←C [Gy/Bq • s]	C←CS [Gy/Bq • s]	N←N [Gy/Bq • s]	N←Cy [Gy/Bq • s]	N←CS [Gy/Bq • s]
^{51}Cr	1.06×10^{-3}	5.39×10^{-4}	2.04×10^{-3}	1.44×10^{-4}	2.49×10^{-8}
^{67}Ga	1.86×10^{-3}	9.94×10^{-4}	3.45×10^{-3}	6.32×10^{-4}	2.64×10^{-4}
^{99m}Tc	8.16×10^{-4}	4.23×10^{-4}	1.55×10^{-3}	8.68×10^{-5}	4.76×10^{-5}
^{111}In	1.47×10^{-3}	8.03×10^{-4}	2.70×10^{-3}	3.03×10^{-4}	1.94×10^{-4}
^{123}I	1.56×10^{-3}	8.36×10^{-4}	2.93×10^{-3}	2.72×10^{-4}	1.40×10^{-4}
^{125}I	3.51×10^{-3}	1.86×10^{-3}	6.60×10^{-3}	5.94×10^{-4}	2.62×10^{-4}
^{201}Tl	4.24×10^{-3}	2.29×10^{-3}	7.83×10^{-3}	1.29×10^{-3}	6.91×10^{-4}
^{203}Pb	2.67×10^{-3}	1.40×10^{-3}	5.03×10^{-3}	7.14×10^{-4}	3.21×10^{-4}

Legenda (alvo←fonte): C – totalidade célula, Cy – citoplasma, CS – superfície célula, N – núcleo célula.

3.3 Estudos de Avaliação da Eficácia dos Electrões de Auger

Humm e colaboradores, (Humm and Chariton 1989), desenvolveram um método para avaliar o potencial terapêutico dos electrões de Auger. Este método pretendia determinar o efeito desta terapêutica na molécula de ADN, através da quantificação da quebras duplas provocadas pelos radionuclídeos emissores de Auger. O modelo de quantificação considerado inclui a análise das quebras duplas do ADN e consequentemente, estima a probabilidade de indução de apoptose (isto é, morte celular induzida), dado que as quebras duplas são mais susceptíveis de induzir apoptose que as quebras simples.

O método proposto por Humm e colaboradores pode ser descrito do seguinte modo, (Humm and Chariton 1989):

Como pressupostos iniciais, este método defende que:

- o Dado que as células se encontram em contínua multiplicação e divisão, os cálculos são baseados na totalidade do ciclo celular (desde G_2 até G_1), sendo os resultados obtidos multiplicados por 2, de forma a contemplar a divisão celular;
- o Cada divisão celular dividirá a actividade na célula para metade;
- o Sabe-se que o ADN celular apresenta dimensões de 3.5×10^{12} Dalton;
- o A radiação de baixa LET produz 1.0×10^{-11} quebras duplas/Gy/Dalton;
- o Um tempo razoável para duplicação celular é de 24 horas;
- o Resultados encontrados por estes investigadores, a considerar para a aplicação deste método encontram-se na Tabela 3.3.

Tabela 3.3. Alguns isótopos e suas características para terapêutica com electrões de Auger (adaptado de (Humm and Chariton 1989)).

Isótopo	Semi-vida física	Captura Electrónica por decaimento (aproximado)	Conversão Interna por decaimento	Média da Energia depositada em 8 μ m de núcleo por decaimento [keV]	Média da energia depositada no ADN por decaimento [eV]	Quebras duplas ADN por decaimento
^{125}I	60 dias	1.0	0.93	10.291	537	1.10
^{123}I	13.2 horas	1.0	0.16	4.879	326	0.73
^{77}Br	56 horas	~1.0	0.01	3.012	149	0.38
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	6.02 horas	0.0	1.10	2.567	165	0.43
^{67}Ga	76 horas	1.0	0.33	5.090	152	0.44

- o De acordo com estudos da sobrevivência celular após irradiação, verifica-se que são necessárias 100 quebras duplas de ADN para produzir 63% de morte celular, pelo que tal valor pode ser utilizado para estimar o número de núclídeos inicialmente anexados ao ADN (N_0) para qualquer isótopo, Tabela 3.4.

Tabela 3.4. Comparação da média de números de átomos incorporados e as actividades iniciais por célula, para produzir 100 quebras duplas de ADN com duas divisões celulares (48 h) (adaptado de (Humm and Chariton 1989)).

Isótopo	Número de Átomos incorporados no genoma	Actividade Inicial por célula ($\text{Bq} \times 10^3$)
^{125}I	15650	2.09
^{123}I	380	5.54
^{77}Br	2022	6.95
^{99m}Tc	490	15.67
^{67}Ga	2366	5.84

As fórmulas desenvolvidas por (Humm and Chariton 1989) para aplicação deste método baseiam-se nos pressupostos que se expõem de seguida e incluem:

- o Caso t_0 seja o tempo de duplicação celular e N_0 o número inicial de núclídeo anexado ao genoma, então o número médio de decaimentos antes da divisão celular é (sendo λ a constante de decaimento): $N_0(1 - e^{-\lambda t})$;
- o O número de quebras duplas produzidas no ADN será de (com f igual ao número de quebras duplas por decaimento – ver Tabela 3.3): $dsb = f \times N_0(1 - e^{-\lambda t_0})$;
- o Caso D seja a dose fornecida ao núcleo por decaimento (ver Tabela 3.3), então, devido ao longo alcance da radiação, tem-se:

$$N_{dsb} = 1 \times 10^{-11} \times 3.5 \times 10^{12} \times D \times N_0(1 - e^{-\lambda t_0}) dsb;$$

- o Finalmente, o número total de quebras duplas do ADN (N_{dsb}) é:

$$N_{dsb} = N_0 ((1 - e^{-\lambda t_0})) \times (f + 35D).$$

De referir contudo que os valores de N_{dsb} e o t_0 dependem do tipo de célula, pelo que o método descrito apenas avalia o mesmo efeito (correspondente à destruição de 63% das células) para diferentes actividades de radionuclídeos.

Anos mais tarde, O'Donoghue e colaboradores (1996) propuseram um método similar para cálculo da indução de quebra duplas de ADN pelos electrões de Auger, de acordo com, (O'Donoghue and Wheldon 1996):

$$DSB_{\max} = n_d N_a \left(\frac{T_D T_B}{T_D T_B + T_{\frac{1}{2}} T_B + T_{\frac{1}{2}} T_D} \right),$$

em que n_d é o número de quebras duplas ADN; N_a relaciona-se com a radioactividade, segundo, $N_a = A_0/k$ (com $k = \ln 2/T_{1/2}$ e $T_{1/2}$ = semi-vida física do radionuclídeo); T_D é o tempo de duplicação celular e T_B a semi-vida biológica do radionuclídeo (enquanto ligado ao ADN).

A equação de O'Donoghue demonstra que quando a semi-vida física do radionuclídeo é muito longa ($T_{1/2} \gg T_D$ e $T_{1/2} \gg T_B$), o número máximo de quebras duplas tende para zero. Assim, a taxa de diluição da radioactividade ligada ao ADN é mais rápida que a taxa de decaimento (devido a dissociação do ADN ou proliferação celular) e, portanto, a eficácia biológica é grandemente reduzida. Por outro lado, se $T_D \gg T_{1/2}$ e $T_B \gg T_{1/2}$, então o número de quebras duplas de ADN tende para o limite superior; ou seja, todos os radionuclídeos decaem numa única célula antes da divisão celular, (O'Donoghue and Wheldon 1996). Esta equação, à semelhança da equação de Humm, permite também a análise da influência do tempo de semi-vida do radionuclídeo, bem como a análise do tempo de duplicação celular, demonstrando que radionuclídeos com tempos de semi-vida reduzidos podem ser potencialmente mais eficazes.

3.4 Electrões de Auger no Contexto Terapêutico

Um radiofármaco emissor de electrões de Auger apresenta potencial terapêutico quando, (Unak 2002):

- O radionuclídeo que o compõe dispõe de um perfil de decaimento radioactivo adequado (como descrito anteriormente);
- O radionuclídeo é economicamente preparado com elevada actividade específica;
- O radionuclídeo deve ser eficientemente incorporado numa molécula transportadora;
- A molécula transportadora deve apresentar uma biodistribuição selectiva para o tecido alvo;
- No tecido alvo, o agente deve associar-se com o complexo do ADN durante um determinado período de tempo consistente com a semi-vida física do radionuclídeo.

De acordo com Britz-Cunningham e seus colaboradores (2003), a terapia molecular dirigida pode ser definida como “a concentração específica de um traçador diagnóstico ou agente terapêutico como resultado da sua interacção com espécies moleculares que se encontram distintamente presentes ou ausentes no estado patológico”, (Britz-Cunningham and Adelstein 2003). Esta definição não é completamente inovadora, pois, já na década de 20 do século passado, Regaud e Lacassagne previram que “o agente ideal para terapia do cancro iria consistir num elemento pesado capaz de emitir radiação de dimensões moleculares, o qual seria administrado no organismo e selectivamente captado pelo protoplasma das células que se pretendia destruir”, (Kassis 2003).

De acordo com Buchegger e co-autores, em 2006, existem essencialmente três requisitos principais para a realização de uma terapêutica com electrões de Auger de sucesso: primeiro, esta deve ser selectiva; segundo, deve permitir aplicações repetidas de emissores internos de radiação no organismo humano; e finalmente, deve dirigir-se a especificamente a células cancerígenas. O primeiro requisito reporta para a necessidade de uma terapia altamente selectiva e específica, para que se evite a toxicidade nos tecidos normais envolventes. O segundo estabelece pontos em comum com outras modalidades terapêuticas, como é o caso da quimioterapia, isto é, realizar-se-iam ciclos de tratamentos; contudo, ao contrário da quimioterapia, o tratamento com electrões de Auger não provoca, geralmente, reposta imunitária. O terceiro e último requisito pretendem eliminar a heterogeneidade que se verifica na captação tumoral. Neste caso, o efeito de *crossfire* das partículas beta menos pode ser uma vantagem em tumores de maiores dimensões, mas é certamente mais prejudicial em pequenos nódulos tumorais, (Buchegger 2006).

Conhecendo os processos de acção celular aquando de um dano infligido, facilmente se compreende que os efeitos terapêuticos dos radionuclídeos emissores de Auger, quando confinados ao núcleo celular, devem-se à indução da fragmentação do ADN de tal forma que dificulte a sua reparação. Tal só é possível devido ao alcance muito reduzido dos electrões de Auger (na ordem dos nanómetros) e alta densidade de ionização. Contudo, surgem desafios e limitações, particularmente em tumores sólidos, e incluem: períodos prolongados de retenção do radiofármaco na corrente sanguínea, o que conduz a uma maior dose de radiação para a medula óssea (um dos tecidos mais radiosensíveis); e fraca penetração em certos locais tumorais, resultando em doses de radiação absorvidas pelo tumor não uniformes, (Britz-Cunningham and Adelstein 2003). Apesar disso, devido às suas características, comparativamente com os emissores beta menos e alfa, os emissores de electrões de Auger apresentam baixa toxicidade durante o seu percurso pela corrente sanguínea ou na medula óssea, sendo potencialmente

muito eficientes quando incorporados no ADN das células alvo, (Buehger 2006). Em sistemas experimentais têm sido desenvolvidos percursores de ADN, agentes intercalantes, hormonas com receptores de ADN, pequenas moléculas com capacidade de penetração celular e oligonucleótidos. Estes visam resolver alguns dos desafios técnicos actuais; nomeadamente, uma entrega rápida e específica do radiofármaco ao seu alvo, rápida eliminação de actividade em tecidos não alvo (fundo) e capacidade de criar efeito citológico. De acordo com Britz-Cunningham, possíveis fontes a explorar, para aumentar a entrega rápida e específica do traçador, incluem a pinocitose, a difusão membranar e a endocitose mediada por receptores, (Britz-Cunningham and Adelstein 2003).

Limitações impostas pela natureza do processo patológico, desenho e concepção dos radiofármacos, processos de deposição do traçador no tecido alvo, bem como a natureza das emissão dos radionuclídeo, são factores que limitam o alcançar de duas premissas básicas da radioterapia dirigida (isto é, ausência ou reduzida captação do radiofármaco pelas células normais, com incorporação selectiva em células tumorais em alta concentração, e deposição de energia apenas em células tumorais) e devem ser corrigidos, (Mariani 2000; Unak 2002; Britz-Cunningham and Adelstein 2003). Segundo Sofou, 2008, a maior limitação em radioterapia tumoral dirigida é a toxicidade devido a acumulação do radionuclídeo em órgãos vitais não-alvo, o que limita a dose administrada. Deste modo, níveis tóxicos proíbem a administração de elevadas doses, necessárias para alcançar doses absorvidas letais no tecido tumoral. Possíveis soluções para ultrapassar esta limitação incluem: entrega directa e específica de moléculas transportadoras, resultando numa biodistribuição mais eficiente; estratégias para parar a angiogénese, sem afectar os tecidos normais; bombardeamento selectivo e destruição de neovasculatura; normalização da vasculatura tumoral para aumentar a captação e penetração tumoral do radiofármaco, com consequente redução da captação heterogénea do tumor; bombardeamento directo de células tumorais acessíveis; e bombardeamento tumoral fraccionado, para dissociar radiotoxicidade de toxicidade induzida pela moléculas transportadora, (Sofou 2008). Para além disso, três outras características importantes a considerar para corrigir as limitações deste tipo de radioterapia incluem, (Buehger 2006):

1. Características físicas adequadas do radionuclídeo utilizado para marcação da molécula transportadora;
2. Baixa massa molecular do transportador (como a somatostatina com 1400 Da), o que possibilitará uma mais fácil difusão no tecido;

3. Expressão de receptores nas membranas celulares ou utilização de outro processo específico de captação pela célula, para uma melhor incorporação do radiofármaco por parte da célula e de forma homogénea por todo o tecido patológico.

De acordo com Buchegger e colaboradores, em 2006, a dose de radiação localmente absorvida pelo tecido tumoral, aquando da realização de terapêutica com electrões de Auger do ^{125}I é cerca de 22000 vezes superior que a radioterapia externa com um feixe de 70 Gy. Para que se compreenda melhor a dimensão dos valores, os autores realizam a seguinte comparação: a energia depositada localmente é de 1.6 MGy ($1.6 \times 10^{-18} \text{ J/nm}^3$), o que corresponderia a um aumento de temperatura de 382 °C por nm^3 de água. Naturalmente que a energia depositada em torno de 2 nm do local de decaimento será rapidamente dissipada, pois é diluída pelo espaço do núcleo, pelo que se se considerar um núcleo com 2 μm de raio, o factor de diluição será de 10^9 e o aquecimento provocado será insignificante ($0.38 \times 10^{-6} \text{ °C}$), (Buchegger 2006).

3.5 Características Físicas dos Electrões de Auger do ^{99m}Tc

A grande maioria dos estudos radiobiológicos com electrões de Auger são realizados com o ^{125}I ; contudo, a lista de radionuclídeos emissores de Auger é vasta e inclui todos aqueles que decaem por conversão interna e captura electrónica, (Humm and Chariton 1989). O ^{99m}Tc é um desses radionuclídeos e é abordado com maior pormenor de seguida.

Apesar da emissão de electrões de Auger por parte do ^{99m}Tc ser inferior a 1%, face aos 3.7% a 19.9% do ^{125}I , ^{123}I e ^{201}Tl , este possui várias características vantajosas, tais como semi-vida física de 6 horas, química adequada aos processos de marcação, radionuclídeo filho estável, entre outras, (Marques 2005; Buchegger 2006). Buchegger e colaboradores, em 2006, sugerem o ^{123}I como um bom candidato à terapia com electrões (formados por captura electrónica e conversão interna), devido à sua semi-vida física de 13.2 horas, facilidade de marcação de péptidos ou oligonucleótidos (originando uma biodistribuição mais selectiva) e possibilidade de monitorizar terapia com imagem cintigráfica, devido à emissão de radiação gama de 159 keV, (Buchegger 2006). Considerando que o ^{99m}Tc apresenta semelhanças com este radionuclídeo (tais como, semi-vida física reduzida, emissão de radiação gama de 140 keV

e facilidade de marcação), então pode-se questionar o eventual interesse e utilidade deste agente enquanto elemento terapêutico pela emissão de electrões de Auger, sendo este, precisamente, o objectivo principal da presente Dissertação.

Sabe-se que o ^{99m}Tc decai para ^{99}Tc através de uma transição por conversão interna seguida de outra transição por conversão interna em 10% das desintegrações, ou seguida de emissão de um fotão gama de 140 keV em 90% das desintegrações. De acordo com Humm e co-autores, em 1989, a eficácia biológica do ^{99m}Tc na produção de quebras duplas no ADN, à semelhança do que acontece com outros emissores de electrões de Auger, nomeadamente o ^{125}I , só é máxima quando o decaimento se processa no ADN ou muito próximo deste. De acordo com estes autores, o ^{99m}Tc deveria ser explorado enquanto agente terapêutico, sendo apontada por este grupo, já em 1989, a importância de estudar moléculas transportadoras passíveis de serem marcadas por este radionuclídeo com o propósito terapêutico, (Humm and Chariton 1989).

As principais características do espectro de radiação do ^{99m}Tc foram apresentadas no relatório número 2 da AAPM, de 1992, e encontram-se indicadas na Tabela 3.5, (Howell 1992).

De acordo com Häflicher e seus colaboradores, 2005, de entre os electrões emitidos pelo ^{99m}Tc aqueles que parecem ser mais interessantes para radioterapia metabólica são os electrões Coster-Kroning e Super-Coster-Kroning da orbital atómica M (electrão CK MMX), com energia média de 116 eV, rendimento por decaimento de 0.75 e alcance de 6 nm; electrões de Auger da orbital atómica M (electrão de Auger MXY), com energia média de 226 eV, rendimento por decaimento de 1.1 e alcance de 10.5 nm; e electrões Coster-Kroning e Super-Coster-Kroning da orbital atómica N (electrão CK NNX), com energia média de 33 eV, rendimento por decaimento de 1.98 e alcance de 2 nm, (Häflicher 2005).

Outra característica do ^{99m}Tc que não pode ser ignorada é o facto de este ser considerado (à semelhança do que acontece com o ^{111}In) um traçador “residualizado” sendo, portanto, aprisionado no interior das células, (Griffiths 1999). Segundo Buchegger e co-autores, 2006, o ^{125}I não entra no núcleo e permanece apenas momentaneamente no citoplasma antes de ser depositado na forma coloidal, (Buchegger 2006), o que contrasta com a residualização do ^{99m}Tc . Para além disso, a possibilidade de aquisição de imagem; nomeadamente, para seguimento e avaliação da eficácia da terapêutica é outra característica vantajosa do ^{99m}Tc .

Poucos estudos até à data têm sido realizados com vista a determinar o RBE do ^{99m}Tc . Pomplun e colaboradores, em 2006, realizaram um estudo com vista a determinar o factor W_r para o ^{99m}Tc , através da utilização do algoritmo Monte Carlo. Este grupo de investigadores obteve um valor de $W_r=1.15$, o qual foi calculado assumindo um RBE de 1 (um) para os fotões gama do ^{99m}Tc (com fracção de dose de 0.06), um RBE de 1 (um) para os electrões obtidos por

conversão electrónica (fracção de dose de 0.89) e um RBE de 4 para os electrões de Auger (fracção de dose de 0.05). Estes valores demonstram a importância dos electrões de Auger para os cálculos microdosimétricos e para a determinação do W_r , (Pomplun 2006).

Tabela 3.5. Espectro de Energia do ^{99m}Tc (adaptado de (Howell 1992)).

	Energia Média (MeV)	Rendimento/Dcaimento	Alcance (microns)
Gama 2	1.41×10^{-1}	8.89×10^{-1}	
IC 1 M,N...	1.82×10^{-3}	9.91×10^{-1}	1.65×10^{-1}
IC 2 K	1.19×10^{-1}	8.43×10^{-2}	1.93×10^2
IC 2 L	1.37×10^{-1}	1.36×10^{-2}	2.44×10^2
IC 2 M,N...	1.40×10^{-1}	3.70×10^{-3}	2.51×10^2
IC 3 K	1.22×10^{-1}	5.90×10^{-3}	1.99×10^2
IC 3 L	1.40×10^{-1}	2.50×10^{-3}	2.50×10^2
Auger KLL	1.53×10^{-2}	1.26×10^{-2}	5.57
Auger KLX	1.78×10^{-2}	4.70×10^{-3}	7.25
CK LLX	4.29×10^{-5}	1.93×10^{-2}	2.83×10^{-3}
Auger LMM	2.05×10^{-3}	8.68×10^{-2}	1.99×10^{-1}
Auger LMX	2.32×10^{-3}	1.37×10^{-2}	2.41×10^{-1}
Auger LXY	2.66×10^{-3}	1.20×10^{-3}	3.00×10^{-1}
CK MMX	1.16×10^{-4}	7.47×10^{-1}	5.89×10^{-3}
Auger MXY	2.26×10^{-4}	1.10	1.05×10^{-2}
CK NNX	3.34×10^{-5}	1.98	2.05×10^{-3}
Raios X $K_{\alpha 1}$	1.84×10^{-2}	3.89×10^{-2}	
Raios X $K_{\alpha 2}$	1.83×10^{-2}	2.17×10^{-2}	
Raios X $K_{\beta 1}$	2.06×10^{-2}	7.60×10^{-3}	
Raios X $K_{\beta 2}$	2.10×10^{-2}	1.50×10^{-3}	
Raios X $K_{\beta 3}$	2.06×10^{-2}	2.70×10^{-3}	
Raios X L	2.45×10^{-3}	4.90×10^{-3}	
Raios X M	2.36×10^{-4}	1.20×10^{-3}	
Rendimento Total de Auger e electrões CK por decaimento = 4.0 Rendimento Total de electrões de Conversão Interna por decaimento = 1.1 Rendimento Total de raios X por decaimento = 0.079 Rendimento Total de raios gama por decaimento = 0.89 Energia Total Libertada por decaimento = 142646 eV Energia dos electrões de Auger e CK libertada por decaimento = 899 eV Energia dos electrões de conversão interna libertada por decaimento = 15383 eV Energia de raios X libertada por decaimento = 1367 eV Energia de raios gama libertada por decaimento = 124997 eV			

Legenda:

Gama 2 – emissão de raios gama da transição nuclear número 2;
 IC – b K, IC – b L, IC – b M,N... - Conversão interna, em que a letra b denota o número da transição nuclear. A notação K, L e M,N... indicam que o electrão foi ejectado das orbitais K, L e M,N... respectivamente;
 Auger KLL – Transição Auger da orbital K com duas lacunas na orbital L;
 Auger KLX – Transição Auger da orbital K onde uma das duas lacunas se situa na orbital L;
 CK LLX – Transições de Coster-Kroning e Super-Coster-Kroning na orbital L;
 Auger LMM – Transições de Auger em que ambas as lacunas são na orbital M;
 Auger LMX – Transição Auger da orbital L onde uma das duas lacunas se situa na orbital M;
 Auger LXY – Transição Auger da orbital L onde nenhuma das duas lacunas se situa na orbital M;
 CK MMX – Transições Coster-Kroning e Super-Coster-Kroning na orbital M;
 Auger MXY – Transições de Auger na orbital M;
 CK NNX – Transições Coster-Kroning e Super-Coster-Kroning na orbital N.

3.6 Estudos Realizados com Electrões de Auger do ^{99m}Tc

De forma a estudar a dosimetria dos electrões de Auger do ^{99m}Tc , Ftacnikova e colegas, 2000, propuseram o uso do algoritmo Monte Carlo para determinar a quantidade de energia depositada pelos electrões de Auger no ADN. Este estudo utilizou três modelos computacionais distintos de ADN para determinar as quebras simples induzidas pelos electrões de Auger. O modelo cilíndrico de ADN apresentou 1.27 quebras simples por cada decaimento radioactivo localizado na base do ADN (efeito directo) para o ^{99m}Tc , face a 2.58 para o ^{123}I e 0.95 para o ^{67}Ga . Por outro lado, o modelo de dupla cadeia apresentou 0.57 quebras simples para o ^{99m}Tc , face a 0.72 para o ^{123}I e 0.39 para o ^{67}Ga . Finalmente o modelo estrutural apresentou 0.19 quebras simples para o ^{99m}Tc , face a 0.53 e 0.29 para o ^{123}I e ^{67}Ga respectivamente. Adicionalmente, as quebras duplas por efeito directo e indirecto foram de 0.11 e 0.68 respectivamente para o ^{99m}Tc (face a 0.21 e 1.23 para o ^{123}I ; 0.09 e 0.59 para o ^{67}Ga), (Ftácniková and Böhm 2000).

Em 2000, Pedraza-López e colaboradores, reportaram que, com doses absorvidas de 1 Gy de ^{99m}Tc -HMPAO (Hexametilpropileno amino oxima) e ^{99m}Tc -ácido gentísico era possível induzir quebras em cerca de 100% do ADN de leucócitos, tendo estes autores atribuído tal fenómeno aos electrões de Auger produzidos durante o decaimento do ^{99m}Tc . Os mesmos investigadores observaram que o $^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$ também era capaz de induzir danos no ADN, contudo em menor percentagem face aos outros radiofármacos estudados (^{99m}Tc -HMPAO e ^{99m}Tc -ácido gentísico). Nenhuma diferença entre os danos causados pelo ^{99m}Tc -HMPAO e o ^{99m}Tc -ácido gentísico foi reportada, apesar de literatura prévia sugerir que o ^{99m}Tc -HMPAO se localiza no citoplasma, enquanto o ^{99m}Tc -ácido gentísico permanece ligado à membrana celular. A ausência de diferenças entre estes dois radiofármacos estudados (^{99m}Tc -HMPAO e ^{99m}Tc -ácido gentísico) pode ser explicada pelo facto deste grupo de investigadores ter utilizado leucócitos, os quais são células com grandes núcleos e distância curta entre o núcleo e a membrana celular (os quais estão separados por uma pequena quantidade de citoplasma). Assim, mesmo quando o radiofármaco se localizava na membrana celular, a relação dimensão celular/energia e alcance do electrão de Auger permitia a indução de danos do ADN, (Pedraza-López 2000). Por outro lado, um outro estudo realizado em 2004 por Kriehuber e colaboradores utilizando células do carcinoma humano escamoso (SCL-II) pretendia comparar os efeitos dos electrões de Auger do ^{99m}Tc com irradiação gama externa de uma fonte de Cobalto-60 (^{60}Co). Estes investigadores concluíram que o pertecnetato de sódio ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) não aumentava a

citotoxicidade nem a genotoxicidade celular, quando comparado com a radiação da fonte uniforme externa de ^{60}Co . Contudo, observaram um aumento do processo apoptótico após exposição a baixas doses de ^{99m}Tc , o que, de acordo com os investigadores, deveria ser estudado com maior pormenor, (Kriehuber 2004). O estudo realizado por Mairs e colaboradores, em 2007, fornece novas evidência que podem ajudar a explicar os resultados de Kriehuber e Pedraza-López. Mairs e colaboradores estudaram os danos biológicos do efeito de *bystander* usando ^{123}I -MIBG, ^{131}I -MIBG e ^{211}At -MABG. O efeito *bystander*, predominante com baixas doses de radiação e baixas taxas de dose, poderá explicar a citotoxicidade observada, por este grupo de investigadores, aquando da utilização de ^{123}I -MIBG (emissor de electrões de Auger de elevada LET) e do ^{211}At -MABG (emissor de partículas alfa de elevada LET) a baixas concentrações radioactivas. Para além disso, de acordo com estes investigadores, radionuclídeos emissores de radiação de alto LET (^{123}I -MIBG e ^{211}At -MABG) podem originar efeitos tóxicos e protectores nas células vizinhas não irradiadas na presença de baixas e altas doses respectivamente, (Mairs 2007). Contudo, os resultados obtidos por Mairs e colaboradores referem-se ao ^{123}I e podem não ser traduzíveis para o ^{99m}Tc , pelo que estudos futuros com ^{99m}Tc enquanto agente irradiante são necessários.

Um outro estudo conduzido por Ilknur e colaboradores, 2002, sobre aberrações cromossómicas em linfócitos após radiomarcagem com ^{99m}Tc -HMPAO, demonstrou *in vitro* que, uma vez estimulada a divisão celular em cultura, múltiplas aberrações eram observadas nas células radiomarcadas face às células controlo ($272.2 \pm 2.5/1000$ células binucleares face $5.5 \pm 1.0/1000$ células binucleares, respectivamente). Com base na natureza e severidade das aberrações cromossómicas, os autores deste estudo estimam que a dose absorvida pelas células terá sido de pelo menos 5Gy, (Ilknur 2002).

A radiotoxicidade de um péptido conjugado intercalante radiomarcado com $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ foi avaliada por Haefliger e seus colaboradores em 2005 usando células de melanoma com crescimento exponencial (B16F1). Diferentes análogos foram investigados e comparados com o $^{99m}\text{TcO}_4^-$. Os resultados obtidos demonstraram que um dos análogos apresentava uma radiotoxicidade 10 vezes superior ao $^{99m}\text{TcO}_4^-$. As alterações morfológicas observadas nas células em morte celular eram típicas de morte celular por radiação ou senescência celular devido a irradiação, ambos resultado de danos ao ADN. Como conclusões finais, estes investigadores verificaram que: a quantidade de radioactividade aplicada era relativamente elevada para se tornar terapeuticamente relevante, dado a reduzida captação do ^{99m}Tc ; assim, melhorias futuras do agente usado eram requeridas para refinar o eventual efeito terapêutico, (Haefliger 2005). Outro estudo realizado pela equipa de Haefliger (2005) avaliou a indução de

quebras duplas do ADN por electrões de Auger do complexo de ^{99m}Tc ligado ao ADN. Neste estudo os investigadores concluíram que o ^{99m}Tc induzia quebras duplas de ADN quando decaía na vizinhança directa deste, e que as quebras duplas observadas eram causadas sobretudo por efeitos directos da radiação ou por reacções de difusão controlada de espécies reactivas ao oxigénio, (Häfliger 2005).

Em 2007, Schipper e colaboradores avaliaram, *in vivo*, a eficácia do ^{99m}Tc -pertechnetato de sódio para terapia de tumores neuroendócrinos que expressam sódio/iodo simporte. Este grupo verificou um efeito terapêutico em tumores neuroendócrinos *in vivo*, sendo os resultados comparáveis com os recolhidos previamente em culturas de células. Actividades superiores a 5550 MBq (150 mCi) apresentavam toxicidade considerável, enquanto que actividades de 3700 MBq (100 mCi) eram bem toleradas e apresentavam capacidade de induzir hemorragia tumoral em 80% dos animais estudados. A translação de modelos 2D (culturas de células) para modelos 3D (modelo animal) não alterou a dose terapêutica absorvida dos electrões de Auger, devido ao ser curto alcance. Os resultados obtidos por este estudo não demonstraram evidência de dose absorvida devido a radiação gama na cultura de célula aquando do uso de concentrações radioactivas elevada e, portanto, é improvável que tal contribua para a dose depositada no interior do modelo 3D (modelo animal), em que a radioactividade é inferior e a maioria será depositada fora do animal, devido ao elevado alcance dos raios gama. Este estudo é particularmente interessante, pois é o primeiro estudo a avaliar o efeito dos electrões de Auger do ^{99m}Tc -pertechnetato de sódio *in vivo*, (Schipper 2007).

3.7 Sumário

O presente capítulo expõe múltiplos estudos recentes realizados com emissores de Auger, comparando as vantagens e desvantagens destes face aos emissores beta menos e alfa, num contexto de radioterapia metabólica. Adicionalmente, expõe as principais características físicas do ^{99m}Tc (agente irradiante a utilizar), bem como, os principais estudos realizados na área com esse emissor de Auger.

Até à data, estudos em culturas de células, *in vivo* e usando modelos computacionais procuraram compreender qual o papel do ^{99m}Tc enquanto agente terapêutico; contudo, estas contribuições são escassas e estudos futuros, como o realizado na presente Dissertação, são importantes nesta fase embrionária para estudo e análise do uso de electrões de Auger do ^{99m}Tc em contexto de radioterapia metabólica. É neste seguimento que se enquadra o capítulo

seguinte desta Dissertação, sendo apresentada a metodologia utilizada para a avaliação dos efeitos terapêuticos do ^{99m}Tc , baseada na utilização de dois simuladores computacionais dos efeitos da radiação no ADN celular após irradiação com electrões de Auger do ^{99m}Tc e um simulador da radiobiologia celular após irradiação com electrões de Auger do ^{99m}Tc .

Capítulo IV. Simuladores de Radiobiología Celular

4.1 Introdução

Os simuladores computacionais de radiobiologia celular são desde há algum tempo uma fonte de informação útil sobre o potencial efeito terapêutico de diferentes agentes irradiantes, sendo de crucial relevância no campo da radioterapia molecular. A principal vantagem destes simuladores é a sua versatilidade e a capacidade de em intervalos de tempo reduzidos, muitas vezes de poucos minutos, obter informação, que de outro modo demoraria largos meses ou mesmo anos e exigiriam grande disponibilidade de recursos. Por exemplo, as culturas de células, embora muito úteis, pois possibilitam o conhecimento do comportamento e função de uma população isolada de células, bem como, o estudo de fenómenos inacessíveis em tecidos intactos, possuem algumas características desvantajosas e algumas limitações. As principais desvantagens das culturas de células incluem: gasto elevado de material, dependência das condições de crescimento da cultura, instabilidade da cultura celular (sobretudo em linhas celulares imortais) e perda de características fenotípicas (necessidade do uso de marcadores). Para além disso, estas requerem operadores experientes com conhecimento da técnica de cultura e de assepsia, (Ryan 2008; Tavares 2009). Em relação às culturas celulares, os simuladores computacionais possuem algumas vantagens; nomeadamente, o facto de permitirem a obtenção de informação de forma mais rápida e flexível, possibilitando o estudo de múltiplos parâmetros do cenário de irradiação num curto espaço de tempo; não existe a desvantagem da instabilidade da cultura celular, nem o risco de contaminação da cultura, que inviabiliza os resultados e força os investigadores a repetir toda a experiência desde o início, e o custo associado é sobejamente inferior (alguns sistemas computacionais podem mesmo ser obtidos em domínio publico). Por outro lado, os simuladores também possuem desvantagens, tais como avaliação baseada em resultados experimentais prévios e conhecimentos actuais, que podem não ser verificados no organismo vivo (embora isso também seja verdade para as culturas de células); e a modelização da cinética celular de forma mecanista, que pode subvalorizar ou sobrevalorizar certos parâmetros e resultados.

Um dos primeiros simuladores dos efeitos da radiação desenvolvido foi o simulador Monte Carlo. Segundo a história, decorria o ano de 1945 quando dois eventos culminaram no aparecimento de um método matemático notável e que ainda hoje é aplicado em diversas áreas do conhecimento. Esses eventos foram os primeiros testes nucleares em Alamogordo e a construção do primeiro computador electrónico. A sua combinação originou o renascimento da técnica matemática conhecida até então, em que os métodos antigos de estatística e

amostragem foram substituídos pelo método Monte Carlo, (Metropolis 1987). O método Monte Carlo é um conjunto de técnicas estocásticas baseadas em números aleatórios e probabilidades estatísticas para investigar problemas científicos. O seu uso possibilita analisar sistemas complexos que de outro modo não seriam possíveis de estudar, pois descrever interações entre dois átomos é relativamente simples; contudo, resolver as mesmas equações para centenas ou milhares de átomos é impossível. Com o método Monte Carlo um sistema complexo pode ser amostrado em números de configurações aleatórias e a informação recolhida pode ser utilizada para descrever o sistema como um todo, (Woller 1996).

Actualmente, métodos Monte Carlo aplicados para construção de simuladores dos efeitos da radiação possibilitam o planeamento em radioterapia, o estudo das interações entre a radiação e a matéria, entre outros; contudo, algumas desvantagens têm sido apontadas a este simulador, particularmente a sua exigência computacional. Assim, comparativamente com o algoritmo de Monte Carlo, computacionalmente mais complexo e detalhado, o algoritmo de Monte Carlo rápido (MCDS) utilizado para obtenção de resultados da presente Dissertação, apresenta boa correlação para a maioria dos espectros de danos radioinduzidos do ADN, o que sugere que a distribuição espacial de danos elementares do ADN é determinada primariamente por eventos independentes estocásticos. A sua rapidez face ao Monte Carlo, em termos de processamento de informação, é que um cenário de exposição de 100 000 células a 1 Gy de radiação requer um tempo de simulação de apenas 1.5 minutos num Intel® Pentium III Xeon a 2.8 GHz, necessitando de uma memória de 1.3 megabytes, (Semenenko and Stewart 2004). Contrariamente a este simulador MCDS, o algoritmo CELLDOSE Monte Carlo para avaliação dos efeitos da radiação em esferas de água isoladas, necessita de algumas horas num Pentium 4-EM64T a 3GHz com 1Go de memória RAM, dependendo do método estatístico seleccionado e dimensões das esferas simuladas, (Champion 2008).

Em contraste o simulador de radiobiologia celular utilizado (VC – *Virtual Cell*) fornece informações sobre sobrevivência celular, probabilidade de controlo tumoral, indução de mutagenese, entre outros, em apenas alguns minutos. Um outro código baseado no método Monte Carlo para o estudo dos efeitos da radiação no ADN, o GEANT4-DNA, encontra-se actualmente em desenvolvimento, prevendo-se a sua conclusão em 2012, (Mantero 2009). As suas potencialidades não são ainda conhecidas actualmente, dado que o projecto teve início apenas em 2009. O PENELOPE (*PENetration and Energy LOss of Positrons and Electrons*) é outro código Monte Carlo, cuja primeira versão foi criada em 1996, e que avalia o transporte de electrões acoplados a fótons em diferentes meios, (Salvat 2003). Este código quando acoplado a outro simulador de danos do ADN, como por exemplo o MCDS, permitiu, segundo Hsiao e

Stewart em 2008, verificar que os valores de RBE de uma única célula ou múltiplas células em monocamada diferiam no máximo em 15%. Esta conjugação de dois códigos demonstrou ser uma metodologia computacionalmente eficiente e útil para a previsão do rendimento de danos em misturas com outros tipos de partículas carregadas, como acontece nos casos de terapia com prótons, aplicações espaciais e dosimetria interna, (Hsiao and Stewart 2008).

Diversos simuladores computacionais foram criados com base no método Monte Carlo, incluindo os utilizados na presente Dissertação, contudo dado que o algoritmo utilizado para construção dos simuladores utilizados (MCDS, simulador de Reparação por Excisão Monte Carlo (MCER) e simulador VC) é um método simplificado do Monte Carlo, as exigências computacionais são ultrapassadas e um simples computador de uso pessoal pode ser utilizado para a obtenção dos resultados. Adicionalmente, segundo Nikjoo e colaboradores, em 1997, a aplicação em detalhe dos avanços tecnológicos aumenta o número de assumpções e a incerteza de parâmetros, pelo que um compromisso entre incertezas e resultados deve ser estabelecido, (Nikjoo 1997); ora tal pode ser outra potencial vantagem do método simplificado do Monte Carlo utilizado na presente Dissertação.

4.2 Simulador de Danos Monte Carlo

4.2.1 Enquadramento

Radiações de baixa LET conduzem à formação de aproximadamente 1000 quebras simples (SSB) e 40 quebras duplas (DSB) por gray (Gy) numa célula de mamíferos típica. O nível de danos a bases é estimado em 2500 para 25000/Gy/célula e, para além dos danos isolados, a radiação ionizante produz também múltiplos locais de danos (*multiply damages sites* – MDS), que consistem em dois ou mais danos elementares num curto espaço de hélices enroladas em torno do ADN (estes podem ser quebras das cadeias de ADN ou danos a bases de ADN). As quebras isoladas ou múltiplas em cada cadeia do ADN separadas por pouco espaço entre hélices do ADN são detectadas como SSB na maioria dos ensaios. Por outro lado, DSB são formadas quando pelo menos duas quebras do ADN se formam em proximidade nas cadeias opostas do ADN. As DSB e outras classes de MDS são, geralmente, as causas primárias de morte induzida pela radiação e mutagénese.

Informação detalhada sobre o espectro de possíveis configurações de danos produzidos pela radiação ionizante é frequentemente obtida pelo uso do simulador de trilhos estruturais

Monte Carlo em combinação com modelos geométricos do ADN e da cromatina. Apesar de modelos sofisticados como o método de Monte Carlo se apresentarem como *gold standard* para prever a configuração do espectro de danos produzido pela radiação, esta abordagem é demasiado dispendiosa e pouco versátil para certas aplicações; nomeadamente, para estimar o rendimento absoluto de alguns danos raros de difícil reparação. Assim, métodos computacionais para estimação do dano biológico molecular radioinduzido que apresentam como principais características rapidez e simplicidade apresentam particular interesse. É neste contexto que se insere o simulador de danos Monte Carlo (*Monte Carlo Damage Simulation*), MCDS, que apresenta apenas quatro parâmetros ajustáveis, dois dos quais podem ser restringidos a um intervalo de valores razoável com base em resultados experimentalmente obtidos, (Semenenko and Stewart 2004).

4.2.2 Algoritmo para Simular Danos ADN

Quatro parâmetros ajustáveis são utilizados para simular os danos do ADN e incluem: número de quebras/Gy/célula (σ_{sb}), número de danos a bases do ADN/Gy/célula (σ_{bd}), comprimento do segmento de ADN medido em pares de bases (bp)/Gy/célula (n_{seg}) e comprimento mínimo de ADN não danificado entre danos elementares entre segmentos vizinhos (medido em bp) (N_{min}). O algoritmo Monte Carlo processa-se essencialmente em duas fases: 1) distribuição aleatória no segmento de ADN (parâmetro n_{seg}) do número esperado de danos elementares produzidos numa célula por uma determinada quantidade de radiação e 2) subdivisão da distribuição de danos elementares no segmento em lesões, sendo este agrupamento determinado pelo parâmetro N_{min} , Figura 4.1.

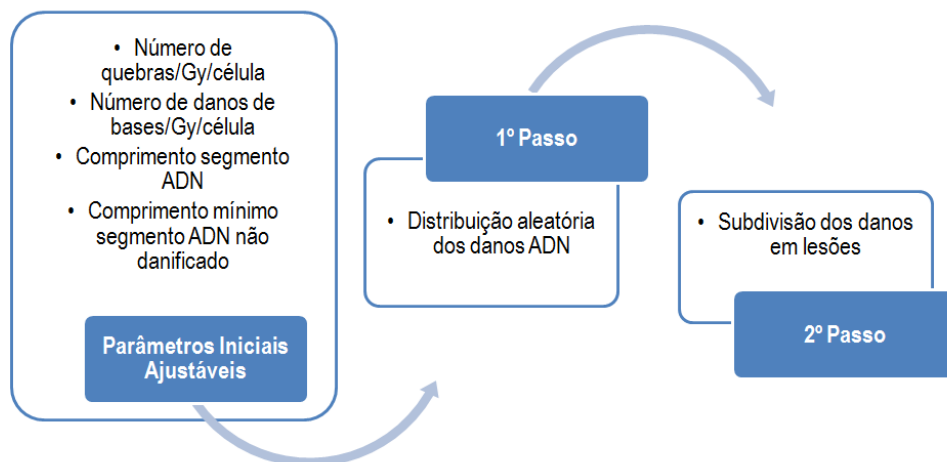


Figura 4.1 Representação esquemática dos passos fundamentais do simulador MCDS.

O procedimento passo-a-passo da execução do simulador MCDS pode ser descrito da seguinte forma:

O primeiro passo, distribuição aleatória dos danos do ADN é composto por cinco subpassos:

- I. Computação dos parâmetros para uma específica dose absorvida, D (Gy). O comprimento do segmento por célula é dado por: $N_{seg} = gn_{seg} D$. Já o número total de quebras por células é dado por: $\sum_{sb} = g \sigma_{sb} D$. Sendo g um factor de escala adimensional que pode ser utilizado para ajustar o rendimento absoluto das lesões de ADN para melhor mimetizar as observações experimentais para tipos específicos de células. Contudo, quando o valor específico para cada célula é desconhecido, g deve ser unitário. Este valor para células eucarióticas pode ser aproximado à razão entre o conteúdo de ADN da célula em estudo e o conteúdo da célula de mamíferos (cerca de 6×10^9 bp). O número de danos de base/célula pode ser calculado através do número de quebras por célula pela equação: $\sum_{Bd} = f \sum_{sb}$.
- II. Selecção aleatória de um par de nucleótidos a partir do segmento de ADN; ou seja, selecção de um integral distribuído uniformemente no intervalo $[1, N_{seg}]$.
- III. Selecção aleatória da cadeia do ADN (cadeia 1 ou 2). Caso o nucleótido seleccionado não esteja danificado, procede-se ao registo da quebra na localização, caso contrário retorna-se ao passo II.
- IV. Criação de um relógio $\sum_{sb} = \sum_{sb} - 1$. Caso $\sum_{sb} > 0$, retornar ao passo II.
- V. Repetição dos passos II a IV para os danos das bases.

No segundo passo, subdivisão dos danos em lesões, N_{min} é o parâmetro que determina a forma de agrupamento dos danos elementares em lesões, pelo que danos separados por pelo menos N_{min} pares de bases são tratados como diferentes lesões, Figura 4.2.

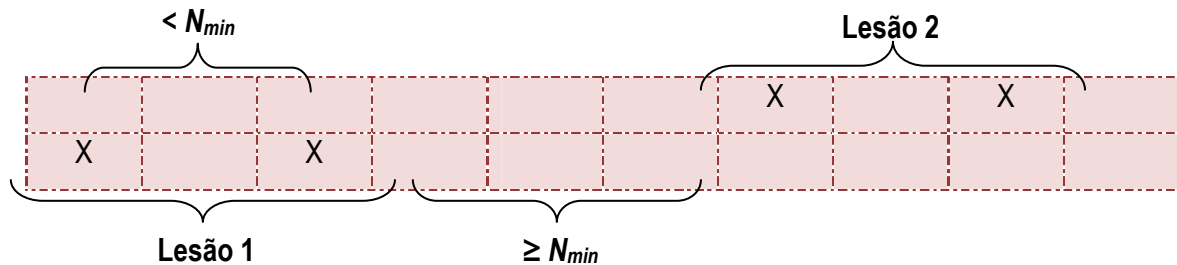


Figura 4.2 Representação esquemática do processo de agrupamento de danos em lesões ao ADN.

O algoritmo considerado para o agrupamento de danos em lesões consiste em quatro passos essenciais:

- I. Iniciar a contagem no fim do segmento de ADN e localizar o primeiro dano elementar em cada uma das cadeias ADN ou em ambas. Iniciar a lesão do ADN aquando da localização do(s) dano(s) elementar(es).
- II. Começando no par de base após o último dano elementar identificado, proceder à movimentação ao longo do segmento do ADN, na mesma direcção, e contar o número de pares de bases não danificado antes do próximo dano elementar encontrado. Caso o fim do segmento do ADN seja atingido antes de se encontrar outro dano elementar, considerar a lesão do ADN na localização do último dano detectado e finalizar.
- III. Caso o número de pares de base não danificadas for $\geq N_{min}$, registar o fim da posição da lesão na última localização de dano elementar detectado. De seguida registar a posição de início da próxima lesão na localização do último dano elementar desta.
- IV. Retornar ao passo II.

Uma vez concluído o processo de agrupamento dos danos elementares do ADN em lesões, estas podem ser analisadas em termos de natureza e distribuição espacial dos danos elementares que as formam, (Semenenko and Stewart 2004).

4.2.3 Parâmetros da Estimação

Como referido, este simulador requer a especificação de quatro parâmetros ajustáveis (σ_{sb} , f , n_{seg} e N_{min}). Sabe-se que para produzir 1000 SSB e 40 DSB/Gy/célula, o número de quebras deverá ser de pelo menos 1080Gy/célula (1000 SSB/Gy/célula + 2 quebras por cada DSB $\times$ 40 DSB/Gy/célula). Assim, σ_{sb} é de aproximadamente 10^3 /Gy/célula para radiações de baixa LET. Ward estimou que a razão danos de bases/quebra ADN, f , é de 2.7; contudo, Nikjoo e colaboradores (2001) obtiveram uma razão entre 2.7 e 3, (Nikjoo 2001; Semenenko and Stewart 2004). O parâmetro n_{seg} e N_{min} são utilizados para ajustar especialmente o conjunto de danos elementares adjacentes. Um estudo realizado por Semenenko e Stewart (2004) demonstrou que o valor ideal de N_{min} , para radiações de alta LET, como é o caso dos electrões de Auger, era de 9 bp. Nesse mesmo estudo, verificaram ainda que o valor n_{seg} era determinate para agrupar danos elementares em lesões de ADN, (Semenenko and Stewart 2004).

4.2.4 Informação de Entrada e Saída

O simulador MCDS consiste num algoritmo Monte Carlo re-parametrizado de forma a fornecer informação (*output*) sobre o rendimento das DSB, SSB e locais de múltiplos danos de bases após simulação com electrões, protões e partículas alfa com energias cinéticas até valores na ordem dos Gigaelectrãovolt (GeV). Os ficheiros de *output* fornecem informação sobre as características de várias classes de danos do ADN, incluindo número médio de lesões por conjunto de danos do ADN e comprimento médio do conjunto de danos em pares de bases (bp).

O MCDS é executado a partir de uma janela de comandos *MS Windows* pelo duplo clique sobre o executável MCDS. Para a execução do simulador basta escrever na linha de comandos: MCDS {nome do ficheiro de input}.inp. Esta linha inicia de imediato o simulador e cria um ficheiro de *output*, que à semelhança do ficheiro de *input* é um ficheiro de texto em formato ASCII.

O ficheiro de *input* inclui os seguintes parâmetros, Figura 4.3:

- I. *SEED*: gerador aleatório de números, integral entre 1 (um) e 2147483646. Quando um valor negativo ou nulo é especificado neste parâmetro, a “semente” será determinada pelo sistema relógio.
- II. *NUMBER OF CELLS*: Todos os resultados produzidos pelo simulador serão reportados como valores médios e desvio padrão da média, pelo que, este parâmetro especifica o número de ensaios corridos pelo simulador para cálculo dos valores médios e desvio padrão.
- III. *PARTICLE*: Símbolo de partículas radioactivas carregas, exemplo, *e* para electrões; *1H* para protões e *4He* para partículas alfa.
- IV. *PARTICLE ENERGY*: Energia da partícula em MeV. O valor mínimo de energia cinética para a simulação é 0.00008 MeV para electrões, 0.105 MeV para protões e 2 MeV para partículas alfa.
- V. *FRACTION BL/BD*: Este parâmetro especifica a fracção de locais de perda de pares de bases no número total de bases danificadas. Na ausência de informação, o valor por defeito é 0 (zero).
- VI. *DMSO SIMULATION PARAMETERS*: O simulador MCDS tem como modelo extraordinário a simulação da presença de moléculas endógenas capturadoras de radicais livres (*scavenger*), pela especificação da quantidade de DMSO (um conhecido *scavenger*). Para simular um ambiente celular normal, este parâmetro deve tomar o valor zero. Quando a concentração de DMSO é estabelecida como sendo 0 (zero), os

outros dois valores deste parâmetro não apresentam impacto sobre os resultados da simulação.

```
1234567890      seed [1, 2147483646]; zero or negative number to randomize
1000            number of cells
MDCS PARAMETERS
e               particle (e for electrons, 1H for protons, etc.)
0.000116       particle energy (MeV)
0.0            fraction BI/Bd
DMSO SIMULATION PARAMETERS
0.5            fraction of non-scavengeable DNA damage
0.5            concentration at half-level (mol dm-3)
0.0            DMSO concentration (mol dm-3)
```

Figura 4.3 Exemplo das linhas de um ficheiro de *input* utilizado para a obtenção de resultados da presente Dissertação.

O ficheiro de *output* fornece informações sobre, Figura 4.4:

- I. Tempo de execução do simulador, em minutos;
- II. Resumo da informação de *input*:
 - a. Tipo de radiação, energia cinética da radiação em estudo *versus* energia cinética mínima da simulação, energia da massa da partícula em repouso em MeV e velocidade da partícula em estudo em relação à velocidade da luz no vácuo;
 - b. Parâmetros de formação de danos e conjunto de danos usados pelo simulador MDCS, que para o caso dos electrões estudados inclui: n_{seg} entre 38958 e 148005 (este parâmetro aumenta com o aumento da energia das partículas); $\sigma_{sb}=1300$; $\sigma_{bd}= 3900$; $f=3.0$; $N_{min}=9.0$ e máxima distância entre duas quebras para que sejam consideradas quebras duplas (DSB) de 10.0. Para a partícula alfa do Actínio-211 (²¹¹At) os valores são: $n_{seg}= 50070$; $\sigma_{sb}=1300$; $\sigma_{bd}= 3900$; $f=3.0$; $N_{min}=9.0$ e máxima distância entre duas quebras para que sejam consideradas DSB de 10.0. E para a partícula beta menos do ¹³¹I: $n_{seg}= 148617$; $\sigma_{sb}=1300$; $\sigma_{bd}= 3900$; $f=3.0$; $N_{min}=9.0$ e máxima distância entre duas quebras para que sejam consideradas DSB de 10.0.
 - c. Cópia dos dados de *input* para simulações com DMSO.
- III. Resultados da simulação:
 - a. Rendimento de danos agrupados de acordo com o esquema de classificação de Nikjoo e colaboradores (ver 4.2.5 sobre métodos de classificação das lesões de ADN), expresso em percentagem, (Nikjoo 1997; Nikjoo 2001);
 - b. Rendimento das diferentes classes de danos (DSB, quebras simples (SSB) e múltiplos locais de danos de bases) por Gy por célula;

- c. Composição do conjunto de lesões, isto é, percentagem de quebras das hélices do ADN ou danos a bases do ADN;
- d. Comprimento da lesão em bp para diferentes classes de danos;
- e. Número de lesões por comprimento de lesões.

```

=====
MCDs Version 2.01 19-JAN-2006
=====
0.041      running time (min)
1234567890 seed
1000      number of cells

RADIATION TYPE: electron
1.1600E-04 Kinetic energy (MeV) >= 7.9862E-05 MeV
5.1100E-01 Rest mass energy (MeV)
2.1304E-02 Speed (beta=v/c)
2.2033E+03 (Zeff/beta)^2 <= 3200

DAMAGE FORMATION AND CLUSTERING:
38958      segment length, nseg (bp per cell per Gy)
1300      number of strand breaks, sigsb (per cell per Gy)
3900      number of base damages, sigbd (per cell per Gy)
3.0       base damage to strand break ratio, f
9         minimum distance between clusters, Nmin (bp)
10        maximum distance between two Sb to compose a DSB, Ndsb (bp)
0.0       fraction B1/Bd

DMSO SIMULATION:
5.0000E-01 fraction of non-scavengable DNA damage
0.0000E-01 concentration at half-level (mol dm^-3)
0.0000E+00 DMSO concentration (mol dm^-3)

% DAMAGE YIELD (See Nikjoo et al. 1997 Int.J.Radiat.Biol. 71, 467-483; Nikjoo et al. 2001 Radiat.Res. 156, 577-583)
=====
45.655     BD - one or more Bd (no Sb)
32.956     SSB - Sb (no auxiliary damage)
7.871      SSB+ - two Sb on the same strand
3.458      2SSB - two or more Sb on opposite strands separated by at least 10 bp
4.548      DSB - two Sb on opposite strands with a separation <= 10 bp
2.954      DSB+ - DSB accompanied by one (or more) additional Sb within 10 bp separation
2.557      DSB++ - more than one DSB whether within the 10 bp separation or further apart
25.583     SSBc - fraction of complex damage (SSB+ and 2SSB) among SSBs
84.282     SSBcb - fraction of complex damage (SSB+ and 2SSB) among SSBs; base damage included
54.787     DSBc - fraction of complex damage (DSB+ and DSB++) among DSBs
93.540     DSBcb - fraction of complex damage (DSB+ and DSB++) among DSBs; base damage included
=====

```

Figura 4.4 Excerto de um ficheiro de *output* do simulador MCDs, com informação de *input* e classificação dos danos segundo (Nikjoo 1997; Nikjoo 2001).

4.2.5 Método de Classificação das Lesões ao ADN

Um estudo levado a cabo por Nikjoo e colaboradores, em 1997, definiu dois métodos alternativos de classificação das quebras do ADN, Figura 4.5. Esses esquemas de classificação consideravam: 1) os padrões de quebras de acordo com a complexidade do dano (simples, duplo e suas combinações) numa ou ambas as cadeias do ADN; e 2) classificação das quebras como resultado directo ou indirecto da radiação (devido a radicais livres OH). As classificações das diferentes quebras do ADN estão listadas na Tabela 4.1, (Nikjoo 1997; Nikjoo 2001).

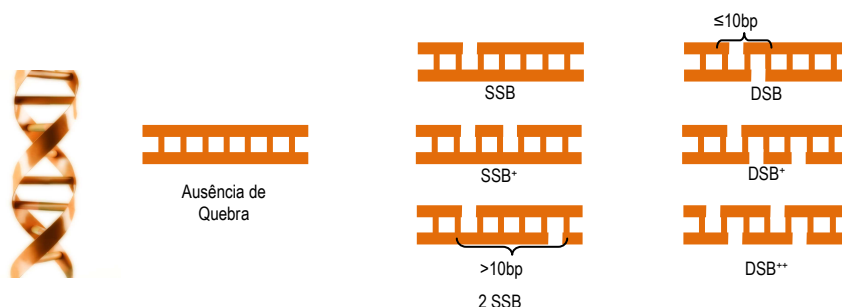


Figura 4.5 Esquema de classificação de danos do ADN segundo (Nikjoo 1997; Nikjoo 2001).

Tabela 4.1 Classificação das diferentes quebras do ADN, segundo (Nikjoo 1997; Nikjoo 2001).

Classificação	Descrição
Ausência de quebra	Nem a deposição energética por efeito directo, nem a deposição energética devido a radicais livres (efeito indirecto) conduz à formação de quebras do ADN
SSB	Quebra simples do ADN
SSB ⁺	Duas quebras simples na mesma cadeia de ADN
2SSB	Duas ou mais quebras simples em cadeias opostas separadas por > 10 bp, mas não classificadas como quebras duplas
DSB	Duas quebras simples opostas e separadas por ≤10 bp
DSB ⁺	Uma quebra dupla acompanhada por uma ou mais quebra simples separadas por menos de 10 bp
DSB ⁺⁺	Mais de uma quebra dupla no segmento de ADN separadas por 10 bp ou mais

4.2.6 Vantagens/Desvantagens

O simulador MCDS apresenta como principais características a rapidez e simplicidade na simulação de danos simples e múltiplos ao ADN, incluindo várias classes de SSB e DSB. Segundo os autores deste simulador, o seu sucesso reside no facto de lesões do ADN em pequena escala poderem ser simuladas sem considerar explicitamente a estrutura do ADN, o enrolamento complexo da cromatina ou a distribuição espacial da deposição energética ao longo do percurso da radiação, (Semenenko and Stewart 2004). Esta observação é consistente com a hipótese de que os processos físicos e químicos responsáveis pela criação de lesões elementares ao ADN são iniciadas devido, sobretudo, à deposição energética num alcance de poucos nanómetros do ADN (como é o caso dos electrões de Auger). Contudo, dado que diferentes tipos de radiação (electrões de Auger, partículas alfa e beta menos) produzem distribuições energéticas espaciais ligeiramente diferentes, parâmetros específicos da radiação, como σ_{Sb} , f , n_{seg} e N_{min} , foram considerados durante a construção do simulador. Contudo, este simulador não fornece informação sobre a localização da lesão no interior do ADN da célula.

A validação deste simulador para células de mamíferos foi realizada, tendo demonstrado que este simulador é válido para doses até algumas dezenas de grays, com valor mínimo de aproximadamente 1 cGy, (Semenenko and Stewart 2004). Por outro lado, um estudo realizado por Carlson e colaboradores, em 2008, verificou que o rendimento de DSB obtido pelo simulador MCDS é substancialmente superior às estimativas experimentais reportadas na literatura, (Carlson 2008). Por exemplo, Newman e colaboradores, em 2000, reportaram aproximadamente

12 DSB/Gy/Gbp para partículas alfa de 2.5 MeV em células V79, bem como Rydberg e sua equipa, em 2002, reportaram 10.4-11.8 DSB/Gy/Gbp no ADN de células GM38 (fibroblastos humanos), quando irradiadas com partículas alfa de 3-7 MeV, (Carlson 2008). Em contraste com estes resultados, o simulador MCDS obteve rendimentos de 20-24 DSB/Gy/Gbp para partículas alfa no mesmo intervalo de energias. Apesar de não serem inesperadas, estas diferenças podem ser atribuídas ao facto do MCDS produzir simulações de caminhos estruturais das partículas, o que constitui uma aproximação aos rendimentos de DSB experimentais. Por outro lado, uma explicação alternativa para os reduzidos rendimentos dos estudos experimentais reside no facto destes apresentarem limitações metodológicas, nomeadamente devido ao uso generalizado de gel de electroforese (PFGE – *pulsed-field gel electrophoresis*). O uso desta técnica laboratorial pode conduzir à perda de pequenos fragmentos de ADN durante a experiência, o que resultará num menor rendimento de DSB, (Carlson 2008).

4.3 Simulação de Reparação por Excisão Monte Carlo

4.3.1 Enquadramento

Tipos similares de lesões ao ADN são produzidos por processos endógenos e vários agentes físicos e químicos; contudo, o rendimento relativo e o arranjo espacial dos nucleótidos danificados pode ser bastante diferente. Grupos de vários nucleótidos danificados numa ou em ambas as hélices do ADN, frequentemente denominados danos múltiplos (*clustered damage*) são característicos da radiação ionizante. Por outro lado, os processos endógenos produzem lesões isoladas, excepto em células com processos de reparação de ADN deficientes, nas quais danos múltiplos do ADN podem ser observados. Os danos múltiplos são potencialmente mais difíceis de reparar, pois as enzimas da reparação podem nem sempre possuir o molde intacto para reparação dos nucleótidos danificados.

Muitos dos danos oxidativos do ADN, desde bases modificadas AP (apurínica/apirimídica) a locais de quebras ADN, requerem reparação por excisão de bases (*Base Excision Repair* – BER). Dois modos de reparação BER têm sido observados em células procarióticas e eucarióticas: a excisão e substituição de um único nucleótido, denominado BER de curta substituição (*Short-Patch BER* – SP-BER), que ocorre na maioria dos casos; e a remoção de fragmentos de 2 a 13 nucleótidos, denominando BER de longa substituição (*Long Patch BER* – LP-BER). Outra via alternativa de reparação é por excisão de nucleótidos

(*Nucleotide Excision Repair* – NER), a qual se caracteriza por reparação enzimática distinta do ADN. Em células eucarióticas, fragmentos de oligonucleótidos, com comprimentos entre 24 e 32 nucleótidos, são substituídos durante o processo de NER. Este processo é a via primária de remoção de espécies reactivas do oxigénio capazes de induzir ciclopurinas em células de mamíferos. Quer o processo de reparação BER, quer o processo NER são vias de reparação altamente conservativas nas células eucarióticas. (Semenenko 2005).

4.3.2 Modelo Reparação por Excisão Monte Carlo

O modelo de reparação por excisão Monte Carlo, MCER, simula os passos essenciais no processo de reparação por excisão de todas as classes de lesões simples e múltiplas que não DSB. O diagrama da Figura 4.6 representa de forma esquemática o modo de funcionamento do modelo MCER.

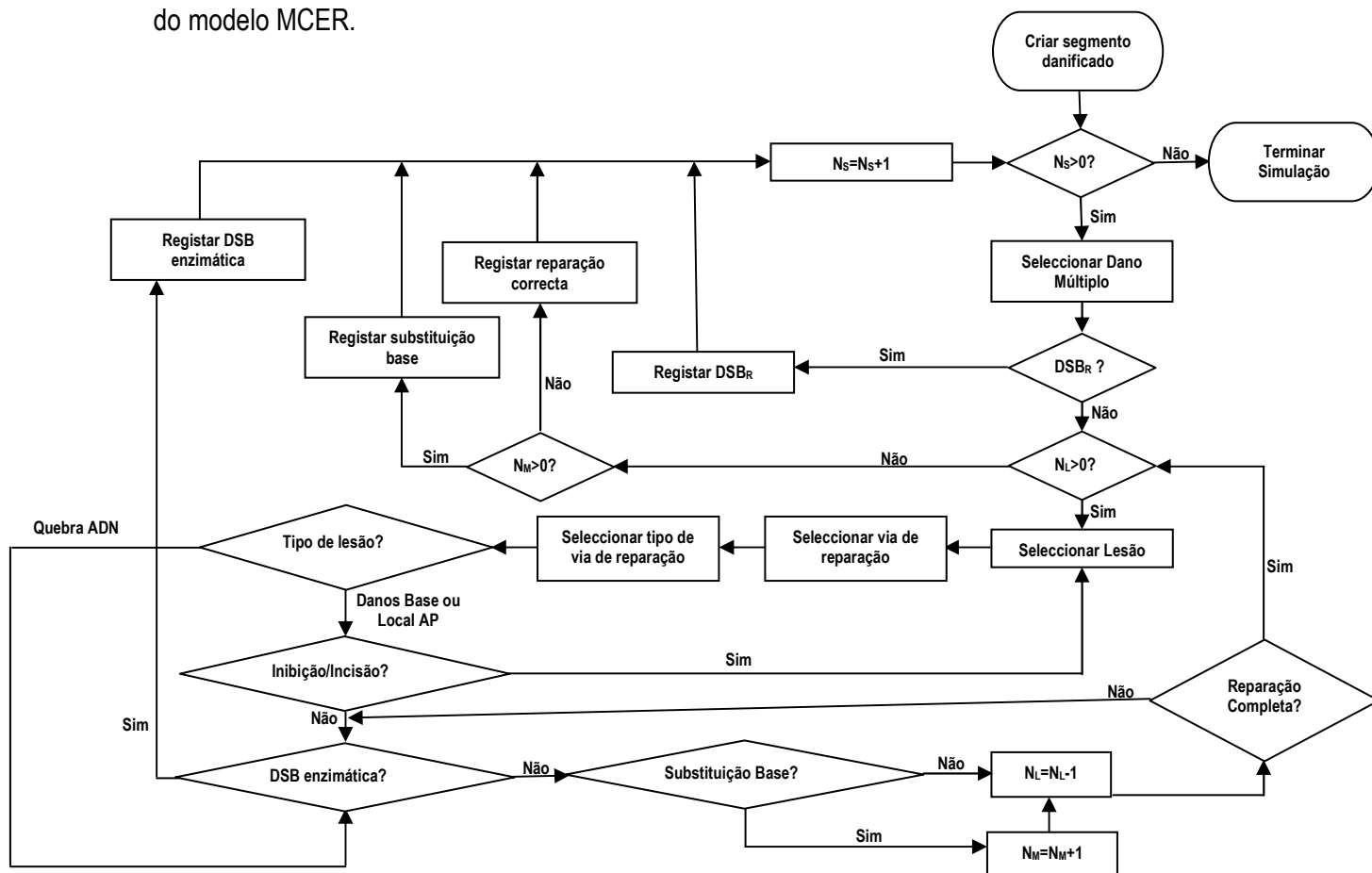


Figura 4.6 Representação esquemática do modo de funcionamento do modelo MCER (adaptado de (Semenenko 2005)). (N_S =número de danos simples ou múltiplos no segmento de ADN; N_L =número de lesões; N_M = número de mutações (substituições de bases) durante o processo de reparação; DSB_R = DSB radioinduzidas.)

Os doze passos essenciais do modelo MCER incluem, (Semenenko 2005):

- I. Criação de um segmento danificado: realizado pelo simulador MCDS.
- II. Selecção do dano múltiplo: por forma a seleccionar o dano múltiplo para reparação, o simulador MCER percorre todo o segmento de ADN até encontrar um dano simples ou múltiplo usando a metodologia descrita para o simulador MCDS.
- III. DSB radioinduzidas: estas DSB, ao contrário das DSB enzimáticas, que são formadas durante os processos de reparação do ADN, são iduzidas directamente pela radiação. A contagem destas DSB radioinduzidas segue o mesmo processo que o algoritmo MCDS, contudo, quando um dano múltiplo detectado não é classificado como DSB, o processo de reparação por excisão é iniciado.
- IV. Selecção da lesão de entre as lesões múltiplas: o processo de reparação por excisão inicia-se pela selecção da lesão alvo para remoção. O processo de selecção processa-se em dois passos, 1) uma das duas cadeias de ADN é seleccionada e 2) uma lesão é seleccionada dentro da cadeia em estudo. A selecção da cadeia de ADN é governada pela probabilidade P_1 , sendo que, quando $P_1=0.5$ ambas as cadeias têm igual probabilidade de serem seleccionadas e quando este valor se aproxima de 0 (zero) ou 1 (um), todas as lesões na cadeia seleccionada são preferencialmente removidas antes das lesões na cadeia oposta serem reparadas. Esta escolha preferencial relaciona-se com o facto de estudos prévios terem demonstrado este fenómeno em processos de reparação por BER ou NER. A selecção da lesão dentro da cadeia, quando lesões múltiplas estão em estudo é feita de forma aleatória.
- V. Selecção do processo de reparação: uma vez seleccionado o nucleótido para remoção, a via responsável pela remoção da lesão é determinada. A contribuição relativa de cada via de reparação para o processo global de remoção de danos múltiplos é determinada por três probabilidades: P_{SP} , P_{LS} e P_{NER} , cuja soma é 1 (um).
- VI. Selecção do tipo de substituição: a substituição SP-BER é caracterizada pela substituição de um único nucleótido danificado. Para o tipo LP-BER e NER, o quais envolvem a remoção de mais que um nucleótido, a simulação da excisão do dano e a nova síntese de ADN é repetida para cada nucleótido ao longo do comprimento da substituição. Os nucleótidos são excisados e novamente sintetizados de forma sequencial de direcção de 5' para 3' do ADN (sendo que a localização de cada porção terminal do segmento de ADN utilizado no simulador determinada de forma aleatória e, consequentemente, fixa no código do MCER).

- VII. Tipo de lesão: quando a lesão a remover é uma quebra do ADN, a inibição da incisão do ADN (passo VIII) não pode ocorrer, bem como a criação de DSB enzimáticas (passo IX), assim, nestes casos, avança-se para o passo X, ou seja a nova síntese de ADN. Por outro lado, se a lesão detectada para remoção é uma base danificada ou um local AP, então segue-se para o passo VIII, IX e X.
- VIII. Inibição da incisão de ADN: estudos realizados nos últimos anos têm vindo a demonstrar que a reparação BER de duas lesões espacialmente próximas na mesma ou oposta cadeia de ADN, seguida por incisão de um codão de ADN, pode ser inibida pela presença de um dano adicional na cadeia oposta. O efeito inibitório é ainda mais pronunciado quando a lesão oposta é uma quebra da cadeia ou um local AP. Este fenómeno é simulado pelo MCER pela especificação da distância de inibição (N_{inh} , em bp). Segundo Blaisdell e colaboradores (2001) o processo de reparação BER de uma base de ADN (8-oxoG) é inibido quando uma quebra da cadeia se encontra presente na cadeia oposta de ADN perímetro de 3 bp, (Semenenko 2005). Com base nestes resultados, o MCER apresenta um valor de $N_{inh}=3$.
- IX. DSB enzimáticas: em alguns tipos de configurações de danos, uma quebra de ADN não reparada pode apresentar uma base danificada oposta ou um local AP que tenha sido marcado para remoção. Se, durante o processo de remoção destes dois tipos de lesões (base danificada e local AP), um excerto de ADN é inserido no espaço danificado perto de uma quebra de ADN existente na cadeia oposta, uma DSB enzimática ocorrerá. Em suma, a reparação de quebras de ADN pode conduzir a dois resultados independentes: reparação correcta (sem substituição de bases) e reparação com substituição de pelo menos uma base (mutação). Por outro lado, o processo de excisão de reparação de uma base danificada e locais de AP pode resultar em três possíveis desfechos: reparação correcta, reparação com mutação e formação de uma DSB enzimática.
- X. Substituição de bases: actualmente, o modelo MCER não considera a formação de mutações por inserção ou deleção; contudo, está prevista a adição futura desta característica ao modelo. O modelo MCER possibilita, no entanto, a avaliação da inserção não-complementar de um nucleótido oposto a uma cadeia não danificada pela polimerase ADN, devido à capacidade intrínseca para a tendência a erro. As taxas de erro das polimerases são muito reduzidas e podem variar em várias ordens de magnitude (10^{-4} - 10^{-7} por cada deoxinucleótido incorporado), dependendo das características da polimerase. A identidade da polimerase ADN que realiza o preenchimento de falhas do ADN, por síntese, em processos de reparação por excisão

em mamíferos é bem conhecida. A polimerase β é a principal responsável pela reparação via SP-BER, enquanto a polimerase δ e/ou ϵ sintetizam sequências de ADN durante o processo de reparação LP-BER e NER. Taxas de erro na ordem de 10^{-4} para a polimerase β têm sido reportados e, sabe-se que a fidelidade da polimerase δ e ϵ durante a síntese replicativa é consideravelmente superior. Os valores utilizados pelo MCER são: 10^{-4} para a polimerase β e 10^{-6} para as polimerases δ e ϵ . O processo de inserção aleatório é simulado por dois parâmetros, φ_{Bd} e φ_{Bl} , que descrevem a probabilidade de erro na inserção de nucleótido. Esta probabilidade é de 0.75, pois existem 4 pares de bases e, portanto, a probabilidade de falhar a inserção correcta é ($3/4 = 0.75$). Os subscritos *Bd* e *Bl* denominam danos de bases e locais de perda das bases (locais AP), respectivamente.

- XI. Reparação completa: quando a reparação de todos os nucleótidos num dado segmento em reparação está finalizada, a simulação regressa ao passo IV e selecciona o próximo nucleótido danificado a assinalar para reparação. Esta reparação sequencial de lesões leva a criação de um conceito de ciclos de reparação, sendo que, um ciclo de reparação se inicia aquando da selecção da lesão a reparar (passo IV) e termina ou com a formação de DSB enzimáticas (passo IX) ou com a substituição de todos os nucleótidos pertencentes a um segmento em reparação (passo XI).
- XII. Terminar a simulação: o simulador finaliza quando todos os danos no segmento completo de ADN em estudo tiverem sido processados. Os danos que não foram classificados como DSB radioinduzidas são classificados em: danos correctamente reparados, danos reparados com mutações e danos convertidos em DSB. O rendimento de cada classe de dano é tabulada em número de lesões por danos múltiplos (*cluster*). O número de ciclos de reparação requerido para remover cada classe de danos também é tabulado no ficheiro de *output*.

4.3.3 Informação de Entrada/Saída

O simulador MCER simula a formação e reparação de danos do ADN (excepto DSB) em células de mamíferos após exposição à radiação ionizante. Este simulador incorpora o MCDS, o qual é responsável para formação de danos do ADN. As simulações MCER fornecem informação sobre: rendimento de DSB radioinduzidas, SSB e locais de danos de base; propabilidade de

reparação por excisão correcta, mutada ou evolução para DSB enzimática; e número de ciclos de reparação necessários para remover o dano múltiplo do ADN.

O MCER, à semelhança do MCDS, é executado a partir de uma janela de comandos *MS Windows* pelo duplo clique sobre o executável MCER. Para a execução do simulador basta escrever na linha de comandos: MCER {nome do ficheiro de input}.inp. Esta linha inicia de imediato o simulador e cria um ficheiro de *output*, que à semelhança do ficheiro de *input*, é um ficheiro de texto em formato ASCII.

A Figura 4.7 apresenta um exemplo de um ficheiro de *input* utilizado para a obtenção dos resultados considerados na presente Dissertação.

```

1234567890      seed [1, 2147483646]; zero or negative number to randomize
1000            number of cells
MCDS PARAMETERS
e               particle (e for electrons, 1H for protons, etc.)
0.000116       particle energy (MeV)
0.0            fraction B1/Bd
DMSO SIMULATION PARAMETERS
0.5            fraction of non-scavengeable DNA damage
0.5            concentration at half-level (mol dm-3)
0.0            DMSO concentration (mol dm-3)
MCER PARAMETERS
3              inhibition distance, Ninh (bp)
0.5            probability of choosing a lesion from the first strand, P1
1.0E-4         polymerase error rate for SP BER, etaSP
1.0E-6         polymerase error rate for LP BER and NER, etaLP and etaNER
0.75          probability of incorrect insertion opposite Bd, phiBd
0.75          probability of incorrect insertion opposite B1, phiB1
    
```

Figura 4.7 Exemplo de um ficheiro de *input* do MCER. De notar que a primeira parte do ficheiro possui comandos comuns com o simulador MCDS (utilizado para simulação dos danos), seguido pelo simulador MCER (reparação dos danos).

O ficheiro de *output* do MCER, Figura 4.8, fornece os seguintes resultados:

- I. Tempo de execução do simulador, em minutos.
- II. Resumo das condições de *input*.
- III. Resultados do MCDS.
- IV. Resultados do MCER:
 - a. Probabilidades dos três possíveis resultados dos métodos de reparação por excisão: reparação correcta, reparação com mutação e formação de DSB enzimática.
 - b. Número de ciclos de reparação para remover danos.
 - c. Resultados detalhados dos quatro cenários de reparação por excisão: SP-BER, LP-BER, SP-NER e LP-NER.

Number of Lesions	p(COR)		p(MUT)		p(DSB)		# REPAIR CYCLES	
	Average	SEM	Average	SEM	Average	SEM	Average	SEM
1	9.99911E-01	2.98599E-05	8.94743E-05	2.98599E-05	0.00000E+00	0.00000E+00	1.00000E+00	0.00000E+00
2	8.20386E-01	1.16347E-03	3.42608E-02	5.21600E-04	1.45333E-01	1.03476E-03	2.04874E+00	2.43584E-03
3	6.68337E-01	1.43183E-03	5.20820E-02	6.71440E-04	2.79581E-01	1.35340E-03	2.78882E+00	4.17952E-03
4	5.64585E-01	1.69326E-03	6.31924E-02	8.19500E-04	3.72222E-01	1.63546E-03	3.36342E+00	6.29667E-03
5	4.87880E-01	1.91593E-03	7.17919E-02	1.01591E-03	4.40328E-01	1.97794E-03	3.85814E+00	8.96552E-03
6	4.24778E-01	2.32372E-03	7.96440E-02	1.23016E-03	4.95578E-01	2.39621E-03	4.28251E+00	1.30312E-02
7	3.84607E-01	2.67705E-03	8.28855E-02	1.50949E-03	5.32508E-01	2.78495E-03	4.69812E+00	1.73706E-02
8	3.37747E-01	2.92884E-03	8.94326E-02	1.76761E-03	5.72820E-01	3.10734E-03	5.05864E+00	2.17949E-02
9	3.03576E-01	3.58481E-03	8.81526E-02	2.17303E-03	6.08271E-01	3.66500E-03	5.36306E+00	2.94552E-02
10	2.65543E-01	3.95938E-03	9.08693E-02	2.69655E-03	6.43588E-01	4.43249E-03	5.58498E+00	3.97431E-02
11	2.40777E-01	4.85755E-03	9.36837E-02	3.38065E-03	6.65539E-01	5.33387E-03	5.89371E+00	5.43103E-02
12	2.12159E-01	5.83461E-03	1.04605E-01	4.36638E-03	6.83236E-01	6.68942E-03	6.14398E+00	7.11228E-02
13	2.07442E-01	7.12503E-03	9.10818E-02	5.14294E-03	7.01476E-01	8.22953E-03	6.47923E+00	9.73762E-02
14	1.62981E-01	7.42805E-03	8.82457E-02	6.05429E-03	7.48774E-01	9.08153E-03	6.35794E+00	1.18477E-01
15	1.43239E-01	8.71085E-03	9.20280E-02	7.40900E-03	7.64733E-01	1.05475E-02	6.48431E+00	1.48117E-01
16	1.35217E-01	1.02730E-02	9.85107E-02	9.09529E-03	7.66272E-01	1.26785E-02	6.81371E+00	1.84907E-01
17	1.09516E-01	1.08250E-02	7.44285E-02	9.01934E-03	8.16055E-01	1.35276E-02	6.40651E+00	2.20456E-01
18	1.28284E-01	1.39555E-02	8.90099E-02	1.16245E-02	7.82706E-01	1.69770E-02	7.43809E+00	2.71893E-01
19	8.30979E-02	1.40279E-02	6.42655E-02	1.22277E-02	8.52637E-01	1.78056E-02	6.55202E+00	3.40170E-01
20	1.05166E-01	1.82060E-02	7.13407E-02	1.51219E-02	8.23493E-01	2.24623E-02	7.40098E+00	4.39916E-01
21	6.37755E-02	1.69285E-02	8.16327E-02	1.92710E-02	8.54592E-01	2.45876E-02	7.46173E+00	5.22354E-01
22	5.45455E-02	2.07707E-02	3.63636E-02	1.79299E-02	9.09091E-01	2.67676E-02	6.30909E+00	6.08838E-01
23	5.55556E-02	2.42805E-02	6.11111E-02	2.47683E-02	8.83333E-01	3.35666E-02	6.25000E+00	7.88148E-01
24	1.49254E-02	1.49254E-02	8.20896E-02	3.29415E-02	9.02985E-01	3.56480E-02	5.57463E+00	8.75973E-01
25	0.00000E+00	0.00000E+00	7.29167E-02	3.64346E-02	9.27083E-01	3.64346E-02	5.37500E+00	8.96519E-01
26	1.56250E-02	1.56250E-02	1.56250E-01	6.52133E-02	8.28125E-01	6.58741E-02	9.76562E+00	1.74119E+00
27	0.00000E+00	0.00000E+00	4.16667E-02	4.16667E-02	9.58333E-01	4.16667E-02	5.20833E+00	1.13728E+00
28	0.00000E+00	0.00000E+00	0.00000E+00	0.00000E+00	1.00000E+00	0.00000E+00	4.52381E+00	6.60516E-01
29	0.00000E+00	0.00000E+00	9.09091E-02	9.09091E-02	9.09091E-01	9.09091E-02	1.00909E+01	2.62663E+00
30	1.66667E-01	1.66667E-01	0.00000E+00	0.00000E+00	8.33333E-01	1.66667E-01	8.50000E+00	4.41022E+00
31	1.66667E-01	1.66667E-01	0.00000E+00	0.00000E+00	8.33333E-01	1.66667E-01	8.50000E+00	4.67440E+00
32	0.00000E+00	0.00000E+00	0.00000E+00	0.00000E+00	1.00000E+00	0.00000E+00	4.00000E+00	0.00000E+00
33	0.00000E+00	0.00000E+00	3.33333E-01	3.33333E-01	6.66667E-01	3.33333E-01	1.23333E+01	1.03494E+01
34	0.00000E+00	0.00000E+00	0.00000E+00	0.00000E+00	1.00000E+00	0.00000E+00	2.50000E+00	1.50000E+00
35	0.00000E+00	0.00000E+00	0.00000E+00	0.00000E+00	1.00000E+00	0.00000E+00	1.50000E+00	5.00000E-01
36	---	---	---	---	---	---	---	---
37	---	---	---	---	---	---	---	---
38	---	---	---	---	---	---	---	---
39	---	---	---	---	---	---	---	---
40	0.00000E+00	0.00000E+00	0.00000E+00	0.00000E+00	1.00000E+00	0.00000E+00	1.00000E+00	0.00000E+00
41	---	---	---	---	---	---	---	---
42	0.00000E+00	0.00000E+00	0.00000E+00	0.00000E+00	1.00000E+00	0.00000E+00	1.00000E+00	0.00000E+00
43	---	---	---	---	---	---	---	---
44	---	---	---	---	---	---	---	---
45	---	---	---	---	---	---	---	---
46	---	---	---	---	---	---	---	---
47	---	---	---	---	---	---	---	---
48	---	---	---	---	---	---	---	---
49	---	---	---	---	---	---	---	---
50	---	---	---	---	---	---	---	---
Average	6.29662E-01	5.73624E-04	5.29945E-02	2.69398E-04	3.17343E-01	5.60716E-04	3.14768E+00	3.06334E-03

Figura 4.8 Exemplo de uma tabela de um ficheiro de *output* do MCER.

4.3.4 Vantagens e Desvantagens

Actualmente, não existe informação disponível na literatura sobre contribuição relativa de cada processo de reparação para o processo global de reparação por excisão; isto é, não existem valores precisos ou distribuições dos parâmetros P_{SP} , P_{LP} e P_{NER} . Segundo Dianov e colaboradores (2000), em células humanas, a maioria dos danos é removido por SP-BER, sendo que as vias LP-BER e NER têm um papel relativamente minoritário na reparação dos danos. Os mesmos resultados foram obtidos por Fortini e colaboradores em 1999, (Semenenko 2005). Apesar destes estudos, trabalho experimental futuro é necessário para identificar as vias e os eventos que determinam que diferentes tipos de danos são removidos por BER ou NER. Dadas estas incertezas, os resultados obtidos pelo simulador MCER são obtidos pela simulação de cenários hipotéticos, baseados nos conhecimentos obtidos até à data.

Apesar de alguns pressupostos iniciais deste simulador não estarem ainda totalmente provados experimentalmente, este simulador é pioneiro na estimativa de reparação de danos de ADN de uma forma mais simples e rápida que o algoritmo complexo de Monte Carlo. Os resultados deste simulador são importantes, pois sabe-se que em células de mamíferos com danos irreparáveis de ADN, o próximo passo é a apoptose, de forma a evitar, presumivelmente,

as consequências de reparações altamente mutagénicas. Vários estudos tem demonstrado que a apoptose é, geralmente, iniciada pela replicação do ADN danificado, (Semenenko 2005). Assim, os resultados do MCER podem constituir uma nova perspectiva para estimação da probabilidade de apoptose radioinduzidas, com base nos dados de reparação do ADN.

De forma a comparar os resultados do simulador MCER com resultados laboratorialmente obtidos, Semenenko e Stewart, em 2005, conduziram uma experiência cujo objectivo era comparar os resultados do simulador com resultados em culturas de *Escherichia Coli* e duas linhas celulares de hamsters chineses (V79 e rxs5) mantidas em laboratório. Estes investigadores verificaram concordância entre os resultados experimentais nas culturas laboratoriais e os resultados do simulador. Este estudo forneceu confiança de que os mecanismos postulados para reparação do ADN por excisão implementados no simulador podem ser úteis na previsão dos resultados dos processos de reparação do ADN, (Semenenko and Stewart 2005).

4.4 Simulador de Radiobiologia Celular

4.4.1 Enquadramento

Quando a radiação ionizante atinge uma célula, DSB do ADN e outras lesões celulares são produzidas em menos de um milissegundo. De seguida, os danos radioinduzidos são processados lentamente, via reparações enzimáticas e reacções de reparação errónea (*misrepair*), cujo desfecho determina, frequentemente, o destino da célula irradiada. Por outro lado, a cinética do ciclo celular pode ser grandemente influenciada pelo processamento da cinética do dano.

Uma vez criada, a DSB é submetida a um processo de restituição, no qual as duas porções terminais livres da DSB são reunidas de forma a restaurar a continuidade geral do cromossoma, podendo este processo não seguir necessariamente a sequência de ADN exacta da base par. Uma pequena parte das reconstituições são letais, outras são submetidas a processos de reunião errónea, Figura 4.9, (Sachs 1997).

O dano ao ADN é o evento iniciador da apoptose, contudo, também os danos a membranas celulares podem induzir apoptose. Para além disso, danos múltiplos ao ADN, que não DSB podem também contribuir para a morte celular, (Carlson 2008). Assim, a avaliação dos

danos ao ADN radioinduzidos (em particular das DSB) fornecem informação sobre o destino final da célula irradiada, pelo que, modelos de avaliação cinética da radiobiologia celular são de crucial importância.

As duas principais vias para reparação das DSB são: recombinação homóloga e recombinação não-homóloga. Esta última é o principal mecanismo de reparação das DSB em células de mamíferos, especialmente nas fases G_0 e G_1 do ciclo celular. Apesar de poder ser geralmente realizada sem erros ou por processos de reparação pouco propensos ao erro, a reparação não-homóloga de uma única DSB resultará provavelmente na formação de inserções e deleções em pequena escala e não numa reparação correcta, (Carlson 2008).

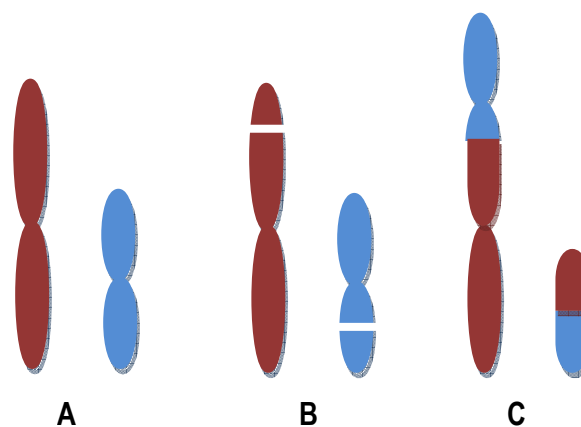


Figura 4.9. Esquema do processo de formação de cromossomas dicêntricos: A) Cromossomas normais; B) Quebra dupla em dois cromossomas; C) Recombinação errônea que conduz à formação de um cromossoma dicêntrico e um cromossoma acêntrico.

4.4.2 Modelo TLK

A relação dose-resposta, produção de danos e mecanismos de processamento têm sido amplamente estudados, sobretudo pelo recurso a modelos radiobiológicos que correlacionam reacção-taxa de dose. Estes modelos avaliam por célula o número médio de DSB e outras lesões ao longo do tempo usando equações de cinética química para produção, reparação correcta e reparação errônea das lesões. Exemplos de modelos incluem: o RMR (*Repair-Misrepair*), o LPL (*Lethal-Potentially Lethal*) e o TLK (*Two-Lesion Kinetic*). Os modelos RMR e LPL enfatizam as reparações errôneas, tais como, a produção de cromossomas dicêntricos letais devido à interacção de duas DSB, (Sachs 1997).

No modelo LPL (Curtis, 1986), as quatro características importantes que determina a sobrevivência das células expostas à radiação são: rendimento inicial de DSB/Gy/célula, rendimento inicial de lesões irreparáveis/Gy/célula (e portanto fatais), taxa de reagrupamento de primeira ordem e taxa de danos por emparelhamento (taxa de agrupamento de segunda ordem). Por outro lado, no modelo RMR (Tobias, 1985) cinco parâmetros chave são utilizados para determinação do potencial mutagénico e letal da radiação ionizante: rendimento inicial de DSB/Gy/célula, probabilidade da DSB ser incorrectamente reparada, probabilidade da reparação errónea da DSB ser letal, taxa de reagrupamento DSB de primeira ordem e taxa de danos por emparelhamento (taxa de agrupamento de segunda ordem), (Stewart 2004).

O modelo adoptado para a realização de simulações com diferentes tipos de células no âmbito da presente Dissertação foi o modelo TLK. Este modelo é conceptualmente similar ao modelo RMR; contudo, neste a radiação cria efectivamente dois tipos de DSB, simples e complexas, enquanto, o modelo RMR apenas considera um tipo de DSB. Por outro lado, o modelo RMR é monofásico, enquanto o modelo TLK avalia os efeitos da radiação em células, nomeadamente, a cinética de reagrupamento de uma forma monofásica ou bifásica.

Apesar do modelo TLK fornecer um enquadramento mais flexível da modelação da formação e reparação das DSB, comparativamente com o modelo LPL e RMR, o aumento da flexibilidade implica a introdução de parâmetros adicionais de modelação. Assim, o modelo TLK apresenta oito parâmetros chave: rendimento de DSB simples e complexas/Gy/célula; probabilidade da DSB ser incorrectamente reparada; probabilidade de reparação errónea letal da DSB; taxa de reagrupamento de DSB de primeira ordem; e taxa de danos por emparelhamento (taxa de agrupamento de segunda ordem), (Stewart 2004).

4.4.3 Informação de Entrada/Saída

O simulador de radiobiologia celular (*Virtual Cell Radiobiology*), VC, é uma solução útil capaz de simular dois dos desfechos biológicos fundamentais em células irradiadas: a morte celular e a transformação neoplásica. Este simulador fornece informação sobre formação e reparação do ADN, mas também sobre rendimentos de aberrações cromossómicas, indução de instabilidade genética, cinética do ciclo celular (antes e após irradiação) e probabilidade de erradicação tumoral após radioterapia celular. Esta solução constitui um esforço inicial e em contínua melhoria, para estudar os processos envolvidos na patogénese e tratamento do cancro, sendo por isso de vital importância para a presente Dissertação.

Também o simulador VC, à semelhança do MCDS e MCER, é executado a partir de uma janela de comandos *MS Windows* pelo duplo clique sobre o executável do VC. Para a execução do simulador basta escrever na linha de comandos: VC {nome do ficheiro de input}.inp-d-s (código para *debug* do simulador). Esta linha inicia de imediato o simulador e cria um ficheiro de *output*, que à semelhança do ficheiro de *input*, é um ficheiro de texto em formato ASCII.

O ficheiro de *input* do VC é construído por vários subgrupos: cenário de exposição (exposição a uma única dose, exposição a múltiplas doses fraccionadas, exposição a radionuclídeos devido ao decaimento exponencial e radioterapia multi-fraccionada), modelos para simulação de formação e reparação de ADN (LPL, RMR e TLK) e modelos para simulação da cinética celular e tecidular. Adicionalmente podem ser simulados cenários de instabilidade genómica ou transformação neoplásica, bem como cenário com ruído aleatório.

Na Figura 4.10 está representado um exemplo de ficheiro de *input* utilizado para a obtenção de resultados considerados na presente Dissertação; com base em cada um dos subgrupos de informação, explica-se o significado de cada linha e sua utilidade.

```

V*
TLK Model
DATE: 4th May 2009
COMMENTS: Teste Tc-99m CKMMX auger cripta intestinal

*/
MODEL:DRM=TLK CKM=QECK
CELL: DNA=5.667D+09 NC=46
ENDO: DSB=4.3349E-03
IRAD: DSB=73.376864964 FCB=0.54861
CLRP: RHT=XXX ETA=2.75E-04 PHI=0.005 AO=AAA GAM=0.25

CCKM: TCC=1 TPOT=1.625 GF=0.5 N0=1000 KAP=1.0D+38 VOL=1

XXX= 0.25 9
AAA= 0.95 0.25

SOLVER: DBLV=0 ETOL=1.0E-09 MX55=999999 HMAX=10
SIMCON: FSDX=1 TSAX=5 TCUT=0 FRDL=0.5 ACUT=1.0D-09

DECAY: BGDR=2.73784E-07 DCUT=0.01 LAM=0.1155 RHL=6 STOL=0.01 TCUT=24 SAD=RX1
RX1=1 1.5 2 /
    
```

Informação sobre modelo seleccionado, data de execução do simulador e comentários

Especificações do modelo

Cinética celular

Parâmetros de controlo do simulador (critérios de paragem, etc...)

Cenário exposição – Decaimento Radioactivo de Radionuclídeos

Figura 4.10 Exemplo de um ficheiro de *input* utilizado com as principais subdivisões: especificações do modelo (incluindo cinética celular), parâmetros de controlo do simulador e cenários de exposição à radiação.

Os parâmetros principais do ficheiro de *input* do simulador VC serão descritos de seguida:

I. Linha código: *MODEL*

- a. DRM=TKL $\Rightarrow$ selecção do modelo de reparação dos danos a utilizar, na presente Dissertação, como referido, é o modelo TLK;
- b. CKM=QECK $\Rightarrow$ especifica o modelo cinético de crescimento celular. Na versão actual do simulador a opção disponível é QECK (*quasi-exponential cell kinetics model*). A cinética de crescimento exponencial é determinada pelos parâmetros *KAP* e *VOL* do subgrupo *CCKM*. Neste modelo um vasto número de densidade celular (1.0^{38} células) é utilizado para evitar erros de excesso de fluxo e também porque o corpo humano possui cerca de 1.0^{14} células.

II. Linha código: *CELL*

- a. DNA=5.667D+09 $\Rightarrow$ conteúdo de ADN celular, em número de pares de bases (bp), na fase G_0 ou G_1 do ciclo celular.
- b. NC=46 $\Rightarrow$ número de cromossomas por célula. Em células eucarióticas de mamíferos o valor é de 23 pares de cromossomas, ou seja, 46 cromossomas.

III. Linha de código: *ENDO*

- a. DSB=4.3349E-03 $\Rightarrow$ número esperado de DSB complexas endógenas por hora/célula.

IV. Linha de código: *IRAD*

- a. DSB={73.376864964; 71.823678552; 40.89349355; 71.64236618} $\Rightarrow$ número de DSB esperado por Gy/célula.
- b. FCB={0.54861; 0.43161; 0.13489; 0.42535} $\Rightarrow$ fracção de DSB por unidade de dose de radiação ionizante que são complexas.

V. Linha de código: *CLRP*

- a. RHT=XXX $\Rightarrow$ tempo de semi-vida para reparação das DSB, em horas. Caso se pretenda especificar que as quebras simples são mais rapidamente reparadas que as quebras duplas, a seguinte linha de código tem que ser escrita: RHT=XXX/ XXX=0.25 9/
- b. ETA=2.5E-04 $\Rightarrow$ taxa de interacção da reparação errónea (sempre com produção de mutação), expressa em h^{-1} .
- c. PHI=0.005 $\Rightarrow$ probabilidade de uma reparação errónea de uma DSB ser letal (0.5% das reparações erróneas de uma DSB são letais).
- d. A0=AAA $\Rightarrow$ probabilidade de reparação correcta de uma DSB. Caso se pretenda especificar que as quebras simples são mais eficazmente reparadas que as

quebras duplas, então a seguinte linha de código deve ser escrita: A0=AAA/
AAA=0.95 0.25/, (Stewart 2004).

- e. GAM=0.25 $\Rightarrow$ fracção de danos erróneos que são letais. Segundo Sachs e colaboradores, 1997, 25% das aberrações comossómicas formadas pela reparação errónea são letais, (Sachs 1997).

VI. Linha de código: CCKM

- a. TCC $\Rightarrow$ tempo médio para uma célula completar mitose, expresso em horas.
- b. TPOT $\Rightarrow$ tempo de duplicação celular, expresso em dias. Tempo médio para uma população celular duplicar em número.
- c. GF $\Rightarrow$ fracção da população celular que se encontra activamente em divisão (em mitose). Se GF=0, todas as células não se estão a dividir (quiescentes), se GF=1 todas as células estão em divisão activa. Para valor de GF>0, o tempo de duplicação da população é determinado pelos parâmetros TCC e TPOT.
- d. N0 $\Rightarrow$ número inicial de células aquando do início da simulação ($t=0$).
- e. KAP $\Rightarrow$ pico da densidade celular (células/cm³). Quando KAP=1.0D+38, a densidade celular é grandíssima.
- f. VOL $\Rightarrow$ volume efectivo de uma cultura de células (cm³) ou de um excerto do tecido de interesse.

VII. Linha de código: SOLVER

- a. DBLV $\Rightarrow$ nível de *debug* do simulador. Existem três níveis: 0 – informação mínima, 1 – informação intermédia e 2 – informação máxima. Conforme se aumenta o nível de *debug* maior é o tempo de CPU requerido para realizar a simulação.
- b. ETOL $\Rightarrow$ método ISML®-DIVPAG para quantificação/determinação do erro de tolerância. Erros de tolerância na ordem dos 10⁻⁷ a 10⁻¹² apresentam bons rendimentos. O tempo de CPU para realização da simulação aumenta com a diminuição do valor de ETOL.
- c. MXSS $\Rightarrow$ número máximo de subpassos do simulador. Valores elevados são recomendados; caso contrário, o simulador pode ser interrompido por um erro fatal (método ISML®-DIVPAG).
- d. HMAX $\Rightarrow$ máxima duração do subpasso, sendo recomendado valores entre 1 e 24 h (método ISML®-DIVPAG).

VIII. Linha de código: SIMCON

- a. FSDX $\Rightarrow$ fraccionamento do tempo de simulação para obtenção resultados durante ou depois (se FSDX=0.001 resultados durante ou se FSDX=1, resultados no fim da simulação).
- b. TSAX $\Rightarrow$ duração de cada subpasso após simulação, expresso em horas. Recomenda-se o uso de valores reduzidos, de forma a obter mais informação sobre a cinética de reparação do dano e a controlar melhor o fim da simulação. Para além disso, valores muito grandes requerem mais tempo de processamento para as simulações.
- c. TCUT $\Rightarrow$ tempo após a exposição para reparação dos danos, expresso em horas. Por exemplo, se TCUT=1h, a simulação será terminada uma hora após a exposição independentemente do tempo de exposição (1 segundo ou 1 ano).
- d. FRDL $\Rightarrow$ fracção de danos residuais no fim da simulação que são tratados como danos letais.
- e. ACUT $\Rightarrow$ dano residual absoluto por célula no final da simulação, expresso em número de danos do ADN por célula. A simulação é terminada quando a quantidade de danos residuais (irreparáveis) é menor que o valor de ACUT.

IX. Linha de código: *DECAY*

- a. BGDR $\Rightarrow$ taxa de dose absorvida devido à radiação de fundo (*background*), expressa em Gy/h. Sabe-se que a radiação natural média no planeta Terra é de aproximadamente 2.4 mGy/ano, o que significa que BGDR será de 2.73784E-07, (UNSCEAR 2007).
- b. DCUT $\Rightarrow$ dose de *cutoff*, em Gy. Parâmetro que limita a simulação para reparação dos danos a uma determinada dose mínima.
- c. LAM $\Rightarrow$ constante de decaimento radioactivo (específica para cada radioisótopo), expressa em h^{-1} .
- d. RHL $\Rightarrow$ semi-vida física do radionúclideo em estudo, expressa em horas.
- e. STOL $\Rightarrow$ tolerância na duração do subpasso do simulador (Gy/h). Alterações na taxa de dose instantânea são modeladas pelo uso de intervalos de tempo sequenciais. O STOL traduz a taxa de dose dentro de cada intervalo de tempo que é constante e, à medida que o seu valor diminui, o tempo de cada passo diminui e a natureza exponencial da verdadeira taxa de dose é modelada mais eficazmente.

- f. TCUT $\Rightarrow$ tempo de *cutoff*, em horas. Tempo utilizado para truncar a função de taxa de dose num dado momento do tempo, após a irradiação do sistema celular de interesse.
- g. SAD $\Rightarrow$ dose absorvida no intervalo de tempo [0, TCUT], expressa em Gy.

O ficheiro de *output* do simulador VC apresenta os seguintes resultados, Figura 4.11:

- I. Tabela com comparação entre modelo linear quadrático e modelo TLK.
- II. Tabela com informações sobre danos radioinduzidos e resultantes de processos endógenos.
- III. Tabela com resumo das propriedades de reparação, incluindo tipos de processos de reparação (SP-BER, LP-BER e NER), probabilidade de mutação letal, reparação errónea e DSB enzimáticas.
- IV. Propriedades do processo de reparação das DSB, incluindo reparação correcta, reparação incorrecta, recombinação homóloga e não-homóloga e cinética de recombinação de primeira e segunda ordem.
- V. Resumo dos parâmetros de input da cinética celular.
- VI. Tabela com os resultados da sobrevivência celular em função da dose e da taxa de dose.
- VII. Tabela com os resultados de sobrevivência celular corrigidos para os efeitos de repopulação.
- VIII. Tabela com informação mutagénica e indução de instabilidade genética aumentada.
- IX. Tabela com informação e transformação neoplásica e probabilidade de controlo tumoral.

DFAR TABLE: Cell survival as a function of dose and dose rate (FRDL=50.0%).

SID	--- Duration (h) --- Exposure	Sim	Dose (Gy)	Dose Rate (Gy/h)	---- LETHAL DAMAGE PER CELL ---- Mutations	Residual	Total	SF(dose)
1	6.000E+00	2.860E+02	1.000E+00	1.667E-01	5.051E-01	3.571E-05	5.0513E-01	6.034255E-01
2	6.000E+00	2.910E+02	1.500E+00	2.500E-01	1.010E+00	3.571E-05	1.0098E+00	3.643029E-01
3	6.000E+00	2.960E+02	2.000E+00	3.333E-01	1.665E+00	3.571E-05	1.6647E+00	1.892551E-01

NOTE: SF=EXP[-(lethal residual damage + lethal mutations)].

QECK TABLE: Cell survival, corrected for repopulation effects, as a function of dose and dose rate. Cell kinetic parameters are: N(0)=F0*KAP*VOL=1.00000E+03, TCC=1.0000 h, Tpot=1.625 days.

SID	TSIM (day)	DOSE (Gy)	DOSE RATE (Gy/h)	- SURVIVING FRACTION - no repop	- repop	----- EXPECTED NUMBER OF CELLS ----- N(t)/N(0)	N(0)*S(D)	N(t)*S(D)	NSC(t)
1	1.192E+01	1.000E+00	1.667E-01	6.0343E-01	6.0343E-01	1.0000E+00	6.0343E+02	6.0343E+02	6.0345E+02
2	1.212E+01	1.500E+00	2.500E-01	3.6430E-01	3.6430E-01	1.0000E+00	3.6430E+02	3.6430E+02	3.6432E+02
3	1.233E+01	2.000E+00	3.333E-01	1.8926E-01	1.8926E-01	1.0000E+00	1.8926E+02	1.8926E+02	1.8926E+02

NOTE: N(0) is the initial number of cells (time=0 day), N(t) is the expected number of unirradiated (control) cells at TSIM, i.e., $N(t)=N(0)*EXP[LN(2)*TSIM/TPOT]$. The surviving fraction S(D) is the expected number of cells, per irradiated cell, that has not sustained lethal DNA damage (no corrections for repopulation effects). NSC(t) is the expected number of cells that survive irradiation, including repopulation effects (recommended method). The product N(t)*S(D) is an alternate method of estimating the surviving fraction with repopulation effects.

Figura 4.11 Exemplo de duas tabelas de um ficheiro de *output* do simulador VC: tabela com a sobrevivência celular (tabela superior) e tabela com resultados de sobrevivência celular corrigidos para os efeitos de repopulação (tabela inferior).

4.4.4 Vantagens e Desvantagens

Os modelos cinéticos da produção de danos radioinduzidos e o seu processamento podem facilitar a uniformidade e quantificação das observações radiobiológicas. Estes possibilitam a realização de estimações quantitativas da relação dose-resposta, constituindo desde os anos 40 o método de quantificação central para a radiobiologia, apresentando aplicações no âmbito da radioterapia, estimativa do risco de carcinogénese e dosimetria biológica, (Sachs 1997).

Exemplos de modelos cinéticos incluem: modelo LPL, modelo RMR e modelo TLK. O modelo LPL possui como principais desvantagens alguma limitação na correlação processamento dos fenómenos bioquímicos das DSB e a morte celular; isto é, este modelo não relaciona directamente a formação e reparação das DSB com a morte celular sem utilizar algumas hipóteses ainda não claramente explicadas sobre a natureza inicial dos danos responsáveis pela mesma; por exemplo, apenas um grupo reduzido de DSB iniciais é potencialmente letal. A mesma desvantagem pode igualmente ser estendida para o modelo RMR e para o modelo linear quadrático, pois ambos apresentam ligações teóricas com o método LPL. De forma a ultrapassar esta limitação dos métodos prévios, o modelo TLK propõe uma melhor correlação entre processos bioquímicos das DSB e a morte celular pela subdivisão das DSB em simples e complexas, as quais possuem diferentes características de reparação, (Guerrero 2002). Assim, à luz do conhecimento actual de entre os modelos cinéticos de radiobiologia celular existentes, o modelo TLK parece aproximar-se mais dos cenários de exposição reais, pelo que foi o modelo seleccionado para a obtenção de resultados para a presente Dissertação.

4.5 Interligação dos Diferentes Simuladores

Os simuladores expostos no presente capítulo apresentam pontos de ligação comuns, sendo que informações de *output* obtidas por um simulador são elas próprias informações de *input* para o simulador seguinte. A Figura 4.12 evidencia esquematicamente essas relações.

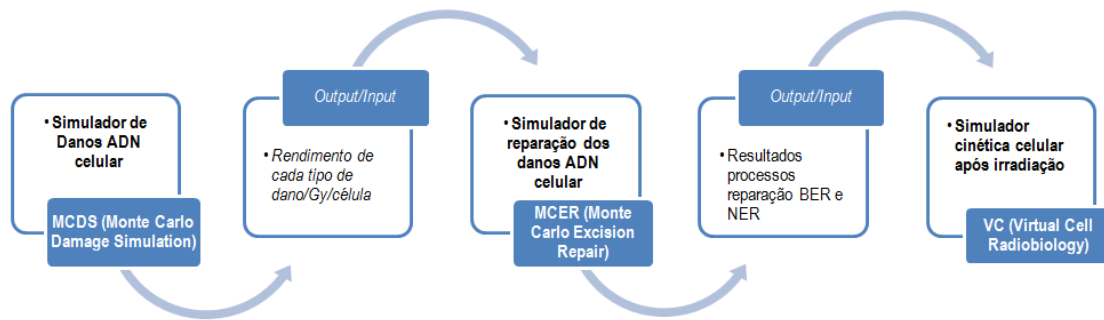


Figura 4.12 Esquema da interligação entre os diferentes simuladores computacionais considerados (MCDS, MCER e VC).

4.6 Parâmetros Experimentais Testados

Para a realização da presente Dissertação utilizaram-se os simuladores anteriormente descritos, de forma a analisar os potenciais efeitos terapêuticos dos electrões de Auger do ^{99m}Tc . Para tal avaliou-se todo o espectro de electrões de Auger do ^{99m}Tc (descrito no Capítulo III), bem como as partículas alfa do ^{211}At e as partículas beta menos do ^{131}I . Selecionou-se o ^{211}At e o ^{131}I , pois ambos são agentes terapêuticos actualmente em utilização em investigação e na parte clínica, respectivamente. Estes radioisótopos serão utilizados para comparação com os electrões de Auger aquando da análise dos resultados. Uma vez finalizada a comparação com o ^{131}I e com o ^{211}At , procede-se à selecção dos dois electrões com maior potencial terapêutico para prosseguir com a análise dos efeitos terapêuticos dos electrões de Auger em células. As células estudadas incluem fibroblastos humanos e células da cripta intestinal. A escolha destes dois tipos de célula prende-se com o facto da primeira apresentar uma radiosensibilidade baixa, enquanto a segunda apresenta uma radiosensibilidade média/alta.

As Tabelas 4.2, 4.3 e 4.4, indicam resumidamente as condições simuladas para cada tipo de electrão e célula para os simuladores MCDS e MCER, e VC, respectivamente.

Dos resultados obtidos a partir do simulador MCDS determinou-se o número de DSB, bem como a fracção de DSB que são complexas, a fim de se incorporar nos ficheiros de *input* do simulador VC.

A irradiação dos dois tipos de células seleccionadas (fibroblastos humanos e células da cripta intestinal humana), utilizando o simulador VC, foi realizada durante períodos de 2, 6 e 24

horas (ver tabela 4.4, TCUT) e com doses de radiação absorvidas nesse intervalo de tempo a variar entre 1, 1.5 e 2 Gy.

Tabela 4.2 Condições iniciais dos simuladores MCDS e MCER.

Partícula Irradiante	Energia [MeV]	Condições Comuns
CK MMX	0.000116	MCDS e MCER: Número de células inicial = 1000 Concentração de DMSO = 0 (ambiente celular normal) MCER: Distância de inibição = 3 bp Probabilidade de seleccionar lesão na primeira cadeia de ADN (P1) = 0.5 Taxa de erro de polimerase SP-BER=1.0⁻⁴ Taxa de erro polimerase LP-BER e NER=1.0⁻⁶ Probabilidade de inserção incorrecta da base danificada oposta = 0.75 Probabilidade de inserção incorrecta da base perdida oposta = 0.75
Auger MXY	0.000226	
Auger LMM	0.00205	
Auger LMX	0.00232	
Auger LXY	0.00266	
Auger KLL	0.0153	
Auger KLX	0.0178	
IC 1 M, N...	0.00182	
IC 2 K	0.119	
IC 3 K	0.122	
IC 2 L	0.137	
IC 3 L	0.14	
IC 2 M, N...	0.14	
Beta - I131	0.606	
Alfa - At211	6.79	

Não foi possível simular os electrões de Auger CK NNX, cuja energia é 33 eV, dado que o limite inferior de energias a simular nestes simuladores é de 0.00008 MeV (80 eV).

Tabela 4.3 Condições comuns no simulador VC.

Condições Comuns			
DRM=TLK & CKM=QECK	PHI=0.005	ETOL=1.0E-09	FRDL=0.5
DNA=5.667D+09	GAM=0.25	MXSS=999999	ACUT=1.0D-09
DSB (endógenas)=4.3349E-03	N0=1000	HMAX=10	BGDR=2.73748E-07
RHT=XXX; XXX=0.25 0.29	KAP=1.0D+38	FSDX=1	DCUT=0.01
A0=AAA; AAA=0.95 0.25	VOL=1	TSAX=5	STOL=0.01
ETA=2.5E-04	DBLV=0	TCUT=0	SAD=RX1; RX1=1 1.5 2

O número inicial de células utilizado no simulador VC foi, à semelhança dos simuladores MCDS e MCER, de 1000 células, as quais se disponham numa densidade celular muito elevada ($1.0D+38$) e num volume reduzido (1 cm^3).

As condições mencionadas na Tabela 4.3 foram mantidas constantes para os diferentes tipos de agentes irradiantes, com o objectivo de comparar os diferentes radionuclídeos nos mesmos cenários celulares. As condições diferentes simuladas no VC estão apresentadas na Tabela 4.4 e referem-se a variáveis características das células e dos radioisótopos estudados.

Tabela 4.4 Condições manipuladas do simulador VC.

Partícula Irradiante	Energia [MeV]	Tipo de Célula	TCC ^{a,b} (h)	TPOT ^{a,b} (dias)	GF	LAM (h ⁻¹)	RHL (h)	TCUT (h)
CK MMX	0.000116	Fibroblasto	0.9	0.667	0/0.5/1	0.1155	6	2/6/24
		Cripta Intestinal	1	1.625	0/0.5/1	0.1155	6	2/6/24
Auger MXY	0.000226	Fibroblasto	0.9	0.667	0/0.5/1	0.1155	6	2/6/24
		Cripta Intestinal	1	1.625	0/0.5/1	0.1155	6	2/6/24
Auger LMM	0.00205	Fibroblasto	0.9	0.667	0/0.5/1	0.1155	6	2/6/24
		Cripta Intestinal	1	1.625	0/0.5/1	0.1155	6	2/6/24
Auger LMX	0.00232	Fibroblasto	0.9	0.667	0/0.5/1	0.1155	6	2/6/24
		Cripta Intestinal	1	1.625	0/0.5/1	0.1155	6	2/6/24
Auger LXY	0.00266	Fibroblasto	0.9	0.667	0/0.5/1	0.1155	6	2/6/24
		Cripta Intestinal	1	1.625	0/0.5/1	0.1155	6	2/6/24
Auger KLL	0.0153	Fibroblasto	0.9	0.667	0/0.5/1	0.1155	6	2/6/24
		Cripta Intestinal	1	1.625	0/0.5/1	0.1155	6	2/6/24
Auger KLX	0.0178	Fibroblasto	0.9	0.667	0/0.5/1	0.1155	6	2/6/24
		Cripta Intestinal	1	1.625	0/0.5/1	0.1155	6	2/6/24
IC 1 M, N...	0.00182	Fibroblasto	0.9	0.667	0/0.5/1	0.1155	6	2/6/24
		Cripta Intestinal	1	1.625	0/0.5/1	0.1155	6	2/6/24
IC 2 K	0.119	Fibroblasto	0.9	0.667	0/0.5/1	0.1155	6	2/6/24
		Cripta Intestinal	1	1.625	0/0.5/1	0.1155	6	2/6/24
IC 3 K	0.122	Fibroblasto	0.9	0.667	0/0.5/1	0.1155	6	2/6/24
		Cripta Intestinal	1	1.625	0/0.5/1	0.1155	6	2/6/24
IC 2 L	0.137	Fibroblasto	0.9	0.667	0/0.5/1	0.1155	6	2/6/24
		Cripta Intestinal	1	1.625	0/0.5/1	0.1155	6	2/6/24
IC 3 L	0.14	Fibroblasto	0.9	0.667	0/0.5/1	0.1155	6	2/6/24
		Cripta Intestinal	1	1.625	0/0.5/1	0.1155	6	2/6/24
IC 2 M, N...	0.14	Fibroblasto	0.9	0.667	0/0.5/1	0.1155	6	2/6/24
		Cripta Intestinal	1	1.625	0/0.5/1	0.1155	6	2/6/24
Beta - I131	0.606	Fibroblasto	0.9	0.667	0/0.5/1	0.0036	192.5	2/6/24
		Cripta Intestinal	1	1.625	0/0.5/1	0.0036	192.5	2/6/24
Alfa - At211	6.79	Fibroblasto	0.9	0.667	0/0.5/1	0.0963	7.2	2/6/24
		Cripta Intestinal	1	1.625	0/0.5/1	0.0963	7.2	2/6/24

^a retirado de (Baserga 1971); ^b retirado de (Baserga 1993)

A análise estatística dos resultados foi realizada com o teste T para comparações entre dois grupos e com o teste ANOVA para comparações entre três ou mais grupos, sendo que um valor $p < 0.01$ representa diferenças muito significativas e um valor $p < 0.05$ diferenças significativas. O *software* utilizado para a análise estatística e criação dos gráficos com a síntese dos resultados apresentado foi o GraphPad Prism 4®.

4.7 Sumário

O presente capítulo expõe em detalhe o funcionamento dos diferentes simuladores utilizados para a realização da presente Dissertação. Neste capítulo as características principais e as vantagens e desvantagens dos diferentes simuladores foram apresentadas. Os três simuladores encontram-se correlacionados entre si e, frequentemente, os ficheiros de *output* gerados por um simulador são informação de *input* para o simulador seguinte, com crescente aumento da complexidade dos simuladores, mas também dos resultados obtidos, que evoluem desde rendimentos de danos ao ADN/Gy/célula até cálculos da probabilidade de controlo tumoral após irradiação.

A informação contida neste capítulo expõe a metodologia empregue para o desenvolvimento da presente Dissertação. Os simuladores computacionais apresentados são métodos relativamente simples e rápidos de obtenção de informação da cinética celular após irradiação, e podem ser empregues na clarificação do potencial terapêutico de múltiplos agentes irradiantes, nomeadamente, do ^{99m}Tc . O capítulo seguinte apresenta os resultados obtidos pela aplicação dos três simuladores expostos neste capítulo bem como a sua discussão.

Capítulo V. Resultados Experimentais Simulados e Discussão

5.1 Introdução

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos pela abordagem global utilizada nesta Dissertação para obtenção de informação computacionalmente simulada, com vista a clarificar o potencial papel do ^{99m}Tc enquanto agente irradiante no contexto de radioterapia metabólica.

Este capítulo encontra-se dividido em três secções principais. Na primeira estão expostos os resultados obtidos pelo simulador de danos Monte Carlo e que dizem respeito ao rendimento de danos ao ADN obtido pela irradiação de diferentes electrões de Auger do ^{99m}Tc e ainda, para melhor compreensão e comparação dos resultados destes electrões, das partículas beta menos do ^{131}I e das partículas alfa do ^{211}At . De seguida expõe-se, na segunda secção, os resultados obtidos pelo simulador de reparação por excisão Monte Carlo, que avalia, uma vez criado o dano, qual a probabilidade deste ser correctamente reparado, apresentar mutação ou evoluir para quebra dupla do ADN. Mais uma vez, os resultados obtidos incluem irradiações e processos de reparação dos electrões de Auger do ^{99m}Tc , das partículas beta menos do ^{131}I e das partículas alfa do ^{211}At . Finalmente, na terceira e última secção avaliam-se os resultados da irradiação na cinética celular de dois tipos de culturas de células: fibroblastos humanos e as células da cripta intestinal humana.

Na última secção são apresentados os resultados principais do simulador de VC que incluem: número médio de mutações letais por célula para diferentes tipos de irradiação, número de células sobreviventes em divisão celular ou quiescentes, resultados da avaliação da indução de instabilidade genética e mutagenese, frequência de transformação neoplásica em células irradiadas e finalmente, probabilidade de controlo tumoral após irradiação.

5.2 Resultados do Simulador de Danos Monte Carlo

Com o objectivo principal de avaliar os danos ao ADN causados pela irradiação com os electrões de Auger do ^{99m}Tc , procedeu-se à utilização do simulador MCDS, pois este possibilita a quantificação dos diferentes danos ao ADN, segundo a metodologia previamente explicada no capítulo anterior. Os resultados deste simulador pretendem auxiliar a resposta à questão inicial desta Dissertação; ou seja, clarificar o potencial dos electrões de Auger do ^{99m}Tc para radioterapia metabólica. Para tal, uma comparação entre os electrões de Auger do ^{99m}Tc e as

partículas beta menos do ^{131}I e partículas alfa do ^{211}At é realizada, pois tal facilitará a avaliação do potencial terapêutico dos electrões de Auger do $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Assim, o rendimento dos diferentes danos ao ADN obtido pela aplicação deste simulador é apresentado nas Figuras 5.1 a 5.6. Estas expõem os resultados do rendimento de quebras simples (SSB) e quebras duplas (DSB) do ADN, segundo (Nikjoo 1997).

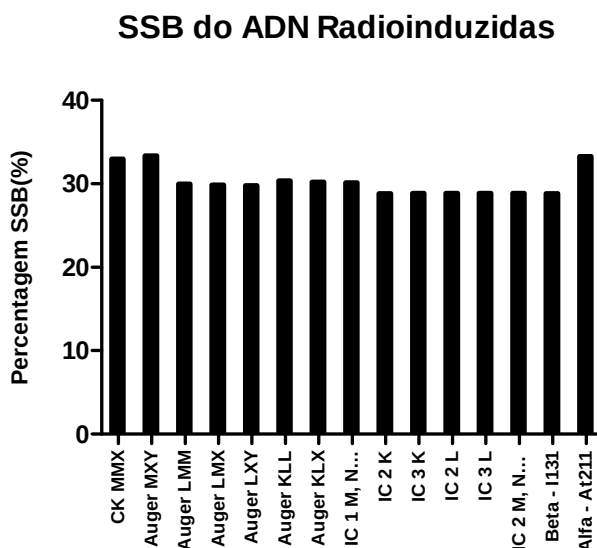


Figura 5.1 Percentagem de quebras simples (SSB) radioinduzidas no ADN para diferentes tipos de agentes irradiantes (electrões de Auger do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ – CKMMX a IC 2 M, N... - partículas beta do ^{131}I e partículas alfa do ^{211}At).

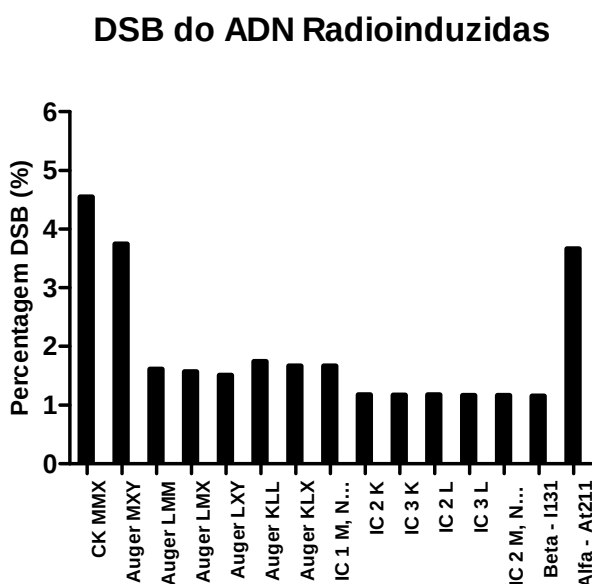


Figura 5.2 Percentagem de quebras duplas (DSB) radioinduzidas no ADN para diferentes tipos de agentes irradiantes (electrões de Auger do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ – CKMMX a IC 2 M, N... - partículas beta do ^{131}I e partículas alfa do ^{211}At).

Tipos de SSB do ADN Radioinduzidas

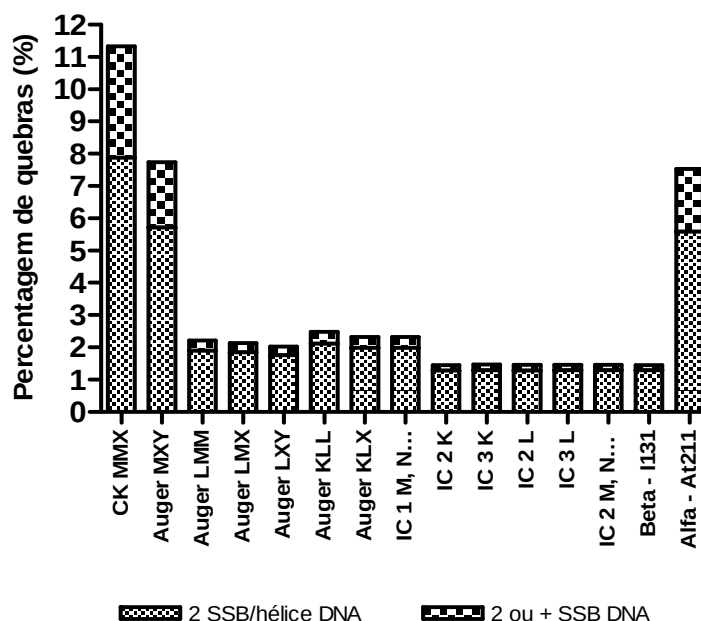


Figura 5.3 Percentagem de duas quebras simples na mesma hélice (2SSB/hélice DNA) e duas ou mais quebras simples em hélices opostas e separadas por pelo menos 10 pares de bases (2 ou + SSB DNA) para diferentes agentes irradiantes.

Tipos de DSB do ADN Radioinduzidas

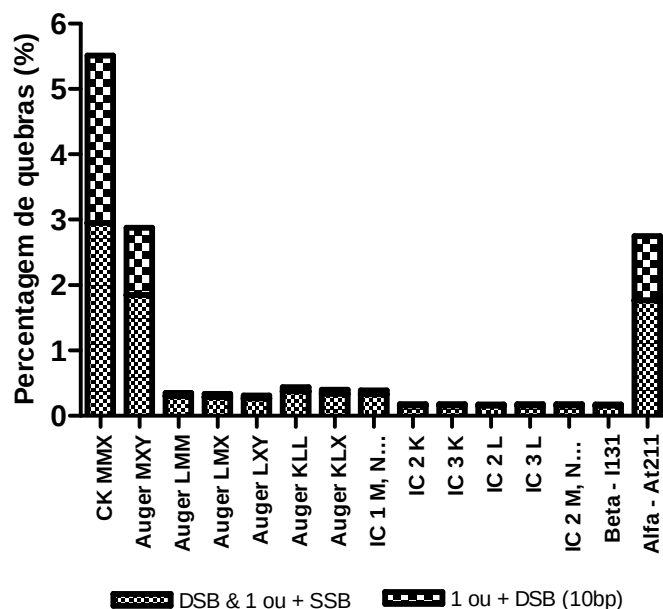


Figura 5.4 Percentagem de uma quebra dupla juntamente com 1 (uma) ou mais quebras simples separadas no máximo por 10 pares de bases (DSB & 1 ou + SSB) e uma ou mais quebras duplas separadas no máximo por 10 pares de bases (1 ou + DSB – 10bp) para diferentes agentes irradiantes.

Fracção de Quebras Simples Complexas

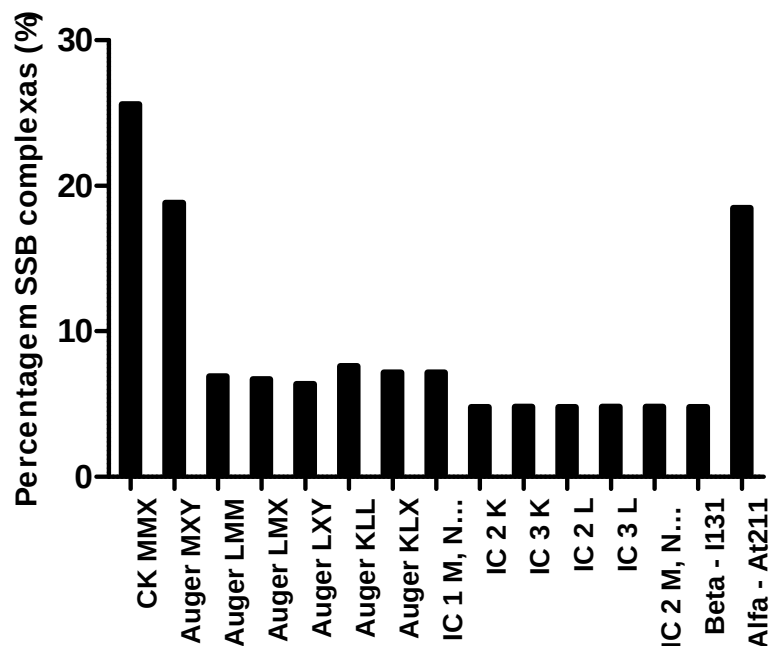


Figura 5.5 Fracção de danos complexos de entre as quebras simples do ADN para diferentes tipos de agentes irradiantes.

Fracção de Quebras Duplas Complexas

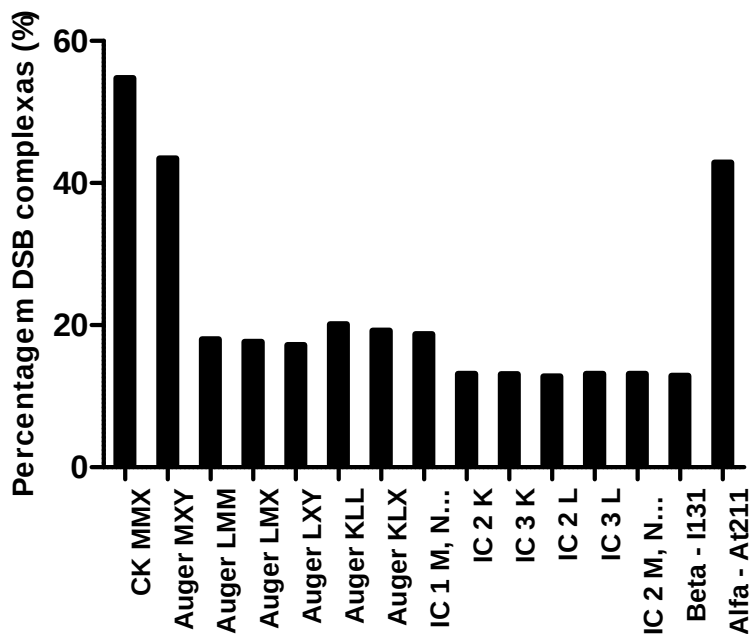


Figura 5.6 Fracção de danos complexos de entre as quebras duplas do ADN para diferentes tipos de agentes irradiantes.

5.3 Resultados do Simulador MCER

A avaliação dos mecanismos de reparação do ADN após irradiação com os diferentes agentes irradiantes possibilita a avaliação da probabilidade de indução de apoptose, dado que, conforme explicado no decurso da presente Dissertação, a formação de quebras duplas radioinduzidas ou enzimáticas (ocorridas durante o processo de reparação) é um forte indicador de indução de apoptose. Por outro lado, também a avaliação da probabilidade de reparação correcta e ainda o número de ciclos de reparação constituem medidas indirectas da capacidade de indução de dano irreparável da radiação e, portanto, da qualidade da radiação.

Com o objectivo de clarificar o potencial terapêutico dos electrões de Auger do ^{99m}Tc , bem como, o seu efeito em células e a sua importância radiobiológica, utilizou-se o simulador MCER segundo a metodologia previamente explicada no capítulo anterior. Os resultados compilados do simulador MCER estão expostos nas Figuras 5.7 a 5.11. Estes incluem os resultados dos quatro principais mecanismos de reparação de quebras simples do ADN, explicados no capítulo anterior: SP-BER, LP-BER, SP-NER e LP-NER.

Reparação SP-BER de Quebras Simples

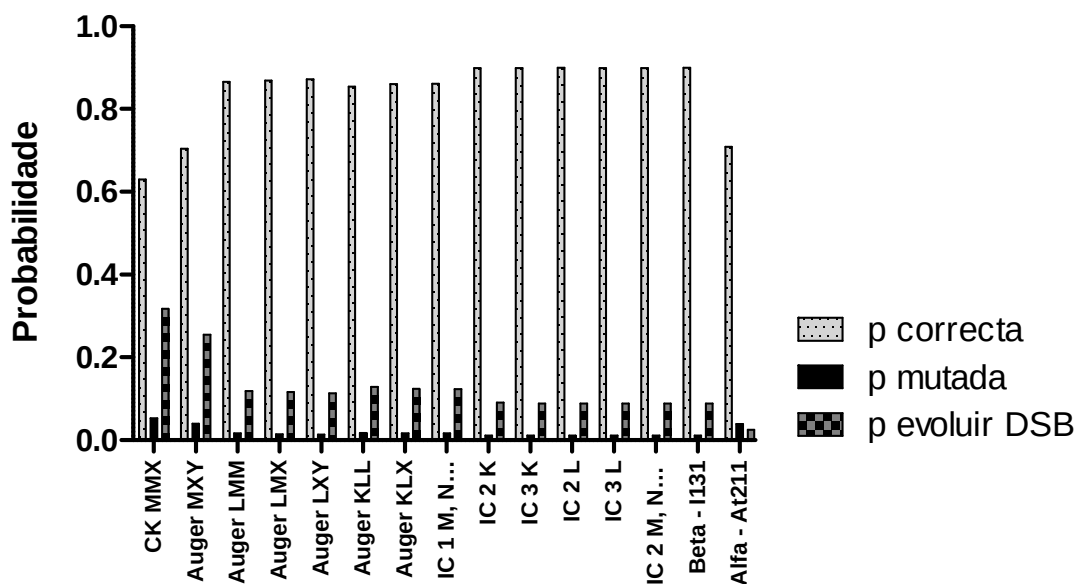


Figura 5.7 Probabilidade de reparação correcta (p correcta), reparação com mutação (p mutada) e evolução para quebra dupla (p evoluir DSB) de quebras simples do ADN, pelo método de reparação por excisão de bases *short patch* (SP-BER).

Reparação LP - BER de Quebras Simples

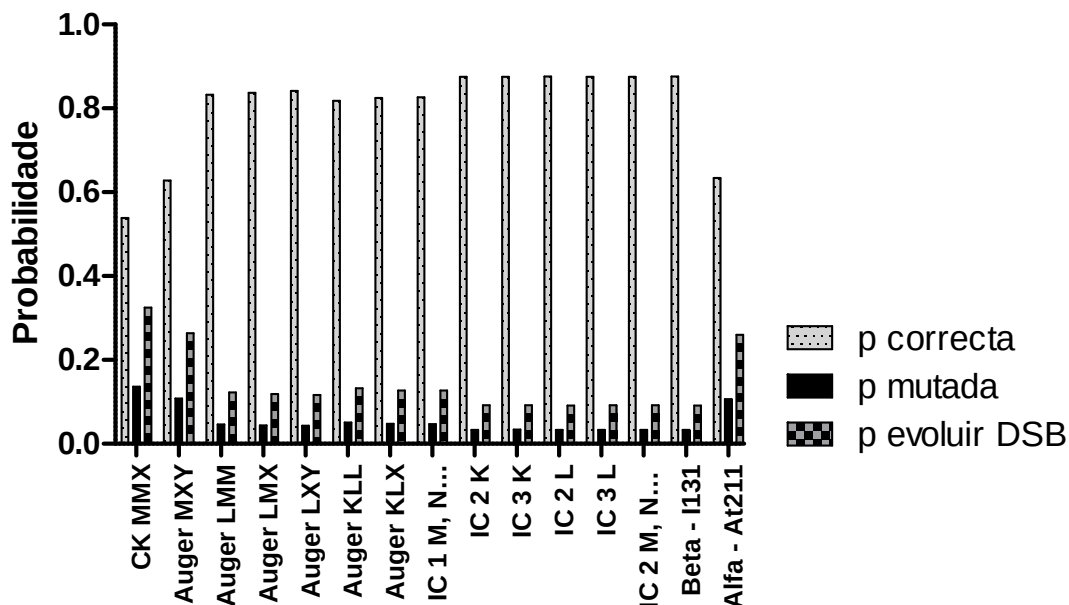


Figura 5.8 Probabilidade de reparação correcta (p correcta), reparação com mutação (p mutada) e evolução para quebra dupla (p evoluir DSB) de quebras simples do ADN, pelo método de reparação por excisão de bases *long patch* (LP-BER).

Reparação SP - NER de Quebras Simples

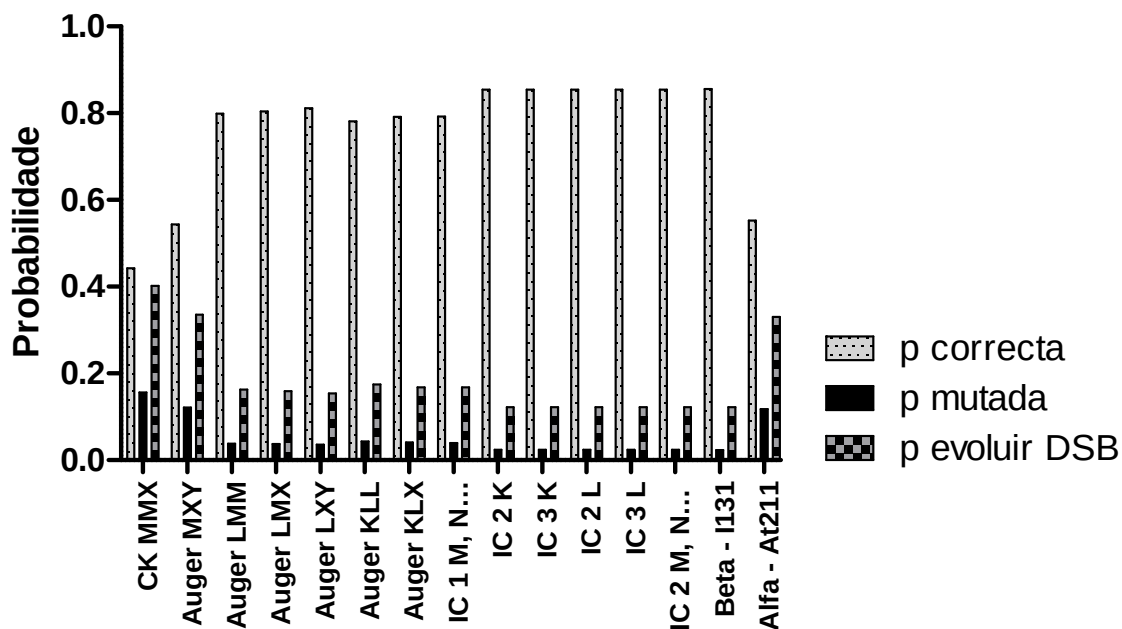


Figura 5.9 Probabilidade de reparação correcta (p correcta), reparação com mutação (p mutada) e evolução para quebra dupla (p evoluir DSB) de quebras simples do ADN, pelo método de reparação por excisão de nucleótidos *short patch* (SP-NER).

Reparação LP - NER de Quebras Simples

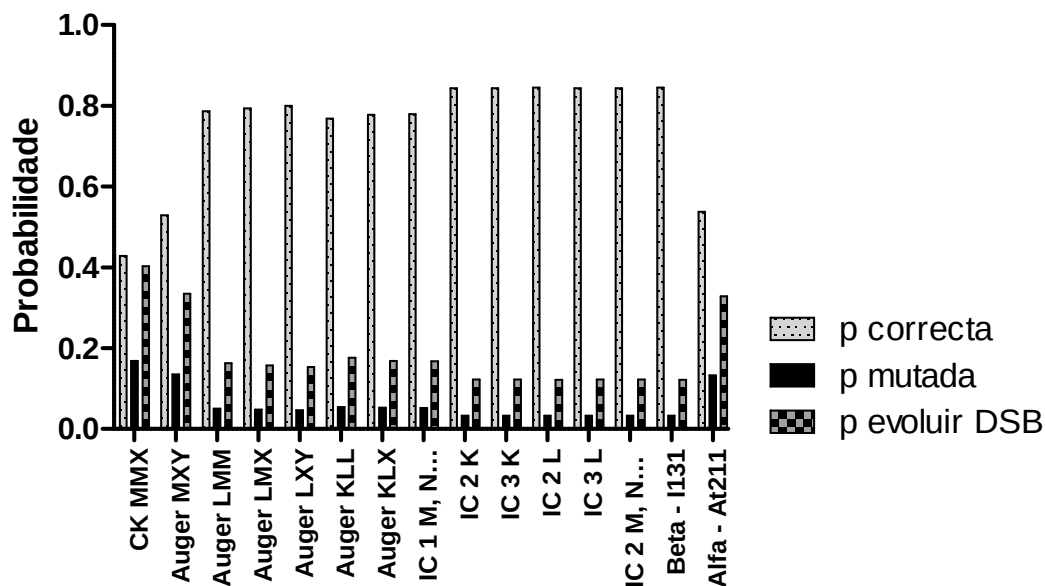


Figura 5.10 Probabilidade de reparação correcta (p correcta), reparação com mutação (p mutada) e evolução para quebra dupla (p evoluir DSB) de quebras simples do ADN, pelo método de reparação por excisão de nucleótidos *long patch* (LP-NER).

Ciclos Reparação Quebras Simples

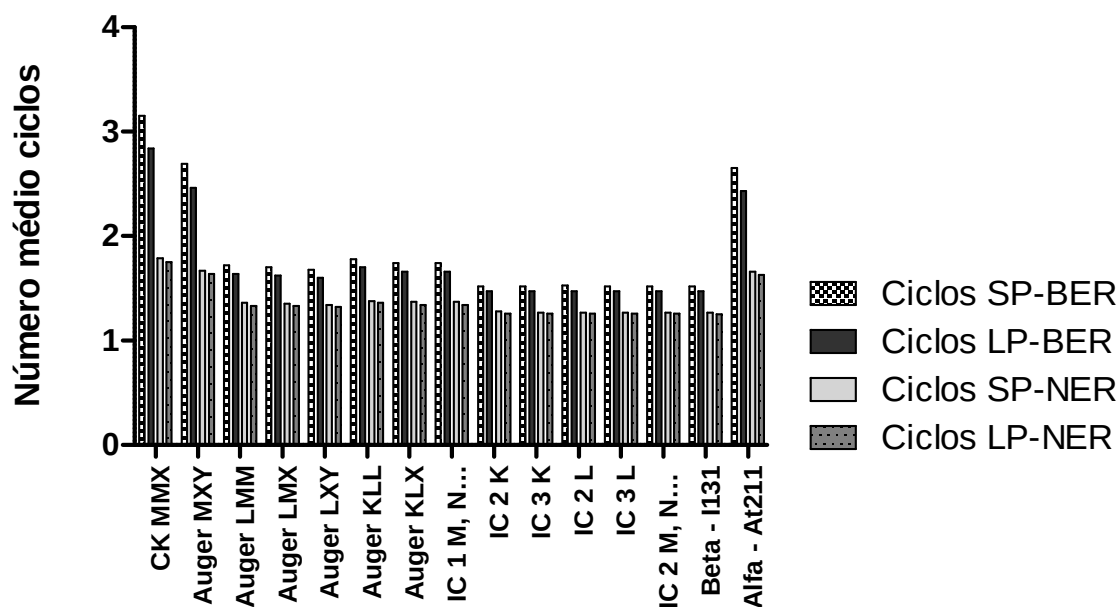


Figura 5.11 Número médio de ciclos de reparação de quebras simples do ADN para diferentes métodos (SP-BER, LP-BER, SP-NER e LP-NER) e para diferentes agentes irradiantes.

5.4 Resultados do Simulador de Radiobiologia Celular

Da análise dos resultados dos simuladores MCDS e MCER verifica-se que os electrões de Auger do ^{99m}Tc potencialmente mais interessantes para radioterapia metabólica são os electrões CKMMX e Auger MXY, pelo que serão estes os electrões a utilizar para o estudo das alterações da cinética celular após irradiação com diferentes tipos de radiações.

Nesta secção, apresentam-se os resultados da irradiação de dois tipos de células (fibroblastos humanos e células da cripta intestinal humana) com os electrões CKMMX e Auger MXY do ^{99m}Tc , as partículas beta menos do ^{131}I e as partículas alfa do ^{211}At . Com estes resultados pretende-se avaliar os efeitos destes dois tipos de electrões do ^{99m}Tc em dois tipos de células com radiosensibilidades distintas. Adicionalmente, estes resultados permitem uma comparação directa entre electrões do ^{99m}Tc seleccionados e outros radionuclídeos utilizados actualmente em radioterapia metabólica, nomeadamente pela análise dos seus efeitos na cinética celular, sobrevida celular, transformação neoplásica e instabilidade genética e controlo tumoral. Os resultados compilados do simulador VC estão expostos nas Figuras 5.11 a 5.18.

A Figura 5.11 apresenta os resultados obtidos em termos de mutações letais por célula, tendo-se verificado diferenças muito significativas entre os diferentes agentes irradiantes, com um $p < 0.0001$ (teste ANOVA). Estas diferenças significativas demonstram que os electrões de Auger CK MMX apresentam maior potencial para indução de danos letais nas células irradiadas, seguidos dos electrões Auger MXY, partículas alfa do ^{211}At e partículas beta menos do ^{131}I . Quer o ^{211}At , quer o ^{131}I são agentes terapêuticos utilizados actualmente.

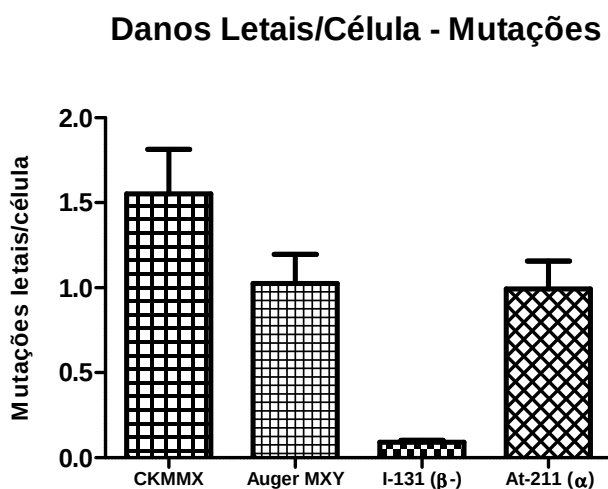


Figura 5.11 Comparação entre o número médio de mutações letais por célula e os diferentes tipos de irradiações ($p < 0.0001$, ANOVA).

A Figura 5.12 apresenta o número de células sobreviventes após irradiação com diferentes agentes irradiantes, quando nenhuma célula irradiada está em divisão (fora do ciclo celular – fase G_0). Também estes resultados demonstram diferenças significativas ($p < 0.0001$, ANOVA) entre a irradiação com ^{131}I face às restantes modalidades de irradiação, contudo não existem diferenças significativas entre electrões de Auger (CKMMX e Auger MXY) e as partículas alfa do ^{211}At , nem diferenças entre sobrevivência de fibroblastos e células da cripta intestinal em G_0 para o mesmo tipo de irradiação.

A Figura 5.13 apresenta o número de células sobreviventes após irradiação com diferentes agentes. As células irradiadas encontram-se em divisão e fora do ciclo celular, representado uma população heterogénea. Mais uma vez se verificam diferenças muito significativas ($p < 0.0001$, ANOVA) entre os diferentes tipos de irradiação em células da cripta intestinal e em fibroblastos ($p = 0.0031$, ANOVA). Para o mesmo agente irradiante, diferenças muito significativas entre fibroblastos e células da cripta intestinal foram observados ($p < 0.0001$, teste T), sendo que o número de células sobreviventes da cripta intestinal após irradiação é significativamente menor que o número de fibroblastos sobreviventes. Por outro lado, os electrões de Auger testados apresentam maior potencial para destruição celular, resultando num menor número de células sobreviventes, comparativamente com a irradiação com partículas beta menos do ^{131}I .

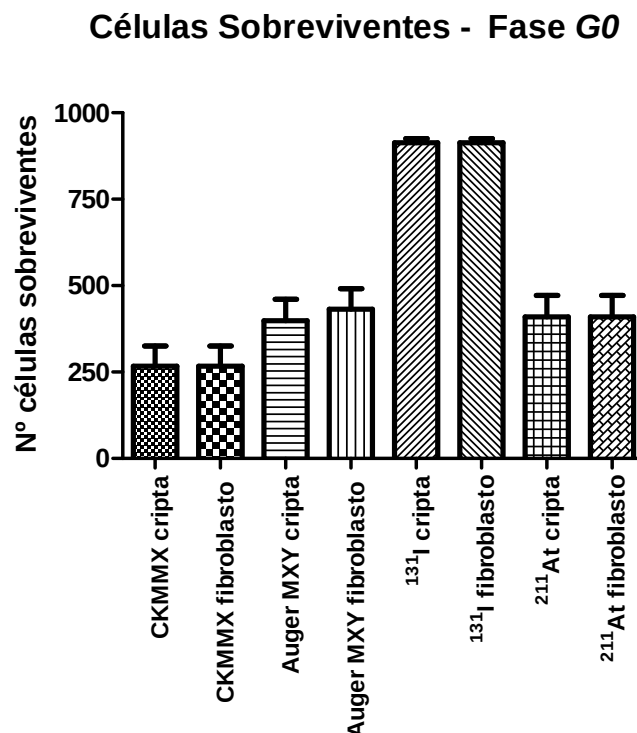


Figura 5.12 Comparação entre o número de células sobreviventes (todas as células fora do ciclo celular – G_0) e os diferentes tipos de irradiações.

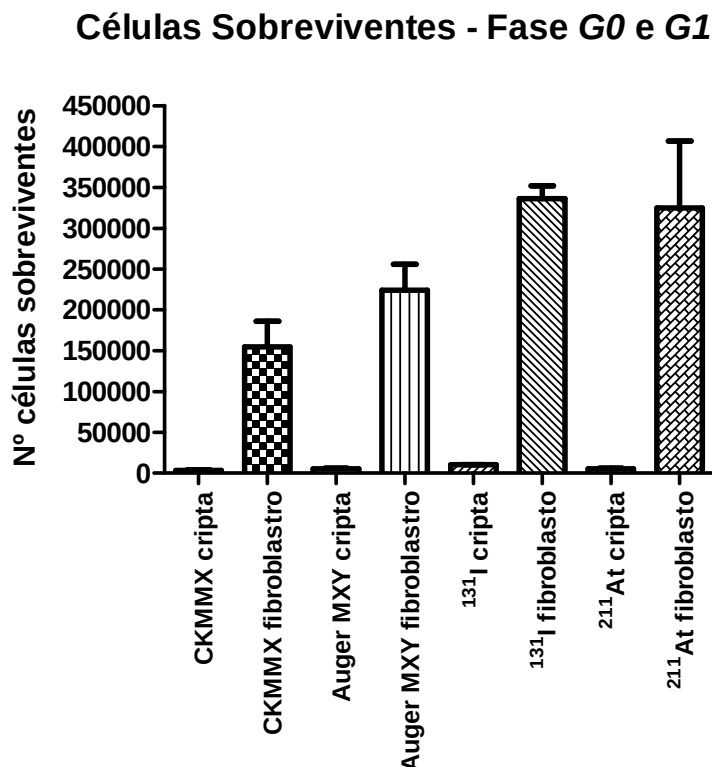


Figura 5.13 Comparação entre o número de células sobreviventes (células fora do ciclo celular - G_0 e células em divisão activa - G_1) e os diferentes tipos de irradiações.

A Figura 5.14 relaciona o número de células que sobrevivem à irradiação com diferentes tipos de agentes irradiantes, em dois tipos de células distintos, sendo que todas as células se encontram em divisão; isto é, em ciclo celular (G_1). Diferenças muito significativas ($p=0.0002$, ANOVA) foram observadas entre os diferentes tipos de irradiação em células da cripta intestinal; contudo não foram observadas diferenças significativas entre diferentes tipos de irradiação em fibroblastos ($p=0.3014$, ANOVA). Nas células da cripta intestinal não se observaram diferenças significativas entre os electrões CKMMX e Auger MXY ($p=0.1406$, teste T), entre os electrões CKMMX e partículas alfa do ^{211}At ($p=0.1103$, teste T), nem entre os electrões Auger MXY e partículas alfa do ^{211}At ($p=0.8897$, teste T). Contudo diferenças muito significativas foram observadas entre electrões CKMMX e partículas beta do ^{131}I ($p<0.0001$, teste T), entre os electrões Auger MXY e as partículas beta do ^{131}I ($p<0.0001$, teste T) e entre as partículas alfa do ^{211}At e as partículas beta do ^{131}I ($p=0.0018$, teste T). Para o mesmo agente irradiante, diferenças muito significativas entre fibroblastos e células da cripta intestinal foram observados ($p<0.0001$, teste T).

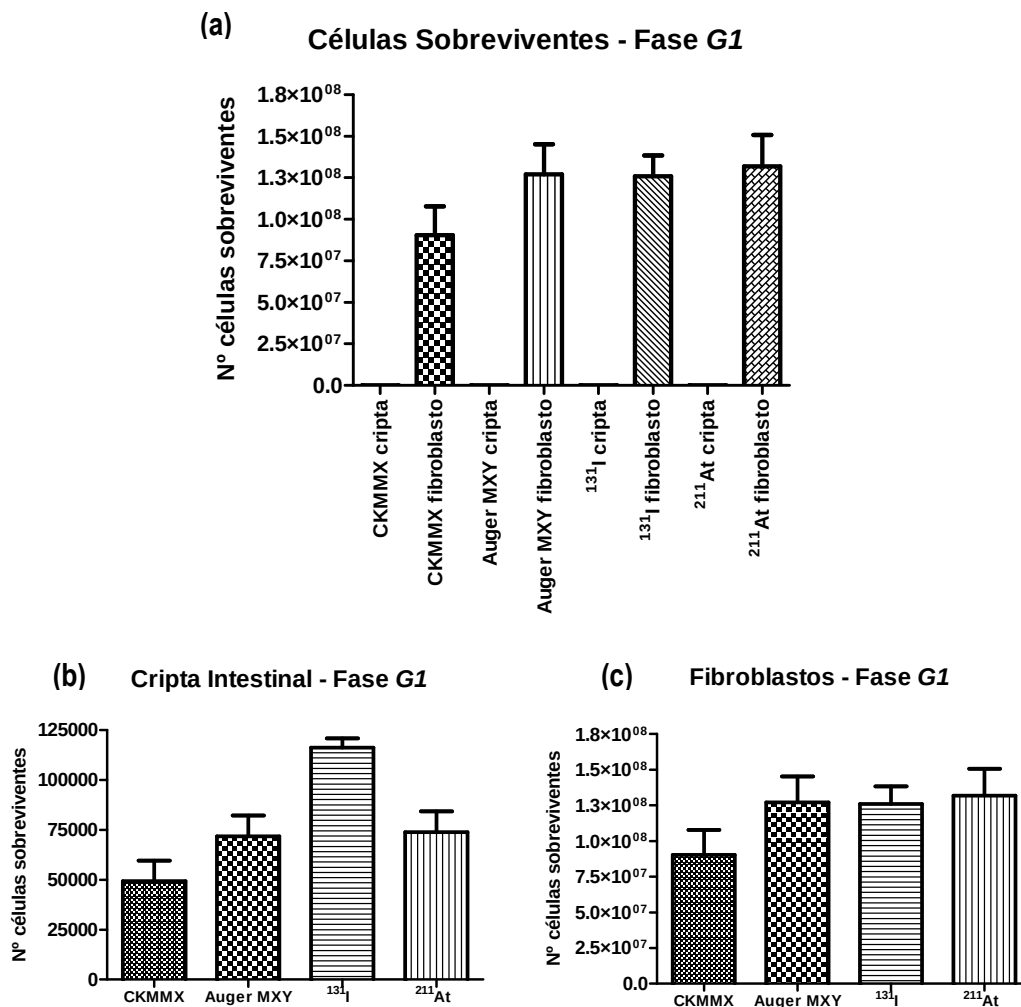


Figura 5.14 Comparação entre o número de células sobreviventes (todas células em divisão - G1) e os diferentes tipos de irradiações: (a) diferentes tipos de células e agentes irradiantes; (b) diferentes agentes irradiantes em células da cripta intestinal e (c) em fibroblastos.

A Figura 5.15 apresenta os resultados da probabilidade de mutagénese e aumento da indução de instabilidade genética para diferentes agentes irradiantes. A mutagénese e aumento da instabilidade genética são definidos como: alteração da função ou expressão de pelo menos um gene crítico de entre os genes alvo com consequente aumento da instabilidade genética.

A análise estatística da Figura 5.15 demonstrou, novamente, diferenças muito significativas entre irradiações com Auger MXY face a irradiações com partículas beta do ¹³¹I ($p=0.001$, teste T) e entre irradiações com partículas alfa do ²¹¹At e partículas beta do ¹³¹I ($p=0.0006$, teste T).

A Figura 5.16 apresenta os resultados da frequência de transformação neoplásica por célula irradiada, tendo-se verificado diferenças muito significativas ($p < 0.0001$, ANOVA) entre diferentes agentes irradiantes por tipo de célula. A frequência de transformação neoplásica é definida em função da dose e taxa de dose em 42 dias (parâmetro fixo do simulador). Verifica-se que as partículas beta menos do ^{131}I possuem uma maior frequência de transformação neoplásica de células irradiadas, comparativamente com as restantes formas de irradiação. O menor valor de frequência de transformação neoplásica é dos electrões CK MMX do $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Mutagénese e Aumento de Instabilidade Genética

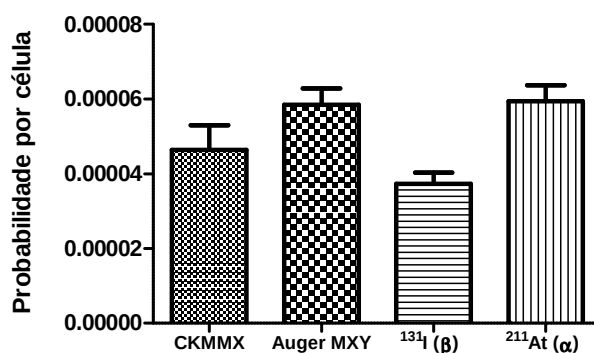


Figura 5.15 Probabilidade de aumento de instabilidade genética e mutagénese após irradiação com diferentes tipos de agentes irradiantes.

Transformação Neoplásica Irradiadas

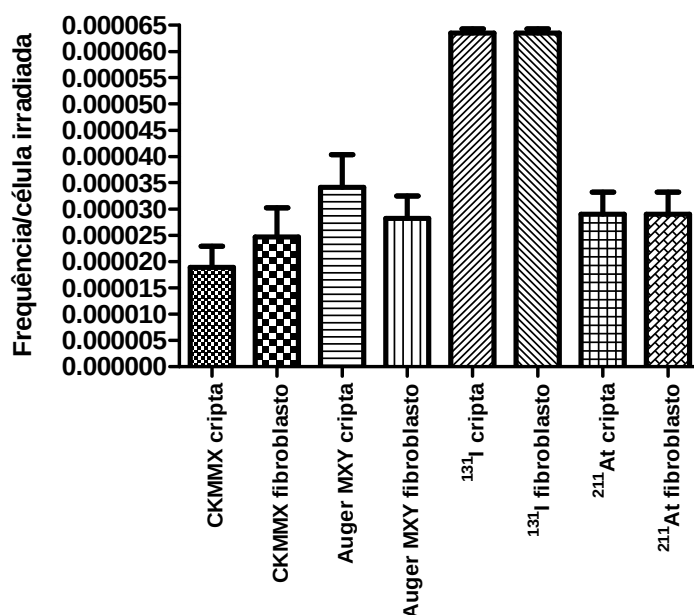


Figura 5.16 Frequência de transformação neoplásica em células irradiadas após irradiação com diferentes agentes irradiantes.

A Tabela 5.1 apresenta os valores de probabilidade de controlo tumoral após irradiação com os diferentes agentes estudados. A probabilidade de controlo tumoral é definido como a probabilidade de nenhuma célula tumoral sobreviver após irradiação. Dado que é virtualmente impossível eliminar todas as células tumorais após uma irradiação (mesmo que durante diferentes intervalos de tempo, como os estudados), os valores apresentados na referida tabela são extremamente baixos (a grande maioria muito próximo de zero), mas possibilitam uma comparação qualitativa dos diferentes agentes. A análise estatística não foi possível realizar, dado que os valores obtidos são muito baixos.

Tabela 5.1 Probabilidade de controlo tumoral (nenhuma célula tumoral sobreviver) para diferentes agentes irradiantes e tipos de células.

Agente irradiante	Fase ciclo celular	Tipo célula	
		Cripta intestinal	Fibroblastos
^{99m} Tc (Electrão CKMMX)	Todas G0	≈0*	≈0*
	G0 e G1	≈0*	≈0*
	Todas G1	≈0*	≈0*
^{99m} Tc (Auger MXY)	Todas G0	≈0*	≈0*
	G0 e G1	≈0*	0 [†]
	Todas G1	0 [†]	0 [†]
¹³¹ I (partícula beta)	Todas G0	0 [†]	0 [†]
	G0 e G1	0 [†]	0 [†]
	Todas G1	0 [†]	0 [†]
²¹¹ At (partícula alfa)	Todas G0	≈0*	≈0*
	G0 e G1	≈0*	0 [†]
	Todas G1	0 [†]	0 [†]

* os valores indicados embora não sejam zero, são muito próximos de zero.

[†] os valores indicados são de facto iguais a zero.

5.5 Discussão

Os resultados obtidos pela aplicação dos diferentes simuladores computacionais possibilitaram a análise de vários parâmetros de cinética celular após irradiações em dois tipos de células e em diferentes tipos de populações celulares (quiescentes, em ciclo ou heterogéneas). Os resultados obtidos apontam para uma superioridade de dois tipos de electrões de Auger do ^{99m}Tc, o electrão CKMMX e o electrão MXY, face a partículas beta menos de agentes actualmente utilizados para radioterapia sistémica. Por outro lado, a sua capacidade de destruição celular é similar a partículas alfa, de alta LET, de radioisótopos também actualmente utilizados em terapêutica. Os resultados obtidos são consistentes com os estudos

recentemente realizados com electrões de Auger do ^{99m}Tc ; nomeadamente, estudos *in vitro* e um estudo *in vivo* expostos no capítulo III. Por outro lado, os simuladores forneceram resultados consistentes com as características dos electrões de Auger de uma forma geral; nomeadamente, superioridade em induzir danos ao ADN para emissores de curto alcance, como é o caso dos electrões de Auger; e maior irradiação das células num menor espaço de tempo, sem fraccionamento da dose pelas células-filhas, para radionuclídeos de menor semi-vida física.

A comparação, pelo uso de métodos computacionais, dos electrões de Auger do ^{99m}Tc com outros agentes irradiantes tem carácter inovador e permite criar uma escala dos electrões potencialmente mais úteis para radioterapia metabólica, sendo estes: o electrão CKMMX e o electrão de Auger MXY. Devido a limitações do simulador utilizado, não foi possível simular o electrão CK NNX, cuja energia é inferior ao limite de execução do simulador, pelo que não foi possível avaliar a sua potencial utilidade. Estes resultados são consistentes com as observações de Häefliger e colaboradores, 2005 (ver capítulo III), (Häefliger 2005).

Os resultados obtidos pelo simulador MCDS demonstram que a percentagem de quebras simples e duplas é sempre superior para os electrões CKMMX e Auger MXY, sendo estes resultados comparáveis com as partículas alfa do ^{211}At . Por outro lado, a capacidade de indução de danos mais complexos e, portanto, mais difíceis de reparar, é superior para os electrões CKMMX e Auger MXY do ^{99m}Tc face às partículas beta menos do ^{131}I . Tal pode ser observado pela percentagem de quebras simples e duplas complexas, que é sempre sobejamente superior para os electrões de Auger em estudo. Assim, o potencial de indução de danos ao ADN é superior para os electrões CKMMX e Auger MXY do ^{99m}Tc face às partículas beta menos do ^{131}I . Por outro lado, os restantes electrões do ^{99m}Tc (em particular aqueles obtidos por conversão interna) simulados apresentam menor capacidade de indução de danos ao ADN, o que pode ser explicado pelo seu maior alcance tecidual, cujo comportamento é similar a partículas beta menos.

O aumento do número de danos ao ADN, bem como o aumento da sua complexidade, dificulta o processo de reparação com sucesso, como se observa pelos resultados obtidos com o simulador computacional MCER. Estes resultados permitem concluir que a probabilidade de reparação correcta é inferior para os electrões CKMMX e Auger MXY do ^{99m}Tc face às partículas beta menos do ^{131}I . Para além disso, a probabilidade de evolução para quebra dupla do ADN ou para mutação é superior para os referidos electrões face às partículas beta menos. Estes resultados são consistentes para qualquer processo de reparação estudado, levando a concluir que, independentemente da via utilizada para correcção do dano ao ADN, a gravidade dos danos causados pelos electrões de Auger CKMMX e MXY, reduz a probabilidade de correcta

reparação e aumenta a probabilidade de mutação/formação de quebras duplas. Sabe-se que as quebras duplas do ADN estão frequentemente associadas a apoptose, (Carlson 2008). Assim, o aumento da capacidade de indução de quebras duplas verificado pelo simulador MCDS, associado ao aumento de conversão de quebras simples em duplas, pela falha do processo de reparação, observado pelos resultados do simulador MCER, leva a concluir que a indução de apoptose é superior para os electrões CKMMX e MXY do ^{99m}Tc face às partículas beta menos do ^{131}I . Deste modo, a capacidade de induzir morte celular às células-alvo é superior para os electrões CKMMX e Auger MXY face às partículas beta menos estudadas. Por outro lado, sabe-se ainda que o aumento do número de ciclos de reparação, aumenta o tempo requerido para reparação do dano e encontra-se associado ao aumento da LET da partícula. Estudos prévios observaram durante o processo de reparação de danos complexos por excisão, um aumento da formação de quebras duplas enzimáticas, (Semenenko 2005). Estes factores suportam mais uma vez a superioridade dos electrões CKMMX e Auger MXY em induzir morte celular, pois o número de ciclos requerido para reparação é maior. Por outro lado, com base em observações de estudos prévios e nos resultados da presente Dissertação, estes electrões podem ser classificados em alta LET e potencialmente úteis para terapêutica.

Os electrões CKMMX e Auger MXY do ^{99m}Tc apresentam um rendimento por decaimento de 0.747 e 1.1 respectivamente, constituindo o terceiro e segundo rendimentos mais elevados de electrões do ^{99m}Tc (o primeiro lugar é ocupado pelo electrão CKNNX com 4 electrões por decaimento, o qual não foi possível simular por razões previamente explicadas). Este valores, apesar de traduzirem um rendimento elevado de entre as emissões de Auger do ^{99m}Tc , são, por outro lado, um rendimento reduzido, se comparado, por exemplo, com o ^{125}I (um dos primeiros emissores de Auger estudado), cujo rendimento para os mesmos electrões é de 1.44 e 3.28 respectivamente, (Howell 1992). Contudo, a conjugação semi-vida física e rendimento por decaimento poderá significar que esta limitação do ^{99m}Tc face a outros emissores de Auger será potencialmente ultrapassável, dado que a semi-vida física do ^{99m}Tc é de apenas 6 horas face a uma semi-vida física de 60 dias do ^{125}I .

Uma vez concluída a análise dos resultados dos simuladores MCDS e MCER, decidiu-se seleccionar os electrões CKMMX e Auger MXY do ^{99m}Tc para posterior avaliação da cinética celular devido: 1) ao seu rendimento superior, face aos restantes electrões emitidos por este radionuclídeo; e 2) devido à sua superioridade em induzir danos ao ADN face aos restantes electrões do ^{99m}Tc estudados.

O simulador VC é pioneiro na avaliação, por métodos computacionais, dos efeitos da radiação em células, sendo um simulador de radiobiologia celular bastante útil. Este simulador,

tal como os simuladores MCDS e MCER, é uma ferramenta de modelação biológica, com um papel cada vez mais importante no desenho, optimização e avaliação de novos planos de tratamento tumoral com radiação. Como referido no capítulo IV, as culturas de células e os simuladores de radiobiologia celular possuem vantagens e desvantagens, mas a rapidez e facilidade de obtenção de resultados dos novos simuladores, cujos modelos aplicados durante a sua construção são cada vez mais fiéis ao modelo real, são vantagens que não são alcançáveis com culturas de células, tradicionalmente demoradas e com requisitos que impossibilitam a criação e manutenção destas por pessoal não especializado.

A capacidade de indução de danos letais celulares devido a mutações foi estudada pelo simulador VC tendo-se verificado, mais uma vez, que os electrões de Auger do ^{99m}Tc seleccionados são capazes de induzir mais dano ao ADN (com diferenças estatisticamente muito significativas, $p < 0.0001$, ANOVA). Estes resultados reforçam e suportam, mais uma vez, os resultados dos outros simuladores.

A novidade introduzida pelo simulador VC face aos restantes simuladores utilizados é a sua capacidade de modelar diferentes tipos de células e diferentes populações celulares. Este simulador possibilitou o estudo dos fibroblastos humanos quiescentes, em ciclo e em populações heterogéneas (quiescentes e em ciclo), e o estudo das células da cripta intestinal quiescentes, em ciclo e em populações heterogéneas. Cada uma destas populações celulares foi irradiada com os electrões CKMMX e Auger MXY do ^{99m}Tc , com as partículas beta menos do ^{131}I e com as partículas alfa do ^{211}At . Os resultados obtidos demonstram que quando todas as células irradiadas estão quiescentes; isto é, não se encontram em divisão celular, não existem diferenças significativas, para o mesmo agente irradiante, entre fibroblastos e células da cripta intestinal. Como as células não estão em divisão, a sua resposta à irradiação é passiva, pois o número de células mortas pela radiação não considera a cinética da divisão celular (duplicação, reparação, paragens do ciclo, entre outros) e, consequentemente, as características de radiosensibilidade típicas de cada célula. Por outro lado, diferentes agentes irradiantes apresentam diferentes resultados em termos de sobrevida das células irradiadas ($p < 0.0001$, ANOVA). Os electrões de Auger estudados, em concordância com os resultados obtidos pelos outros simuladores, são os que apresentam menor número de células sobreviventes, seguidos pelas partículas alfa do ^{211}At e, finalmente pelas partículas beta menos do ^{131}I , que apresenta o maior número de células sobreviventes. Por outro lado, quando a população em estudo é heterogénea (células quiescentes e em ciclo), diferenças muito significativas observam-se entre diferentes agentes irradiantes e entre diferentes tipos celulares. Neste caso, como parte da população está em divisão e parte está quiescente, o que representa uma situação mais próxima

do modelo real, a resposta celular à irradiação é ditada pelo tipo de radiação, dose absorvida e características da cinética celular, nomeadamente, tempo de duplicação celular. Os resultados obtidos demonstram que para o mesmo agente irradiante, o número de células que sobrevive é drasticamente inferior para as células da cripta intestinal face aos fibroblastos. Tal é explicado pela radiosensibilidade de cada tipo de célula. Os fibroblastos são células tipicamente mais resistentes à irradiação, dado que o seu tempo de ciclo celular e duplicação é inferior às células da cripta intestinal, (Baserga 1971). Assim, para a mesma dose de radiação, os danos induzidos em fibroblastos são inferiores aos induzidos nas células da cripta intestinal. De notar, mais uma vez a superioridade dos electrões de Auger em estudo em induzir danos e reduzir a sobrevivência celular, face às partículas beta menos do ^{131}I . As diferenças para o mesmo tipo de irradiação em diferentes populações celulares são também observadas para populações em que todas as células estão em divisão celular, o que está de acordo com o explicado. Contudo, algo inesperado é a ausência de diferenças entre os diversos agentes irradiantes estudados em fibroblastos, pelo que, quando todos os fibroblastos estão em divisão celular, a sua resposta à radiação parece ser independente do tipo de radiação. Tal pode ser explicado pela reduzida radiosensibilidade deste tipo de células e pela sua activa proliferação, que responde à irradiação através da duplicação e aumento do número de células, compensando os diferentes efeitos da radiação. Contrariamente aos fibroblastos, as células da cripta intestinal cujo tempo de duplicação é superior (39 horas face a 16 horas dos fibroblastos), não consegue, mesmo em divisão celular, compensar os danos induzidos pela radiação para a mesma dose absorvida; apresentando diferenças muito significativas para os diferentes agentes irradiantes, com superioridade para os electrões de Auger.

O estudo do aumento da mutagenese e instabilidade genética do simulador VC demonstrou que os electrões de Auger em análise apresentam maior probabilidade de mutagenese e indução de instabilidade genética face aos restantes agentes irradiantes. Contudo, quando se analisa a probabilidade de transformação neoplásica das células irradiantes em função dos diferentes agentes, as partículas beta menos do ^{131}I são as que apresentam maior probabilidade. Quer isto dizer que, a instabilidade genética e mutagenese induzida pelos electrões de Auger conduzirá provavelmente à morte celular ou a mutações benignas, enquanto o risco de mutagenese com consequências celulares (transformação neoplásica) é superior no caso das partículas beta menos. Por outro lado, quando se avalia a probabilidade de controlo tumoral, isto é, nenhuma célula tumoral sobreviver à irradiação, os resultados obtidos, embora muito reduzidos, apontam para uma superioridade dos electrões de Auger face às partículas beta menos do ^{131}I . Os resultados de probabilidade de controlo tumoral devem, contudo, ser

considerados com cuidado, pois os modelos de irradiação simulados contemplam apenas uma irradiação durante diferentes intervalos de tempo e não irradiações múltiplas em ciclo (metodologia mais frequente de tratamento tumoral). De qualquer modo, dado que se pretende comparar os electrões de Auger com outros emissores já conhecidos e utilizados em terapia tumoral, de forma a avaliar o seu potencial interesse enquanto agente terapêutico, o uso das mesmas condições de irradiação permite a realização de uma comparação adequada aos objectivos da presente Dissertação.

Os resultados do simulador VC apresentados dizem respeito à média das taxas de dose estudadas e que são relativas a intervalos de exposição de 2, 6 e 24 h com doses absorvidas de 1, 1.5 e 2 Gy para cada intervalo de tempo considerado. Conforme esperado, verifica-se que para a mesma dose, a maior taxa de dose (obtida pelos diferentes intervalos de irradiação) corresponde ao maior dano celular traduzido, nomeadamente, por menor sobrevida celular.

5.6 Sumário

Neste capítulo expõem-se os resultados obtidos com os diferentes simuladores utilizados, iniciando-se com a classificação do potencial terapêutico dos electrões de Auger do ^{99m}Tc face outros radionúcleos universalmente aceites como agentes terapêuticos, a destacar: o ^{131}I , tradicionalmente utilizado na terapêutica de tumores da tiróide e, quando acoplado a uma molécula transportadora a tumores neuroendócrinos, entre outros; e o ^{211}At que tem sido cada vez mais apontado como um agente de escolha para radioterapia metabólica, devido às suas características vantajosas, nomeadamente alcance curto das partículas. De seguida analisou-se as diferentes vias de reparação dos danos do ADN e seus resultados em termos de reparação correcta, reparação com mutação e evolução para quebra dupla do ADN. Também a análise destes resultados possibilitou a avaliação dos electrões de Auger do ^{99m}Tc no contexto de radioterapia metabólica, face aos emissores beta menos tradicionais e aos emissores alfa. Finalmente, uma vez seleccionados os electrões de Auger mais vantajosos do ^{99m}Tc , expõem-se os resultados do simulador de cinética celular após irradiação, com a avaliação de múltiplos parâmetros e sua comparação com o ^{131}I e o ^{211}At . Uma discussão das vantagens e desvantagens dos electrões de Auger do ^{99m}Tc , bem como, o seu potencial terapêutico e comparação com outros estudos realizados foi apresentada no presente capítulo.

No capítulo seguinte apresentam-se as conclusões finais desta Dissertação e perspectivas futuras.

Capítulo VI. Conclusões Finais e Perspectivas Futuras

6.1 Conclusões Finais

O ciclo celular é uma das principais características das células, tendo por isso mesmo, sido exposto no capítulo II da presente Dissertação. As principais fases do ciclo celular são a fase G_1 , fase G_2 , fase S e mitose. Contudo, por vezes, quando as células sofrem agressões, por agentes irradiantes, químicos ou físicos, um outro estágio celular verifica-se com frequência, a fase G_0 . Esta fase constitui um momento de paragem do ciclo celular que possibilitará a recuperação dos danos sofridos, ou quando tal não é possível conduzirá à morte celular programada, também denominada apoptose. Adicionalmente, conceitos fundamentais de radiobiologia celular, essenciais para a compreensão da Dissertação, foram também expostos no capítulo II. Alguns desses conceitos, nomeadamente, conceito de sobrevivência celular e eficácia biológica relativa (RBE), foram posteriormente utilizados para 1) analisar estudos prévios dos efeitos terapêuticos dos electrões de Auger, em particular do ^{99m}Tc (capítulo III) e 2) para interpretar os resultados obtidos pela aplicação dos simuladores utilizados (capítulo V).

No capítulo III verificou-se o crescente interesse dos electrões de Auger para radioterapia metabólica devido às suas características vantajosas, a destacar o curto alcance (entre alguns nanómetros e micrómetros), que possibilita uma terapêutica mais focada e com menos danos às células vizinhas. Para além disso conclui-se que o papel do ^{99m}Tc enquanto agente terapêutico ainda está por definir e que estudos futuros (como os realizados na presente Dissertação) são requeridos para melhor avaliar/caracterizar este emissor de electrões de Auger. De facto, os estudos realizados até ao presente com o ^{99m}Tc são ainda escassos, os radiofármacos radiomarcados com ^{99m}Tc e utilizados para estes estudos têm que ser aprefeiçoados; e o principal desafio é a colocação do ^{99m}Tc no interior da célula (o mais próximo possível do núcleo celular).

Assim, com o objectivo de avaliar o potencial do ^{99m}Tc enquanto agente terapêutico, realizaram-se, nesta Dissertação, estudos de radiobiologia celular com recurso a métodos computacionais expostos no capítulo IV. A metodologia aplicada consistiu em três simuladores dos efeitos da radiação ionizante quer no ADN, quer em dois tipos de células previamente seleccionadas (fibroblastos humanos e células da cripta intestinal humana): o simulador MCDS, o simulador MCER e o simulador VC. O primeiro destinava-se ao estudo dos efeitos de diferentes tipos de radiação, incluindo os electrões de Auger do ^{99m}Tc , no ADN. De seguida e seguindo um ciclo contínuo, os danos causados pela irradiação e medidos pelo simulador MCDS, foram introduzidos no simulador MCER, o qual analisou os diferentes métodos de

reparação do ADN e a consequente probabilidade de reparação correcta, mutação e evolução para quebras dupla do ADN. Finalmente os resultados obtidos durante a aplicação dos dois simuladores complementares, MCDS e MCER, e mais uma vez utilizando os resultados obtidos por estes simuladores, realizou-se a análise dos efeitos dos electrões de Auger em dois tipos de células pelo uso do simulador VC. O simulador VC é um simulador de radiobiologia celular para o estudo dos efeitos terapêuticos de diferentes radioisótopos, incluindo probabilidade de mutagenese e instabilidade genética; probabilidade de controlo tumoral e sobrevida celular. As características, vantagens e desvantagens de cada simulador utilizado são expostas no capítulo IV. Os resultados obtidos pelos simuladores referidos foram apresentados e analisados no capítulo V desta Dissertação.

Os principais objectivos desta Dissertação incluíam a caracterização da natureza dos efeitos produzidos pelos electrões de Auger em culturas de células seleccionadas e a obtenção de dados necessários à caracterização do potencial do ^{99m}Tc em tanto que agente terapêutico, em contexto de (Rádio) Terapia Metabólica. Estes objectivos foram cumpridos e os resultados obtidos permitem concluir que os electrões CKMMX e Auger MXY do ^{99m}Tc possuem potencial terapêutico comparável às partículas alfa de elevado LET do ^{211}At e superior às partículas beta menos do ^{131}I .

Em termos celulares os seus efeitos são superiores (menor sobrevida celular) em células da cripta intestinal face aos fibroblastos, o que está de acordo com as premissas de radiosensibilidade celular, correlacionando-se com os tempos de duplicação celular e qualidade da irradiação.

Relativamente às diferentes populações celulares estudadas (quiescentes, heterogéneas e em ciclo), conclui-se que as células quiescentes são mais sensíveis aos efeitos da radiação, face às populações heterogéneas ou em divisão. Também neste campo se verifica a superioridade dos electrões de Auger em induzir danos irreparáveis. A probabilidade de indução de apoptose é superior para os electrões CKMMX e Auger MXY do ^{99m}Tc face às partículas beta menos do ^{131}I (e comparáveis à partícula alfa do ^{211}At), o que se traduz numa maior eficácia em destruição celular e, portanto, no contexto tumoral em maior destruição do tecido alvo.

6.2 Perspectivas Futuras

Apesar da abordagem global adoptada e implementada ao longo desta Dissertação produzir resultados bastante satisfatórios e promissores, a mesma pode ser enriquecida e melhorada, nomeadamente, nos seguintes pontos:

- *Extensão do limiar de energia da partícula do simulador MCDS e MCER:* devido a limitações do método computacional utilizado, não foi possível simular o electrão CKNNX, dado que a sua energia era inferior ao limite mínimo do simulador. Com a crescente melhoria do simulador e o aumento dos conhecimentos da radiobiologia celular, prevê-se que esta limitação possa ser ultrapassada futuramente.
- *Comparação dos resultados obtidos com estudos laboratoriais:* no âmbito da presente Dissertação utilizou-se métodos computacionais para a caracterização do potencial terapêutico do ^{99m}Tc . Esses métodos são inovadores, rápidos e simples, possibilitando a modelização de processos/sistemas biológicos, nomeadamente células, com vista a facultar o desenho, optimização e avaliação de potenciais agentes terapêuticos, assim como, planos de tratamentos com radiação. Contudo, apesar de muito úteis numa abordagem inicial do problema, estes métodos devem ser correlacionados com estudos laboratoriais, para maior validação dos resultados. Alguns estudos de correlação já foram realizados (Semenenko e Stewart, 2005 – ver capítulo IV), tendo-se verificado uma boa correlação entre os resultados do simulador e os resultados laboratoriais, (Semenenko and Stewart 2005).
- *Desenho dos radiofármacos:* o modelo computacional utilizado avaliou os efeitos dos electrões de Auger do ^{99m}Tc no ADN celular, contudo, conforme exposto na presente Dissertação, a colocação do radiofármaco próximo do núcleo celular é um processo complexo, que requer uma cooperação multidisciplinar para a criação de moléculas transportadoras selectivas. Embora a avaliação de diferentes radiofármacos marcados com ^{99m}Tc não fizesse parte do âmbito da presente Dissertação, será seguramente importante avaliar esse parâmetro no futuro.

Bibliografia

- Adelstein, J. and A. Kassis (1996). "Strand Breaks in Plasmid DNA Following Positional Changes of Auger-Electron-Emitting Radionuclides." Acta Oncologica **35**(7): 797-801.
- Anazetti, M. and P. Melo (2007). "Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular." Metrocamp Pesquisa **1**(1): 37-58.
- Baserga, R. (1971). The Cell Cycle and Cancer. The Biochemistry of Disease - A Molecular Approach to Cell Pathology - Volume I. E. Farber. USA, Marcel Dekker. I: 22.
- Baserga, R. (1993). Definig the Cycle. Cell Biology - Organelle Structure and Function. D. Sadava. USA, Jone and Barlett Publishers.
- Boswell, C. and M. Brechbiel (2005). "Auger Electrons: Lethal, Low Energy, and Coming Soon to a Tumor Cell Nucleus Near You." The Journal of Nuclear Medicine **46**(12): 1946-1947.
- Boyd, M. R., Susan; Dorrens, Jennifer; Fullerton, Natasha; Tan, Ker; Zalutsky, Michael; Mairs, Robert (2006). "Radiation-Induced Biologic Bystander Effect Elicited In Vitro by Targeted Radiopharmaceuticals Labeled with a, b and Auger Electrons Emitting Radionuclides." Journal of Nuclear Medicine **47**: 1007-1015.
- Britannica, E. (2007). "DNA." Retrieved 30 Maio 2008, from <http://www.britannica.com/EBchecked/topic-art/275706/106485/The-human-genome-is-made-up-of-approximately-three-billion#assembly=url~http%3A%2F%2Fwww.britannica.com%2FEBchecked%2Ftopic-art%2F275706%2F106485%2FThe-human-genome-is-made-up-of-approximately-three-billion&tab=active~checked%2Citems~checked>.
- Britz-Cunningham, S. and J. Adelstein (2003). "Molecular Targeting with Radionuclides: State of the Science." The Journal of Nuclear Medicine **44**(12): 1945-1961.
- Buchegger, F. P.-A., Florence ; Dupertuis, Yves; Delaloye, Angelika (2006). "Auger Radiation Targeted into DNA: A Therapy Perspective." European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging **33**(11): 1352-1363.
- Carlson, D. R., Stewart; Semenenko, V; Sandison, A (2008). "Combined Use of Monte Carlo DNA Damage Simulations and Deterministic Repair Models to Examine Putative Mechanisms of Cell Killing." Radiation Research **169**: 447-459.
- Champion, C. Z.-F., Paolo; Hindié, Elif (2008). "CELLDOSE: A Monte Carlo Code to Assess Electron Dose Distribution - S Values for ¹³¹I in Spheres of Various Sizes." Journal of Nuclear Medicine **49**: 151-157.
- Chen, P. W., Judy; Hope, Kristin; Jin, Liqing; Dick,Jonh; Cameron, Ross; Brandwein, Joseph; Minden, Mark; Reilly,Raymond (2006). "Nuclear Localizing Sequences Promote Nuclear Translocation and Enhance the Radiotoxicity of the Anti-CD33 Monoclonal Antibody

- HuM195 Labeled with ^{111}In in Human Myeloid Leukemia Cells." The Journal of Nuclear Medicine **47**: 827-836.
- Dash, P. (2008). "Apoptosis." Reproductive and Cardiovascular Research Group, from <http://www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash/apoptosis/apoptosis.pdf>.
- Dekker. (2004). "Bottom-up nanotechnology." Retrieved 30 Maio 2008, from <http://lamp.tu-graz.ac.at/~hadley/nanoscience/week4/4.html>.
- Faraggi, M. G., Isabelle; Labriolle-Vaylet, Claire; Moretti, Jean-Luc; Bok, Bernard (1994). "The Influence of Tracer Localization on the Electron Dose Rate Delivered to the Cell Nucleus." Journal of Nuclear Medicine **35**: 113-119.
- Ftáčniková, S. and R. Böhm (2000). "Monte Carlo Calculations of Energy Deposition in DNA for Auger Emitters." Radiation Protection Dosimetry **92**: 269-278.
- Ginj, M. H., Karin; Tschumi,Sibylle; Schulz,Stefan; Maecke,Helmuth (2005). "Trifunctional Somatostatin-Based Derivatives Designed for Targeted Radiotherapy Using Auger Electron Emitters." The Journal of Nuclear Medicine **46**(12): 2097-2013.
- Goodall, K. (2003). "In Search of the Fountain of Youth - Preliminary Analysis of Deuterium's Role in DNA Degradation." Retrieved Maio 2008, from http://www.springboard4health.com/notebook/health_deuterium_analysis.html.
- Griffiths, G. G., Serengulam; Sgouros,George;Ong,Gaik;Goldenberg,David;Mattes,Jules (1999). "Cytotoxicity with Auger Electron-Emitting Radionuclides Delivered by Antibodies." International Journal of Cancer **81**(6): 985-992.
- Guerrero, M. S., R; Wang, J; Li, X (2002). "Equivalence of linear-quadratic and two-lesion kinetic models." Physics in Medicine and Biology **47**: 3197-3209.
- Haefliger, P. A., Nikos; Renard, Annabelle; Giambonini-Brugnoli, Guya; Marty, Cornelia; Alberto, Roger (2005). "Cell Uptake and Radiotoxicity Studies of an Nuclear Localization Signal Peptide-Intercalator Conjugate Labeled with $[\text{Tc}(\text{CO})]$." Bioconjugate Chemistry **16**(3): 582-587.
- Häfliger, P. A., Nikos; Spingler, Bernhard; Georgiev, Oleg; Viola, Giampietro; Alberto, Roger (2005). "Induction of DNA-Double-Strand Breaks by Auger Electrons from $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Complexes with DNA-Binding Ligands." ChemBioChem **6**: 414-421.
- Hofer, K. (2000). "Biophysical Aspects of Auger Processes." Acta Oncologica **39**(6): 651-657.
- Howell, R. (1992). "Radiation Spectra for Auger-Electron Emitting Radionuclides: Report No.2 of AAPM Nuclear Medicine Task Group No.6." Medical Physics **19**(6): 1371-1383.
- Hsiao, Y. and R. Stewart (2008). "Monte Carlo simulation of DNA damage induction by x-rays and selected radioisotopes." Physics in Medicine and Biology **53**: 233-244.

- Humm, J. and D. Chariton (1989). "A New Calculational Method to Assess the Therapeutic Potential of Auger Electron Emission." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **17**(2): 351-360.
- Humm, J. H., Roger; Rao, Dandamudi (1994). "Dosimetry of Auger-Electron-Emitting Radionuclides." Medical Physics **21**(12): 1901-1915.
- İlknur, A. V., E; Durak, B; Gülbaz, Z; Basaran, N; Stokkel, M; Pauwels, E (2002). "Labeling of Mixed Leukocytes with ^{99m}Tc-HMPAO Causes Severe Chromosomal Aberrations in Lymphocytes." Journal of Nuclear Medicine **43**: 203-206.
- Kassis, A. (2003). "Cancer Therapy with Auger Electrons: Are We Almost There?" The Journal of Nuclear Medicine **44**(9): 1479-1481.
- Kriehuber, R. K., K; Schultz, F; Weiss, D (2004). "Study on cell survival, induction of apoptosis and micronucleus formation in SCL-II cells after exposure to the auger electron emitter Tc-99m." International Journal of Radiation and Biology **80**(11-12): 875-880.
- Mairs, R. F., Natasha; Zalutsky, Michael; Boyd, Marie (2007). "Targeted Radiotherapy: Microgray Doses and the Bystander Effect." Dose-Response **5**: 204-213.
- Mantero, A. C., R; Champion, C; Francis, Z; Guatelli, S; Incerti, S; Mantero, A; Mascialino, B; Moretto, P; Nieminen, P; Tran, H; Villagrasa, C. (2009). "The Geant4-DNA project." Retrieved Julho, 2009, from http://www.inta.es/g4suw2009/docs/Presentations/22_Fri_May_2009/G4SUWS_2009_Mantero_Geant4DNA.pdf.
- Mariani, G. B., Lisa; Adelstein, S; Kassis, Amin; (2000). "Emerging Roles for Radiometabolic Therapy of Tumors Based on Auger Electron Emission." The Journal of Nuclear Medicine **41**(9): 1519-1521.
- Marques, F. P., António; Campello, Maria; Lacerda, Sara; Vitor, Rute; Gano, Lurdes; Delgado, Rita; Santos, Isabel (2005). "Radiopharmaceuticals for Targeted Radiotherapy." Radiation Protection Dosimetry **116**: 601-604.
- Metropolis, N. (1987). "The Beginning of the Monte Carlo Method." Los Alamos Science(Special Issue): 125-130.
- NCBI. (2004). "What is a Cell?" A Science Primer Retrieved 23 May 2008, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/genetics_cell.html.
- Nikjoo, H. O. N., P; Wilson, E; Goodhead, D (2001). "Computational Approach for Determining the Spectrum of DNA Damage Induced by Ionizing Radiation." Radiation Research **156**: 577-583.

- Nikjoo, H. O. N., P; Wilson, E; Goodhead, D; Terrissol, M (1997). "Computational modelling of low-energy electron-induced DNA damage by early physical and chemical events." International Journal of Radiation and Biology **71**(5): 467-483.
- O'Donnell, R. (2006). "Nuclear Localizing Sequences: An Innovative Way to Improve Targeted Radiotherapy." The Journal of Nuclear Medicine **47**(5): 738-739.
- O'Donoghue, J. and T. Wheldon (1996). "Targeted radiotherapy using Auger electron emitters." Physics in Medicine and Biology **41**: 1973-1992.
- Pedraza-López, M. F.-F., G; Mendiola-Cruz, M; Moralez-Ramírez, P (2000). "Assessment of Radiation-Induced DNA Damage Caused by the Incorporation of Tc-99m-Radiopharmaceuticals in Murine Lymphocytes Using Cell Gel Electrophoresis." Mutation Research **465**(1-2): 139-144.
- Pomplun, E. T., M; Kümmerle, E (2006). "Estimation of Radiation Weighting Factor for ^{99m}Tc." Radiation Protection Dosimetry **122**: 80-81.
- Ryan, J. (2008). Introduction to Animal Cell Culture. Technical Bulletin.
- Sachs, R. H., P; Brenner, D (1997). "The link between low-LET dose-response relations and the underlying kinetics of damage production/repair/misrepair." International Journal of Radiation and Biology **72**(4): 351-374.
- Salvat, F. F.-V., José; Sempau, Josep (2003). PENELOPE - A code System for Monte Carlo Simulation of Electron and Photon Transport. Workshop Proceedings - Issy-les-Moulineaux, France, Issy-les-Moulineaux, France.
- Sastry, K. (1992). "Biological Effects of the Auger Emitter Iodine-125: A Review. Report No.1 of AAPM Nuclear Medicine Task Group No.6." Medical Physics **19**(6): 1361-1370.
- Schipper, M. R., Christoph; Seitz, S; Weber, A; Béhé, Martin; Schurrat, T; Schramm, N; Keil, B; Alfke, H; Behr, T (2007). "Efficacy of ^{99m}Tc pertechnetate and ¹³¹I radioisotope therapy in sodium/iodide symporter (NIS)-expressing neuroendocrine tumors in vivo." European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging **34**: 638-650.
- Semenenko, V. and R. Stewart (2004). "A Fast Monte Carlo Algorithm to Simulate the Spectrum of DNA Damages Formed by Ionizing Radiation." Radiation Research **161**: 451-457.
- Semenenko, V. and R. Stewart (2005). "Monte Carlo Simulation of Base and Nucleotide Excision Repair of Clustered DNA Damage Sites. II. Comparisons of Model Predictions to Measured Data." Radiation Research **164**: 194-201.
- Semenenko, V. S., R; Ackerman, E (2005). "Monte Carlo Simulation of Base and Nucleotide Excision Repair of Clustered DNA Damage Sites. I. Model Properties and Predicted Trends." Radiation Research **164**: 180-193.

- Silva, A. (2000). Terra, Universo de Vida. Porto, Porto Editora.
- Sofou, S. (2008). "Radionuclide carriers for targeting of cancer." International Journal of Nanomedicine **3**(2): 181-199.
- Stepanek, J. L., Börje; Weinreich, Regin (1996). "Auger-Electron Spectra of Radionuclides For Therapy and Diagnosis." Acta Oncologica **35**(7): 863-868.
- Stewart, R. (2004). "Computational Radiation Biology." Retrieved December 2008, from <http://rh.healthsciences.purdue.edu/>.
- Suntharalingam, N. P., E; Hendry, J. (2002). "Basic Radiobiology." Chapter 14 Retrieved 30 May 2008, from http://www-naweb.iaea.org/nahu/dmrip/pdf_files/Chapter14.pdf.
- Tavares, A. T., João. (2009). "Princípios Gerais de Culturas de Células e Citometria de Fluxo para Avaliação dos Efeitos da Radiação Ionizante." from http://paginas.fe.up.pt/~tavares/downloads/publications/relatorios/RelInt_AT_JT_07_09.pdf.
- Unak, P. (2002). "Targeted Tumor Radiotherapy." Brazilian Archives of Biology and Technology **45**: 97-110.
- UNSCEAR (2007). Report of the United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation to the General Assembly. U. N. S. C. o. t. E. o. A. Radiation.
- Urashima, T. N., Hatsumi; Wang, Ketai; Adelstein, S; Little, Jonh; Kassis, Amin (2006). "Induction of Apoptosis in Human Tumor Cells After Exposure to Auger Electrons: Comparison with Gamma-Ray Exposure." Nuclear Medicine Biology **33**(8): 1055-1063.
- Watanabe, N. S., Hiroaki; Ogihara-Umeda, Izumi; Tanada, Shuji; Kim, E; Yonekura, Yoshiharu; Sasaki, Yasuhito (2006). "Molecular Therapy of Human Neuroblastoma Cells Using Auger Electrons of ¹¹¹In-Labeled N-myc Antisense Oligonucleotides." The Journal of Nuclear Medicine **47**(10): 1670-1677.
- Woller, J. (1996). "The Basics of Monte Carlo Simulations." Retrieved Julho, 2009, from <http://www.chem.unl.edu/zeng/joy/mclab/mcintro.html>.