

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE FÍSICA E ESCOLA DE ENGENHARIA
CURSO DE ENGENHARIA FÍSICA

HENRIQUE BAUERMANN FONTELES

**ANÁLISE DE DANOS NO DNA DE CÉLULAS DE GLIOMA
INDUZIDOS POR PRÓTONS DE BAIXA ENERGIA: UMA
PROTONTERAPIA MICROSCÓPICA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PORTO ALEGRE
2019

HENRIQUE BAUERMANN FONTELES

**ANÁLISE DE DANOS NO DNA DE CÉLULAS DE GLIOMA
INDUZIDOS POR PRÓTONS DE BAIXA ENERGIA: UMA
PROTONTERAPIA MICROSCÓPICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia Física da UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Luis Grande
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Coorientador: Prof. Dr. Guido Lenz
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

PORTO ALEGRE
2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família por todo o suporte e amor que me deram ao longo desses 5 anos de graduação.

Agradeço a UFRGS por ser uma universidade pública, gratuita e de altíssima qualidade.

Agradeço a CAPES e ao CNPq pelo fomento à pesquisa.

Agradeço ao Prof. Pedro Grande por ter orientado esse projeto e sempre proporcionar discussões importantes e ensinamentos relevantes.

Agradeço ao Prof. Guido Lenz e a Dra. Karine Begnini por terem tido interesse no trabalho, pela co-orientação, por concederem as amostras analisadas e os equipamentos de análise.

Agradeço ao Prof. Johnny Ferraz Dias, ao Prof. Luiz Gustavo Pereira e ao Prof. Gustavo Gil por aceitarem ser da banca avaliadora e sempre estarem dispostos a me ajudar quando necessário.

Um agradecimento muito especial ao Laboratório de Implantação Lônica e seus funcionários Agostinho, Kovalick e Leandro que sempre tiveram boa vontade em me atender e ajudar a resolver os problemas.

Agradeço ao Prof. Rogério Maltez por ter me orientado por 2 anos na iniciação científica e proporcionado muito conhecimento.

Agradeço ao Prof. Cristiano Krug por ter sido o melhor representante possível da COMGRAD e sempre ter feito de tudo e mais um pouco para melhorar o curso de Engenharia Física, além de promover orientações de como se estruturar um trabalho de conclusão de curso.

Agradeço aos meus colegas de graduação que sempre estiveram comigo em todos os momentos e fizeram dessa experiência a melhor possível - Tenho muito orgulho de vocês!

Agradeço ao Júlio, Carina, Juliana, Luísa e Cunha por serem os melhores amigos que eu poderia ter.

Agradeço aos amigos do Discord pela parceria e amizade que sempre demonstraram.

Agradeço a todas as pessoas do grupo HEPSim por terem me ajudado com as simulações e com o entendimento de Geant4.

"A lesson without pain is meaningless. That's because no one can gain without sacrificing something. But by enduring that pain and overcoming it, he shall obtain a powerful, unmatched heart. A fullmetal heart." (Hiromu Arakawa).

RESUMO

FONTELES, Henrique. ANÁLISE DE DANOS NO DNA DE CÉLULAS DE GLIOMA INDUZIDOS POR PRÓTONS DE BAIXA ENERGIA: UMA PROTONTERAPIA MICROSCÓPICA. 2019. 50 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Engenharia Física, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. PORTO ALEGRE, 2019.

O trabalho visa analisar os danos no DNA de células de glioma em cultura induzidos por prótons de baixa energia (2-4 MeV). Com isso, pretende-se entender os mecanismos que estão envolvidos no processo, a interação dos prótons com as células, por que determinado dano ocorre e se há possibilidade de regeneração, mutação ou morte celular. A metodologia baseia-se em mapear ao longo do tempo a evolução do dano em células irradiadas utilizando um microscópio de fluorescência, pois dentro do núcleo dessas células há proteínas fluorescentes marcadoras de danos induzidos no DNA. Cálculos de dose, simulações computacionais e procedimentos experimentais também serão abordados, bem como um aparato experimental construído que possibilita a análise de amostras vivas com o acelerador de partículas.

Palavras-chave: Protonterapia. Danos no DNA. Interação de Prótons com Células Vivas. Análise por Feixe de Íons.

ABSTRACT

FONTELES, Henrique. DNA DAMAGE ANALYSIS OF GLIOMA CELLS INDUCED BY LOW ENERGY PROTONS: A MICROSCOPIC PROTON THERAPY. 2019. 50 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Engenharia Física, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. PORTO ALEGRE, 2019.

This work aims to analyse the DNA damage in glioma cells induced by low energy protons (2-4 MeV). It's intended to understand the mechanisms that are involved in the process, the interaction of protons with the cells, why determined damage occurs and if there is a possibility of regeneration, mutation or cell death. The methodology is based on mapping the damage advancement over time in irradiated cells using a fluorescence microscope, because inside the nucleus of these cells there are fluorescent proteins that work as DNA-induced damage markers. Dose calculations, computational simulations and experimental procedures are also addressed, as well as the construction of a tool that enabled the analysis of living samples with the particle accelerator.

Keywords: Proton Therapy. DNA Damage. Interaction of Protons with Living Cells. Ion Beam Analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa dos centros de CPT presentes no mundo em 2017. Nota-se que majoritariamente os centros estão presentes em países com economia e desenvolvimento tecnológico avançados.	2
Figura 2 – Principais interações de prótons com a matéria. Em (a) ocorre espalhamento inelástico com a eletrosfera do átomo, em (b) espalhamento elástico coulombiano repulsivo com o núcleo do átomo e em (c) reação nuclear não-elástica com o núcleo do átomo alvo resultando na emissão de partículas secundárias.	4
Figura 3 – Dependência das contribuições eletrônica e nuclear para a perda de energia total em função da energia do íon incidente. A equação de Bethe (Equação (3)) descreve bem o comportamento para altas energias. v_1 é a velocidade do íon, v_0 é a velocidade de Bohr e z o número atômico do íon. As linhas tracejadas verticais delimitam a região de médias energias e E_c é a energia na qual a contribuição eletrônica passa a ser mais relevante que a nuclear.	6
Figura 4 – Regimes da perda de energia eletrônica. Para íons com baixas velocidades a perda de energia é proporcional a sua velocidade (região de <i>Lindhard-Scharff</i>), enquanto que para íons com altas velocidades a perda de energia decresce com o aumento da energia cinética (região de <i>Bethe</i>).	6
Figura 5 – Um feixe monoenergético com energia E_0 perde uma quantidade ΔE de energia ao atravessar um alvo fino de espessura Δx . Simultaneamente, ocorre o <i>straggling</i> de energia, alargando a linha espectral em $\pm\delta\Delta E$	7
Figura 6 – Comparação dos perfis de deposição de energia de prótons, íons de carbono e fótons em água. Nota-se que apenas as partículas carregadas apresentam a propriedade do pico de Bragg, que está centrado em aproximadamente 140 mm.	8
Figura 7 – Sobreposição de picos de Bragg com diferentes energias de feixe e intensidades para tratar um tumor espesso.	9
Figura 8 – Simulação de um tumor sendo tratado por fótons (parte superior) e prótons (parte inferior). Cada cor representa uma curva isodose, sendo a amarela a maior dose e a azul clara a menor. A elipse azul mostra o local do tumor alvo	9
Figura 9 – Curva experimental da variação do RBE em função da profundidade em água para um feixe de carbono de 5×10^7 íons/cm ² com 270 MeV, evidenciando o aumento significativo na região do pico de Bragg.	10
Figura 10 – Esquema simplificado do ciclo celular, mostrando as fases G ₀ , G ₁ , S, G ₂ e M.	11
Figura 11 – Distribuição de dose comparando (a) radioterapia com (b) protonterapia.	12

Figura 12 – Ligações de hidrogênio estabelecidas entre as bases nitrogenadas do DNA e suas respectivas estruturas químicas. Atentar para o fato da adenina se ligar com a timina e a guanina com a citosina.	14
Figura 13 – Esquema mostrando as três etapas da radiólise da água. A etapa física consiste em deposições de energia seguida de processos de relaxação rápidos. Isso leva à formação de moléculas de água ionizadas, excitadas e elétrons livres. Na etapa físico-química é onde a maioria dos processos ocorrem, incluindo reações íon-molécula, dissociação devido a relaxação, auto-ionização de moléculas excitadas, etc. Por fim ocorre a etapa química, em que as espécies químicas formadas começam a se difundir no meio e podem, posteriormente, reagir umas com as outras ou com outras moléculas do ambiente químico.	15
Figura 14 – Esquema mostrando, simplificada, como se dá a interação da radiação ionizante com alvos biológicos.	15
Figura 15 – Comparação entre três diferentes modelos de resposta à dose. A linha tracejada representa o patamar em que os efeitos da radiação não são observados e os eixos x e y representam a dose de radiação e os efeitos na saúde, respectivamente.	19
Figura 16 – Interpretação de um dinucleossomo pelo programa. Assim que um arquivo .pdb é carregado, a geometria é convertida na geometria Geant4. Em seguida, a visualização é realizada com algum <i>driver</i> de vídeo compatível (QT, OGL, etc). A visualização padrão dos átomos é feita por esferas utilizando a parametrização de van der Waals. As esferas cinzas representam o carbono (C), as vermelhas o oxigênio (O), as azul-marinho o nitrogênio (N) e as laranjas o fósforo (P).	21
Figura 17 – Arquivo <i>.root</i> gerado pela simulação do exemplo PD4DNA. Os três gráficos gerados são histogramas, sendo o de cima de energia depositada, o de baixo à esquerda de quebras simples e o de baixo à direita de quebras duplas.	22
Figura 18 – Acelerador <i>Tandetron 3 MV</i> do LII-UFRGS.	23
Figura 19 – Perspectiva da peça criada. O modelo 3D foi construído utilizando o software de modelagem <i>Blender</i>	24
Figura 20 – Vistas ortográficas da peça, sendo: vista anterior (a), vista lateral esquerda (b) e vista superior (c). As dimensões foram medidas com um paquímetro digital.	25
Figura 21 – Situação padrão para relacionar a fluência de um feixe de partículas carregadas com a dose física absorvida.	27

Figura 22 – Variação da perda de energia em função da profundidade para prótons de 1,8 MeV em água. Importante notar a profundidade máxima penetrada pelo feixe e a diferença principal entre fótons e partículas carregadas: o pico de Bragg.	29
Figura 23 – Modo como a placa de alumínio foi fixada na peça utilizando fita carbono. Nota-se também que foram feitas marcações para saber qual lado foi irradiado e qual não foi. A peça foi presa com as presilhas do porta amostras da linha de implantação nas extremidades.	32
Figura 24 – Comparação entre o núcleo de células saudáveis e de células danificadas. No segundo grupo, percebe-se uma quantidade muito maior de pontos fluorescentes devido a 53BP1, constatando que as células sofreram danos. A barra de escala corresponde a 25 μm	33
Figura 25 – Quantificação experimental da progressão de dano no DNA de células comparando irradiações de prótons com fótons. O método de determinação de danos utilizado pelo pesquisador foi o ensaio cometa. É interessante observar que os danos começam a ser significativos a partir de duas horas pós-irradiação.	34
Figura 26 – Fotos tiradas no microscópio de fluorescência mostrando as células em cima e seus respectivos núcleos embaixo.	35
Figura 27 – Melhor campo observado que continha o maior número de células em foco. A região observada é o centro do Mylar.	36
Figura 28 – Células observadas após 1 hora depois da irradiação. Pode-se observar, novamente, a dificuldade de focar todas as células de um mesmo campo devido ao Mylar.	36
Figura 29 – Mesmas células da Figura 28 após 5h da irradiação.	37
Figura 30 – Sujeiras encontradas quando as células foram observadas após 24 horas da irradiação.	38
Figura 31 – Mesmas sujeiras encontradas na Figura 30 mostradas como elas fluorescem e ofuscam as células da proximidade.	38
Figura 32 – Modo como a peça foi colocada na linha do acelerador. A placa de alumínio foi refeita de modo a ocupar melhor o espaço.	39
Figura 33 – Foto no visível mostrando as gotículas que possivelmente se aderiram no Mylar devido ao risco de caneta. Importante notar a dificuldade em achar as células dado o grande número de gotículas.	40
Figura 34 – Mesmo campo da Figura 33, porém em fluorescência.	40
Figura 35 – Foto mostrando as células após 2 horas da irradiação. Não se observa danos no DNA até esse momento.	41
Figura 36 – Foto após 24 horas da irradiação. Ainda não são observadas significativas fluorescências que indicam que realmente houve danos.	41

Figura 37 – Foto após 42 horas da irradiação. A alta intensidade de fluorescência sugere que a ação da proteína 53BP1 começou a se manifestar	42
Figura 38 – Método utilizado no cálculo das intensidades de fluorescência do núcleo das células pelo <i>ImageJ</i>	43
Figura 39 – Gráfico mostrando as intensidades de fluorescência média e máxima para cada etapa do experimento considerando uma média de quatro fotos de campos distintos e o desvio padrão associado.	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Discriminação percentual da dose que chega em órgãos próximos de tumor comparando irradiação por fótons com prótons.	12
Tabela 2 – Manifestação macroscópica da radiação ionizante ao interagir com diferentes órgãos a diferentes doses.	17
Tabela 3 – Resumo das quatro principais etapas do ciclo celular, suas atividades e radiossensitividades. A fase G_0 não foi incluída, pois seu comportamento ainda não é bem descrito na literatura em relação a radiosensitividade. . .	18
Tabela 4 – Fatores de peso de radiação para diferentes tipos de radiação.	26
Tabela 5 – Fatores de peso de tecido para diferentes tipos de tecidos/órgãos.	27
Tabela 6 – Intensidade de Fluorescência calculada pelo programa <i>ImageJ</i> na etapa de pré-irradiação. As grandezas estão em unidades arbitrárias.	43
Tabela 7 – Intensidade de Fluorescência calculada pelo programa <i>ImageJ</i> na etapa de 2 horas pós-irradiação. As grandezas estão em unidades arbitrárias.	43
Tabela 8 – Intensidade de Fluorescência calculada pelo programa <i>ImageJ</i> na etapa de 24 horas pós-irradiação. As grandezas estão em unidades arbitrárias.	44
Tabela 9 – Intensidade de Fluorescência calculada pelo programa <i>ImageJ</i> na etapa de 42 horas pós-irradiação. As grandezas estão em unidades arbitrárias.	44
Tabela 10 – Resumo comparativo das quatro etapas do experimento. Foram feitas as médias das grandezas das quatro fotos de cada etapa. As grandezas estão em unidades arbitrárias.	44

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos	2
2 – Fundamentação Teórica	4
2.1 Interação de Prótons com a Matéria	4
2.1.1 Perda de Energia	5
2.1.1.1 <i>Straggling de Energia</i>	7
2.1.2 Pico de Bragg	7
2.1.3 Aspecto Biológico	9
2.2 Mecanismo de Ação da Radiação contra Tumores	11
2.2.1 Os Benefícios da Protonterapia	11
2.3 Efeitos Biológicos da Radiação Ionizante	12
2.3.1 Mecanismos de Interação da Radiação Ionizante	13
2.3.1.1 Mecanismo Direto	13
2.3.1.2 Mecanismo Indireto	13
2.3.2 Danos Provenientes das Radiações Ionizantes e suas Classificações	16
2.3.3 Fatores que Afetam a Interação da Radiação Ionizante	16
2.3.3.1 Fatores Relacionados a Radiação Ionizante	17
2.3.3.2 Fatores Relacionados ao Alvo Biológico	17
2.3.4 Modelos de Resposta à Dose	18
2.4 Geant4	19
2.4.1 O Exemplo PDB4DNA	20
3 – METODOLOGIA	23
3.1 O Acelerador de Partículas	23
3.2 Células Vivas no Vácuo	24
3.2.1 Caracterização da Peça	24
3.3 Dosimetria e Cálculo de Perda de Energia	26
3.4 Amostras Celulares, Preparação de Amostra e Equipamento de Análise	30
3.4.1 Microscópio de Fluorescência	30
3.5 Irradiações e Análise de Danos no DNA	31
4 – Resultados, Conclusões e Perspectivas	35
4.1 Primeira Irradiação	35
4.2 Segunda Irradiação	38
4.3 Conclusões	45

4.4	Perspectivas Futuras	45
	Referências	47

1 INTRODUÇÃO

Estudar formas alternativas e mais eficientes para tratar doenças sempre vai ser alvo de muitas pesquisas ao redor do mundo. Em se tratando de tumores, é um problema crescente, na medida em que a cada ano o número de mortes devido ao câncer aumenta. Em 2015, no Brasil, houve 209.780 mortes, número esse que, ao ser comparado com o de 1998, alcança um aumento de quase 90%, quando o número de mortes foi de 110.799, aponta o Conselho Federal de Medicina (CFM). Expandindo a análise para o mundo todo, a Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC, 2018) informou que, em 2018, 18 milhões de novos casos da doença foram registrados. No mesmo relatório a IARC ainda menciona que um em cada cinco homens e uma em cada seis mulheres desenvolvem a doença na vida adulta, sendo que um em cada oito homens e uma em cada onze mulheres acabam falecendo como causa direta dessa doença.

Com base nos dados apresentados acima, percebe-se que há uma necessidade muito grande em conter o avanço dessa doença que, por muitas vezes, acaba por ser letal. Uma das formas que cientistas encontraram para tentar combater o câncer é a protonterapia, uma terapia que ao invés de fazer uso de radiação eletromagnética (raios X ou raios gama), utiliza partículas carregadas de alta energia.

O descobrimento dessa técnica deu-se em 1946 pelo pesquisador Robert R. Wilson. Desde então, muito se avançou nos princípios físicos que descrevem a terapia com partículas carregadas (CPT)¹, fazendo com que centros especializados fossem abertos em alguns lugares do mundo, como mostra a [Figura 1](#), e ajudassem a tratar pacientes com necessidade.

O maior benefício da protonterapia em relação a radioterapia reside no fato de que o perfil de dose dessas partículas é menos prejudicial para o paciente. Dose é definida como a quantidade de energia depositada por unidade de massa no contexto físico-médico, sendo medida em *Grays* e amplamente utilizada para caracterizar tratamentos contra tumores. Ele é caracterizado por uma baixa deposição de energia na entrada da irradiação e um máximo acentuado próximo ao final do alcance das partículas, seguido por uma queda brusca. Os centros mais modernos e tecnológicos de protonterapia buscam explorar e pesquisar as vantagens desse perfil a fim de realizar um tratamento cada vez menos invasivo, minimizando os danos aos tecidos adjacentes e aumentando a dose no tumor. Já os raios X e gama, possuem um perfil diferente, concentrando a dose perto da entrada e decaindo até atravessar todo o corpo do paciente.

O principal entrave para a terapia com prótons se difundir no mundo todo é o seu alto custo agregado. Para construir um centro especializado em protonterapia é necessária uma quantia monetária muito grande, que varia dependendo do número de salas disponíveis para tratamento e do número de pacientes que podem ser tratados no centro. Um centro

¹Do inglês, *Charged Particle Therapy*.

micrométrica, diretamente observando a interação do prótons com as células tumorais. As irradiações foram conduzidas no Laboratório de Implantação Iônica (LII) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, coordenado pelo Prof. Dr. Pedro Luis Grande e as amostras celulares, bem como os equipamentos de análise, disponibilizados pelo Laboratório de Sinalização Celular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, coordenado pelo Prof. Dr. Guido Lenz. Esse projeto é uma parceria do Instituto de Física com o Instituto de Biociências. Pretende-se com o trabalho iniciar uma nova linha de pesquisa no LII, pois jamais foi feita irradiação em células vivas. Abaixo estão listados sucintamente os principais objetivos do trabalho.

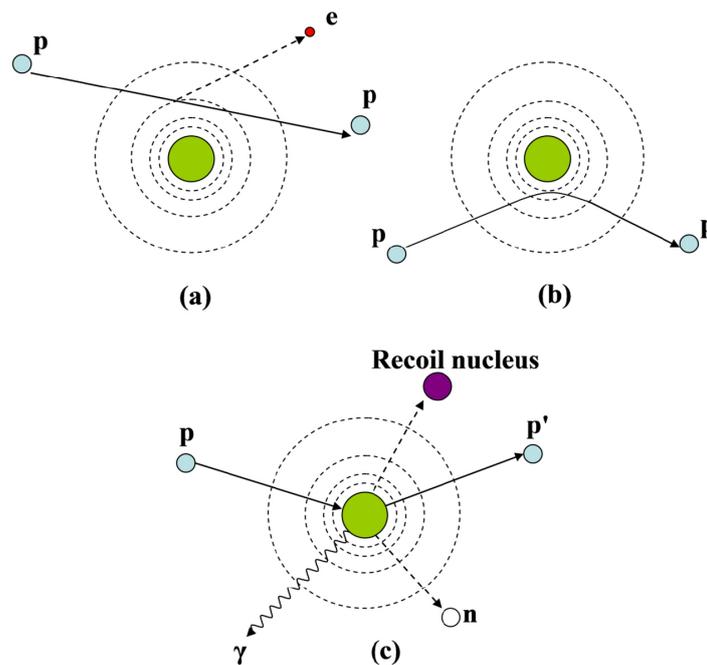
- Criar um aparato experimental para que as células vivas possam sobreviver no vácuo necessário para conduzir os experimentos;
- Analisar os danos no DNA das células em cultura e observar se ocorre regeneração, morte celular ou surgimento de alguma mutação;
- Aprimorar o entendimento da interação de prótons com células vivas;
- Incentivar novas linhas pesquisa no laboratório voltadas para essa área.

2 Fundamentação Teórica

2.1 Interação de Prótons com a Matéria

Prótons interagem majoritariamente por três mecanismos com a matéria: espalhamento inelástico, em que não há conservação de energia cinética, espalhamento elástico, em que há conservação de energia cinética e interações nucleares não-elásticas. Um esquema desses três mecanismos pode ser observado na [Figura 2](#). É de suma importância entender as interações que ocorrem, pois elas ditam o comportamento e a trajetória dessas partículas ao interagirem com um alvo.

Figura 2 – Principais interações de prótons com a matéria. Em (a) ocorre espalhamento inelástico com a eletrosfera do átomo, em (b) espalhamento elástico coulombiano repulsivo com o núcleo do átomo e em (c) reação nuclear não-elástica com o núcleo do átomo alvo resultando na emissão de partículas secundárias.



Fonte: (NEWHAUSER; ZHANG, 2015)

Em uma primeira aproximação, prótons perdem energia cinética continuamente via espalhamentos inelásticos com os elétrons do átomo alvo. Como sua massa de repouso é quase 2000 vezes maior que a do elétron, eles viajam em praticamente uma linha reta, sem ter sua trajetória defletida. Porém, caso passem perto do núcleo, ocorrerá espalhamento elástico, resultando em deflexão de trajetória, pois a massa do núcleo é comparável com a massa do próton. Essas duas interações são as mais comuns, mas ainda existe a probabilidade de ocorrer reação nuclear, isto é, o próton penetrar no núcleo e fazer com ele emita partículas (outro

próton, deutério, trítio, nêutron, etc) e/ou radiação gama. Por fim, radiação *Bremsstrahlung*, que é a emissão de radiação eletromagnética devido ao freamento de partículas carregadas, também é possível, mas seu efeito não é muito relevante (NEWHAUSER; ZHANG, 2015).

2.1.1 Perda de Energia

A perda de energia de íons na matéria é um fator determinante para se entender como se dá sua interação com o meio. Como o íon perde sua energia (E) por unidade de distância percorrida (x) dentro do alvo, a perda de energia em um material, que normalmente é referenciada como poder de freamento ou força de freamento, é definida como dE/dx . No contexto médico a perda de energia também é chamada de LET¹.

Um íon energético percorrendo um material perde sua energia principalmente via dois processos considerados independentes: perda de energia nuclear e perda de energia eletrônica. Logo, o poder de freamento pode ser separado em poder de freamento nuclear e poder de freamento eletrônico. Portanto, pode-se escrever a perda de energia total (S), como sendo:

$$S = \left(\frac{dE}{dx}\right) = \left(\frac{dE}{dx}\right)_n + \left(\frac{dE}{dx}\right)_e = S_n + S_e, \quad (1)$$

onde o subíndice n indica a perda de energia nuclear e o subíndice e indica a perda de energia eletrônica.

Além disso, pode-se associar o poder freamento com a densidade do material alvo (ρ), dando origem a grandeza chamada de *Stopping Cross Section*, como mostra a Equação (2).

$$\frac{S}{\rho} = -\frac{1}{\rho} \frac{dE}{dx} \quad (2)$$

A independência do freamento nuclear e do freamento eletrônico sugere que o poder de freamento total seja extremamente dependente da energia do íon, ou de sua velocidade, pois a energia é praticamente toda cinética. A Figura 3 mostra os dois regimes comentados em função da energia do íon e a relação com sua velocidade.

O poder de freamento nuclear domina para baixas energias, enquanto que para altas energias, o eletrônico é mais influente. A perda de energia eletrônica começa a dominar a partir da energia crítica (E_c), alcança um máximo e decai até chegar na região de *Bethe*, que governa o comportamento para altas energias. A Figura 4 mostra uma ampliação na região do freamento eletrônico e a Equação (3) descreve a *stopping cross section* para altas energias (fórmula de *Bethe*). Para prótons a região de baixas energias corresponde a até 100 keV e a região de *Bethe* a partir de 300 keV, aproximadamente.

$$\frac{S}{\rho} = -\frac{dE}{\rho dx} = 4\pi N_A r_e^2 m_e c^2 \frac{Z z^2}{A \beta^2} \left[\ln \frac{2m_e c^2 \gamma^2 \beta^2}{I} - \beta^2 - \frac{\delta}{2} - \frac{C}{Z} \right] \quad (3)$$

Onde N_A é o número de Avogadro, r_e é o raio de interação clássico do elétron, considerando-o o vo m_e é a massa do elétron, z é a carga do íon incidente, Z é o número atômico do material

¹Do inglês, *Linear Energy Transfer*

Figura 3 – Dependência das contribuições eletrônica e nuclear para a perda de energia total em função da energia do íon incidente. A equação de Bethe (Equação (3)) descreve bem o comportamento para altas energias. v_1 é a velocidade do íon, v_0 é a velocidade de Bohr e z o número atômico do íon. As linhas tracejadas verticais delimitam a região de médias energias e E_c é a energia na qual a contribuição eletrônica passa a ser mais relevante que a nuclear.

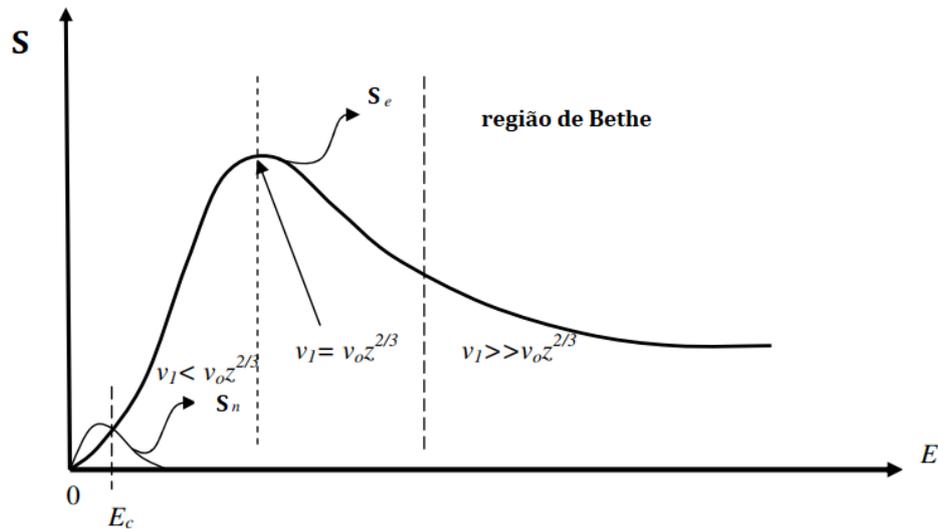
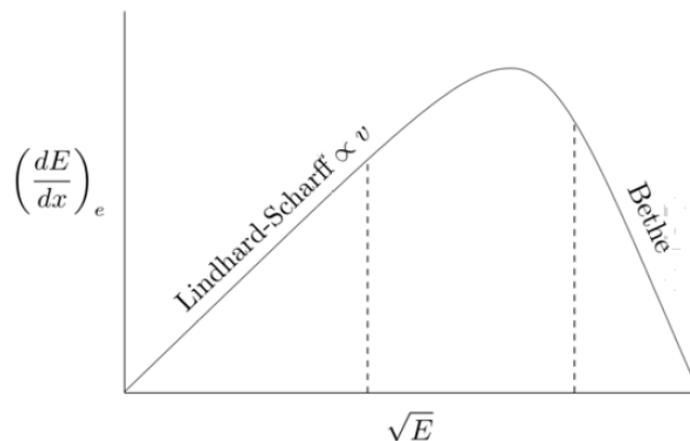


Figura 4 – Regimes da perda de energia eletrônica. Para íons com baixas velocidades a perda de energia é proporcional a sua velocidade (região de Lindhard-Scharff), enquanto que para íons com altas velocidades a perda de energia decresce com o aumento da energia cinética (região de Bethe).



Fonte: (BACKMAN, 2012)

alvo, A é o peso atômico do material alvo, c é a velocidade da luz no vácuo, $\beta = \frac{v}{c}$, onde v é a velocidade do íon incidente, $\gamma = (1 - \beta^2)^{-\frac{1}{2}}$, I é o potencial médio de excitação do material alvo, δ é a correção da densidade levando em conta o efeito de blindagem dos elétrons, que é importante para altas energias e C é o fator de correção devido às camadas eletrônicas, que é importante para baixas energias, quando a velocidade do íon incidente é próxima da velocidade dos elétrons do material alvo. O físico Felix Bloch também deu uma contribuição importante

para fórmula acima, mostrando que o potencial médio de excitação pode ser aproximado por

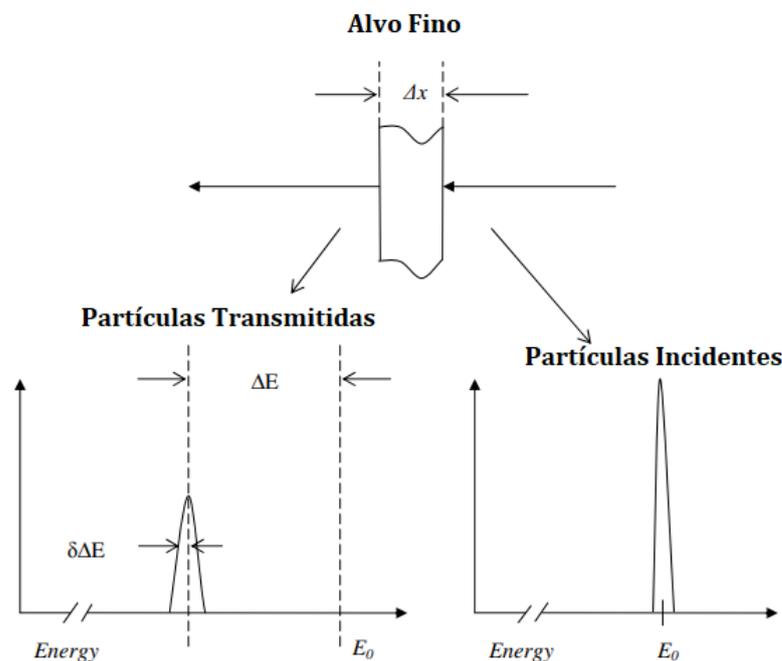
$$I = (10eV) \times Z \quad (4)$$

Substituindo esse valor na [Equação \(3\)](#), tem-se a famosa fórmula de *Bethe-Bloch*.

2.1.1.1 *Stragglings* de Energia

Íons energéticos penetrando em um material perdem sua energia por diversas interações com os átomos do alvo, o que acaba resultando em flutuações estatísticas. Isso implica que íons idênticos com a mesma energia inicial possuem diferentes energias finais ao atravessar uma profundidade Δx de um mesmo material. Logo, a quantidade de energia que o íon perdeu (ΔE) está sujeita a flutuações. Essa natureza discreta dos processos de perda de energia, resultando em incerteza na própria energia e na sua propagação, é conhecida como *stragglings* e é retratada na [Figura 5](#).

Figura 5 – Um feixe monoenergético com energia E_0 perde uma quantidade ΔE de energia ao atravessar um alvo fino de espessura Δx . Simultaneamente, ocorre o *stragglings* de energia, alargando a linha espectral em $\pm \delta \Delta E$.

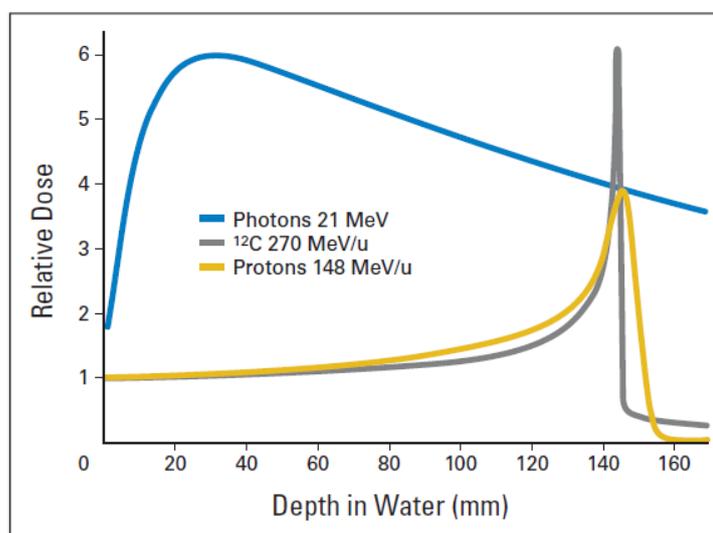


2.1.2 Pico de Bragg

A diferença mais proeminente de um feixe de partículas carregadas comparado a um feixe de fótons é o perfil de dose. Para feixes de fótons há um aumento da energia depositada nos primeiros centímetros do tecido, seguido de um máximo e um decaimento exponencial. Já para partículas carregadas o perfil é completamente diferente. Na entrada a deposição de energia

é relativamente baixa, seguindo assim até um máximo bastante acentuado (Pico de Bragg) e logo decaindo a praticamente zero. Para íons mais pesados, como, por exemplo, o carbono, existe ainda uma pequena parcela de energia, após o pico de Bragg, a ser depositada, decorrente de reações nucleares com o alvo que produzem partículas mais leves. Essas partículas possuem alcance maior comparado as partículas primárias (SCHOLZ, 2000). A Figura 6 compara os perfis de dose de prótons, íons de carbono e fótons.

Figura 6 – Comparação dos perfis de deposição de energia de prótons, íons de carbono e fótons em água. Nota-se que apenas as partículas carregadas apresentam a propriedade do pico de Bragg, que está centrado em aproximadamente 140 mm.

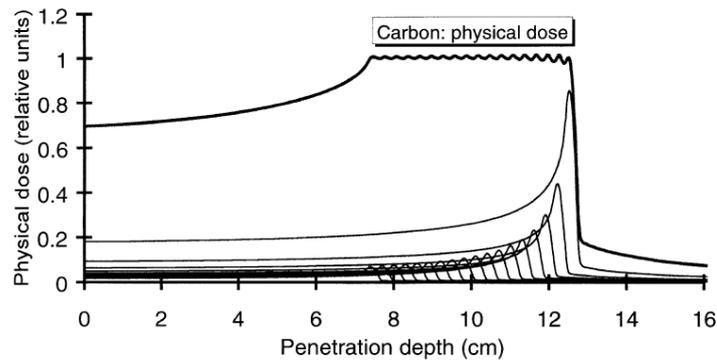


Fonte: (SCHULZ-ERTNER; TSUJII, 2007)

A espessura de um único pico de Bragg é muito estreita para tratar tumores com dimensões típicas de alguns centímetros. Logo, múltiplos picos devem ser sobrepostos para que o tumor inteiro receba a dose necessária. Essa variação de onde o pico estará posicionado pode ser atingida utilizando diferentes materiais absorvedores na frente do feixe, alterando a sua energia, ou até mesmo com uma combinação de ambos (SCHOLZ, 2000). A Figura 7 mostra justamente a sobreposição dos picos e a sua resultante para uma tratamento com íons de carbono.

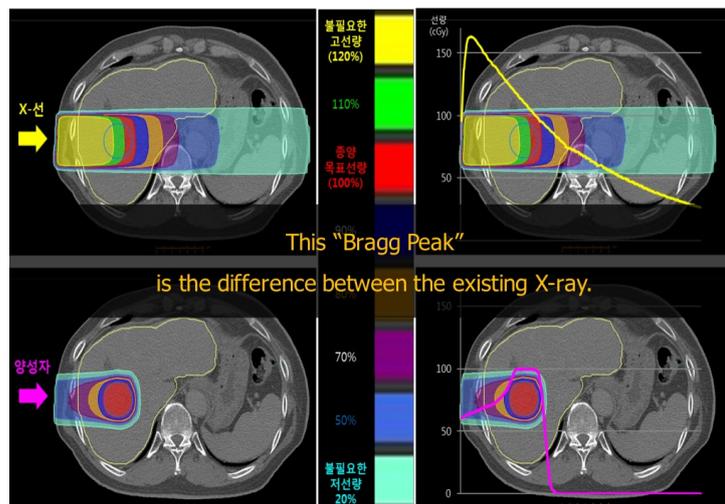
O fato da maior quantidade de energia estar sendo depositada no tumor faz com que os tecidos adjacentes não sejam tão afetados como são na radioterapia, resultando num tratamento menos tóxico e invasivo para o paciente. A Figura 8 mostra uma simulação do tratamento de um tumor por fótons e por prótons. Cada cor representa uma curva isodose, isto é, com a mesma dose sendo aplicada e a elipse azul representa o tumor alvo. Claramente, pode-se observar que a dose que chega no tumor é um pouco maior na radioterapia do que na protonterapia, porém as doses nos canais de entrada e saída são substancialmente menores no tratamento com prótons. Isso mostra que a quantidade de regiões que não deveriam receber radiação é muito menor, resultando em menos danos ao paciente.

Figura 7 – Sobreposição de picos de Bragg com diferentes energias de feixe e intensidades para tratar um tumor espesso.



Fonte: (SCHOLZ, 2000)

Figura 8 – Simulação de um tumor sendo tratado por fótons (parte superior) e prótons (parte inferior). Cada cor representa uma curva isodose, sendo a amarela a maior dose e a azul clara a menor. A elipse azul mostra o local do tumor alvo



Fonte: (CENTER, 2015)

2.1.3 Aspecto Biológico

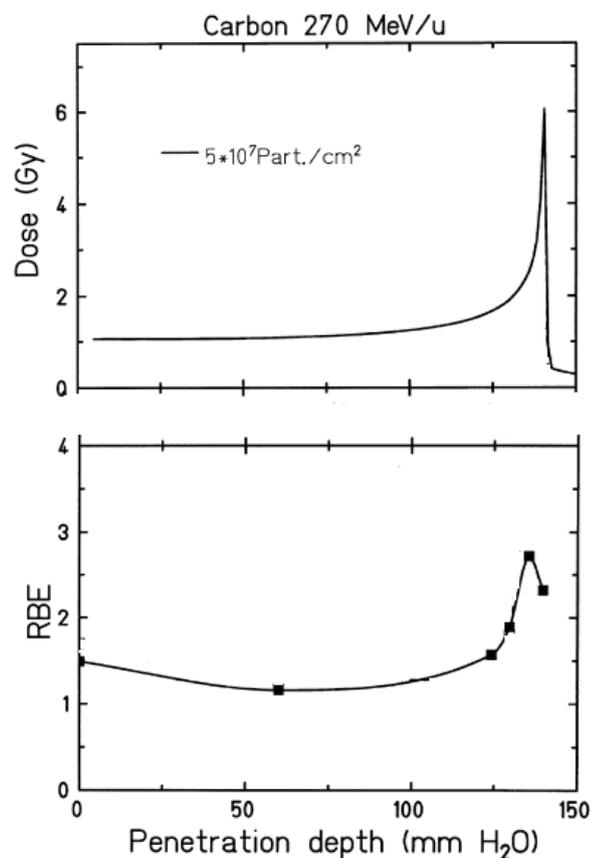
Um outra vantagem de partículas carregadas frente a fótons é a sua maior eficiência biológica, em particular na região do pico de Bragg, ou seja, no próprio tumor. Essa maior eficiência é devido ao padrão microscópico de deposição de dose pelas partículas. Enquanto que fótons depositam sua energia aleatoriamente, distribuindo-a, então, de uma maneira praticamente homogênea ao longo do meio, íons depositam uma grande fração de sua energia em uma região em torno de sua trajetória. A dose local segue uma lei $1/r^2$, centrada na trajetória, até um raio máximo que depende da energia do íon. O fato da eficiência ser maior para um feixe de partículas carregadas é explicado justamente pela deposição concentrada e localizada de energia (SCHOLZ, 2000).

Normalmente, a eficiência biológica é descrita em termos da eficiência biológica relativa (RBE^2). Ela é definida como sendo a razão entre as doses necessárias para produzir um determinado efeito biológico com fótons e com partículas carregadas, respectivamente:

$$RBE = \frac{D_{\gamma}}{D_{Ion}} \quad (5)$$

Como a distribuição local de dose na trajetória da partícula depende da sua energia, o RBE varia dependendo da profundidade, como mostra a [Figura 9](#). Na entrada percebe-se que o RBE é relativamente pequeno, mas na região do pico de Bragg ele aumenta consideravelmente, devido a alta perda de energia nessa região, ou seja, alta dose local. Como a dose efetiva biológica (BED^3) é dada pelo produto da dose física e do RBE, a já alta concentração de dose no pico de Bragg torna-se ainda mais alta nessa análise. Vale ressaltar que o RBE não é função unicamente do tipo de radiação, mas também de qual tecido ou organismo que a radiação está interagindo.

Figura 9 – Curva experimental da variação do RBE em função da profundidade em água para um feixe de carbono de 5×10^7 íons/cm² com 270 MeV, evidenciando o aumento significativo na região do pico de Bragg.



Fonte: Adaptado de ([SCHOLZ, 2000](#))

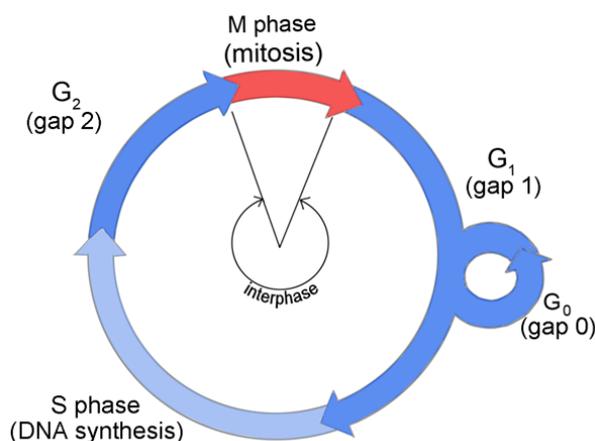
²Do inglês, *Relative Biological Effectiveness*

³Do inglês, *Biological Effective Dose*

2.2 Mecanismo de Ação da Radiação contra Tumores

O principal mecanismo que faz com que radiação seja usada para tratar tumores é o dano causado no DNA das células cancerígenas. Esse dano pode ser causado por fótons de alta energia (radioterapia) ou por partículas carregadas (CPT). O princípio biológico é o mesmo para os dois casos: células tumorais estão em constante atividade celular, isto é, realizam o ciclo celular muito mais vezes do que células somáticas regulares. O ciclo celular é composto pelas fases G_0 , G_1 , S, G_2 e M, nessa ordem, podendo ser observado na [Figura 10](#). Na fase G_2 o material genético está compactado na forma de cromossomos, fazendo com que as enzimas reparadoras de danos não consigam realizar a sua função, ou seja, nessa fase o DNA está mais suscetível a radiação, ou mais radiosensível. Portanto, células que estão em maior atividade estão mais sujeitas a terem seu DNA afetado e, conseqüentemente, sofrerem morte celular. Esse é o motivo pelo qual células saudáveis são menos afetadas do que células cancerígenas no tratamento envolvendo radiação, pois possuem atividade menor e passam menos tempo na fase G_2 .

Figura 10 – Esquema simplificado do ciclo celular, mostrando as fases G_0 , G_1 , S, G_2 e M.



Fonte: (BRIDGE, 2000)

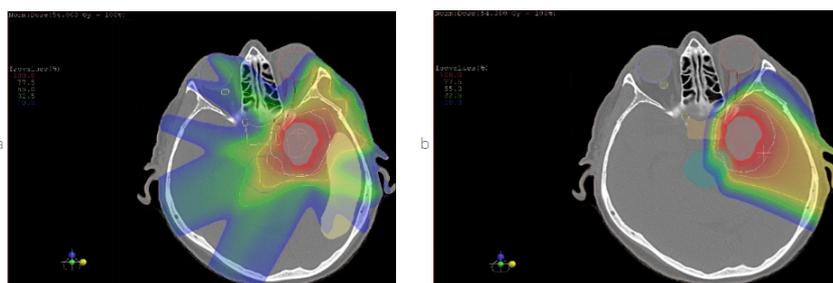
Partículas carregadas normalmente causam danos via deposição direta de energia, enquanto que fótons majoritariamente geram radicais livres, que por sua vez acabam danificando as fitas de DNA das células. A interação da radiação com o DNA será melhor explicada na [Seção 2.3](#).

2.2.1 Os Benefícios da Protonterapia

A maior vantagem da protonterapia em relação a radioterapia é a melhor distribuição de radiação, devido a propriedade do Pico de Bragg, que faz com boa parte da dose seja entregue diretamente no alvo e não se espalhe para tecidos adjacentes. Com isso, melhores resultados podem ser alcançados, pois doses mais elevadas podem ser aplicadas sem induzir efeitos

secundários graves no paciente e sem aumentar o nível de toxicidade da terapia. Na [Figura 11](#) há uma simulação da distribuição de dose comparando a radioterapia e a protonterapia. Percebe-se claramente que em (b) a distribuição é muito mais localizada do que em (a), demonstrando como a protonterapia consegue concentrar a dose em poucas regiões. Ainda sobre a mesma simulação, a [Tabela 1](#) discrimina o percentual da dose que chegou em cada órgão perto do tumor alvo. Com os resultados, mostra-se que realmente o percentual da dose nas regiões além do tumor é maior quando a radioterapia é utilizada.

Figura 11 – Distribuição de dose comparando (a) radioterapia com (b) protonterapia.



Fonte: ([CENTER, 2016](#))

Tabela 1 – Discriminação percentual da dose que chega em órgãos próximos de tumor comparando irradiação por fótons com prótons.

	IMRT (Fótons)	IMPT (Prótons)
Alvo (Tumor Cerebral)	60 Gy (100%)	60 Gy (100%)
Cérebro - Dose Média	35,7 Gy (59,5%)	25,9 Gy (43,1%)
Tronco Cerebral - Dose Média	18,6 Gy (31%)	5,3 Gy (8,8%)
Olho Direito - Dose Média	28,3 Gy (47,2%)	9,7 Gy (16,2%)

Fonte: ([CENTER, 2016](#))

Em suma, tumores cerebrais são um dos tipos de tumores mais tratados por protonterapia, pois necessitam de altas doses aplicadas. Os resultados do tratamento por prótons são superiores ao tratamento por fótons em cânceres de grau 2-3⁴ ([RONSON BRIAN B. SCHULTE, 2006](#)) ([PETIT et al., 2008](#)). Além disso, os efeitos adversos são mais brandos, pois a dose é mais concentrada e não se espalha tanto para tecidos saudáveis.

2.3 Efeitos Biológicos da Radiação Ionizante

Ionização é o processo em que elétrons são arrancados do átomo após expostos a algum fator externo, seja alta temperatura, descargas elétricas, partículas carregadas, radiações

⁴ Grau 2-3 refere-se a velocidade de crescimento do tumor e à possibilidade de diferenciá-lo de células normais. Essa escala vai de 1-4 ([EDGE; COMPTON, 2010](#)).

eletromagnéticas, etc. Cunha-se o nome de radiação ionizante àquela radiação capaz, então, de tornar o átomo um íon. Dentre elas, estão: raios X, raios γ , partículas α , prótons, partículas β , entre outras. As fontes de radiações ionizantes podem ser naturais (raios cósmicos e materiais radioativos em rochas, como o potássio-40) ou devido a ação humana (usinas nucleares e fontes de radiação para a medicina). Os efeitos biológicos da radiação ionizante são variados e dependem de diversos fatores, sendo normalmente danosos para o organismo humano.

2.3.1 Mecanismos de Interação da Radiação Ionizante

Radiações ionizantes causam danos em tecidos e estruturas biológicas devido a principalmente dois mecanismos: direto e indireto. Um fluxograma ilustrativo pode ser observado na [Figura 14](#). O principal alvo é o DNA, um composto orgânico que possui uma estrutura de dupla hélice composta por duas fitas mantidas juntas por ligações de hidrogênio, pois caso haja alguma alteração em sua estrutura química diversas complicações podem ocorrer, como: morte celular, mutação, carcinogênese, etc. A principal composição dessa macromolécula é uma cadeia de agrupamentos fosfato e de açúcares que se alternam. Todos os DNA's possuem a mesma estrutura, a mudança é na sequência das bases nitrogenadas. Existem quatro tipos de bases: citosina, guanina, timina e adenina. A citosina e a guanina são ligadas entre si por três ligações de hidrogênio, enquanto que a adenina e a timina são ligadas por duas. Combinações diferentes dessas duas comentadas são impossíveis, pois há incompatibilidade espacial para que as ligações de hidrogênio possam ser estabelecidas. As ligações entre as bases nitrogenadas e suas respectivas estruturas podem ser observadas na [Figura 12](#).

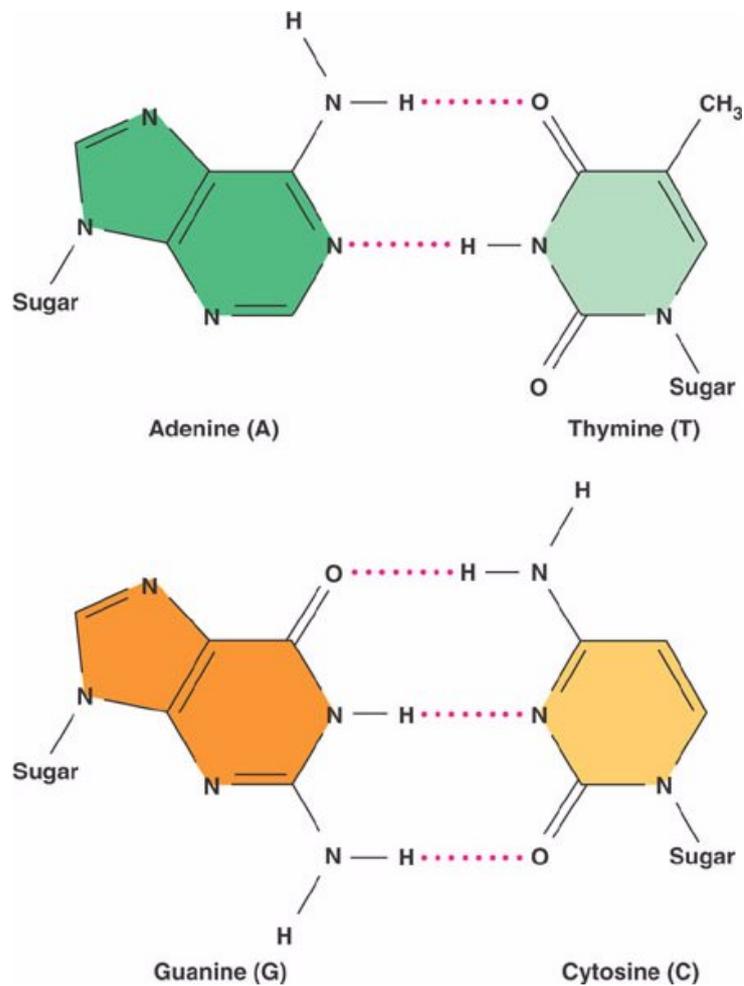
2.3.1.1 Mecanismo Direto

A teoria do mecanismo direto propõe que a interação da radiação ionizante com a estrutura biológica é dada diretamente com os átomos. Todos os átomos e moléculas dentro da célula, como enzimas, proteínas estruturais e RNA estão suscetíveis a sofrer danos devido a radiação, porém é o DNA o principal alvo, no qual a radiação produz quebras simples ou duplas nas fitas ([ELGAZZAR; KAZEM, 2006](#)). As quebras duplas são muito mais prejudiciais às células e as simples normalmente conseguem ser reparadas ([VYŠÍN et al., 2015](#)).

2.3.1.2 Mecanismo Indireto

A teoria do mecanismo direto era insuficiente para explicar todos os danos celulares causados pela radiação ionizante. Então, a teoria do mecanismo indireto propõe que o dano também pode ser proveniente de radicais oxidativos livres altamente reativos causados pela radiólise de moléculas de água que estão no ambiente celular ao interagirem com a radiação. Esses radicais formados interagem com átomos e moléculas do ambiente celular, principalmente com DNA, para produzir mudanças químicas na sua estrutura e, conseqüentemente, efeitos adversos ([ELGAZZAR; KAZEM, 2006](#)). A [Figura 13](#) mostra um esquema da radiólise da água,

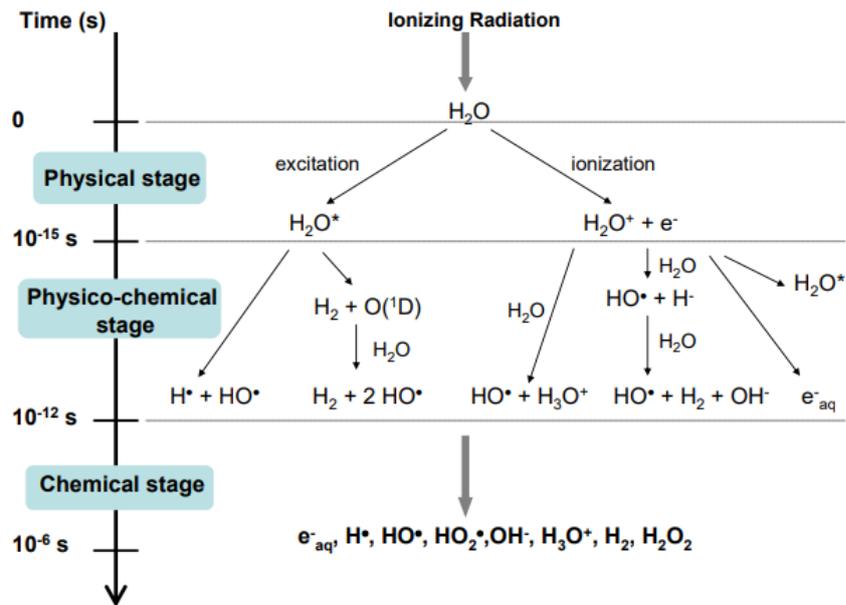
Figura 12 – Ligações de hidrogênio estabelecidas entre as bases nitrogenadas do DNA e suas respectivas estruturas químicas. Atentar para o fato da adenina se ligar com a timina e a guanina com a citosina.



bem como os radicais formados. Foi estimado que, aproximadamente, dois terços do dano biológico causado por radiações ionizantes com baixo valor de LET (raios-X, raios- γ , partículas β) é devido ao mecanismo indireto, ao passo que radiações ionizantes com alto valor de LET (partículas α , prótons) são essencialmente causados pelo mecanismo direto (SAHA, 2001).

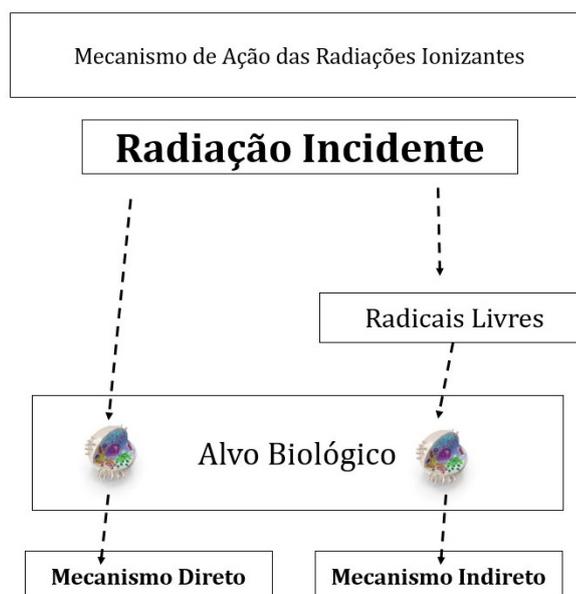
Existem ainda outros 2 fenômenos que constituem o mecanismo indireto. Efeitos da radiação já foram observados em células que não foram diretamente irradiadas. Foi demonstrado que células na proximidade de células irradiadas acabam sofrendo efeitos tardios da radiação. Dois efeitos são os mais estudados na literatura: o efeito *bystander* e a instabilidade genômica (MORGAN, 2003a).

Figura 13 – Esquema mostrando as três etapas da radiólise da água. A etapa física consiste em deposições de energia seguida de processos de relaxação rápidos. Isso leva à formação de moléculas de água ionizadas, excitadas e elétrons livres. Na etapa físico-química é onde a maioria dos processos ocorrem, incluindo reações íon-molécula, dissociação devido a relaxação, auto-ionização de moléculas excitadas, etc. Por fim ocorre a etapa química, em que as espécies químicas formadas começam a se difundir no meio e podem, posteriormente, reagir umas com as outras ou com outras moléculas do ambiente químico.



Fonte: (CAëR, 2011)

Figura 14 – Esquema mostrando, simplificadamente, como se dá a interação da radiação ionizante com alvos biológicos.



O efeito *bystander* ocorre através da interação célula-célula, onde as células diretamente irradiadas comunicam-se com as adjacentes e espalham o efeito da radiação para um maior número de células. Esse efeito também é observado quando células que foram irradiadas são colocadas em um outro meio, fazendo com que as células da vizinhança do novo meio venham a apresentar danos no DNA, mutações e até mesmo carcinogênese. O mecanismo de comunicação ainda não é claramente entendido, mas já foi proposto que seja devido à liberação de citocina, um extenso grupo de moléculas envolvido na emissão de sinais entre as células (FLOETH et al., 2001). O efeito *bystander* é principalmente observado e estudado em radiações com alto valor de LET, como partículas α (IYER; LEHNERT, 2000), mas já foi constatado também para raios-X e raios- γ , que possuem baixo valor de LET.

Foi observado que não apenas as células irradiadas, mas também as descendentes podem apresentar efeitos tardios. Células que suportam danos não-letais no DNA mostram um aumento na taxa de mutação nas células descendentes em várias gerações após a exposição inicial. A esse fenômeno dá-se o nome de instabilidade genômica. Efeitos tardios observados incluem morte reprodutiva até seis gerações após a irradiação (MORGAN, 2003b).

2.3.2 Danos Provenientes das Radiações Ionizantes e suas Classificações

Os efeitos radiobiológicos podem ser separados, inicialmente, em duas categorias: estocásticos e determinísticos. Os efeitos estocásticos são aqueles que não possuem um limiar de dose para ocorrer, pois são de natureza probabilística. Apesar de não haver um limiar de dose, quanto maior ela for, maior é a chance do dano ocorrer. Esses danos normalmente são caracterizados por pequenas exposições em grandes períodos de tempo, podendo causar câncer e mudança do código genético. Os determinísticos são pautados por um limiar de dose, isto é, o efeito só vai ocorrer se o limiar for ultrapassado. Assim como os estocásticos, quanto maior for a dose, maior é a magnitude do efeito. Queimadura, náusea, necrose e hemorragia são apenas alguns exemplos de danos determinísticos, podendo chegar até a morte (AGGARWAL, 2014).

Além dessa classificação, os danos podem ser também classificados como somáticos ou hereditários. Os somáticos são aqueles devido a irradiação de um tecido específico, ou seja, afeta apenas a pessoa alvo. Os efeitos hereditários, por sua vez, ocorrem quando células gaméticas, responsáveis pela reprodução, sofrem algum dano, que pode acabar por se manifestar em descendentes da pessoa alvo. A Tabela 2 mostra o efeito macroscópico da radiação ionizante em diferentes órgãos com diferentes doses.

2.3.3 Fatores que Afetam a Interação da Radiação Ionizante

O dano devido a radiação pode ser modificado por fatores que dependem tanto da radiação ionizante interagente, quanto do tecido/órgão alvo.

Tabela 2 – Manifestação macroscópica da radiação ionizante ao interagir com diferentes órgãos a diferentes doses.

Dose (Gy)	Órgão	Efeito
1,5 - 2,0	Ovários	Esterilidade Temporária.
2,5 - 6,0	Ovários	Esterilidade Permanente.
5,0	Olhos	Catarata (após 5 - 10 anos).
6,0	Pele	Eritemas/Depilação.
10,0 - 20,0	Pele	Queimaduras, Necrose, Perda de Cabelo, etc.

Fonte: (AGGARWAL, 2014)

2.3.3.1 Fatores Relacionados a Radiação Ionizante

O primeiro fator é justamente a natureza da radiação, pois elas diferem no valor do LET. Altos valores de LET fazem com a radiação penetre pouco na matéria, como no caso de partículas α , e baixos valores de LET levam a grandes alcances, como raios X. O modo de administração da dose e a taxa de dose também são dois fatores importantes, pois há bastante diferença se o alvo receber a dose inteira em uma única vez, ao invés de fracioná-la em sessões. Quanto mais sessões forem realizadas para um mesmo valor de dose, maior é a probabilidade de haver reparação celular e menor é o dano (ELGAZZAR; KAZEM, 2006).

2.3.3.2 Fatores Relacionados ao Alvo Biológico

Algumas propriedades de células e tecidos podem, significativamente, modificar os efeitos biológicos da radiação ionizante. Os três fatores mais estudados são: radiosensibilidade, fase do ciclo celular e grau de oxigenação do tecido.

Radiossensibilidade. Embora todas as células possam ser afetadas pela radiação ionizante, células somáticas e seus respectivos tumores variam na sensibilidade a radiação. A radiosensibilidade varia com a taxa de mitose celular e em que etapa da vida a célula se encontra. Células sanguíneas em formação são muito suscetíveis a radiação, enquanto que neurônios são muito resistentes, por exemplo. Quando células que estão nas fases G_0/G_1 são expostas a radiação ionizante, elas tendem a interromper a progressão para as fases G_2/M (ELGAZZAR; KAZEM, 2006).

Fase do Ciclo Celular. O ciclo celular é composto por diversas fases: a pré-síntese de DNA (G_1), a fase de síntese de DNA (S), a pós-síntese de DNA (G_2), a mitose (M) e a fase de não crescimento (G_0), que representa o tempo após a mitose até o início da fase G_1 novamente. Todas as fases do ciclo celular podem ser afetadas pela radiação ionizante, porém cada fase possui uma radiosensibilidade diferente. Na maior parte das vezes a sensibilidade é maior na fase G_2 , onde irradiações durante essa fase acabam por retardar o início da divisão celular. Irradiações na mitose (M) induzem aberrações cromossômicas, isto é, quebras simples ou duplas nas fitas de DNA. Além disso, a sensibilidade de uma fase do ciclo celular pode também variar em relação ao tipo de célula que está sendo estudado (SAHA, 2001). A recuperação de danos

não-letais pode ocorrer em qualquer etapa do ciclo celular, porém é mais pronunciada na fase S (WARD, 1988). A fase S é considerada a mais radorresistente, porque as enzimas que realizam o processo de reparação de dano no DNA estão em atividade máxima, minimizando os danos induzidos por radiação. Durante as fases G₂ e M, o DNA está na forma de cromossomos, fazendo com que as enzimas de reparação tenham dificuldade de operar, levando a uma maior radiosensibilidade. A Tabela 3 resume as principais fases do ciclo celular e suas respectivas radiosensibilidades.

Tabela 3 – Resumo das quatro principais etapas do ciclo celular, suas atividades e radiosensibilidades. A fase G₀ não foi incluída, pois seu comportamento ainda não é bem descrito na literatura em relação a radiosensibilidade.

Fase	Intervalo de Tempo Relativo	Atividade Principal	Radiosensibilidade
M	5 - 10%	Divisão Celular	Alta
G1	10 - 50%	Preparação para a Síntese de DNA	Moderada
S	30 - 50%	Síntese de DNA	Mínima
G2	15 - 25%	Preparação para a Mitose	Alta

Fonte: (PAWLIK; KEYOMARSI, 2004)

Grau de Oxigenação do Tecido. Oxigênio molecular é conhecido por ser um agente que potencializa a resposta a radiação, esse fenômeno é conhecido como efeito oxigênio. Ele é especialmente importante para radiações que causam danos a partir do mecanismo indireto. Essa potencialização do dano deve-se ao fato do oxigênio ser necessário para fixar ou tornar permanente o dano, sem ele os danos no DNA são mais facilmente reparados. Além disso, a sua presença aumenta também o número de radicais oxidativos livres danosos para a célula. A quantificação desse efeito é dada pela *OER*⁵, e pode ser calculada pela equação abaixo

$$OER = \frac{Dose_{anoxic}}{Dose_{oxic}}, \quad (6)$$

onde o primeiro termo é a dose em condições com pouco oxigênio e o segundo termo é a dose em condições com bastante oxigênio. A *OER* é sempre usada como um fator comparativo para um mesmo efeito biológico. Foi constatado na literatura que para radiações de baixo valor de LET a *OER* possui um valor que varia entre 2,5-3,0, isto é, quase três vezes mais células morrem em ambientes que possuem maior concentração de oxigênio, comparado a ambientes com pouco oxigênio. Radiações que depositam sua energia pelo mecanismo direto possuem *OER* aproximadamente igual a 1, levando a conclusão de que o grau de oxigenação do tecido não é um fator de grande influência para esses tipos de radiação (LIVESEY; REED, 1987).

2.3.4 Modelos de Resposta à Dose

Existe uma variedade de modelos que busca prever as relações entre a dose de radiação e o efeito biológico causado em uma exposição. A diferença dos modelos surge a partir de

⁵Do Inglês, *Oxygen Enhancement Ratio*

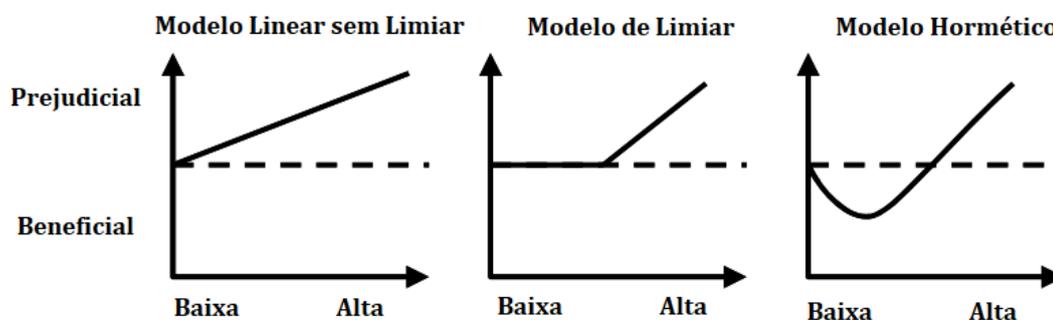
diferentes premissas pensadas em cada um deles. Abaixo estão três modelos simplificados de resposta à dose partindo de três premissas diferentes e a [Figura 15](#) ilustra-os.

Modelo Linear sem Limiar. Esse modelo assume que qualquer nível de radiação é danoso e o risco aumenta linearmente com o aumento da dose. Normalmente é usado para modelar proteção radiológica, pois limita o risco de trabalhadores em locais que possuem radiação ([ELGAZZAR; KAZEM, 2006](#)).

Modelo de Limiar. Assim como no modelo anterior, esse também assume que o risco da radiação aumenta linearmente com a dose, porém ela só começa a ser realmente danosa a partir de um limiar excedido. Abaixo desse limiar não é para se esperar nenhum risco ([ELGAZZAR; KAZEM, 2006](#)).

Modelo Hormético. Nesse modelo, a radiação possui dois efeitos, em que abaixo de um determinado limiar ela é considerada protetiva e apenas acima ela produz efeitos negativos. A teoria do modelo baseia-se no fato de que baixos níveis de radiação induzem mecanismos celulares de proteção, que por sua vez acabam prevenindo danos no DNA que espontaneamente poderiam acontecer devido a algum estresse externo ([FEINENDEGEN; LABORATORY UPTON,](#)).

Figura 15 – Comparação entre três diferentes modelos de resposta à dose. A linha tracejada representa o patamar em que os efeitos da radiação não são observados e os eixos x e y representam a dose de radiação e os efeitos na saúde, respectivamente.



Fonte: Adaptado de ([ELGAZZAR; KAZEM, 2006](#))

2.4 Geant4

Geant4 é um *toolkit* para simular a passagem de partículas pela matéria. Inclui uma gama completa de funcionalidades, englobando desde modelos físicos complexos, a geometrias de detectores, cálculos de propriedades físicas e trajetória de partículas. Foi criado explorando engenharia de software e programação orientada a objetos, sendo sua implementação na linguagem de programação C++. Os códigos são todos baseados em simulações de Monte Carlo. Ele vem sendo utilizado em diversas aplicações, como: física nuclear e de altas energias, projetos de aceleradores, engenharia espacial, física médica, etc ([AGOSTINELLI et al., 2003](#)).

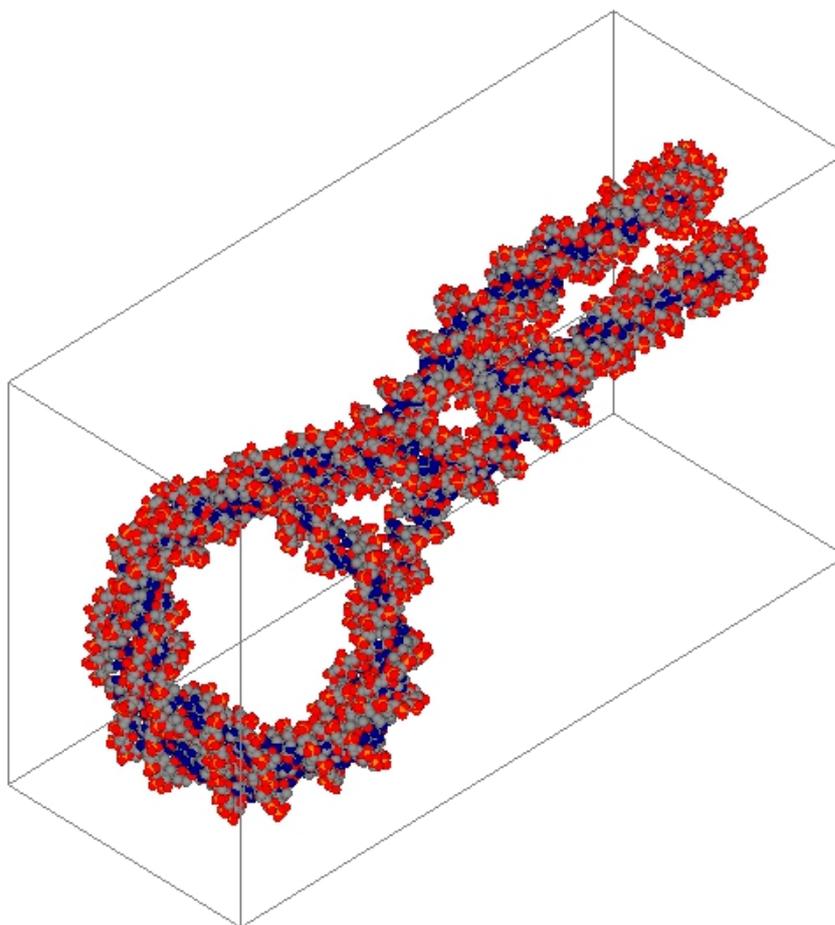
Por ser um programa extremamente eficiente, funcional e livre, e estar, cada vez mais, chamando a atenção de pesquisadores e desenvolvedores, diversos exemplos já foram criados e disponibilizados para a comunidade científica. A parte de física médica e, mais recentemente de DNA (<http://geant4-dna.org/>), vem se estabelecendo como uma das grandes vertentes da ferramenta.

2.4.1 O Exemplo PDB4DNA

O PDB4DNA é um exemplo presente no pacote Geant4 baseado em uma biblioteca C++ independente, livre e de código aberto, chamada PDBlib, que permite o uso da descrição em nível atômico da molécula de DNA nas simulações de Monte Carlo de transporte de partículas do programa. O maior foco desse exemplo é conseguir determinar a quantidade de energia que foi depositada e a quantidade de quebras que houve, sejam elas duplas ou simples. Ou seja, entrando com um arquivo (.pdb), que modela a estrutura biológica desejada, a partícula interagente, sua energia e o número de eventos, o programa simula a quantidade de energia que foi depositada na estrutura e o número de quebras simples e duplas no DNA. O algoritmo para determinar as quebras supõe que se caso haja uma deposição de energia superior a 8,22 eV, ocorre quebra simples, e se em uma distância de 10 pares de bases ocorrer outra quebra simples, uma quebra dupla é computada.

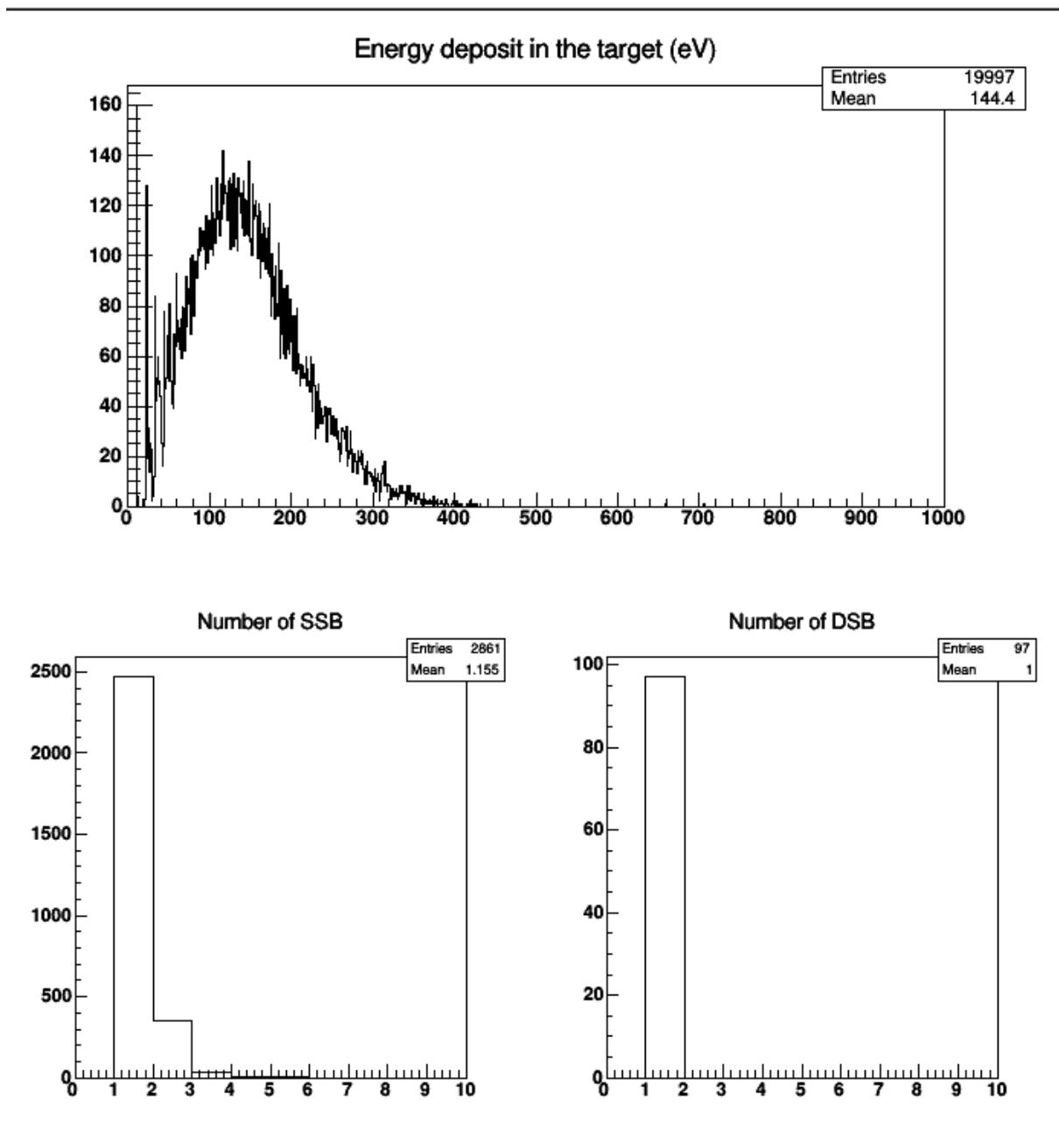
O programa ainda conta com uma interface gráfica para que se possa visualizar a estrutura biológica simulada e os eventos ocorrendo. A [Figura 16](#) mostra um exemplo de como um dinucleossomo é interpretado pelo programa. Depois de feita a simulação, no próprio terminal onde o programa é rodado, já é informado os valores absolutos de energia depositada e do número de quebras, mas além disso um arquivo *.root* é gerado, que possibilita uma análise mais profunda utilizando o software ROOT, desenvolvido pelo CERN, que serve para lidar com o processamento de dados e análise estatística. A [Figura 17](#) mostra as informações que o arquivo de saída possui após feita uma simulação.

Figura 16 – Interpretação de um dinucleossomo pelo programa. Assim que um arquivo .pdb é carregado, a geometria é convertida na geometria Geant4. Em seguida, a visualização é realizada com algum *driver* de vídeo compatível (QT, OGL, etc). A visualização padrão dos átomos é feita por esferas utilizando a parametrização de van der Waals. As esferas cinzas representam o carbono (C), as vermelhas o oxigênio (O), as azul-marinho o nitrogênio (N) e as laranjas o fósforo (P).



Fonte: (DELAGE et al., 2015)

Figura 17 – Arquivo *.root* gerado pela simulação do exemplo PD4DNA. Os três gráficos gerados são histogramas, sendo o de cima de energia depositada, o de baixo à esquerda de quebras simples e o de baixo à direita de quebras duplas.



Fonte: (DELAGE et al., 2015)

3 METODOLOGIA

3.1 O Acelerador de Partículas

Como já mencionado, os experimentos foram realizados no LII-UFRGS utilizando o acelerador de partículas *Tandetron 3 MV*, que foi responsável por gerar os íons H^+ incidentes na amostra. Para a obtenção desses prótons, gás hidrogênio é introduzido numa região com intenso campo magnético, onde ocorre a produção de íons H^- . Os íons gerados pela fonte são injetados no acelerador por um sistema de lentes magnéticas e fendas mecânicas, responsáveis por selecionar os íons de acordo com suas massas e direcioná-los até o terminal positivo do acelerador. Nesse caso os íons negativos são atraídos pelo potencial positivo. Já no terminal positivo, eles perdem seus elétrons em um *stripper* gasoso de gás nitrogênio, tornando-se íons H^+ . Após a aceleração, um sistema de deflexão e focalização direciona-os para uma das linhas experimentais (NIEKRASZEWICZ, 2014). A pressão nas linhas do equipamento é da ordem de 10^{-7} mbar, o que configura alto vácuo. O projeto não visou a detecção de nenhuma partícula, simplesmente a irradiação das células em cultura. Uma foto do acelerador pode ser vista na [Figura 18](#).

Figura 18 – Acelerador *Tandetron 3 MV* do LII-UFRGS.



3.2 Células Vivas no Vácuo

Um dos objetivos do trabalho já foi alcançado: a criação de uma ferramenta para que as células em cultura não morressem ao entrar em um ambiente de alto vácuo na linha do equipamento. Por serem células vivas, elas precisam de ar para sobreviver, ou seja, um ambiente de baixíssima pressão é considerado hostil. A solução pensada foi uma peça metálica de alumínio, construída totalmente na oficina mecânica do LII, fixada com anéis de teflon, que conta com uma janela de Mylar¹ de 8 μm , para que o feixe de prótons possa atravessar sem perder muita energia. A vedação é feita com O-rings e a parte de trás é parafusada com a da frente. A [Figura 19](#) mostra a peça em perspectiva e a [Figura 20](#) mostra as vistas ortográficas da peça com as dimensões mais relevantes.

Figura 19 – Perspectiva da peça criada. O modelo 3D foi construído utilizando o software de modelagem *Blender*.



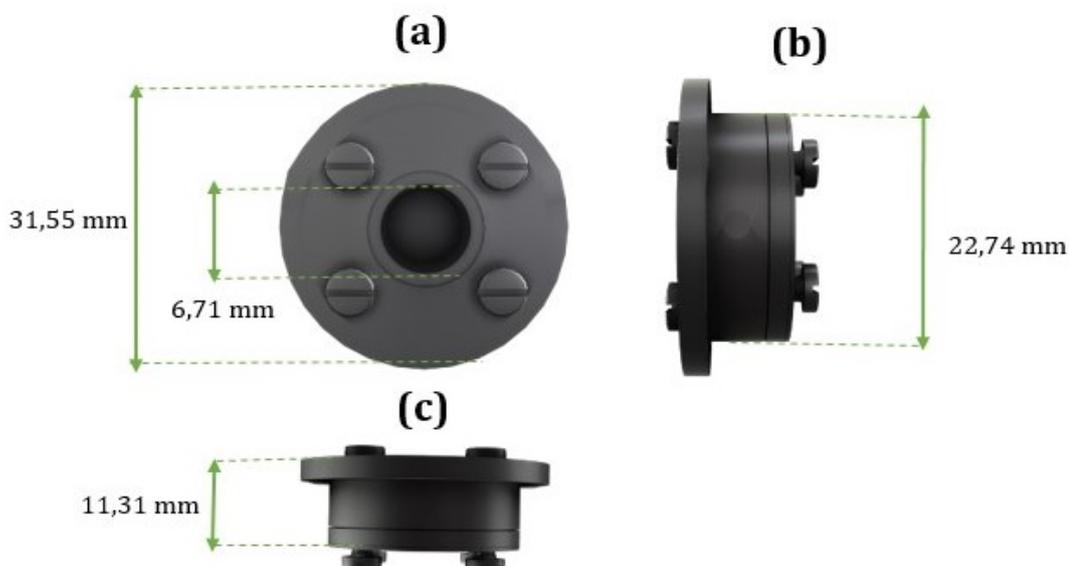
A principal funcionalidade da peça é o fato dela possuir um pequeno poço de aproximadamente 250 μL de volume, em pressão atmosférica, que possibilita a análise de líquidos e amostras vivas. O mecanismo foi cunhado de feixe externo-interno aqui no laboratório. A proposta das irradiações é justamente fazer uso desse poço para que as células possam ser irradiadas estando embebidas em seu meio de cultura, a fim de minimizar os estresses provenientes do ambiente externo.

3.2.1 Caracterização da Peça

Como fazer irradiação com uma peça que possui ar em seu interior é algo novo para o laboratório, testes foram realizados a fim de caracterizá-la em relação a pressão e dose de radiação suportadas. Esse cuidado é extremamente necessário, pois caso o Mylar rompa ou

¹É um polímero muito usado como atenuante de radiação. Sua composição química é aproximadamente 46% carbono, 18% oxigênio e 36% hidrogênio, com densidade de 1,4 g/cm^3 .

Figura 20 – Vistas ortográficas da peça, sendo: vista anterior (a), vista lateral esquerda (b) e vista superior (c). As dimensões foram medidas com um paquímetro digital.



permita vazamento de um grande volume de ar ou contaminantes durante a irradiação, a linha inteira poderia ficar comprometida, resultando em complicações relevantes para o laboratório.

O teste de pressão foi realizado com o auxílio de uma câmara de vácuo externa. Após a montagem e vedação da peça, ela foi colocada dentro da câmara a uma pressão de aproximadamente 10^{-3} mbar. Para saber se ela não estava permitindo vazamento de ar, observou-se o comportamento do Mylar. Se o polímero estivesse bem vedado, devido a diferença de pressão dentro e fora da peça, surgiria uma força que faria com que ele se deformasse em um formato convexo. Caso não houvesse deformação, inferir-se-ia que haveria algum erro na construção da peça e que ela estaria permitindo a saída de ar. Foram efetuados 2 testes, mantendo-a na câmara por 30 minutos. A deformação do Mylar foi observada em ambos, levando a conclusão de que o fato de colocá-la em vácuo não era um problema. A pressão na linha de irradiação (10^{-7} mbar) é bem menor que na câmara externa utilizada nos testes, porém a força resultante da diferença de pressão da linha comparada com a da câmara é praticamente a mesma, logo como a ferramenta suportou a pressão da câmara, ela também suporta a pressão da linha.

Já o teste de dose foi realizado mantendo a energia do feixe constante em 2 MeV e variando a fluência, grandeza que quantifica o número de prótons por unidade de área, até um valor máximo estipulado. No primeiro teste, começou-se com $1,0 \times 10^{11}$ prótons/cm² e progressivamente se aumentou a fluência até $2,0 \times 10^{14}$ prótons/cm². Ao atingir esse valor, o medidor de pressão da linha apontou um aumento $3,7 \times 10^{-7}$ mbar para $1,0 \times 10^{-6}$ mbar. Nesse momento interrompeu-se com o teste e a peça foi retirada da linha. Vale mencionar que o aumento de pressão não foi abrupto, isto é, o ar vazado não foi o volume total de ar que

estava contido na peça. No segundo teste o valor máximo da fluência foi maior, chegando a $2,8 \times 10^{14}$ prótons/cm², sem se observar aumento no medidor de pressão da linha. Como a peça é montada manualmente para cada teste, leves diferenças na montagem podem levar a diferentes resultados nos testes. Portanto, por medidas de segurança, adotou-se que a fluência não deve ultrapassar 10^{14} prótons/cm².

Para as irradiações propostas nesse trabalho, os valores suportados pela peça são mais do que suficientes, na medida em que a fluência utilizada é da ordem de 10^{10} prótons/cm². Caso eventualmente seja necessário uma peça que suporte valores superiores de fluência, há a possibilidade de aumentar a espessura do polímero, deixando-o mais resistente, porém fazendo com que os íons incidentes percam mais energia. Importante mencionar que todos os testes foram feitos com íons de Hidrogênio, o que não necessariamente indica os mesmos resultados de fluência suportados para íons mais pesados.

3.3 Dosimetria e Cálculo de Perda de Energia

A dose física absorvida, ou apenas dose, é definida como a quantidade de energia que foi absorvida por unidade de massa do alvo. No S.I., a unidade padrão é o *Gray* (Gy), definido como: $[Gy] = \frac{J}{kg}$. Um tratamento típico envolve uma dose total de, aproximadamente, 70 Gy, normalmente fracionados em sessões de 2 Gy. Uma unidade mais antiga, mas que ainda pode ser encontrada na literatura é o *rad*, definido como $[rad] = \frac{100 \text{ erg}}{g}$, ou 0,01 Gy, comumente chamado de "centiGray". Ainda há mais uma unidade para dose que deve ser mencionada, o *Sievert* (Sv), que representa as doses equivalente e efetiva, levando em conta o efeito biológico da radiação no tecido humano. Importante mencionar que a dose equivalente não é sinônimo da dose efetiva, apesar das duas serem expressadas em Sieverts, pois a equivalente trata de um órgão específico, enquanto que a efetiva considera o corpo inteiro. A criação dessa unidade deu-se porque foi observado que diferentes tipos de radiação induziam diferentes efeitos biológicos, a partir de uma mesma dose física.

Para realizar a conversão da dose física absorvida para a dose equivalente ou para a dose efetiva, existem coeficientes que pesam o tipo da radiação e o órgão. Eles são chamados de fator de peso de radiação (ω_R) e fator de peso de tecido (ω_T), respectivamente. As [Tabela 4](#) e [Tabela 5](#) mostram esses coeficientes para diferentes tipos de radiação e tecidos.

Tabela 4 – Fatores de peso de radiação para diferentes tipos de radiação.

Tipo de Radiação	Fator de Peso de Radiação, ω_R
Fótons	1
Elétrons	1
Prótons	2
Partículas Alfa	20

Fonte: (VALENTIN, 2003)

Tabela 5 – Fatores de peso de tecido para diferentes tipos de tecidos/órgãos.

Tecido/Órgão	Fator de Peso de Tecido, ω_T
Estômago	0,12
Fígado	0,04
Pele	0,01
Cérebro	0,01

Fonte: (VALENTIN, 2003)

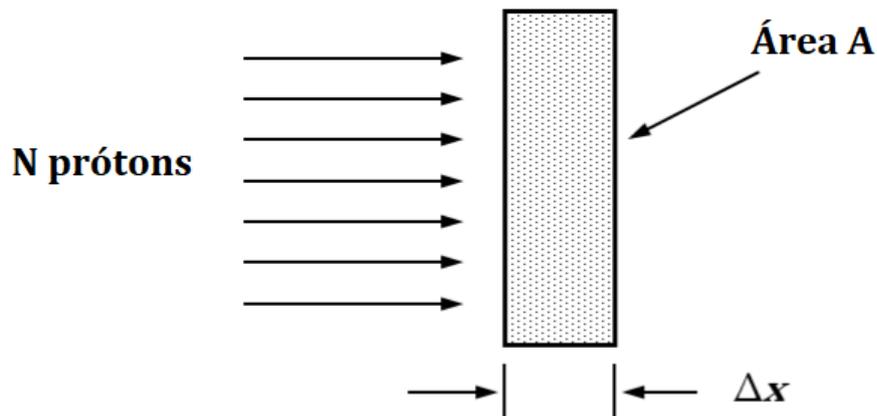
Portanto, tendo os dois fatores de peso e a dose física absorvida, pode-se calcular tanto a dose equivalente, quanto a efetiva, a partir das duas equações abaixo, respectivamente:

$$D_{eq}[Sv] = D[Gy] \times \omega_R \tag{7}$$

$$D_{ef}[Sv] = D[Gy] \times \omega_R \times \omega_T \tag{8}$$

A unidade que foi utilizada nos testes de caracterização da peça (fluência) não é comum e nem apropriada para descrever dose no contexto biológico. Porém, existe uma equação que relaciona a fluência de um feixe de partículas carregadas com a dose física absorvida. Partindo da situação da Figura 21, podemos relacionar a energia depositada pelo feixe com a massa do alvo:

Figura 21 – Situação padrão para relacionar a fluência de um feixe de partículas carregadas com a dose física absorvida.



$$Dose \equiv \frac{\text{energia}}{\text{massa}} = \frac{(dE/dx) \times \Delta x \times N}{\rho \times A \times \Delta x} = \Phi \frac{S}{\rho}, \tag{9}$$

onde Φ é definido como a fluência do feixe, S representa a perda de energia e ρ a densidade do alvo. O termo $\frac{S}{\rho}$ é chamado de *stopping cross section*. Apesar de J/kg ser uma unidade conveniente para expressar dose, prótons/m² para fluência e J/(kg/m²) para o *stopping cross section*, não são. Por isso, escreve-se a Equação (9) com um fator multiplicativo na frente para

que se possa utilizar unidades mais usuais, resultando em:

$$D[Gy] = 0,1602\Phi \left[\frac{Gp}{cm^2} \right] \frac{S}{\rho} \left[\frac{MeV}{g/cm^2} \right] \quad (10)$$

Uma outra maneira de escrever a [Equação \(10\)](#) é considerando a densidade superficial de carga ao invés da fluência, fazendo com a a constante desapareça:

$$D[Gy] = \frac{q}{A} \left[\frac{nC}{cm^2} \right] \frac{S}{\rho} \left[\frac{MeV}{g/cm^2} \right] \quad (11)$$

Tomando a derivada temporal da [Equação \(11\)](#), é possível calcular a taxa de dose que está sendo depositada, em função da densidade de corrente do feixe:

$$\dot{D} \left[\frac{Gy}{s} \right] = \frac{i_p}{A} \left[\frac{nA}{cm^2} \right] \frac{S}{\rho} \left[\frac{MeV}{g/cm^2} \right] \quad (12)$$

Doses comuns em irradiações de células vivas variam de 1-10 Gy, e a taxa normalmente não passa de 1-2 Gy/min ([NAPOLITANO et al., 1992](#)) ([BELLI et al., 1989](#)). Importante ressaltar que as fórmulas derivadas nessa seção em hipótese alguma devem servir para o cálculo da dose em um paciente real, no entanto servem como uma primeira estimativa. Os métodos mais precisos de quantificação de dose são dosímetros muito bem calibrados e simulações computacionais específicas para este fim.

Para estimar a dose que o feixe de prótons deposita nas células, é necessário primeiro saber quanto de energia o feixe perde ao atravessar o Mylar. Esse cálculo pode ser feito utilizando o software *SRIM-2013*, uma ferramenta amplamente difundida no meio acadêmico para realizar esse tipo de simulação. Como *input*, entra-se com o íon incidente (H^+), alvo (Mylar) e energia do feixe (2 MeV). Rodando o programa, obtém-se um valor de $20,98 \frac{keV}{\mu m}$.

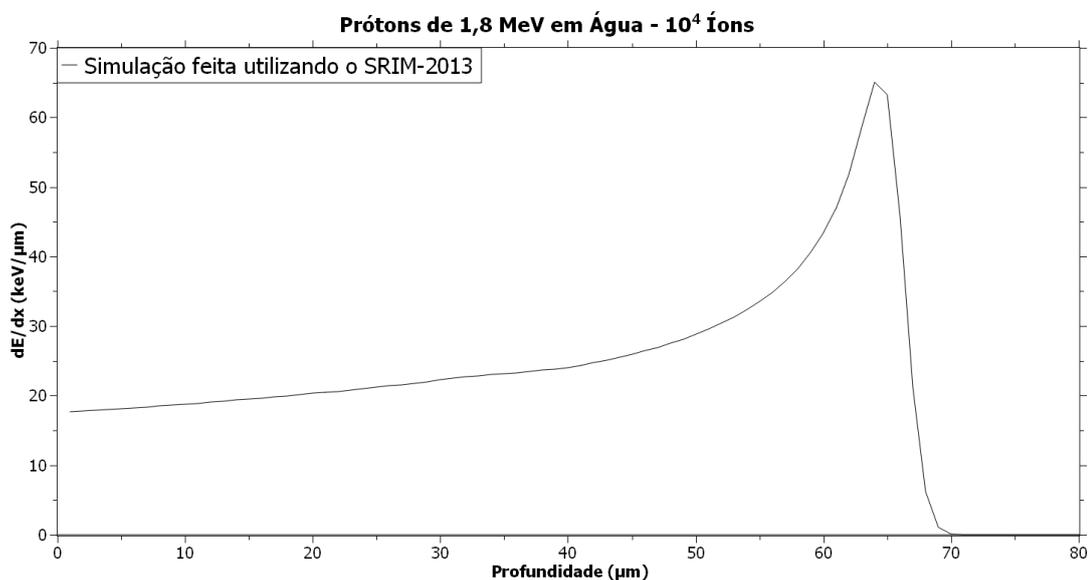
Considerando uma aproximação de energia superfície, basta multiplicar pela sua espessura (8 μm) e tem-se quanto de energia foi perdida, logo $E_{Loss} = 167,84 keV$. Sabendo que os prótons incidentes possuem 2 MeV, conclui-se que eles chegam com aproximadamente 1,83 MeV nas células.

O modelo mais usado para as células é a água ([BELLI et al., 1989](#)) ([NAPOLITANO et al., 1992](#)), portanto, para saber a perda de energia do prótons nas células, basta rodar novamente o *SRIM-2013*, porém com o alvo sendo a água e com energia do feixe sendo 1,83 MeV. Como resultado, temos que a perda de energia do feixe após passar pelo Mylar é $17,68 \frac{keV}{\mu m}$. A perda de energia não é constante durante a trajetória dos prótons na matéria, como

mostra a [Figura 22](#), porém como as células estão aderidas na superfície do Mylar (será abordado mais detalhadamente na próxima seção), podemos considerar o valor de $17,68 \frac{keV}{\mu m}$ para as

estimativas de dose. Além disso, é interessante observar que a profundidade máxima penetrada pelos prótons na água é de, aproximadamente, 70 μm e o seu pico de Bragg encontra-se perto dos 65 μm .

Figura 22 – Variação da perda de energia em função da profundidade para prótons de 1,8 MeV em água. Importante notar a profundidade máxima penetrada pelo feixe e a diferença principal entre fótons e partículas carregadas: o pico de Bragg.



Tendo o valor da perda de energia calculado, pode-se fazer uma estimativa da dose física absorvida pelas células devido a uma irradiação de prótons com 2 MeV. Atualmente no LII a fluência mínima que pode ser atingida pelo acelerador é da ordem de 10^{10} prótons/cm², resultando em uma densidade de corrente de 0,5 nA/cm². Fazendo uso da [Equação \(12\)](#), e escrevendo o termo de perda de energia e densidade na unidade correta, chega-se no valor calculado abaixo:

$$\dot{D} \left[\frac{\text{Gy}}{\text{s}} \right] = 0,5 \left[\frac{\text{nA}}{\text{cm}^2} \right] \times 176,9 \left[\frac{\text{Mev}}{\text{g/cm}^2} \right] = 84,4 \text{ Gy/s}$$

O tempo de irradiação para essa fluência é de 4 segundos, logo a dose física absorvida é o valor calculado acima multiplicado pelo tempo de irradiação. Realizando essa conta simples, tem-se um valor estimado para a dose nas células de 353,6 Gy.

Como se pode ver, o valor calculado acima é extremamente alto, fora do padrão dos experimentos realizados na literatura, em que a dose varia de 1-10 Gy. Infelizmente, essa é a dose mínima que atualmente pode ser alcançada no laboratório. Para chegar em uma dose factível com a realidade a fluência do feixe deveria ser da ordem de 10^7 prótons/cm². Todos os cálculos e parâmetros experimentais mencionados nessa seção são os que foram realmente utilizados na primeira irradiação realizada nesse trabalho.

3.4 Amostras Celulares, Preparação de Amostra e Equipamento de Análise

As amostras celulares analisadas são da linhagem A-172, decorrente de glioma humano, e são cultivadas no meio de cultura DMEM². Elas ficam aderidas em recipientes propícios para cultura e em uma estufa com atmosfera e temperatura controladas. O tamanho médio do núcleo dessas células é aproximadamente 20 μm .

O passo zero para começar o processo de preparação de amostra na peça é esterilizá-la, a fim de minimizar o número de impurezas e contaminantes presentes. A esterilização ideal seria a autoclave³, porém como o material de vedação da peça não resiste a temperaturas muito altas, esse método é inviável, pelo menos por enquanto. A alternativa foi utilizar álcool etílico convencional e uma lâmpada UV.

O processo de preparação de amostras celulares na peça começa retirando-se as células do recipiente em que elas estavam aderidas com uma enzima chamada tripsina, que promove a desaderência. O próximo passo é utilizar uma câmara de *Neubauer* a fim de realizar a contagem das células e estimar quantas células estará se colocando na peça. Para fazer com que elas fiquem aderidas ao Mylar, utiliza-se um polímero chamado polilisina, composto por sucessivos monômeros do aminoácido lisina. O processo de aderência das células normalmente leva de 4 a 5 horas. É importante ressaltar que durante a maior parte do tempo a peça permanece na estufa com temperatura e atmosfera controladas, sendo retirada apenas quando alguma análise vai ser feita.

3.4.1 Microscópio de Fluorescência

O equipamento de análise das amostras celulares é o microscópio de fluorescência. Seu funcionamento é muito similar com o de um microscópio óptico convencional, porém ele possui algumas ferramentas a mais para aumentar a gama de aplicações possíveis. A principal diferença é que o óptico utiliza luz visível (400-700 nm) para iluminar a amostra e produzir uma imagem magnificada, e o de fluorescência utiliza uma fonte de luz muito mais intensa, também no visível, que excita alguma espécie fluorescente na amostra. A espécie fluorescente então emite luz com energia menor do que a incidente, que por sua vez produz a imagem magnificada ao invés da fonte original (HOLLIFIED; BRADBURY; EVENNETT, 1996).

A microscopia de fluorescência é normalmente utilizada para observar características específicas de algum sistema de análise. No caso desse trabalho, faz-se uso do microscópio para observar uma proteína fluorescente que indica quebras duplas no DNA.

²Do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, é uma das variantes mais amplamente difundidas do meio Eagle. O DMEM é uma modificação do *Basal Medium Eagle* (BME) que contém quatro vezes a concentração de aminoácidos e vitaminas. Além disso, a formulação também inclui glicina, serina e nitrato férrico. A formulação original contém 1000 mg/L de glicose e foi originalmente usada para cultivar células embrionárias de camundongos.

³A autoclave é um equipamento no qual o material a ser esterilizado é colocado em um ambiente com vapor de água em altas temperatura e pressão por determinado tempo. A ação conjunta da temperatura, pressão e umidade promove a termocoagulação e desnaturação de proteínas enzimáticas e estruturais dos microrganismos, causando sua morte.

3.5 Irradiações e Análise de Danos no DNA

As irradiações foram realizadas no LII inicialmente com os parâmetros experimentais mencionados na [Seção 3.3](#), isto é: energia do feixe de prótons igual a 2 MeV, fluência de 10^{10} prótons/cm² e densidade de corrente de 0,5 nA/cm², resultando em uma dose física absorvida de aproximadamente 354 Gy. As células foram colocadas na peça junto com o meio de cultura para minimizar o estresse que elas poderiam sofrer. Com isso, esse foi o primeiro experimento a possuir amostra líquida no laboratório, abrindo espaço para novas e abrangentes linhas de pesquisa.

Antes de colocar a peça com a amostra na linha do acelerador, realizou-se novamente um teste de vácuo para se certificar que não haveria contaminação ou vazamento. Felizmente, o Mylar deformou-se em um formato convexo, evidenciando o comportamento de boa vedação. Após esse teste inicial, a peça foi colocada na linha de implantação do acelerador e a irradiação ocorreu por quatro segundos. O medidor de pressão foi constantemente observado durante esse tempo e não apontou aumento da pressão, evidenciando que não houve contaminação ou vazamento.

Para que houvesse um grupo de controle, ou seja, amostras celulares que não foram irradiadas, a fim de comparação, colocou-se uma placa de alumínio que bloqueava a passagem do feixe em metade da peça. Assim, foi possível saber qual região foi irradiada e qual não foi. É de suma importância possuir um grupo de controle para que se possa saber se o dano foi realmente da irradiação, ou se foi de algum estresse que as células sofreram devido a fatores externos. A placa de alumínio foi fixada na peça utilizando fita carbono, como pode ser observado na [Figura 23](#).

Após realizada a irradiação, retira-se a peça da linha do acelerador e a análise pode começar a ser feita. Dentro do núcleo dessa linhagem celular há uma proteína fluorescente chamada 53BP1 que age como agente reparador de danos no DNA, isto é, quanto mais proteínas estiverem fluorescendo no núcleo da célula, mais dano acumulado existe. Essa proteína sinaliza apenas danos referentes a quebras duplas, que são os mais nocivos para as células. Para monitorar a cinética do dano, utiliza-se um microscópio de fluorescência, capaz de detectar a fluorescência dessa proteína. A peça para ser colocada no microscópio é desparafusada sem retirar o Mylar. A [Figura 24](#) compara o núcleo de células saudáveis com o núcleo de células que sofreram danos. Pode-se observar que no segundo grupo a quantidade de fluorescência devido a 53BP1 é significativamente maior, constatando que houve danos. Ainda não é unânime na literatura, mas acredita-se que de 1-10 pontos fluorescentes é considerado estado normal da célula ([YANG et al., 2015](#)).

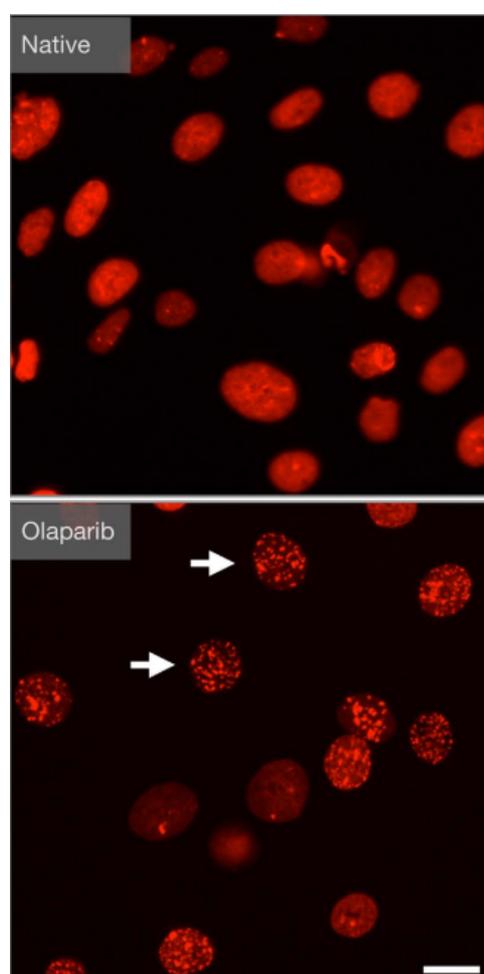
A proposta do trabalho é comparar o grupo de células não irradiado (controle) com as células irradiadas e tentar observar como se dá a progressão do dano e possíveis desdobramentos, como: morte celular, mutação, regeneração, etc. O microscópio de fluorescência auxilia no processo, pois é possível, além de observar a fluorescência das proteínas, tirar fotos do que está sendo observado, fazendo com que se possa relacionar a quantidade de fluorescência em

Figura 23 – Modo como a placa de alumínio foi fixada na peça utilizando fita carbono. Nota-se também que foram feitas marcações para saber qual lado foi irradiado e qual não foi. A peça foi presa com as presilhas do porta amostras da linha de implantação nas extremidades.



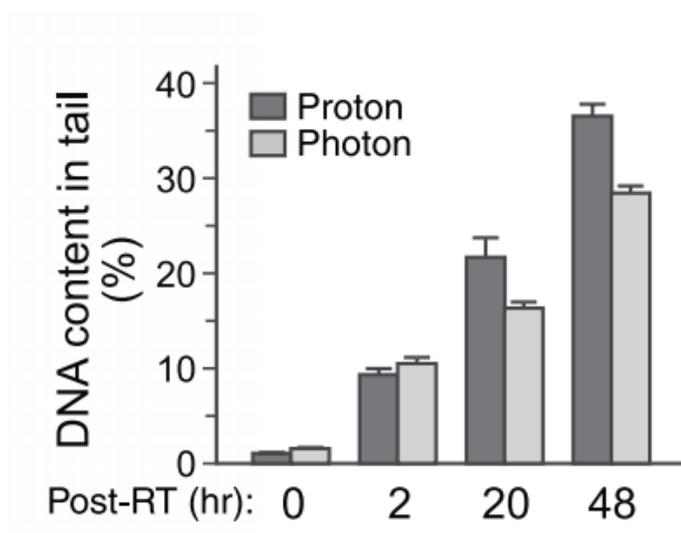
um determinado tempo após a irradiação, com os danos sofridos. O objetivo final é conseguir obter um gráfico similar a [Figura 25](#), porém, nesse caso, o pesquisador estava interessado no ensaio cometa, que é um outro método de quantificação de danos no DNA, e no caso desse trabalho seria referente a quantidade de fluorescência ao longo do tempo. Importante ressaltar que ainda não existe uma relação conhecida entre o número de fluorescências e o número de quebras duplas, apenas uma correlação simples de que quanto mais fluorescência há no núcleo, mais quebras duplas ocorreram e maior é o dano acumulado.

Figura 24 – Comparação entre o núcleo de células saudáveis e de células danificadas. No segundo grupo, percebe-se uma quantidade muito maior de pontos fluorescentes devido a 53BP1, constatando que as células sofreram danos. A barra de escala corresponde a 25 μm .



Fonte: (YANG et al., 2015)

Figura 25 – Quantificação experimental da progressão de dano no DNA de células comparando irradiações de prótons com fótons. O método de determinação de danos utilizado pelo pesquisador foi o ensaio cometa. É interessante observar que os danos começam a ser significativos a partir de duas horas pós-irradiação.



Fonte: Adaptado de (MITTEER et al., 2015)

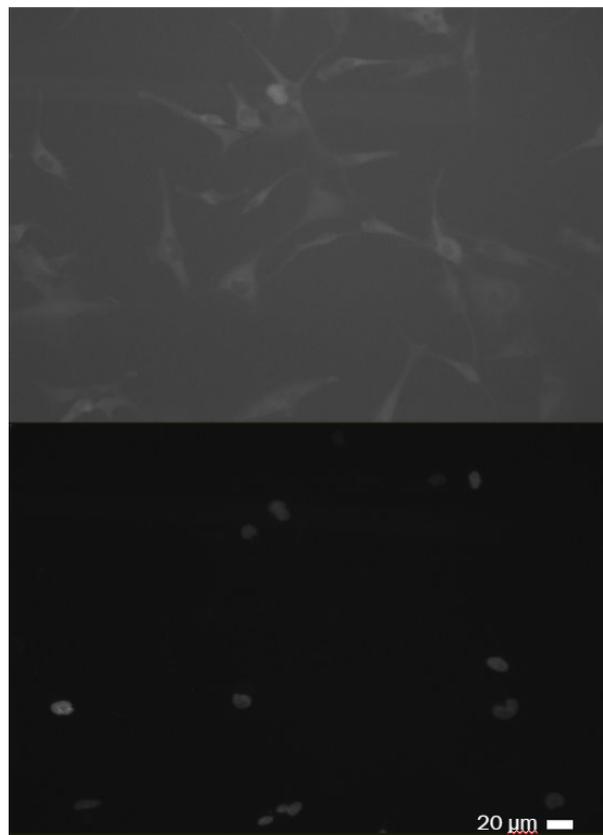
4 Resultados, Conclusões e Perspectivas

Esta seção busca discutir e apresentar as conclusões das irradiações realizadas durante o período desse trabalho. Foram realizadas duas irradiações, ambas no Laboratório de Implantação lônica.

4.1 Primeira Irradiação

Antes de realizar o experimento foram tiradas fotos para que se observasse o estado das células e de seus núcleos pré-irradiação. Duas fotos tiradas no microscópio de fluorescência podem ser observadas na [Figura 26](#). A primeira foto mostra as células propriamente ditas e a segunda os seus respectivos núcleos. As fotos em escala de cinza foram tiradas utilizando o microscópio *ZEIS Axiovert 200* e as em tonalidade avermelhada no microscópio *Floid*, que possui essa cor como padrão para visualização. É importante dizer que, para melhor visualização do leitor, as imagens passaram por um tratamento de contraste.

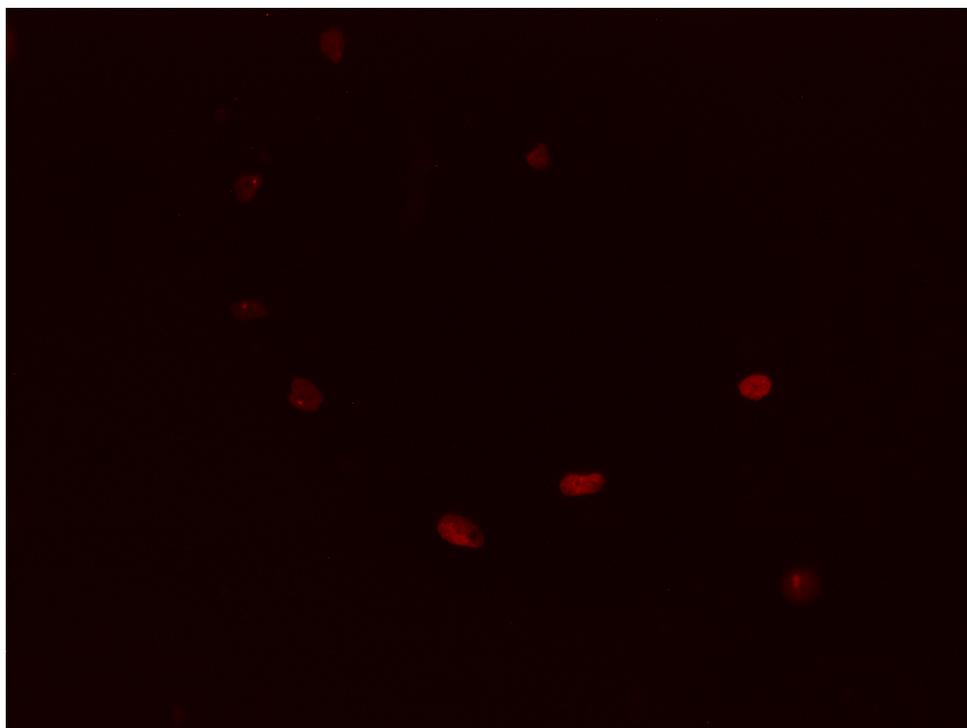
Figura 26 – Fotos tiradas no microscópio de fluorescência mostrando as células em cima e seus respectivos núcleos embaixo.



Pode-se observar a dificuldade de focar todas as células de um mesmo campo. Isso é devido ao fato do Mylar não ser plano o suficiente, resultando em um maior trabalho em tirar

as fotos, pois cada célula deve ser focada individualmente para se obter mais nitidez. O melhor campo observado foi na região central do Mylar, como mostra a [Figura 27](#).

Figura 27 – Melhor campo observado que continha o maior número de células em foco. A região observada é o centro do Mylar.



Após a irradiação, buscou-se monitorar as células para observar a progressão do dano. Foram tiradas fotos depois de 1, 5 e 24 horas. A [Figura 28](#) mostra algumas células após 1 hora e a [Figura 29](#) as mesmas células após 5h.

Figura 28 – Células observadas após 1 hora depois da irradiação. Pode-se observar, novamente, a dificuldade de focar todas as células de um mesmo campo devido ao Mylar.

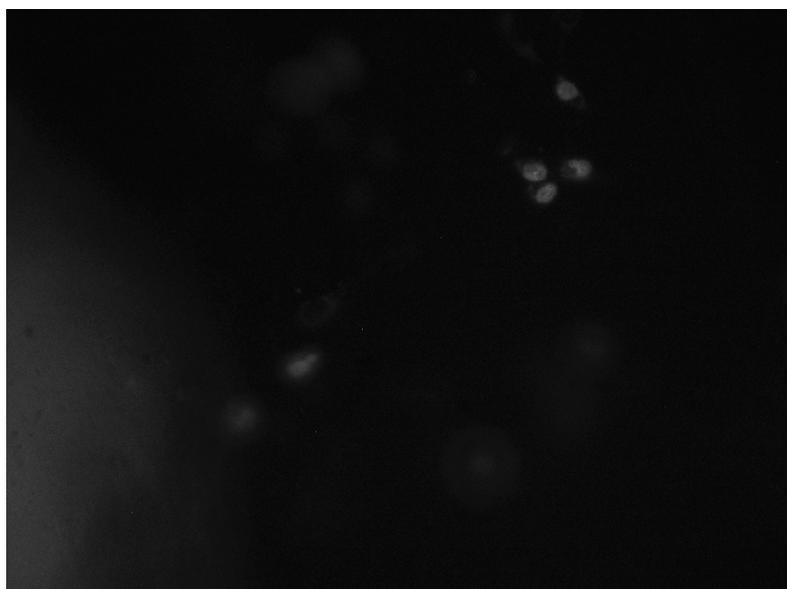
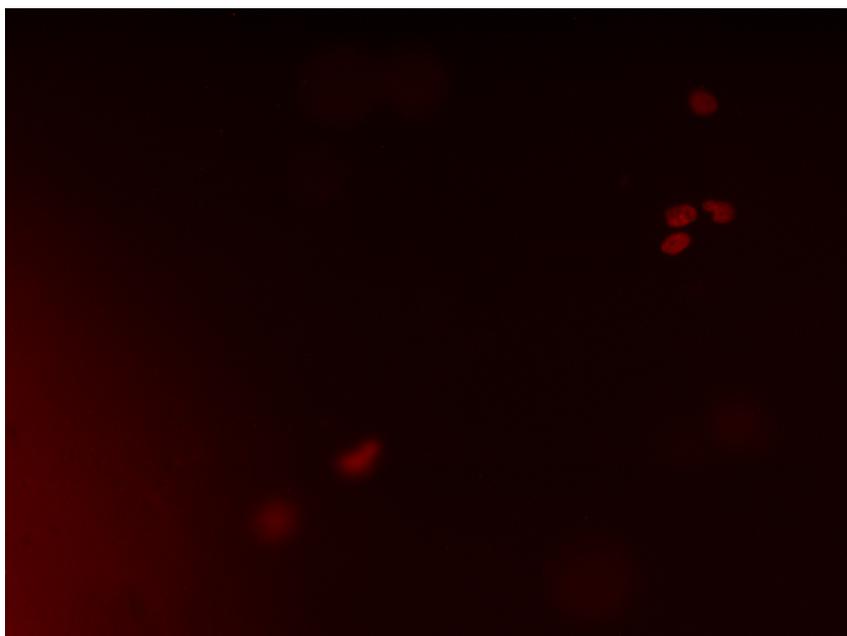


Figura 29 – Mesmas células da Figura 28 após 5h da irradiação.



Observando atentamente as fotos percebe-se que mesmo após 5 horas não apareceram fluorescências significativas nas células, elas aparentam muito mais com as células nativas da Figura 24 do que com as que sofreram danos. Prosseguindo na análise, a ideia era obter fotos das mesmas células após 24 e 48 horas a fim de caracterizar um intervalo de tempo mais completo. Porém, quando as amostras foram observadas novamente, encontrou-se uma grande quantidade de células desaderidas ou mortas e “sujeiras” no Mylar que impediam a visualização das células, pois elas eram muito fluorescentes e não permitiam um contraste favorável. A Figura 30 mostra as sujeiras encontradas e a Figura 31 as mesmas sujeiras em fluorescência. Essas sujeiras encontradas possivelmente advém da polilisina que pode ter se descolado do Mylar e levado a essas estruturas encontradas no microscópio. Outra possibilidade, mas com menor probabilidade, é devido ao fato da peça não ter sido autoclavada e alguma impureza ter se estabelecido depois de um tempo. Infelizmente a análise dessa amostra de células teve de ser parada devido a esse fato descrito.

Figura 30 – Sujeiras encontradas quando as células foram observadas após 24 horas da irradiação.

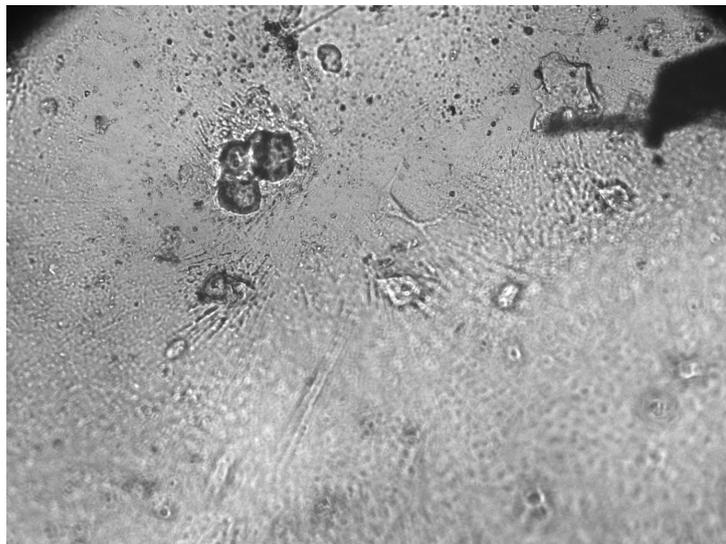
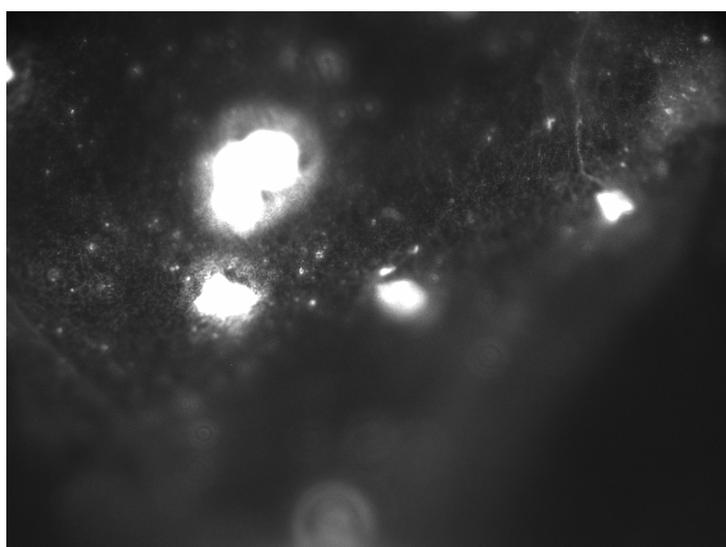


Figura 31 – Mesmas sujeiras encontradas na Figura 30 mostradas como elas fluorescem e ofuscam as células da proximidade.



4.2 Segunda Irradiação

Para a segunda irradiação algumas mudanças na peça foram feitas a fim de potencializar o seu uso e minimizar os fatores negativos que ocorreram no primeiro experimento. A primeira mudança foi substituir a vedação de Teflon para O-ring de Viton, pois ele resiste a temperaturas mais altas e permite a autoclave da peça, diminuindo o número de impurezas presentes. A segunda mudança foi trocar a espessura da janela de Mylar de 8 μm para um Mylar de 23 μm , com o objetivo de tentar deixá-lo mais plano e facilitar na hora de realizar o foco no microscópio. Sobre a irradiação em si o único parâmetro modificado foi a energia do feixe, alterada para 4 MeV, com o intuito de diminuir a dose depositada nas células. O modo como a

peça foi colocada na linha de implantação do acelerador foi o mesmo, a única alteração foi na placa de alumínio para bloquear o feixe. A [Figura 32](#) mostra o *setup* da irradiação.

Figura 32 – Modo como a peça foi colocada na linha do acelerador. A placa de alumínio foi refeita de modo a ocupar melhor o espaço.



Realizando os mesmos cálculos descritos na [Seção 3.3](#), e considerando novamente uma fluência de 10^{10} prótons/cm², uma densidade de corrente de 0,5 nA/cm² e tempo de irradiação de 4 segundos, mas alterando a energia para 4 MeV, chega-se em uma taxa de dose de 51,45 Gy/s e uma dose física absorvida total de 205,80 Gy. Pode-se perceber que mesmo aumentando a espessura do Mylar, ou seja, fazendo o feixe perder mais energia ao atravessá-lo, o aumento da energia para 4 MeV resultou em uma dose menor, apesar de ainda ser extremamente alta.

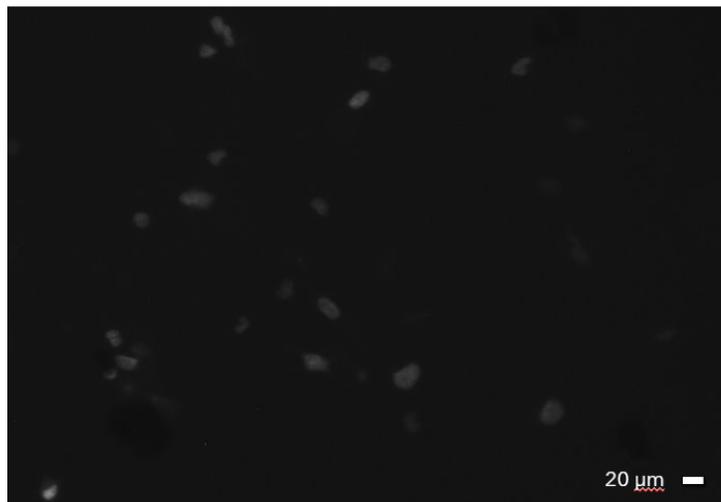
Infelizmente, na hora da montagem da nova peça para a irradiação, foram desenhados dois riscos em formato de cruz no Mylar a fim de localizar melhor cada campo no microscópio. Porém, os riscos estavam na parte de dentro do Mylar, e não na de fora, o que resultou em uma dificuldade imensa de achar as células no visível, pois a tinta da caneta aparentemente se depositou em toda a região do Mylar após o processo de autoclave. Uma foto no visível pode ser observada na [Figura 33](#), mostrando essas “gotículas” que aparecem quando a peça é observada no microscópio e a dificuldade de achar as células. A [Figura 34](#) apresenta os núcleos das células da [Figura 33](#) a fim de comparação. Além disso, na região central, onde o risco é mais forte, há uma fluorescência indesejada que prejudica a visualização dos núcleos também. Ambas as fotos foram tiradas pré-irradiação.

Prosseguindo com o experimento, foram tiradas fotos após 2, 24 e 42 horas da irradiação. Abaixo se encontram as fotos mencionada: a [Figura 35](#) mostras as células após

Figura 33 – Foto no visível mostrando as gotículas que possivelmente se aderiram no Mylar devido ao risco de caneta. Importante notar a dificuldade em achar as células dado o grande número de gotículas.



Figura 34 – Mesmo campo da Figura 33, porém em fluorescência.



2 horas, a Figura 36 após 24 horas e a Figura 37 após 42 horas. Como era de se esperar, depois de 2 horas não foram observados danos, assim como no primeiro experimento. Após 24 horas também não foram constatadas significativas fluorescências que indicariam danos. Apenas após 42 horas é que foram vistos fortes indícios de que a proteína 53BP1 estava agindo como reparadora de danos no DNA. Isso mostra que realmente pode demorar mais de 24 horas para que a ação da proteína se manifeste ativamente. Por se tratar de tumores a análise é ainda mais difícil, pois diversos mecanismos diferentes podem estar ocorrendo na células, fazendo com que não haja na literatura um tempo mínimo ou máximo para que ação da 53BP1 se estabeleça ou cesse.

Figura 35 – Foto mostrando as células após 2 horas da irradiação. Não se observa danos no DNA até esse momento.

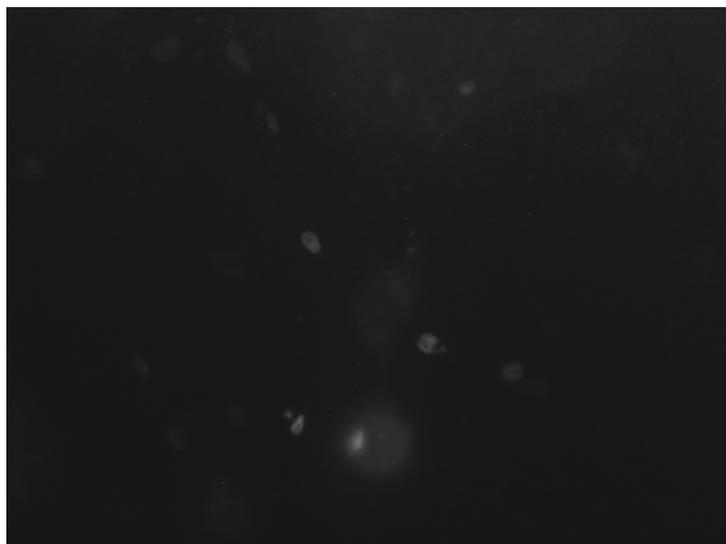


Figura 36 – Foto após 24 horas da irradiação. Ainda não são observadas significativas fluorescências que indicam que realmente houve danos.

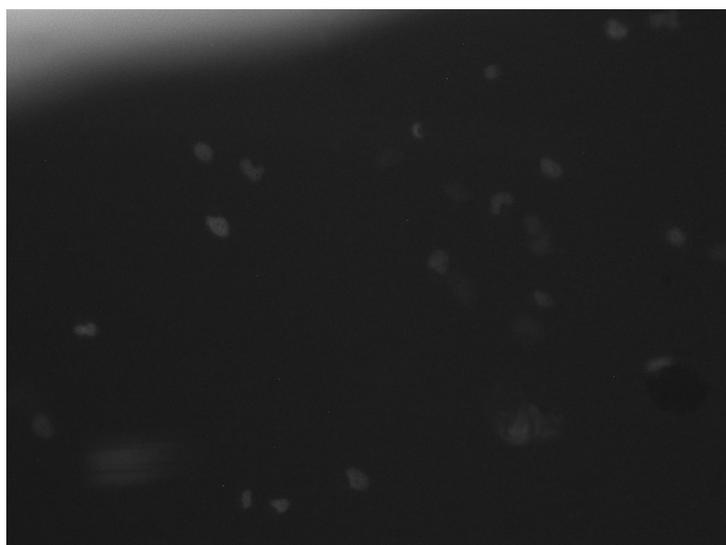
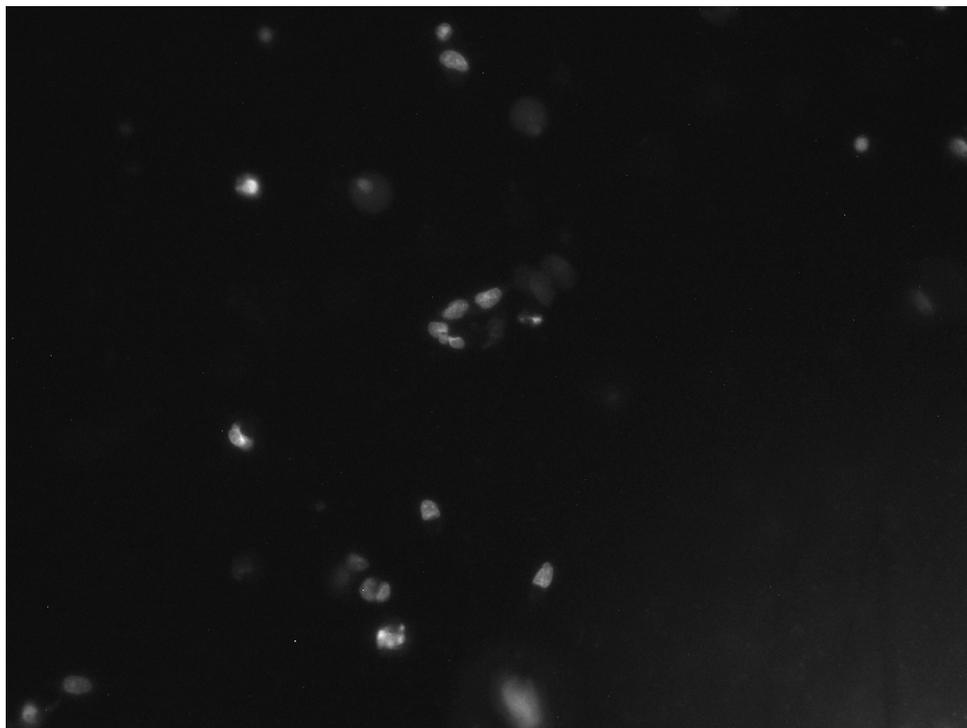


Figura 37 – Foto após 42 horas da irradiação. A alta intensidade de fluorescência sugere que a ação da proteína 53BP1 começou a se manifestar



Como forma de corroborar a afirmação de que houve danos após 42 horas da irradiação, foi utilizado o software *ImageJ* para quantificar a intensidade de fluorescência das células em cada etapa do experimento, já que a quantificação do número de pontos fluorescentes devido a 53BP1 era inviável devido a baixa magnificação das imagens. O método é bastante simples, o programa permite que o usuário contorne uma região específica (no caso o núcleo da célula) e meça a intensidade de fluorescência. A [Figura 38](#) mostra um exemplo da aplicação do método. Foram escolhidas as quatro fotos mais nítidas de cada etapa e os resultados são apresentados abaixo. Nas tabelas, encontram-se os valores das intensidades de fluorescência máxima, mínima e média e o desvio padrão associado. Todas as grandezas presentes nas tabelas foram normalizadas pelo número de células nítidas presentes no campo, sendo estabelecido um limite de no mínimo 7 células por campo para uma amostragem suficiente. Para esses cálculos as imagens não sofreram nenhum tipo de tratamento, sendo analisadas da forma que saíram do microscópio. A [Tabela 6](#) apresenta os valores pré-irradiação, a [Tabela 7](#) 2 horas pós-irradiação, a [Tabela 8](#) 24 horas pós-irradiação e a [Tabela 9](#) 42 horas pós-irradiação. De forma a resumir os dados encontrados, a [Tabela 10](#) mostra as médias das grandezas das quatro fotos de cada etapa e a [Figura 39](#) mostra essas grandezas plotadas para uma melhor visualização.

Figura 38 – Método utilizado no cálculo das intensidades de fluorescência do núcleo das células pelo *ImageJ*.

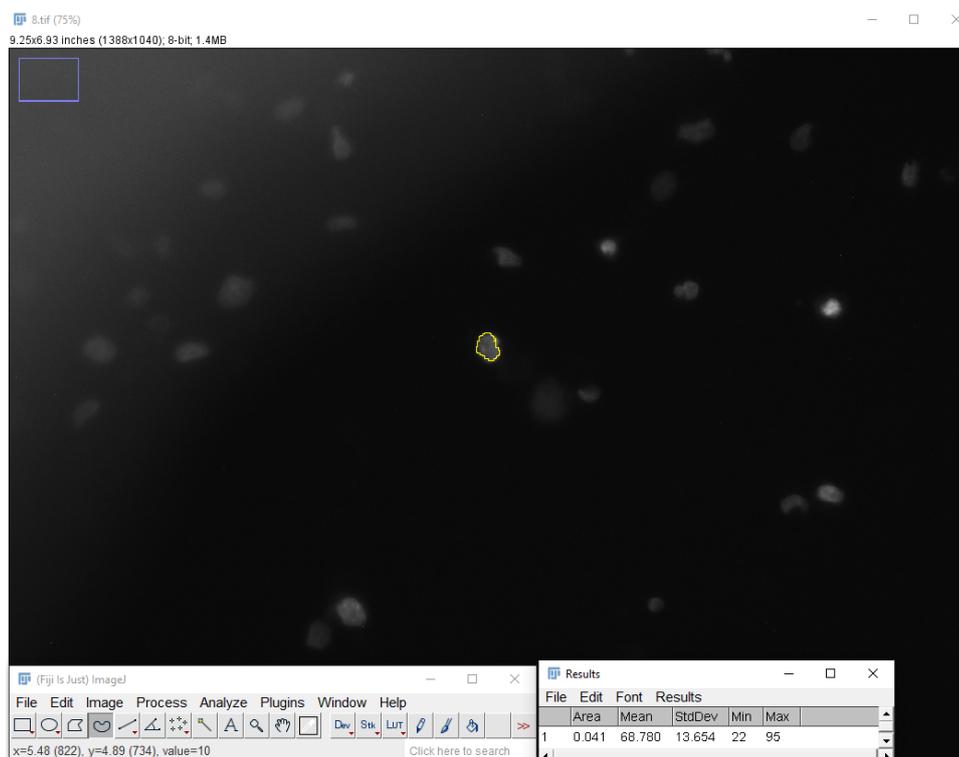


Tabela 6 – Intensidade de Fluorescência calculada pelo programa *ImageJ* na etapa de pré-irradiação. As grandezas estão em unidades arbitrárias.

Foto	Quantidade de Células	Máxima	Mínima	Média	Desvio Padrão
1	10	39,500	18,900	30,049	3,910
2	10	38,400	14,100	27,585	4,802
3	9	35,333	15,778	26,887	3,683
4	10	34,100	15,700	25,684	3,643

Tabela 7 – Intensidade de Fluorescência calculada pelo programa *ImageJ* na etapa de 2 horas pós-irradiação. As grandezas estão em unidades arbitrárias.

Foto	Quantidade de Células	Máxima	Mínima	Média	Desvio Padrão
1	8	42,625	16,750	30,425	5,058
2	8	38,250	15,250	28,103	4,668
3	9	38,000	16,889	28,592	3,994
4	8	39,375	17,625	30,598	3,984

Tabela 8 – Intensidade de Fluorescência calculada pelo programa *ImageJ* na etapa de 24 horas pós-irradiação. As grandezas estão em unidades arbitrárias.

Foto	Quantidade de Células	Máxima	Mínima	Média	Desvio Padrão
1	8	43,250	11,750	27,571	6,170
2	7	44,714	17,143	32,066	5,087
3	7	31,286	9,429	20,893	4,564
4	7	33,714	11,143	22,721	3,949

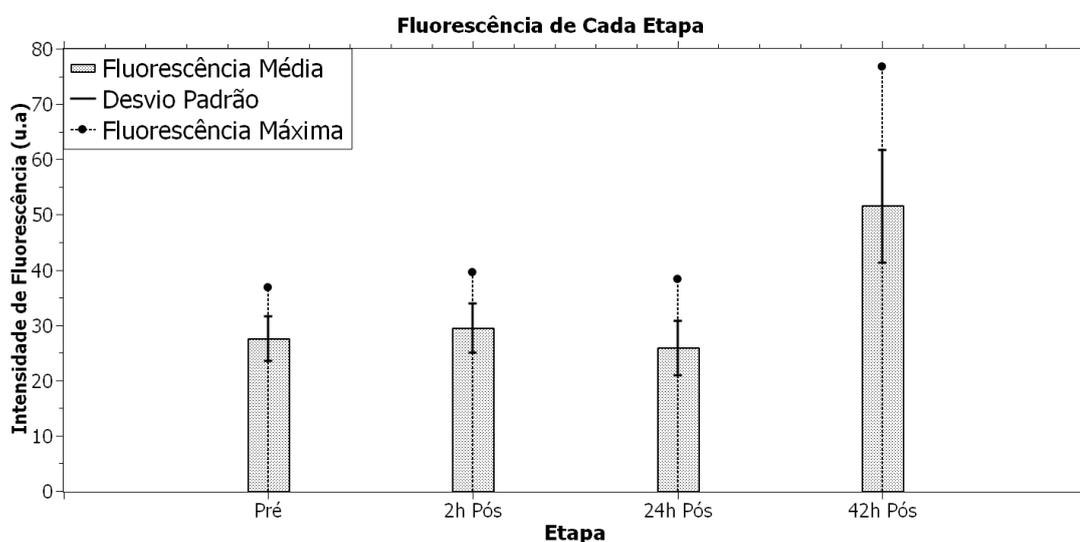
Tabela 9 – Intensidade de Fluorescência calculada pelo programa *ImageJ* na etapa de 42 horas pós-irradiação. As grandezas estão em unidades arbitrárias.

Foto	Quantidade de Células	Máxima	Mínima	Média	Desvio Padrão
1	10	72,400	23,700	51,655	9,126
2	8	79,375	18,250	46,725	10,212
3	10	75,400	22,800	52,184	9,889
4	10	79,800	19,100	55,393	11,536

Tabela 10 – Resumo comparativo das quatro etapas do experimento. Foram feitas as médias das grandezas das quatro fotos de cada etapa. As grandezas estão em unidades arbitrárias.

Etapa	Máxima	Mínima	Média	Desvio Padrão
Pré	36,833	16,119	27,551	4,009
2h Pós	39,562	16,628	29,431	4,426
24h Pós	40,559	12,366	27,453	4,942
42h Pós	76,744	20,962	51,489	10,191

Figura 39 – Gráfico mostrando as intensidades de fluorescência média e máxima para cada etapa do experimento considerando uma média de quatro fotos de campos distintos e o desvio padrão associado.



Observando os dados apresentados, percebe-se que a intensidade média das etapas pré, 2 horas pós e 24 horas pós é muito semelhante, não apresentando diferenças estatísticas

significativas, assim como as primeiras suspeitas levantadas apenas analisando as fotos tiradas. A intensidade máxima também não aponta diferenças marcantes entre as três primeiras etapas do experimento. Apenas após 42 horas da irradiação é que um grande aumento na intensidade de fluorescência, tanto média, quanto máxima, é observado, sugerindo que a proteína está realmente ativa nos núcleos celulares tentando reparar as quebras duplas provenientes da irradiação com prótons.

4.3 Conclusões

A conclusão mais significativa é que, dentro do próprio laboratório, foi possível construir e desenvolver uma ferramenta que possibilitou a análise de amostras biológicas vivas embebidas em um meio de cultura líquido e não permitiu nenhum tipo de vazamento ou contaminação para a linha do acelerador. Essa contribuição com certeza vai alavancar diversas novas linhas de pesquisa e mais aplicações surgirão na medida em que mais pesquisadores tiverem acesso a peça e puderem dar suas opiniões e sugestões para sua melhoria. Obviamente que outros testes ainda serão feitos a fim de caracterizá-la melhor, mas o fato de já se ter conseguido conduzir experimentos que analisaram amostras líquidas e vivas mostra como a peça está funcional.

A respeito da irradiação, pode-se dizer que foi provado que o Mylar funciona muito bem como substrato celular e permite a aderência das células. Além disso, a análise de danos via 53BP1 se mostrou possível, como apresenta a [Figura 39](#), que claramente demonstra um aumento significativo na intensidade de fluorescência das células após 42 horas da irradiação. Porém, devido ao tamanho da peça, a única objetiva possível no microscópio para dar um foco adequado é a de 20 vezes, fazendo com que as células fiquem muito longe e não seja possível contar o número de pontos fluorescentes e, conseqüentemente, fazer uma análise quantitativa de danos. Outra conclusão que pode se tirar da [Figura 39](#) é que o intervalo de tempo entre 24 e 42 horas pós-irradiação deve ser melhor monitorado, isto é, mais fotos devem ser tiradas para que o comportamento seja melhor mapeado, pois é nesse intervalo que aparentemente a proteína está começando a agir de forma mais ativa.

4.4 Perspectivas Futuras

A principal tarefa a ser feita é conseguir diminuir a dose entregue as células para que seja algo factível e possa ser comparado com experimentos similares já documentados na literatura. Está se estudando um sistema de retroespalhamento dos prótons para que a dose seja mais controlada e menos intensa. Outra alternativa é adaptar alguma linha do acelerador para se ter um feixe externo. Ambas as possibilidades estão sendo consideradas para os próximos experimentos.

Em relação a peça existe o desafio de tentar diminuir o seu tamanho para possibilitar a utilização de uma objetiva de maior magnificação (de 40 ou 60 vezes, por exemplo) a fim de observar as células com mais detalhes e realizar a contagem do número de pontos fluorescentes

para uma análise mais quantitativa e já padronizada na literatura. Ainda está se pensando na mudança da janela de Mylar para o nitreto de silício (Si_3N_4), um material muito mais resistente e plano, apesar do Mylar ter obtido um bom desempenho na segunda irradiação.

Busca-se ainda desenvolver um modelo teórico que associe a quantidade de pontos fluorescentes com a quantidade de quebras duplas e perda de energia, pois, como comentado na [Seção 3.5](#), não há ainda um modelo estabelecido na literatura. Para isso, pretende-se utilizar a ferramenta *Geant4*, descrita na [Seção 2.4](#), que possui uma simulação que calcula a quantidade de quebras duplas que houve, dado um feixe energético de partículas e uma estrutura biológica a ser analisada.

Obviamente, quanto mais experimentos forem realizados, mais resultados serão obtidos, o que certamente contribuirá para um entendimento cada vez maior do sistema de análise. Logo, mais irradiações serão planejadas com intuito de sedimentar os bons indicadores apresentados até agora e aplicar as melhorias descritas nessa seção para ampliar e potencializar as futuras análises.

Referências

- AGGARWAL, L. Biological effects of ionizing radiation. **SHODH PRERAK**, IV (1), 01 2014. Citado 2 vezes nas páginas 16 e 17.
- AGOSTINELLI, S. et al. Geant4—a simulation toolkit. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment**, v. 506, n. 3, p. 250 – 303, 2003. ISSN 0168-9002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168900203013688>>. Citado na página 19.
- AIHW. **Brain Cancer**. 2016. Disponível em: <<https://www.curebraincancer.org.au/page/8/facts-stats>>. Citado na página 2.
- BACKMAN, M. **Effects of nuclear and electronic stopping power on ion irradiation of silicon-based compounds**. Tese (Doutorado) — University of Helsinki, 2012. Citado na página 6.
- BELLI, M. et al. Rbe-let relationship for the survival of v79 cells irradiated with low energy protons. **International Journal of Radiation Biology**, Taylor Francis, v. 55, n. 1, p. 93–104, 1989. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/09553008914550101>>. Citado na página 28.
- BRIDGE, H. C. **Mitosis**. 2000. Disponível em: <http://cyberbridge.mcb.harvard.edu/mitosis_3.html>. Citado na página 11.
- CAËR, S. L. Water radiolysis: Influence of oxide surfaces on h2 production under ionizing radiation. **Water**, v. 3, n. 1, p. 235–253, 2011. ISSN 2073-4441. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4441/3/1/235>>. Citado na página 15.
- CENTER, P. T. **Cancer Treatment - Brain and CNS Tumors**. 2016. Disponível em: <<http://proton-cancer-treatment.com/en/for-professionals/>>. Citado na página 12.
- CENTER, S. M. **Principles of Proton Therapy**. 2015. Disponível em: <<http://www.samsunghospital.com/home/proton/en/whatsProtonTherapy/principle.do>>. Citado na página 9.
- DELAGE, E. et al. Pdb4dna: Implementation of dna geometry from the protein data bank (pdb) description for geant4-dna monte-carlo simulations. **Computer Physics Communications**, v. 192, p. 282 – 288, 2015. ISSN 0010-4655. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010465515000843>>. Citado 2 vezes nas páginas 21 e 22.
- DURANTE, J. S. L. M.; ORECCHIA, R. Charged-particle therapy in cancer: clinical uses and future perspectives. **Nature Reviews Clinical Oncology**, Nature Publishing Group, v. 14, n. 1, p. 1–2, mar 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrclinonc.2017.30>>. Citado na página 2.
- EDGE, S. B.; COMPTON, C. C. The american joint committee on cancer: the 7th edition of the ajcc cancer staging manual and the future of tnm. **Annals of Surgical Oncology**, v. 17, n. 6, p. 1471–1474, Jun 2010. ISSN 1534-4681. Disponível em: <<https://doi.org/10.1245/s10434-010-0985-4>>. Citado na página 12.

ELGAZZAR, A. H.; KAZEM, N. Biological effects of ionizing radiation. In: _____. **The Pathophysiologic Basis of Nuclear Medicine**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2006. p. 540–548. ISBN 978-3-540-47953-6. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-540-47953-6_23>. Citado 3 vezes nas páginas 13, 17 e 19.

FEINENDEGEN, L. E.; LABORATORY UPTON, N. U. S. B. N. **Low doses of ionizing radiation: Relationship between biological benefit and damage induction. A synopsis**. Citado na página 19.

FLOETH, F. W. et al. Local inflammation and devascularization – in vivo mechanisms of the "bystander effect" in vpc-mediated hsv-tk/gcv gene therapy for human malignant glioma. **Cancer Gene Therapy**, v. 8, n. 11, p. 843–851, 2001. ISSN 1476-5500. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7700382>>. Citado na página 16.

HOLLIFIED, J. M.; BRADBURY, S.; EVENNETT, P. Contrast techniques in light microscopy. **Microscopy Today**, Cambridge University Press, v. 4, n. 8, p. 6–9, 1996. Citado na página 30.

IARC. **Latest global cancer data**. 2018. Disponível em: <<http://gco.iarc.fr/>>. Citado na página 1.

IYER, R.; LEHNERT, B. E. Factors underlying the cell growth-related bystander responses to particles. **Cancer Research**, American Association for Cancer Research, v. 60, n. 5, p. 1290–1298, 2000. ISSN 0008-5472. Disponível em: <<https://cancerres.aacrjournals.org/content/60/5/1290>>. Citado na página 16.

LIVESEY, J. C.; REED, D. J. Chemical protection against ionizing radiation. In: LETT, J. T. (Ed.). Elsevier, 1987, (Advances in Radiation Biology, v. 13). p. 285 – 353. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780120354139500108>>. Citado na página 18.

MITTEER, R. A. et al. Proton beam radiation induces dna damage and cell apoptosis in glioma stem cells through reactive oxygen species. **Scientific Reports**, The Author(s) SN -, v. 5, p. 13961 EP –, Sep 2015. Article. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/srep13961>>. Citado na página 34.

MORGAN, W. F. Non-targeted and Delayed Effects of Exposure to Ionizing Radiation: I. Radiation-Induced Genomic Instability and Bystander Effects In Vitro. **Radiation Research**, Radiation Research Society, v. 159, n. 5, p. 567 – 580, 2003. Disponível em: <[https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2003\)159\[0567:NADEOE\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2003)159[0567:NADEOE]2.0.CO;2)>. Citado na página 14.

MORGAN, W. F. Non-targeted and Delayed Effects of Exposure to Ionizing Radiation: II. Radiation-Induced Genomic Instability and Bystander Effects In Vivo, Clastogenic Factors and Transgenerational Effects. **Radiation Research**, Radiation Research Society, v. 159, n. 5, p. 581 – 596, 2003. Disponível em: <[https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2003\)159\[0581:NADEOE\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2003)159[0581:NADEOE]2.0.CO;2)>. Citado na página 16.

NAPOLITANO, M. et al. Inactivation of c3h 10t cells by monoenergetic high let alpha-particles. **International Journal of Radiation Biology**, Taylor Francis, v. 61, n. 6, p. 813–820, 1992. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/09553009214551691>>. Citado na página 28.

NEUHAUSER, W. D.; ZHANG, R. The physics of proton therapy. **Physics in Medicine and Biology**, IOP Publishing, v. 60, n. 8, p. R155–R209, mar 2015. Disponível em: <<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0031-9155/60/8/R155/meta>>. Citado 2 vezes nas páginas 4 e 5.

NIEKRASZEWICZ, L. A. B. **Microanálise com Feixes de Íons: Caracterização de Elementos Leves em Materiais via Micro-NRA e Micro-PIXE**. Tese (Doutorado) — Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Física, 2014. Citado na página 23.

PAWLIK, T. M.; KEYOMARSI, K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. **International Journal of Radiation Oncology * Biology * Physics**, Elsevier, v. 59, n. 4, p. 928–942, Jul 2004. ISSN 0360-3016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2004.03.005>>. Citado na página 18.

PETIT, J. H. et al. Proton Stereotactic Radiotherapy for Persistent Adrenocorticotropin-Producing Adenomas. **The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 93, n. 2, p. 393–399, 02 2008. ISSN 0021-972X. Disponível em: <<https://doi.org/10.1210/jc.2007-1220>>. Citado na página 12.

RONSON BRIAN B. SCHULTE, R. W. H. K. P. L. L. N. S. J. M. S. J. D. Fractionated proton beam irradiation of pituitary adenomas. **International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics**, v. 64, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2005.07.978>>. Citado na página 12.

SAHA, G. B. Radiation biology. In: _____. **Physics and Radiobiology of Nuclear Medicine**. New York, NY: Springer New York, 2001. p. 183–212. ISBN 978-1-4757-3497-3. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-3497-3_14>. Citado 2 vezes nas páginas 14 e 17.

SCHOLZ, M. Heavy ion tumour therapy. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v. 161-163, p. 76 – 82, 2000. ISSN 0168-583X. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168583X99006692>>. Citado 3 vezes nas páginas 8, 9 e 10.

SCHULZ-ERTNER, D.; TSUJII, H. Particle radiation therapy using proton and heavier ion beams. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 8, p. 953–964, 2007. PMID: 17350944. Disponível em: <<https://doi.org/10.1200/JCO.2006.09.7816>>. Citado na página 8.

VALENTIN, J. Relative biological effectiveness (rbe), quality factor (q), and radiation weighting factor (wr): Icrp publication 92: Approved by the commission in january 2003. **Annals of the ICRP**, v. 33, n. 4, p. 1–121, 2003. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0146-6453\(03\)00024-1](https://doi.org/10.1016/S0146-6453(03)00024-1)>. Citado 2 vezes nas páginas 26 e 27.

VYŠÍN, L. et al. Proton-induced direct and indirect damage of plasmid DNA. **Radiation and Environmental Biophysics**, Springer Science and Business Media LLC, v. 54, n. 3, p. 343–352, maio 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00411-015-0605-6>>. Citado na página 13.

WARD, J. Dna damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: Identities, mechanisms of formation, and reparability. In: COHN, W. E.; MOLDAVE, K. (Ed.). Academic Press, 1988, (Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, v. 35). p. 95 – 125. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S007966030860611X>>. Citado na página 18.

YANG, K. S. et al. Single cell resolution in vivo imaging of dna damage following parp inhibition. **Scientific Reports**, The Author(s) SN -, v. 5, p. 10129 EP -, May 2015. Article. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/srep10129>>. Citado 2 vezes nas páginas 31 e 33.