

Projeto de Doutorado

**Validação de um modelo para medir os efeitos
da radiação ionizante no DNA**

Felix Mas

Orientador: Prof. Dr. Airton Deppman

2001

Resumo

Vários modelos para explicar o efeito das radiações ionizantes no DNA têm sido propostos[1-5]. Estes modelos matemáticos devem ser comprovados e/ou verificados. Algumas evidências experimentais tem sido obtidas sobre muitos deles. Este projeto está dirigido a validar experimentalmente o modelo teórico: Dois Passos para interação da radiação ionizante com o DNA.

Este modelo se propõe a investigar os danos produzidos na molécula de DNA, através de seu perfil de fragmentação utilizando diferentes tipos de radiação, com diferentes energias do feixe primário até uma ampla faixa de doses. A partir dos danos obtidos, pretendemos desenvolver um modelo capaz de prever danos radiobiológicos em seres humanos quando esses são submetidos a tratamentos terapêuticos. Serão estudados os efeitos das seguintes radiações: gama, prótons, elétrons, nêutrons e partículas alfa, que podem ser recebidas pelo ser humano abaixo certa circunstâncias: radiação primária o secundária em seções de radioterapia, ingestão de radionuclídeos presentes na cadeia alimentar, exposição ocupacional entre outras formas. Para o desenvolvimento deste projeto pretende-se utilizar como alvo de estudo plasmídeos pBluescript (II KS+), phagemid, com 2,96 kb derivado de pUC 19. Os estudos iniciais serão feitos com esse plasmídeo em de solução sem a presença de qualquer mecanismo de reparo e de qualquer interação do DNA com proteínas que normalmente estão presentes na célula. A principal vantagem desse tipo de estudo in vitro é a relativa facilidade que se tem para identificar e determinar quebras simples e duplas. As irradiações com gama serão feitas em instalações como, o Irradiador de ^{60}Co - Gamma Cell - mod. 220, e no canal tangencial BH - 4 - 12 do reator IEA-

R1 do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) de São Paulo. As irradiações com prótons no Acelerador Pelletron do Instituto de Física da Universidade de São Paulo. Já as irradiações com nêutrons serão feitas no irradiador de neutrôns do tipo Van Der Graff do Edifício do Reator Do IPEN e por fim as irradiações com partículas alfa serão feitas no Laboratório do Acelerador Linear (LAL) do IF da USP. A determinação dos efeitos induzidos pelas radiações poderão ser determinados mediante o uso do método de eletroforese em gel de agarose, que permitirá visualizar a fragmentação dos plasmídeos [6], assim como no microscópio de força atômica que possibilitará a obtenção da distribuição de tamanho dos fragmentos produzidos pela irradiações com resolução não alcançável com técnicas convencionais e independentes de qualquer modelo teórico [7-8]. Além disso, mediante a utilização de um espectrometro de massa acoplado a um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC), esperamos obter um perfil de segmentação dos plasmídeos irradiados e sua separação cromatográfica.

A validação teórica dos resultados obtidos nos experimentos, assim como a elaboração da dissertação do doutorado e sua discussão serão desenvolvidos no Instituto de Física da Universidade de São Paulo.

Introdução

Como são conhecidas as células são formadas fundamentalmente por água. O processo mais importante que ocorre quando a radiação incide em uma célula é a ionização da água. O DNA é considerado o alvo mais importante em uma célula do ponto de vista de danos causados por irradiação de um material biológico. Esta molécula chamada de ácido desossiribonucleico (DNA) tem um papel crucial na vida, pois é responsável por toda informação genética humana.

A radiação exhaustiva de uma célula usualmente gera a morte da mesma. Esta situação não é boa, mas atualmente é melhor do que no caso da célula ser danada num ponto onde suas defesas são sobrecarregadas. Assim é possível que se dane o DNA. Nas células se desencadeará múltiplos mecanismos [9-13] para reparar esses danos causados no DNA, estes mecanismos de reparo poderão ser sobrecarregados e ocasionar um aumento da frequência das mutações, resultando na replicação incorreta do DNA. Se os genes responsáveis pela divisão das células sofrerem danos à célula poderá continuar se desenvolvendo sem controle e isso acarretará um provável câncer.

O reparo de qualquer dano ocorrido no DNA é fundamental para os organismos vivos.

Comparando os danos causados por diferentes tipos de radiação o fundamental deve ser o tipo em que a radiação puder depositar mais energia num pequeno volume de células.

Depois do câncer o mais comum que os efeitos da radiação criem mutações. Está claro que as radiações podem causar danos ao DNA, mas as mutações requerem que esses danos sejam mais sutis. O dano pode matar a célula e somente um dano pequeno alterará um simples gene e o

organismo resultante terá transmitido os efeitos dessa radiação. Em outras palavras isso acarretará em mutações do DNA que poderão ser transmitidas a gerações futuras, tornando-se um fator permanente.

O dano da radiação no DNA se produz fundamentalmente por dois mecanismos. Em um, o dano é indireto, as moléculas de água são ionizadas e o ataque ao DNA ocorre pelas moléculas de hidrogênio, radicais OH e elétrons livres que foram criados e se difundem no meio causando oxidação e redução das substâncias biológicas iniciando mudanças químicas.

Em outros mecanismos o dano é direto nos quais a perda dos elétrons primários e a captura de outros elétrons ocorrem na molécula de DNA.

Em nosso estudo trataremos o mecanismo direto e determinaremos a magnitude do dano causado pela radiação quanto a simples (SSB) e duplas (DSB) quebras[12-17].

Existe uma relação entre a dose e a produção de cada um desses tipos de rupturas, só que a natureza exata disso é controversa. Diferentes estudos tem mostrado a existência de dependências linear, quadrática, linear quadrática, poissonica e logística [1-5, 18] para diferentes doses de radiação incluindo baixos e altos valores de transferência linear de energia (LET). Existem outros modelos baseados na técnica de Monte Carlo que simulam os danos produzidos no DNA através da radiação induzida.

Estudos realizados mostram que quase todas as quebras simples do DNA podem ser reparadas enzimaticamente in vivo, por isso esses tipos de dano têm pouco significado com relação a viabilidade celular. No entanto as duplas quebras, apesar de haver a possibilidade de reparo, são rupturas extremamente críticas em relação ao dano permanente que se

pode originar em uma célula, por isso o seu estudo tem um significado especial em radiobiologia. Por esse motivo, os estudos sobre os efeitos da radiação no DNA e em materiais biológicos tem se intensificado nos últimos anos [1-20].

As células que sofrem rápida divisão são as mais sensíveis ao dano da radiação.

A gravidade e a permanência do dano biológico causado pela radiação ionizante estão diretamente relacionados com fatores importantes: LET e dose, que são características macroscópicas da energia depositada pela radiação ionizante [21].

As radiações de mais alto LET (nêutrons, prótons, partículas alfa e íons pesados) produzem um dano biológico que pode superar a capacidade normal da célula de repará-lo e é muito maior que nas de mais baixo LET (raios-X, gama e elétrons) para a mesma dose [22-26].

Quando se trata de partículas carregadas com fótons e nêutrons, além do LET e da dose o dano radiobiológico depende em grande parte da energia do feixe primário como um fator determinante da distribuição dessa no meio biológico, especialmente quando se trata de volumes pequenos.

Diante de tudo que já foi dito anteriormente, atualmente o dano da radiação no DNA e seu mecanismo de reparação estão sendo estudados. Grandes simulações estão sendo realizadas. Esses modelos teóricos devem ser comprovados e verificados.

Modelo de dois passos para a interação da radiação ionizante com o
DNA em água

A partícula com LET igual a ϵ cria n_p pares de íons, com

$$dn_p = k\epsilon dl \quad (1)$$

Os íons se movem em uma direção radial, e, a distância r da trajetória da partícula incidente, o número de danos (2) na molécula para a distância entre r e $r+dr$, n_d , é

$$dn_d = dn_p \left(\frac{dn_m}{dS} \right) \sigma_d \quad (2)$$

onde dn_m é o número de moléculas num volume $dV=dSdr$ atravessado pelos íons,

$$dn_m = \rho_m dSdr \quad (3)$$

com $dS = 2\pi r dl$,

ρ_m : é o número de moléculas por unidade de volume, e

σ_d : é a seção microscópica par o dano d por íon incidente

Como a energia do par iônico é independente das características da partícula incidente, σ_d não é dependente da energia depositada, ϵdl .

Substituindo (1) e (3) em (2), obtemos

$$dn_d = k\epsilon l \rho_m \sigma_d dr \quad (4)$$

Considerando r_i como livre caminho médio dos íons i , e integrando (4), obtemos (5),

$$\int_0^{n_d} dn_d = k\epsilon l \rho_m \sigma_d \int_0^{r_i} dr \quad (5)$$

$$n_p = k\epsilon l \rho_m \sigma_d r_i \quad (6)$$

Estas expressões dão o número de danos na molécula do alvo induzido por uma partícula incidente de LET entre ϵ e $\epsilon+d\epsilon$.

Isso é conveniente para definir a seção microscópica para o dano induzido pela partícula incidente, σ . Se dn_i partículas atravessam a região, o número de danos induzidos nas moléculas é dado por (7)

$$dn_d = dn_i \left(\frac{dn'_m}{dS'} \right) \sigma \quad (7)$$

onde dS' , é a superfície irradiada, e

$$dn'_m = \rho_m dS' dr \quad (8)$$

é o número de moléculas do alvo dentro da região irradiada.

Então, substituindo (8) em (7) e integrando obtemos:

$$\int_0^{n_d} dn'_d = \rho_m \sigma \int_0^{n_i} dn'_i \int_0^l dl' \quad (10)$$

$$n_d = \rho_m \sigma n_i l \quad (11)$$

Substituindo (6) em (11), considerando n_i igual 1, a partir de (1) temos

$$\sigma = k \sigma_d r_i \varepsilon \quad (12)$$

Essa expressão mostra que a seção de choque é proporcional a partícula incidente, LET, independentemente do seu tipo e da sua energia inicial. Além disso, a constante $\sigma = k \sigma_d r_i$ depende somente das características do meio e da molécula alvo estudada. A constante k está relacionada com a energia mínima necessária para a produção do par iônico e r_i depende da distância que esse íon produzido alcançará na trajetória de ionização, ambos k e r_i dependem das propriedades do meio.

A seção microscópica σ_d depende das propriedades da molécula alvo.

Este trabalho é relevante porque por meio de um modelo matemático podemos obter maior precisão dos valores das doses

prescritas nos tratamentos de radioterapia, ajudando assim a preservar a saúde do ser humano [27-31].

Objetivo

O objetivo geral deste projeto é estudar os efeitos dos diferentes tipos de radiação nas moléculas de DNA.

O objetivo específico é verificar experimentalmente o modelo teórico descrito anteriormente.

Metodologia e Material necessário

Para o desenvolvimento deste projeto se pretende utilizar:

- ◇ como alvo de estudo, plasmídeos de DNA pBluescript® II SK(+) phagemid, com 2,96 Kb derivado de pUC 19. Estes plasmídeos estarão na forma circular superenovelada;
- ◇ gel de agarose;
- ◇ syber gold como intensificador para a eletroforese;
- ◇ alumínio para a construção dos alvos;
- ◇ laminas de makrofol.

Processos e técnicas de irradiação

Irradiações Gama

As irradiações com gamas serão realizadas em diferentes energias gama e variando as doses para cada energia. As energias disponíveis são:

- a) 1 MeV - para isso se utilizará um irradiador gama de uma fonte de ^{60}Co - Gamma Cell - modelo 220, instalado no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN).

- b) 4,171 MeV - utilizando-se um alvo de bismuto onde a radiação gama se obtém através da captura de nêutrons térmicos.
- c) 7,367 - utilizando um alvo de chumbo onde ela é obtida também através da captura de nêutrons térmicos.

O arranjo experimental dos últimos dois tipos será montado no canal tangencial BH-4-12 do reator IEA-R1.

Irradiações com nêutrons

Os plasmídeos serão irradiados com nêutrons de 2.8 e 14.5 MeV num amplo espectro de doses. Neutrons dessas energias podem ser obtidos via as reações $2\text{H}(d,n) 3\text{He}$ e $3\text{H}(d,n) 4\text{He}$, no gerador de neutrons de alto fluxo do IPEN (fig.1).

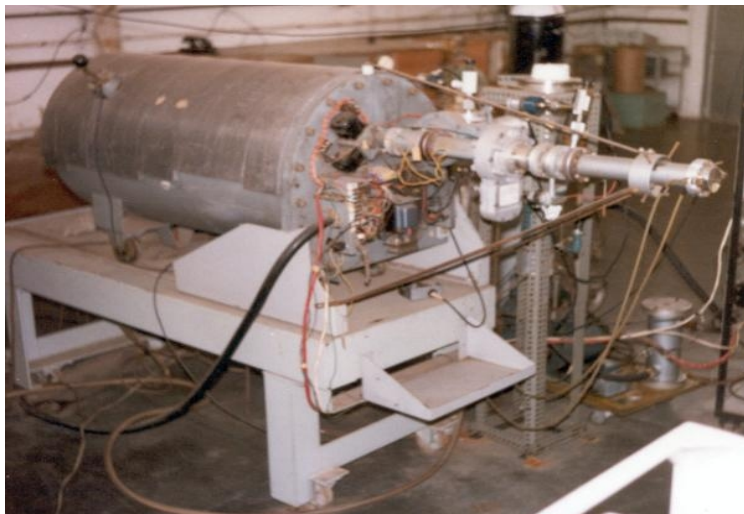


fig. 1 - irradiador de nêutrons

Irradiações com prótons

Serão irradiados a energia de 10,5 MeV com diferentes doses num canal do Acelerador de prótons Pelletron da Universidade de São Paulo. Esta é uma máquina eletrostática tipo Tandem construída por NEC (national Eletrostatic Corporation) e instalada no Instituto de Física em 1972.

Irradiações com partículas alfa

As irradiações com alfa serão feitas com fonte depositada de Amerício 241 fabricadas no IPEN. O arranjo experimental desse tipo de irradiação consiste de uma cápsula da Holanda onde se alíquota o DNA com a fonte depositada no alumínio apoiada sobre a amostra.

Processos e técnicas de determinação dos efeitos

Eletroforese em gel de agarose

Essa metodologia possibilitará a visualização da fragmentação do plasmídeo e a estimativa da quantidade de quebras simples e duplas originadas pelas diferentes condições de irradiação. A eletroforese em gel de agarose separa os plasmídeos em três grupos: forma superenovelada, forma circular relaxada e forma linear de acordo com as possíveis quebras que venha a ocorrer (fig. 2) . A quantidade de SSb e DSB pode ser determinada aplicando o modelo teórico a partir do número de fragmentos medidos em cada uma das diferentes conformações.

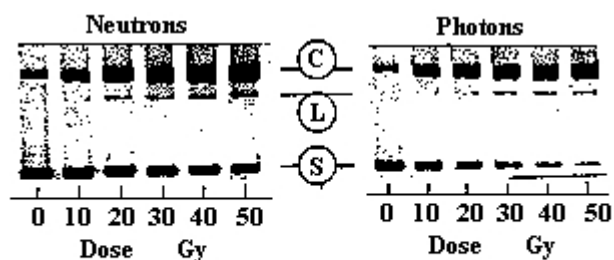


fig. 2. Gel de eletroforese com bandas (C) circular, (L) linear e (S) superenovelada

Com este fim, os géis serão preparados utilizando reativos com alto grau de pureza. Os mesmos contém agarose (cerca de 1%), tampão Tris-EDTA. A mobilidade das amostras durante a corrida eletroforética poderá ser acompanhada por meio de um corante azul (bromofenol). Cerca de 4 μg de cada amostra será aplicada no gel, incluindo uma amostra controle que permitirá estimar o tamanho dos fragmentos. As frações das três formas do plasmídeo serão determinadas por emissão de fluorescência devido a coloração com syber gold 0,1% por radiação ultravioleta.

Referências

1. M.A.Siddiqi and E. Boethe, Radiat. Res. Single and Double strand break formation in DNA irradiated in aqueous solution: dependence on dose and OH radical scavenger concentration. Radiat. Res. 112: 449-463(1987).
2. K.H.Chadwick and H.P. Leenhouts. The molecular theory of Radiation Biology. Springer-Verlag, Berlin, 1981.

3. Vicent E. Coe et. al., A Quantitative Model of DNA Fragments Generated by Ionizing Radiation, and Possible Experimental Applications, *Radiation Research* 125, 102-106(1991).
4. Parke W.C. et. Al., Kinetic model of random DNA cleavage by radiation, *Phys. Ver. E* 1997, 56: 5819-5822.
5. Werner Friedland et. al., Simulation of DNA fragment distributions after irradiation with photons, *Radiat. Environ. Biophys.* 38, 39-47, 1999.
6. Vassilyev D.G, Morikawa K.. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7: 103-109. (1997)
7. Pang D. et.al., Investigation of Neutron Induced Damage in DNA by Atomic Force Microscopy: Experimental Evidence of Clustered DNA Lesions, *Radiation Research* 1998, 150: 612-618.
8. Arruda-Neto, J.D.T.; Tavares, M.V.; Filadelfo, M. *Radioanalytical. Nuclear Chemistry* 221:97-104; 1997.
9. Pang D. et al., Atomic Force Microscope Imaging of DNA Repair Proteins: Applications in Radiobiological Research, *Radiat. Oncol. Invest.* 1997, 5:163-169.
10. Pang D. et al., Atomic Force Microscopy Investigation of radiation induced DNA Double Strand Breaks, *Scanning Microscopy* Vol. 10, No.4, 1996(pags. 1105-1110).
11. Kanaar, R., et.al., Molecular mechanisms of DNA double-strand break repair, *Trend Cell. Biol.* 8, 483-489, 1998.
12. Tainer J.A, Thayer M.M, Cunningham R.P.. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 20-26. (1995)
13. Fritz Eckstein, David M.J. Lilley (eds.). *DNA Repair.* (1998).
14. E. J. Hall. *Radiobiology for Biologist*, J. B. Lippincot Co., Philadelphia 1994.

15. J. F. Ward, *Int. J. Radiat. Biol.* 66 (1994) 427.
16. Lindahl, T. (1993). *Nature* 362: 709-715.
17. G. Taucher-Scholz, et al., Detection of heavy-ion-induced DNA double-strands breaks using static-field gel electrophoresis, *Radiat. Environ. Biophys*(1995)34:101-106.
18. E. Gudowska-Nowak, et. Al., Compound Poisson Process and clustered damage of radiation induced DNA double strands breaks. *Acta Physica Polonica B*, 31(5), 2000.
19. M. Krämer, G. Kraft, Calculations of heavy-ion track structure, *Radiat. Environ. Biophys*(1994) 33:91-109.
20. V.V. Moisenko et. al., Calculation of radiation-induced DNA damage from photons and tritium beta particles, *Radiat. Environ. Biophys*(2001) 40:23-31.
21. M. Spothem-Maurizot, M. Charlier, R. Sabbatier. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1990, vol. 57, No. 2, 301-313.
22. M. Lobrich, P.K. Cooper, B. Rydberg, *Int. J. Radiat. Biol.* 70, 493 (1997).
23. Marion, Jerry B. and Fowler, J. L. “Fast Neutron Physics”. New York, Interscience Publisher, 1960-63.
24. H.C. Newman, K.M. Prise, M. Folkard, B.D. Michael, *Int. J. Radiat. Biol.* 71, 374 (1997).
25. G. Kraft, *Nucl. Sci. Appl.* 1, 1 (1987).
26. F. Kraxenberger et al. *Radiat. Environ. Biophys.* 37, 107 (1998).
27. Chatterjee A. *Nuclear Instrument and Methods in Physics Research.* 1989, A280: 439-448.
28. Denis L. Henshaw. *Health effects of low dose radiation*, BNES, London 1997.

29. Cook V. E. and Mortiner R. K. Radiation Research 1991, 125: 102-106
30. González, Abel J. Boletín del OIEA, 4/ 1994.
31. Y. Takizawa, S. Hisamatsu, T. Abe, J. Yamashita. Journal of Radioanalytical Nuclear Chemistry, 243 (2): 305-312. (2000)
32. M. Stotheim-Maurizot, et.al., Int.J. Radiat. Biol., 1990, vol.57, No.2, 301-313.